

Aus der Klinik für
Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie
Universitätskliniken, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. R. Larsen

AUSWIRKUNGEN DER KUPFFERZELLBLOCKADE MIT
GADOLINIUM(III)CHLORID UND DICHLORMETHYLENDIPHOSPHONAT AUF DIE
MIKROZIRKULATION IN DER LEBER NACH SEPTISCHEM SCHOCK

- INTRAVITALMIKROSKOPISCHE STUDIE AM TIERMODELL -

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2007

vorgelegt von

Stephan Niederländer

geboren am 14.11.1974 in Saarbrücken

1 Zusammenfassung	4
2 Summary	5
3 Einleitung.....	6
3.1 Klinische Relevanz der Sepsis und des septischen Schocks	6
3.2 Endotoxine und ihre Bedeutung im Schockgeschehen.....	8
3.2.1 Aufbau und Lokalisation des Endotoxin.....	8
3.2.2 Wirkung des Endotoxin	9
3.3 Bedeutung der Leber im Schockgeschehen	10
3.3.1 Leberaufbau und -funktion.....	10
3.3.2 Spezifische Reaktionen der Leber nach Endotoxämie.....	12
3.3.2.1 Hepatische Proteinbio- und Akute-Phasen-Protein-Synthese.....	12
3.3.2.2 Die Rolle der ortständigen Makrophagen im septischen Schock nach Endotoxinstimulation	13
3.3.2.3 Mikrozirkulationsstörungen in der Leber.....	13
3.4 Mediatoren des Schockgeschehens	15
3.4.1 Zytokine	15
3.4.2 Arachidonsäurederivate (Eicosanoide)	17
3.4.3 Plasmatische Proteinase, Gerinnungs- und Komplementsystem.....	19
3.5 Leukozyten-Endothel-Interaktion	21
3.5.1 Adhäsionsrezeptoren.....	21
3.5.2 Kaskade der Leukozyten-Endothel-Interaktion.....	23
3.5.3 Besonderheit in der Leber	25
3.6 Bisherige Studien und Ideen	26
3.7 Verwandte Substanzen zur Modulation der Kupferzellaktivität.....	27
4 Material und Methoden	29
4.1 Versuchstiere.....	29
4.2 Versuch.....	29
4.2.1 Versuchsgruppen, verwendete Substanzen und Versuchsvorbereitung.....	29
4.2.2 Narkose und Präparation.....	30
4.2.2.1 Narkose	30
4.2.2.2 Präparation (2. Eingriff)	30
4.3 Versuchsprotokoll	32
4.3.1 Versuchsablauf.....	32
4.3.2 Monitoring	33
4.3.3 Klinisch-chemische Parameter	33
4.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	35
4.4.1 Vorbereitung zur Mikroskopie	35
4.4.2 Intravitalmikroskopie.....	35
4.5 Auswertung.....	38
4.5.1 Auswertungseinheit	38
4.5.2 Leukozyten - Endothel - Interaktion.....	38
4.5.3 Leukozytenfluss.....	41
4.5.4 Messung der Sinusoidweite.....	42
4.5.5 Perfundierte Sinusoide	43
4.6 Statistik	44

5 Ergebnisse	45
5.1 Hämodynamik und Laborparameter.....	45
5.1.1 Mittlerer arterieller Druck.....	45
5.1.2 Herzfrequenz.....	46
5.1.3 Der Säure-Base-Haushalt und Sauerstoffpartialdruck.....	47
5.1.4 Blutbild.....	49
5.2 Intravitalmikroskopische Parameter.....	50
5.2.1 Leukozyten-Endothel-Interaktion.....	50
5.2.1.1 Leberläppchen.....	51
5.2.1.2 Zentralvene.....	57
5.2.2 Sinusoidweite.....	62
5.2.3 Funktionelle Sinusoiddichte.....	63
5.2.4 Leukozytenfluss.....	64
5.2.5 Sinusoidale Leukozytengeschwindigkeit.....	65
5.3 Organschaden an der Leber.....	66
6 Diskussion	69
6.1 Modell zur Untersuchung des septischen Schockes.....	69
6.2 Pathophysiologisch messbare Veränderungen bei septischem Schock.....	70
6.3 Veränderungen nach Blockade der Kupfferzellen.....	75
6.3.1 Gadoliniumchlorid.....	75
6.3.2 MDP.....	78
6.4 Vergleich Gadoliniumchlorid und MDP.....	80
6.5 Therapeutische Relevanz und Schlussfolgerung.....	82
7 Literaturverzeichnis	83
8 Danksagung	94
9 Lebenslauf	95

1 Zusammenfassung

Die Leber besitzt eine Schlüsselposition in der Antwort des Organismus auf Stressereignisse wie Sepsis. Vor allem den sessilen, immunkompetenten Makrophagen der Leber, den Kupfferzellen, kommt als Trigger und Motor des generalisierten Entzündungssyndroms (SIRS) durch Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (z.B. TNF- α , IL-1) nach Stimulation u.a. durch Endotoxin eine zentrale Rolle zu. Die Folge kann eine hepatische Dysfunktion und mikrovaskuläre Perfusionsstörung mit konsekutivem Leberversagen sein, was als ein Teil eines sich entwickelnden Multiorganversagens (MODS) angesehen werden muss.

In dieser Studie wurde der Frage nachgegangen, inwiefern die Einschränkung der hepatischen Mikrozirkulation nach Stressereignis durch eine vorherige Kupfferzellblockade beeinflusst werden kann. In Doppelblindversuchen wurden die Kupfferzellen von männlichen Sprague-Dawley Ratten entweder mit Gadoliniumchlorid ($GdCl_3$) oder Dichloromethylendi-phosphonat (MDP) blockiert. Der Kontrollgruppe wurde 0.9 %-ige Natriumchloridlösung (NaCl) intravenös injiziert. Als Referenzgruppe fungierte eine Nicht Schock-Gruppe (keine Vormedikation, keine Schockinduktion). Nach Auslösen eines septischen Insultes (1mg/kg LPS intravenös) wurde die Lebermikrozirkulation mit Hilfe des Modells der Intravitalmikroskopie zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 1, 6 und 12 Stunden) untersucht.

Die Ergebnis der Studie zeigen einen Einfluss der Kupfferzellaktivität auf die Perfusion in den Lebersinusoiden sowohl für Normalbedingungen als auch nach Stressereignissen wie dem septischen Schock. Die Messdaten lassen dabei auf unterschiedliche Wirkmechanismen und Effekte der Kupfferzellblockade mit Gadoliniumchlorid oder MDP schließen. Während in der NaCl-Gruppe eine signifikante Abnahme der Sinusoidweiten und eine Zunahme der Leukozyten-Endothel-Interaktionen gesehen werden konnte, führte die Vorbehandlung mit Gadoliniumchlorid zu einer Verringerung dieser stressinduzierten Veränderungen. In der MDP-Gruppe zeigte sich keine relevante Veränderung der Sinusoidweite, und die Leukozyten gingen von allen Schockgruppen die wenigsten dauerhaft adhärenenten Bindungen mit dem Endothel ein. Die Leberenzymwerte korrelierten nicht mit diesen Veränderungen.

Die inflammatorische Reaktion wurde in der MDP-Gruppe am Ausgeprägtesten verzögert. Trotz Modulation der Kupfferzellaktivität wurde die Entzündungsreaktion nicht gestoppt, so dass zusätzliche, parallele Mechanismen als Verstärker der Entzündungsantwort existieren müssen.

2 Summary

BLOCKADE OF KUPFFER CELLS BY GADOLINIUMCHLORID OR DICHLOROMETHYLENE DIPHOSPHONATE INFLUENCES HEPATIC MICROCIRCULATION AFTER SEPSIS

The liver plays a key role in the host defense response after sepsis. Kupffer cells (KC), located in the sinusoidal lumen of the liver, have been shown to be a trigger and motor of the subsequent inflammatory response syndrome. The phagocytosis as the main function of the KCs leads to the elimination of LPS in the blood stream. The activation of specific mediators, e.g. TNF- α , IL-1, may cause a hepatocellular dysfunction, microcirculatory alterations and in the end a liver injury involving which must be regarded as a starting point of the MODS.

In a double-blinded study we investigated the effect of KC-blockade with either Gadoliniumchlorid ($GdCl_3$) or liposome-entrapped dichloromethylene diphosphonate (MDP) on hepatic microcirculation after sepsis (induced by intravenous LPS) in male Sprague-Dawley rats. There were a control group with 0.9 % saline solution and a reference group, called No Shock group, without manipulation or shock induction. Microvascular flow was observed by intravital microscopy of fluorescence-marked (Acridin Orange) leukocytes in liver sinusoids at baseline, 1 h, 6 h and 12 h after shock induction.

The results implicate a significant influence of KC on the regulation of microvascular change in liver sinusoids under normal conditions as well as after sepsis. The data indicate differential pathways and effects of blocking KCs by $GdCl_3$ or MDP. In animals treated with normal saline there were found a significant reduction of sinusoidal width and an increase in the leucocyte-endothel-interaction, especially of permanent adherent leucocytes. Pretreatment with $GdCl_3$ reduced the shock-induced alterations after septic insult. The animals in the MDP group showed no significant alterations in the sinusoidal widths or the leukocyte flow. There were more rollers/ temporary adherent bindings than permanent adherent leukocytes.

The result suggested a better outcome of the MDP pretreated animals, following by the $GdCl_3$ group in comparison to the NaCl group.

Although the KC having blocked, the inflammatory response progressed in a reduced way. This indicates that there must exist other, parallel mechanisms which are involved but which seem to be not as dominant.

3 Einleitung

3.1 Klinische Relevanz der Sepsis und des septischen Schocks

Die septische Komplikation, d.h. die Allgemeininfektion mit oder ohne Schockbild, tritt weiterhin in fast allen medizinischen Bereichen auf und spielt eine wichtige Rolle im Patientenoutcome (LINDE-ZWIRBLE und ANGUS, 2004).

Zur besseren Einteilung und Verständnis der verschiedenen Krankheitsbilder wurde durch das AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS/SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS CONFERENCES (1992) folgende Begriffe definiert:

Als „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS) wird ein systemisches Entzündungssyndrom bezeichnet, bei dem mindestens zwei der folgenden Kriterien gegeben sein müssen: 1. Körpertemperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$, 2. Herzfrequenz $>90/\text{min}$, 3. Atemfrequenz $>20/\text{min}$ oder $\text{p}_a\text{CO}_2 <32 \text{ mmHg}$ und 4. Leukozytenzahl $>12000/\mu\text{l}$ oder $<4000/\mu\text{l}$ oder $> 10\%$ unreife Formen. Ein möglicher Auslöser kann z.B. eine Pankreatitis sein.

Die Sepsis wird definiert als eine systemische Reaktion auf Grundlage eines infektiösen Prozesses, bei dem dieselben Kriterien wie bei der SIRS erfüllt sein müssen. Die Sepsis bezeichnet somit ein Krankheitsbild, das infolge von ständigem oder periodischem Eindringen von pathogenen Bakterien und deren Giften aus einem Krankheitsherd oder einem natürlichen Reservoir in den Blutkreislauf entsteht. Dabei ist die normale, der Erregerabwehr dienende, zyklische Allgemeinreaktion ausgeblieben, oder die Spontanheilung konnte aufgrund einer besonderen Reaktionslage des Organismus nicht mehr eintreten (ROCHE LEXIKON). Die klinischen Symptome der Sepsis sind mannigfaltig und reichen von intermittierendem Fieber mit Schüttelfrost, über toxische Schäden am Knochenmark und am Blutbild (z.B. Thrombozytopenie) bis hin zu Veränderungen am Herzen (z.B. linksventrikuläre Dysfunktion mit Ödembildung) und an den Gefäßnerven (z.B. Tachykardie, Hypotonie) (COHEN, 2002). Die Folge ist eine Zentralisation des Kreislaufsystems und die Ausbildung eines Schocks (CAILLE et al, 2004).

Schock beschreibt ein akutes Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf (Gewebehypoxie) mit einer qualitativen und quantitativen Verminderung der nutritiven Durchblutung lebenswichtiger Organe. Dabei können mehrere Schockarten wie kardiogener, spinaler, anaphylaktischer und hypovolämischer Schock unterschieden werden.

Als septischer Schock wird eine sepsisbedingte Hypotension und eine abnorme Organperfusion bezeichnet, welche trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr aufgetreten ist.

Während simple Infektionen heutzutage mit Erfolg behandelt werden können, beträgt die Letalität bei einer Sepsis in Verbindung mit einem septischen Schockzustand trotz modernster Intensivtherapie weit mehr als 50 % (ANGUS et al, 2001; FLAATTEN, 2004). Die Ursachen liegen zum einen in den therapeutischen Ansätzen, welche vorwiegend aus einer Entfernung der Sepsisquelle, einer Antibiotika- oder einer symptomatischen Therapie, z.B. dem Auffüllen eines relativen Volumendefizits oder dem Einsatz von Katecholaminen, bestehen (ASFARM et al, 2004). Zum anderen kommt der Entstehung eines „Multiorgandysfunktionssyndroms“ (MODS) eine entscheidende Rolle an der hohen Mortalität der Patienten mit Sepsis zu (FLAATTEN, 2004). Die exakten pathophysiologischen Mechanismen für den Übergang einer Erkrankung in ein MODS sind bis dato nicht vollständig geklärt. Akzeptiert ist das sogenannte „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS), welches für einen Teil der Patienten die Grundlage für die Entwicklung eines MODS darstellt. Dabei kommt es sowohl im Ablauf des SIRS als auch im Ablauf der lokalen Entzündungsreaktion zu weitgehend gleichartigen pathophysiologischen Mechanismen. Auf lokaler Ebene zeigt sich diese Art der Abwehrreaktion durchaus sinnvoll, weil sie unter anderem der Schadensreparatur und der Abwehr fremder Organismen dient. In den meisten Fällen führt die Immunreaktion, ohne dabei klinisch erkennbare Anzeichen einer Infektion hervorzurufen, zu einer kompletten Eliminierung der Mikroorganismen. Unter ernsteren Umständen kann die inflammatorische Antwort jedoch durch eine Generalisation der lokalen Entzündungsmediatoren beispielsweise durch einen „spill-over“ Effekt, d.h. nach einem Versagen oder einer Überbeanspruchung der lokalen Mechanismen, die normalerweise der Neutralisation der lokalen Entzündungsmediatoren dienen, zu einer überschüssenden systemischen Abwehrreaktion des gesamten Organismus führen (VAN AMERSFOORT et al, 2003). Die körpereigenen Kontrollmechanismen können in dieser Situation auf den vermehrten Ansturm an Entzündungsmediatoren nicht mehr ausreichend reagieren. Es kommt zur Dysfunktion mehrerer Organe, die zu einem Schock, MODS oder Tod führen können (TSLOTOU et al, 2005). Beim septischen Geschehen sind davon besonders vier Organe (Lunge, Leber, Niere und Herz) betroffen. Dabei treten die ersten Veränderungen am kardiopulmonalen System auf, bevor die Leber und die Nieren in ihren Funktionen eingeschränkt werden (BONE, 1993).

Da alle Schockformen in diese meist tödlich verlaufende Endstrecke des Schockgeschehens übergehen können, werden weiterhin gezielte Behandlungsmöglichkeiten gesucht. Die bisherigen Therapieansätze beschränken sich hauptsächlich auf Präventiv- und symptomatische Maßnahmen der einzelnen Schockarten. In der „modernen“ Medizin konnten aber in den letzten Jahren neue Medikamente zum Beispiel rekombiniertes humanes Aktiviertes

Protein C (= rhAPC (Xigris®)) als therapeutische Option eingeführt werden. Dieser Wirkstoff bedingt unter anderem durch Hemmung der Produktion des Tumor-Nekrose-Faktors in Monozyten, Blockierung der Leukozytenadhäsion an Selektine und Begrenzung der Thrombin-induzierten Entzündungsreaktion innerhalb des Endothels der Mikrogefäße eine antiinflammatorische Wirkung. In mehreren Studien (PROWESS-, ADDRESS-Studie) konnte ein besseres Outcome für Patienten mit schwerer Sepsis unter rhAPC im Vergleich zu einer Placebo-Therapie gesehen werden. Außer den medikamentösen Behandlungsstrategien stehen außerdem für die verschiedenen Organdysfunktionen im Rahmen eines Schockgeschehens gezielte Ersatz- und Unterstützungsverfahren zur Verfügung, welche erfolgreich in der Therapie eines MODS angewandt werden konnten, zum Beispiel die kontinuierliche Dialyse bei einer Schockniere, die Beatmung bei einer Schocklunge (ARDS) (BAUE, 1994).

Die Therapie des MODS bleibt aber wegen der hohen Letalität von 30 bis 80 % weiterhin unbefriedigend (ROSE und MARZI, 1996). Der Entwicklung von geeigneten therapeutischen Ansätzen wird seither vermehrte Aufmerksamkeit gewidmet. Diverse Untersuchungen beschäftigen sich daher mit der Aufdeckung und dem Verständnis der exakten pathophysiologischen Mechanismen eines MODS. Wie sich bis dato gezeigt hat, kommt der Leber in der Regulation der Immunantwort nach einem Schock und an der Entstehung eines MODS eine zentrale Rolle zu (RING und STREMMEL, 2000). Aus diesem Grund ist die Leber in dieser Studie Gegenstand bzw. Organ der Untersuchung.

3.2 Endotoxine und ihre Bedeutung im Schockgeschehen

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts bemerkte PFEIFFER (1892) eine hitzestabile toxische Komponente in gram-negativen Bakterien, welche durch RIETSCHEL et al (1987) als ein Bestandteil der äußeren Zellwand entschlüsselt werden konnte.

3.2.1 Aufbau und Lokalisation des Endotoxin

Die Zellwand von gram-negativen Bakterien ist mehrschichtig. Das wichtigste Strukturelement bildet die äußere Membran, welche aus einem Lipidbilayer besteht, und durch ein Peptidoglykane von der inneren Membran separiert ist. Die Intermediärschicht ist mit der äußeren Membran kovalent verbunden und besteht aus Murein. Nach Innen wird die Zellwand von einer Zytoplasmamembran abgeschlossen (BRADE und RIETSCHEL, 1986).

Aufgrund seiner chemischen Struktur entspricht das bakterielle Endotoxin einem Lipopolysaccharid, welches in die äußere Membran eingebettet ist (RIETSCHEL et al, 1987), und kann immunchemisch wie folgt (3 Komponente) eingeteilt werden:

- Lipid A : Die Struktur ist bei gram-negativen Bakterien weitgehend identisch. Die Funktion besteht als „Membrananker“ des Lipopolysaccharids, d.h. der Lipid A-Bestandteil des LPS dient zur Verankerung des Moleküls mit der bakteriellen Zellwand und hält die Permeabilitätsbarriere der äußeren Membran aufrecht. Nach LOPPNOW et al (1993) stellt das Lipid A die eigentliche Endotoxin Eigenschaft dar.
- hydrophober Lipidanteil
- hydrophobes Polysaccharid (Zuckerkomponente): Der Zuckeranteil besteht aus dem sogenannten „Core“-Polysaccharid und der O-spezifischen Kette.

3.2.2 Wirkung des Endotoxin

Die pathogenetische Bedeutung von Endotoxin in der gram-negativen Sepsis ist etabliert. Erhöhte Serumkonzentrationen von zirkulierendem LPS konnten mit der Manifestierung eines SIRS assoziiert werden (COHEN, 2002).

Das Endotoxin geht im Körper mit verschiedenen Komponenten Bindungen ein. Einerseits kommt es dadurch zu einer direkten Neutralisation des Endotoxin und damit Inhibierung seiner Wirkung (TEAH et al, 1988). Andererseits wird das Immunsystem aktiviert. Dabei bindet zirkulierendes, bakterielles LPS unter anderem an das Serumprotein „LPS-bindendes Protein“ (LBP), welches von Hepatozyten gebildet wird (WRIGHT et al, 1990). Nach der damit verbundenen Detektion erfolgt über komplexe Zwischenschritte eine breitgefächerte Aktivierung der Immunantwort. Mononukleäre Zellen schütten daraufhin Zytokine aus. Durch eine zusätzliche Bildung von Chemokinen, Lipidmediatoren und Sauerstoffradikalen wird die zelluläre und humorale Immunabwehr koordiniert.

Diese Vielzahl an biologisch und physiologisch sehr komplexen Abläufen können nun unter bestimmten Umständen wie hohe LPS-Konzentration den Organismus schädigen bzw. eine systemische Entzündungsreaktion auslösen (siehe Abbildung 1).

Das Endotoxin verursacht auf diesem Weg einen dem septischen Schock vergleichbaren Krankheitszustand mit teils identischen klinischen Krankheitssymptomen und Reaktionen.

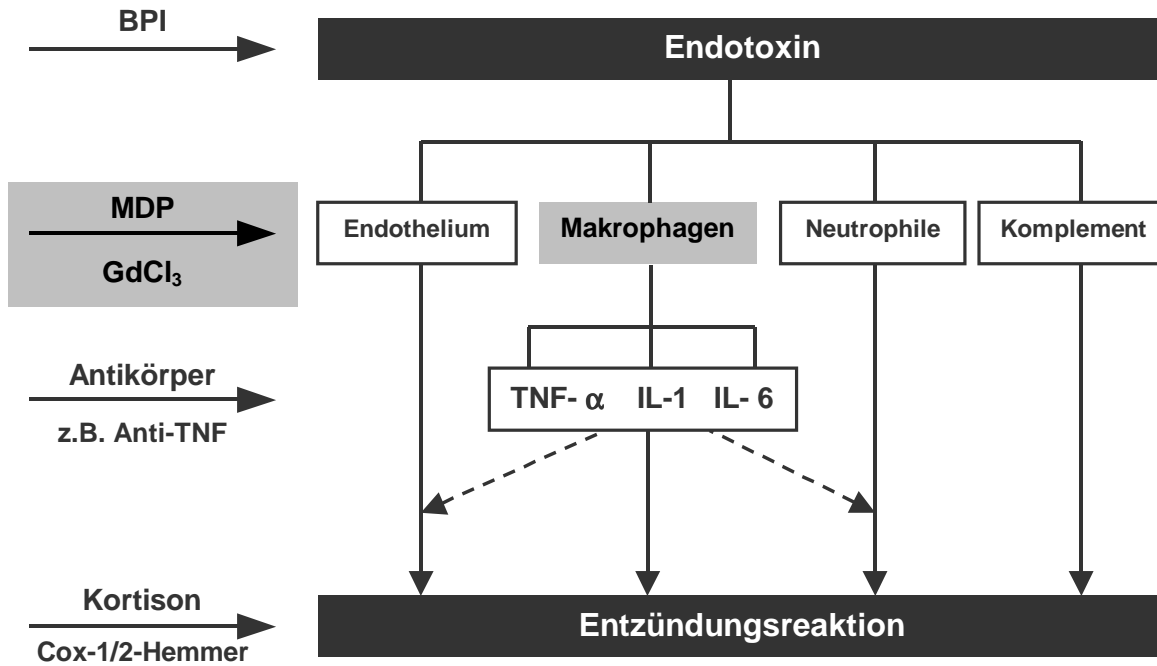


Abbildung 1: Pathomechanismus des septischen Schocks, modifiziert nach COHEN, 2002. Therapieansätze zur Vermeidung einer systemischen Entzündungsreaktion (BPI = Bactericidal/Permeability-Increasing Protein, Cox = Cyclooxygenase)

Aus diesem Grund wird das Lipopolysaccharid von vielen wissenschaftlichen Gruppen und auch von uns zur Erzeugung eines septischen Schocks in tierexperimentellen Versuchen bzw. Untersuchungen verwandt. Dabei sollte aber bedacht werden, dass nicht das Endotoxin allein für die Erzeugung eines septischen Schocks von Bedeutung ist. Weitere bakterielle Toxine sowie gewisse Entzündungsmediatoren des Körpers besitzen ähnliche Fähigkeiten (ZIVOT und HOFFMANN, 1995).

3.3 Bedeutung der Leber im Schockgeschehen

3.3.1 Leberaufbau und -funktion

Die Leber ist ein Organ mit vielen Aufgaben wie der Entgiftung, als Produktionsort (z.B. Galle), als Stoffwechselorgan oder der Abwehrfunktion (RACANELLI und REHERMANN, 2006). Um diesen Aufgaben gerecht zu werden, besitzt die Leber einen speziellen anatomischen Aufbau. Das Modell des Leberazinus nach RAPPORT (1958) beschreibt die topographischen Zusammenhänge aus funktioneller Sicht:

Die Blutversorgung der Leber erfolgt demnach über zwei unterschiedliche Systeme: Die Portalvene und zu einem geringen Anteil über die Arteria hepatica. Der sinusoidale Blutfluss verläuft auf Läppchenebene vom portalen Einstromgebiet zur Zentralvene, wodurch sich drei funktionell verschiedene Regionen differenzieren lassen: Das periportale, das midzonale und das perizentrale Feld.

Diese funktionelle Einteilung beruht zusätzlich auf morphologischen Unterschieden. Zum einen findet sich eine vielfältige Zellpopulation im Lebergewebe, welche sich zum anderen in der Leber zonenspezifisch anreichert bzw. verteilt. Beispielsweise konnte im Rahmen eines hämorrhagischen Schockgeschehens aufgrund einer hohen Anzahl an Zellen mit verminderter Xanthinoxidasekonzentration im midzonalen Bereich größere, durch Sauerstoffradikale vermittelte Zellschäden in dieser Leberregion festgestellt werden (MAROTTO et al, 1988).

Die Abbildung 2 zeigt die Leberzellverteilung:

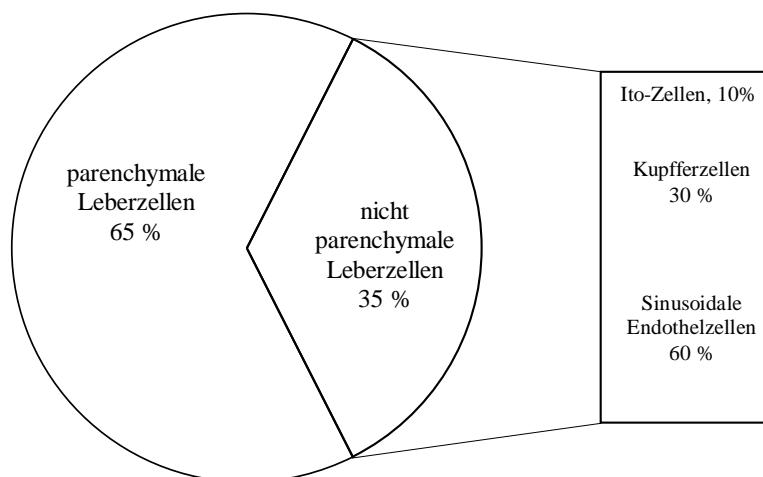


Abbildung 2: Leberzell-Verteilung

Die parenchymalen Leberzellen stellen mit einem Anteil von 94 % am Zellvolumen und 65 % an der Gesamtzahl den Hauptanteil der Leberzellpopulation dar (VAN BOSSUYT et al, 1988). Die Hepatozyten befinden sich entlang der Lebersinusoide in verschiedenen Konzentrationen entsprechend der zonenspezifischen Verteilung.

Die „nichtparenchymalen Leberzellen“ (NPLZ) umfassen nur 6 % des Lebervolumens, machen jedoch 35 % der Zellzahl aus. Den Hauptanteil stellen die sinusoidalen Endothelzellen, die sich von Endothelzellen in anderen Stromgebieten zum Beispiel hinsichtlich einer Reihe von Oberflächenrezeptoren unterscheiden (VAN BERKEL et al, 1991). Die zweit-

stärkste Population sind die Kupfferschen Sternzellen, die intrasinusoidal und im Disse`schen Raum liegen (MCCUSKEY, 1988). Zu einem geringeren Anteil finden sich Ito-Zellen, die vorwiegend im perisinusoidalen Raum vorkommen. Daneben existieren wenige intrahepatische Lymphozyten (KMIEC, 2001).

3.3.2 Spezifische Reaktionen der Leber nach Endotoxinämie

Aus folgenden Gründen stand die Leber in mehreren wissenschaftlichen Arbeiten als zentrales Organ bei der Untersuchung des Phänomens „Schock“ im Mittelpunkt des Interesses:

Der größte (prozentuale) Anteil des Herzminutenvolumens kann durch die Leber geschleust werden. Als Organ mit der wichtigen Aufgabe der Entgiftung bzw. als Filterstation des Körpers steht die Leber dadurch mit vielen Fremdstoffen in Berührung.

Ihre anatomische Lage im direkten Einflussgebiet der Vena portae lässt die Leber zum ersten Organ im Kontakt mit Bakterien und Endotoxinen aus dem Darmbereich lancieren. Aus diesem Grund besitzt die Leber ein wirkungsvolles Abwehrsystem, um eine frühzeitige Immunantwort in die Wege zu leiten, und um deren systemische Zirkulation zu verhindern (RACANELLI und REHERMANN, 2006). Die Immunabwehr erfolgt durch ortsständige Makrophagen, den Kupfferschen Sternzellen. Diese sogenannten Kupfferzellen nehmen dabei mit circa 80 % des gesamten retikuloendothelialen Systems die größte Population an Gewebemakrophagen im Gesamtorganismus ein.

3.3.2.1 Hepatische Proteinbio- und Akute-Phasen-Protein-Synthese

Durch das Schockgeschehen kommt es zu lokalen wie auch globalen metabolischen Veränderungen. In der Leber ist die Proteinbiosynthese betroffen: Neben einer Verminderung der Syntheseleistung werden vermehrt sogenannte Akute-Phase-Proteine bei entsprechender Reduktion der Albumin-Synthese produziert (O`LEARY et al, 2003). Zu den Bekanntesten zählt das C-reaktive Protein. Ihre Funktion liegt in einer Beseitigung von für den Organismus gefährlichen Substanzen über verschiedene Mechanismen wie Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg mit der Folge einer Verstärkung der zytolytischen Abwehrreaktion (VOLLMAR et al, 1993). Die Regulation dieser Änderung in der hepatischen Proteinbiosynthese erfolgt hauptsächlich durch eine LPS-bedingte Aktivierung der Kupfferzellen mit Freisetzung von Mediatoren wie Il-1 oder Il-6 (WEST et al, 1988; BANKEY und CERRA, 1993).

Zur Beurteilung der ischämiebedingten Einschränkung der Hepatozytenfunktion können die Proteinsyntheseleistung, die Fähigkeit zur Verstoffwechslung (z.B. Bilirubin) sowie der Anstieg der Leberenzymaktivität (aufgrund des Untergangs der Leberzellen durch Schädigung) herangezogen werden. Die Funktion und der Energiestoffwechsel der Hepatozyten korreliert mit dem Grad der Mikrozirkulationsstörung (VOLLMAR et al, 1993).

3.3.2.2 Die Rolle der ortständigen Makrophagen im septischen Schock nach Endotoxinstimulation

Die Immunreaktion erfolgt unter anderem durch Antigenpräsentierende Zellen (APZ). In der Leber besitzen die Kupfferzellen als Gewebemakrophagen diese bedeutende Rolle.

Unter physiologischen Bedingungen strömen bereits geringste Mengen von Mikroorganismen in die Leber ein (NOLAN, 1981), so dass die Kupfferzellen schon in Ruhe eine Stimulation aufweisen. Nach intravenöser Verabreichung von Endotoxin erfahren die Kupfferzellen eine deutliche Aktivitätssteigerung, was an einer Zunahme der Phagozytoserate abgelesen werden kann (MCCUSKEY et al (1982)). Die Kupfferzellen schütten daraufhin über eine vermehrte Produktion eine große Menge an Entzündungsmediatoren wie Tumor-Nekrose-Faktor (z.B. TNF- α) oder Interleukine (z.B. Il-1) aus (SALUK-JUSZCZAK und WACHOWICZ, 2005). Da die Kupferzellen circa 80 % des gesamten retikuloendothelialen Systems des Organismus ausmachen, nehmen die Gewebemakrophagen dadurch einen entscheidenden, modulierenden und regulierenden Einfluss auf den weiteren Abwehrprozess sowie auf die Leukozyten-Endothel-Interaktionen.

3.3.2.3 Mikrozirkulationsstörungen in der Leber

An der Regulation der sinusoidalen Durchblutung sind in- und direkt hepatische Faktoren bzw. Mechanismen beteiligt:

Auf hepatischer Ebene spielt die sinusoidale Heterogenität eine entscheidende Rolle. Zum einen kann über eine Kontraktion der Ito-Zellen, die durch ihre Filamentanordnung netzartig um die sinusoidalen Endothelzellen im Disse'schen Raum gespannt sind (WAKE et al, 1993), die Weite der Sinusoide reguliert werden. Zum anderen werden durch eine Schwellung der perivaskulären Kupffer- und Endothelzellen die Sinusoidweiten verändert (MCCUSKEY, 2000). Indirekt hepatisch erfolgt die Regulation der sinusoidalen Perfusion vorwiegend über spezifische, parakrin wirkende, vasoaktive Mediatoren. MCCUSKEY und REILLY (1993)

konnten in ihren Untersuchungen eine Beeinflussung der Sinusoidweite durch adrenerge (α_2 -, β_2 - Rezeptoren), cholinerge (Acetylcholin), aminerge (Histamin, Serotonin) und peptiderge (Vasoaktives intestinales Peptid, Neuropeptid Y) Stimuli nachweisen. Stickstoffmonoxid (NO), Prostatcyclin (PG-I₂) sowie Adenosin (LEFER und LEFER, 1993) führen dabei zu einer Vasodilatation der sinusoidalen Gefäße, während die Verkleinerung der Sinusoidweite durch die Arachidonsäuremetaboliten (z.B. Tx-A₂), Sauerstoffradikalen und vor allem durch das Endothelin-1, welches in den sinusoidalen Endothelzellen lokalisiert ist (SAKAMOTO et al, 1993), vermittelt wird. Die Wirkung des Endothelin-1 funktioniert über eine Produktion von Superoxidmetaboliten in LPS-aktivierten Granulozyten mit der Folge einer schnellen Inaktivierung des vom Endothel gebildeten NO (WANG und ANDERSSON, 1995).

Schon in früheren Studien konnte nach intravenöser Verabreichung von Endotoxin eine signifikante Mikrozirkulationsstörung in der Leber beobachtet werden (Bauer et al, 1994). WAKE et al (1993) sahen den Anfang in einer Veränderung der Kapillardurchblutung, welche über eine durch Endotoxin ausgelöste, unkontrollierte Aktivierung der sinusoidalen Heterogenität zustande kommt. Durch die Schwellung der Endothel- und Kupfferzellen sowie einer Kontraktion der Itozellen verengen sich die Sinusoide mit konsekutiver Verringerung der hepatischen Perfusion. Zusätzlich wird nach JIMENEZ et al (2005) das fein abgestimmte System der Leberperfusion, welches das Ziel der bedarfsgerechten, lokalen Steuerung der Leberzellversorgung verfolgt, durch eine Zunahme an vasoaktiven Substanzen, z.B. einem Anstieg des Prostaglandin(PG)-E₂-Spiegels, mit Verschiebung der physiologischen Balance zwischen vasodilatatorischen und – konstringierenden Faktoren gestört. In der Folge kommt es zu einer anfänglich partiellen Minderperfusion oder völligen Ausschaltung einer Leberregion. Über gegenregulative Maßnahmen wie vermehrter Bildung von vasodilatativen Faktoren z.B. Stickstoffmonoxid (NO) sowie einer Steigerung des Herzminutenvolumens bildet sich im weiteren Verlauf eine hyperdynamie Phase mit Hyperperfusion bestimmter Lebergebiere aus. Eine nutritive Bedeutung scheint dies nicht zu haben, vielmehr ist ein Shunten des Blutflusses das Ziel (ROSE und MARZI, 1996).

Durch eine Zunahme der Leukozyten-Endothel-Interaktionen entsteht über die Transmigration ins Gewebe zusätzlich eine mikrovaskuläre Schädigung. Die Leukozyten sammeln sich dabei aufgrund einer Abnahme der Deformierbarkeit im Verlauf des Schocks auch im Gefäßlumen an (NISHINO et al, 2005). Des weiteren thrombosiert ein Teil der Kapillaren durch ein gestörtes Blutgerinnungssystem (CRONER et al, 2006). Das Herzzeitvolumen fällt mit zunehmender Schockdauer ab, so dass sich trotz massiv überschüssender Produktion von

gegenregulativen Faktoren eine hypodynamische Phase und in der Folge ein Zusammenbruch der Leberzirkulation einstellt (RING und STREMMEL, 2000).

Bildlich gesehen lässt sich aus dem Gesagten zusammenfassen, dass die Leber sowohl als „Modulator“ (SIEGEL, 1992) als auch „Verstärker“ (MARZI, 1994) der Entzündung agiert.

3.4 Mediatoren des Schockgeschehens

3.4.1 Zytokine

Unter „Zytokine“ werden potente Glykoproteine verstanden, welche nach lokaler Sezenerung auf parakrine, endokrine oder autokrine Weise (KMIEC, 2001) die Reaktion des Körpers auf ein immunologisches oder inflammatorisches Geschehen modifizieren (BALKWILL und BURKE, 1989; DINARELLO, 1997). Zu den Zytokinen zählen Interleukine, TNF, Interferone, Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF) und Chemokine.

Während die proinflammatorischen Zytokine eine Entzündungsreaktion unterhalten, versucht der Körper durch antiinflammatorische Mediatoren dieser nachhaltigen Antwort entgegenzuwirken. Unter anderem werden vermehrt Antagonisten wie lösliche TNF-Rezeptoren oder IL-1-Rezeptorantagonisten gebildet.

Im Folgenden werden die wichtigsten Zytokine besprochen:

- Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (Kachektin): TNF- α stellt eines der potentesten proinflammatorischen Zytokine dar und induziert die gesamte Kaskade eines Endotoxin ähnlichen Schocksyndroms. Andererseits scheint eine basale TNF- α Produktion auf niedrigem Niveau wichtig für die Immunabwehr des Organismus zu sein (TRACY et al, 1986). In einem Schockgeschehen tritt TNF- α sehr früh auf und besitzt nur eine kurze Halbwertszeit (RING und STREMMEL, 2000). Die Ausschüttung erfolgt hauptsächlich durch Makrophagen oder Monozyten (KESHAV et al, 1990). Im weiteren Verlauf kommt es über spezifische Rezeptoren zur Stimulation von immunkompetenten Zellen wie Granulozyten oder Lymphozyten mit konsekutiver Ausschüttung von z.B. Interleukinen und Sauerstoffradikalen (BONE, 1993). Über die Freisetzung von Prostazyklin und „Endothelial Derived Relaxing Factor“ (EDRF) wird die frühe vasodilatatorische Phase der Entzündung eingeleitet (AYALA et al, 1994). Zudem wirkt TNF- α wesentlich über eine „Aktivierung“ der

Leukozyten-Endothel-Interaktion an der Störung und Aufhebung der Gefäßpermeabilitätsbarriere mit. Besondere Bedeutung findet dabei die Tatsache, dass TNF- α die Expression von Adhäsionsrezeptoren wie ICAM-1 fördert und so die Anheftung der polymorphkernigen Granulozyten (PMN) an das Endothel sowie deren Migration ins Gewebe mitbewirkt (FURIE und MCHUGH, 1989; POBER und COTRAN, 1990; MARZI et al, 1995).

- Interleukin-1 : Das IL-1 β ist das vorherrschende Peptid bei der bakteriellen Sepsis (ROSE und MARZI, 1996). Die Produktion erfolgt unter anderem in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (TRACY et al, 1986). Ähnlich dem Wirkmechanismus des TNF- α löst IL-1 β die Ausschüttung von Mediatoren wie Arachidonsäurederivate oder Interleukine aus. Dabei kann ein Synergismus zu TNF- α beispielsweise in der Interaktion zwischen dem Leukozyt und Endothel gesehen werden (BONE, 1993). Als Konsequenz der Freisetzung wird die hepatische Synthese von Akute-Phase-Proteinen eingeleitet.

Interleukin-6: Die Bildung erfolgt nach Stimulation durch IL-1, TNF- α oder Endotoxin hauptsächlich in den Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen. Die wesentliche Funktion von IL-6 liegt in einer antiinflammatorischen Wirkung (DIAO und KOHANAWA, 2005). Durch Stimulation der Hepatozytenaktivität wird die Bildung der Akute-Phase-Proteine induziert (KISHIMOTO, 2005). IL-6 zeigt sich im Plasma früh und über die ersten Tage anhaltend erhöht. Der IL-6 Spiegel persistiert im weiteren Verlauf abhängig vom Auftreten septischer Komplikationen (MARTINS et al, 2003).

Interleukin-8: Die Synthese findet in verschiedenen Zelllinien nach Stimulation durch IL-1, TNF- α und bakterielle Produkte statt. IL-8 fungiert als Hauptmediator von Chemotaxis, Diapedese und Sauerstoffradikalproduktion in neutrophilen Granulozyten. Ähnlich den proinflammatorischen Zytokinen wurde eine frühe Erhöhung der IL-8-Plasmakonzentration bei Patienten mit tödlich verlaufendem ARDS gesehen. In der Spätphase stieg die IL-8-Plasmakonzentration sogar weiter an (HACK et al, 1992). ROSE und MARZI (1996) konnten diese Korrelation zwischen einer erhöhten IL-8-Plasmakonzentration und der Ausbildung eines MODS mit letalem Ausgang bestätigen.

3.4.2 Arachidonsäurederivate (Eicosanoide)

Die Eicosanoide sind eine Gruppe von intra- und interzellulären Mediatoren, die aus der mehrfach ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure gebildet werden. Die Hauptproduzenten stellen in der Leber die Kupfferzellen dar. Im Blut werden sie schnell inaktiviert und wirken in erster Linie auf die unmittelbare Umgebung. (DECKER, 1990).

In Abbildung 3 ist die Entstehung der Eicosanoide dargestellt:

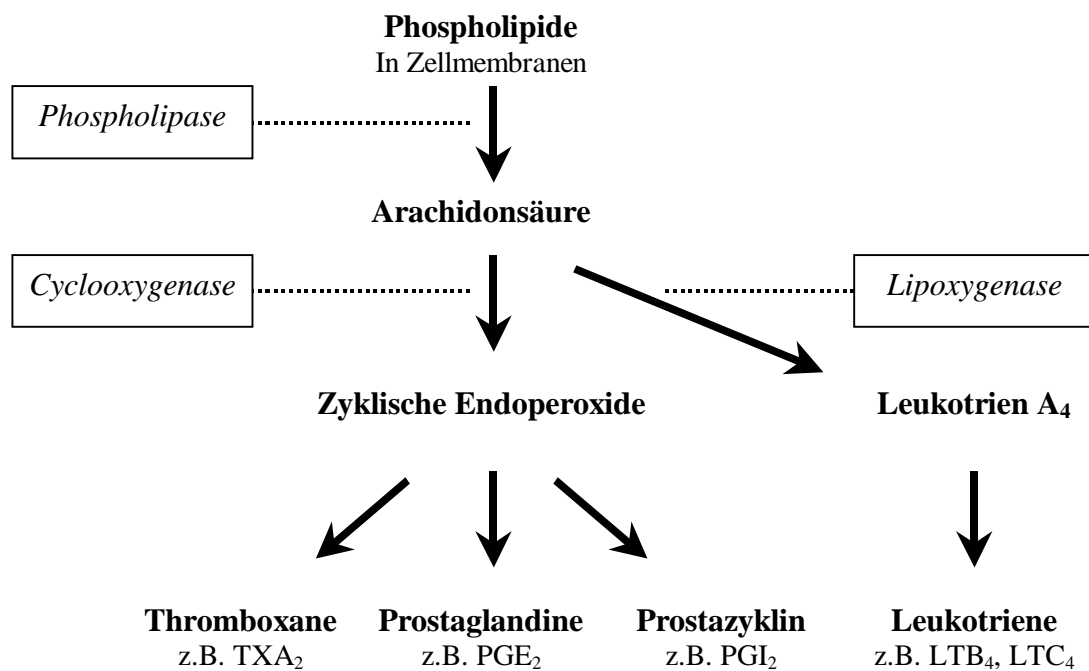


Abbildung 3: Arachidonsäure-Zyklus

Die Umwandlung von membranständigen Phospholipiden zur Arachidonsäure wird von der induzierbaren calciumabhängigen Phospholipase A₂ katalysiert. Es folgt eine Auftrennung des Stoffwechsels in eine Cyclooxygenase- und eine Lipoxygenase-abhängige Reaktion. Das Verhältnis zwischen den zyklischen Endoperoxiden sowie den Leukotrienen trägt nach ZAITSEVA et al (2000) zur Steuerung der Phagozytose-tätigkeit bei. Die wichtigsten Endprodukte sind aus Abbildung 3 ersichtlich:

- Leukotriene (LT): Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Bildung vorwiegend in Mastzellen. Während der Entzündungsreaktion findet eine zusätzliche Produktion in eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Makrophagen sowie Thrombozyten statt. Die Folge ist eine wesentliche Verstärkung der Entzündungsreaktion sowie eine Einbeziehung des Blut-

gerinnungssystemen. Jedes Leukotrien besitzt verschiedene biologische Wirkmechanismen. Beispielsweise führt LT-D4 zu einer Vasokonstriktion bei gleichzeitiger Erhöhung der Gefäßpermeabilität (LEFER, 1989). LT-B4 fungiert als chemotaktischer Botenstoff für Leukozyten mit der Folge der Stimulation zur Transmigration (HABENICHT, 1990).

- Prostaglandin (PG): Die Gruppe der PG vermittelt unterschiedliche Wirkungen. Vor allem Prostaglandin PG-E2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Entzündungsreaktion. Die Hauptwirkung liegt in einer Vasodilatation sowie in einer Steigerung der glomerulären Filtrationsrate. Durch eine Inhibition der Lymphozyten- und Makrophagenaktivierung weist PG-E2 zudem einen immunsuppressiven Charakter auf.

Als Gegenspieler der Prostaglandine fungiert nach SAKAMOTO et al (2004) ein PG-EP4 Rezeptor mit Verbesserung der Hämodynamik nach Stimulation.

- Thromboxan A₂ (TxA₂): Hauptproduzent sind die Thrombozyten. Die Funktion von TxA₂ liegt zum einen in der Förderung der Thrombozytenaggregation, was eine Thrombenbildung im Gefäßsystem begünstigt. Zum anderen wird die broncho- und vasokonstriktorische Wirkung des Prostazyklin antagonisiert (LEFER, 1989).

- Prostazyklin (PG-I₂): Dieses vor allem in den Endothelzellen vorkommende Arachidonsäurederivat scheint bei der Hypotension nach Endotoxinexposition eine wichtige Rolle zu spielen (FLOHE und GIERTZ, 1987). Aufgrund der eher zytoprotektiven Eigenschaften am Gefäßendothel wird PG-I₂ eigentlich als „Anti-Schock Mediator“ eingestuft (LEFER, 1989). PG-I₂ bewirkt eine Hemmung der Thrombozytenaggregation, eine Steigerung der glomerulären Filtrationsrate und zeigt bronchodilatatorische Eigenschaften (HABENICHT, 1990). Freie Radikale modulieren aber die Lipidperoxidation und somit die PG-I₂-Synthese der Endothelzellen. In Abhängigkeit von der zeitlichen Dauer der Zellhypoxie wird die PGI₂-Synthese dadurch zunehmend gehemmt (PALLUY, 1991).

In diesem Zusammenhang wird der Plättchenaktivierende Faktor (PAF) kurz erwähnt, der ebenfalls ein Produkt des Lipidstoffwechsels der meisten Blutzellen und Endothelien darstellt. PAF bewirkt direkt eine Stimulation von Thrombozyten, eine Induktion der Leukozytenadhärenzen am Endothel sowie eine Steigerung der Gefäßpermeabilität (MARZI et al, 1994). Nach Endotoxingabe löst PAF die Freisetzung hochpotenter Eicosanoiden aus (ROSE und MARZI, 1996).

3.4.3 Plasmatische Proteinasen, Gerinnungs- und Komplementsystem

Folgende Systeme wirken an einer Entzündungsreaktion mit:

Das Komplementsystem ermöglicht nach Aktivierung entweder über den klassischen oder alternativen Weg durch den Kontakt mit bakteriellen Mikroorganismen drei Funktionen:

Die Antigenopsonierung und Zellaktivierung (WALPORT, 1989) werden durch die Spaltprodukte der Enzymkaskade ausgeübt. Zum Beispiel fungiert C5a („Anaphylatoxin“) als hochpotentes Chemotaxin für polymorphkernige Granulozyten und Makrophagen und bewirkt durch Induktion die Degranulation der Makrophagen. Über ein Ankurbeln der Interleukin- und Prostaglandinproduktion werden dadurch die Endothelzellen aktiviert sowie über die Mastzellen die Permeabilitätsverhältnisse verändert. Neutrophile Granulozyten sind zudem mit C5a-Rezeptoren ausgestattet, so dass ein unmittelbares Mitwirken an der Leukozyten-Endothel-Interaktion besteht (TONNENSEN et al, 1984).

Die Zytolyse der betroffenen Zellen erfolgt über das Komplement C3b durch Bildung eines C5b-C9 („membrane attack“) Komplexes (BOSSI et al, 2004).

Im Rahmen einer Sepsis wird das Gleichgewicht zwischen Fibrinolyse- und Blutgerinnungssystem im Sinne einer „Pro-Koagulopathie“ und „Antifibrinolyse“ empfindlich gestört (DEMPFLE, 2005). Als Auslöser fungieren proinflammatorische Zytokine (VAN DER POLL et al, 1999). Neben einer überschüssigen Aktivierung der Blutgerinnung mit vermehrtem Verbrauch an Gerinnungsfaktoren bei gleichzeitig verminderter Synthese in der Leber werden die Konzentrationen der drei natürlichen „fibrinolytischen“ Proteine („Tissue Factor Inhibitor“, Antithrombin III und Protein C) vermindert und die fibrinolytischen Regulationsmechanismen z.B. durch hohe Spiegel an Plasminogen-Aktivator Inhibitor Typ-1 (PAI-1) gestört. Die Folge ist eine mikrovaskuläre Thrombose mit Organinfarkt und hämorrhagischer Diathese sowie eine Minderperfusion des entsprechenden Organs (NIMAH und BRILLI, 2003). Der Sinn ist die Vermeidung einer Ausbreitung der Bakterien über die Kapillaren in die systemische Zirkulation sowie die lokale Abwehr (DIXON, 2004). CRONER et al (2006) konnte in seiner Studie zeigen, dass bereits eine Stunde nach Induktion einer Endotoxinämie die postsinusoidalen Venolen in der Leber größtenteils verschlossen sind. Je nach Art der Infektion führt dies zu einer leichten bis massiven Schädigung des entsprechenden Organs. Im Rahmen eines septischen Schockes werden jedoch über eine disseminierte intravasale Koagulopathie mehrere Organe geschädigt, was mit der Ausbildung eines MODS einhergeht

(GANDO et al, 2005; LEVI und TENCATE, 1999). In der „Postmortem“-Studie von DIXON (2004) konnten bei Patienten mit Sepsis multiple Organembolien gefunden werden.

Das Kallikrein-Kinin-System (KKS) verfolgt normalerweise als Gegenspieler zum Renin-Angiotensin-System (RAS) die Aufgabe der Blutdrucksenkung sowie der Vermeidung von Thrombosen (SHARIAT-MADAR et al, 2002). Nach Aktivierung durch Bakterieneinwirkung bewirken die Kinine jedoch über Veränderungen an den Endothelzellen eine Steigerung der Gefäßpermeabilität mit Ödembildung. Die hämodynamischen Verhältnisse werden zudem zu Gunsten einer Hypotension verschoben (SHARIAT-MADAR und SCHMAIER, 2004).

Aufgrund der vielfältigen Eigenschaften sowie Verknüpfung der einzelnen Systeme (siehe Abbildung 4) verwundert es nicht, dass eine lokale oder generalisierte Überproduktion bzw. Aktivierung der verschiedenen Systeme zu einer Störung der Homöostase mit Anstoßen bzw. Verstärken einer inflammatorischen Reaktion führen können.

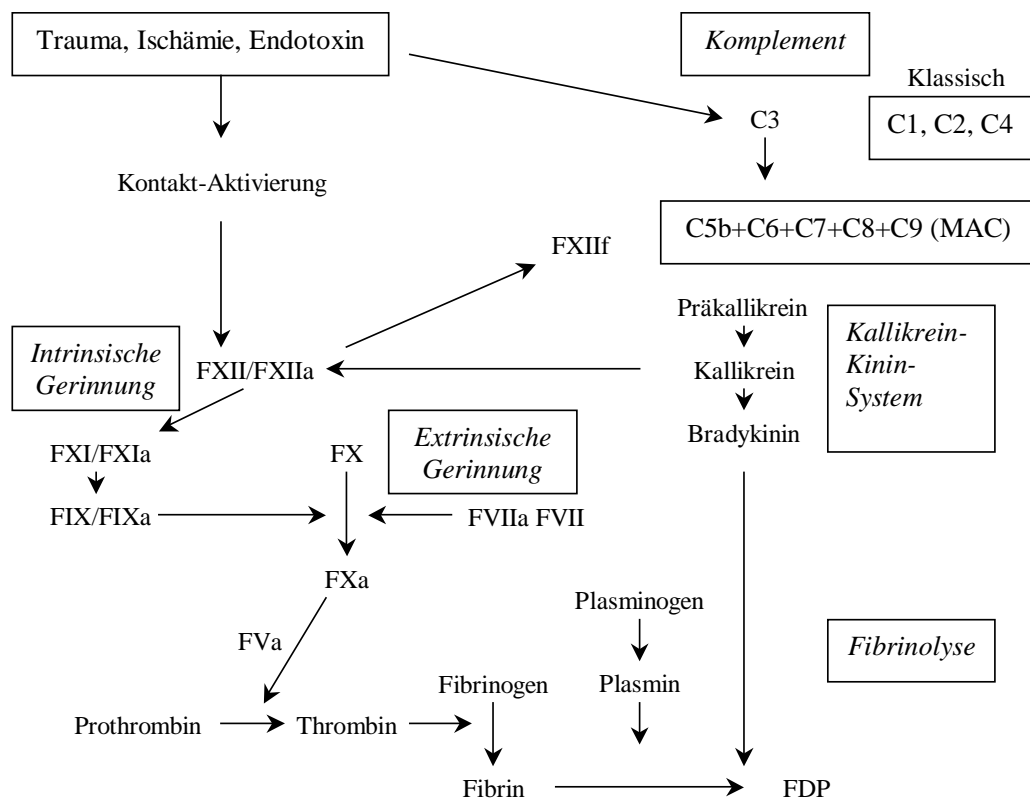


Abbildung 4: Traumarelevante Komponenten des Gerinnungs-, Fibrinolyse- und Komplementsystems nach ROSE AND MARZI (1996)

3.5 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Die Zell-Zell-Interaktion zwischen Leukozyt und Endothel ist eine Schlüsselreaktion und die Grundvoraussetzung für die Rekrutierung, Akkumulation und Emigration von zirkulierenden Leukozyten in das perivaskuläre Gewebe.

Die physiologische Leukozytenfunktion wird durch eine kontrollierte, Rezeptor-gebundene Interaktion mit Endothelzellen, Thrombozyten und extrazellulären Matrixkomponenten bestimmt. Die Expression und Funktion dieser Rezeptoren kann jedoch direkt (z.B. durch LPS (ZHOU et al, 2005)) oder indirekt durch humorale Faktoren wie Zytokine, durch Oxidation und durch biomechanische Scherkräfte beeinflusst werden. Gerät dieses Zusammenspiel durch exogene oder endogene Faktoren beispielsweise durch einen septischen Schock außer Kontrolle, so kann es zu einer Zunahme der Leukozyten-Endothel-Interaktionen kommen. Die Folgen sind Gefäß- und Gewebeschäden in primär nicht geschädigtem Gewebe. Dabei wird in der Frühphase der Entzündungsreaktion die Schädigung durch Zytokine, z.B. durch TNF- α aus Kupfferzellen, und Radikale verursacht, während erst im späteren Verlauf die Adhäsionskaskade mit Emigration der neutrophilen Granulozyten als zerstörerischer Faktor wirkt (CARLOS et al, 1990).

Ein MODS entwickelt sich somit durch die lawinenartige Ausbreitung der Entzündungsreaktion und nicht unmittelbar aus einer Überflutung des Organismus mit Endotoxin.

3.5.1 Adhäsionsrezeptoren

Bei der Regulation der Zell-Zell-Interaktion sind spezielle Moleküle, sogenannte Adhäsionsmoleküle, beteiligt. Folgende Moleküle können unterschieden werden (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1: Faktoren der Leukozyten-Endothel-Interaktion, modifiziert nach CARLOS AND HARLAN (1994) und ROSE AND MARZI (1996)

	“Rolling”	Adhäsion	Transmigration
Leukozyt	L-Selektin, Sle ^x , Fucosylierte Strukturen	β_2 -Integrine (v.a. CD11 _b /CD18)	PECAM-1, β_2 -Integrine (v.a. CD11 _b /CD18)
Endothel	E-Selektin, P-Selektin, Fucosylierte Strukturen	ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1	ICAM-1, PECAM-1, VCAM-1
Mediatoren	Sauerstoffradikale, LPS, Zytokine, Histamin, etc.	IL-1, IL-8, TNF- α , PAF, Komplement, etc.	Chemotaxine, IL-8, Komplement, etc.

- Selektine: Wie bei allen Adhäsionsmolekülen handelt es sich um membrandurchspannende Proteine mit großem extrazellulärem Anteil. Im Detail lässt sich eine „Epidermal Growth Factor“(EGF)-ähnliche Region, ein komplementregulierendes Protein, eine Lektinhaltige Bindungsdomäne sowie ein transmembraner Anteil mit kurzem zytoplasmatischen Schwanz nachweisen (JUTILA, 1992). Drei Selektin-Typen wurden bisher beschrieben:

Auf dem Endothel finden sich E (ELAM-1)- und P (GMP-140, Granule Membrane Protein)-Selektine, während auf der leukozytären Seite das L (LECCAM-1)-Selektin anzutreffen ist.

Die Selektine binden meistens an die fucosylierte Kohlenhydratliganden, den sogenannten Sialyl-Lewisx (Slex), der Gegenseite (CARLOS und HARLAN, 1994). Daneben existieren proteinhaltige Rezeptoren, z.B. PSGL-1 und GlyCAM-1, welchen im Gegensatz zu CARLOS und HARLAN (1994) eine bedeutende Rolle zugeschrieben wird (ATARASHI et al, 2005).

- Leukozytenintegrine bestehen aus einer nicht kovalent aneinander gelagerten, proteinhaltigen α - und β -Untereinheit, von denen jeweils weitere Untereinheiten existieren. Bisher wurden 21 Integrinkombinationen beschrieben (CARLOS und HARLAN, 1994).

Zu den wichtigsten gehören die β 2-Integrine mit folgenden Kombinationsmöglichkeiten:

CD11a/CD18 (α -L/ β -2), auch LFA-1 (Lymphocyte Function Associated Antigen),

CD11b/CD18 (α -M/ β -2), auch Mac-1 (Macrophage Antigen) und

CD11c/CD18 (α -X/ β -2), auch p150/95, genannt.

Auf der Leukozytenoberfläche können diese Liganden zur Unterscheidung der Leukozytenpopulation benutzt werden. Während LFA-1 auf allen Leukozyten vorkommt, sind MAC-1 und p150/95 spezifisch für Monozyten und neutrophile Granulozyten (SIMPSON et al, 1993).

Die endothelialen Rezeptoren für p150/95 konnten noch nicht identifiziert werden (CARLOS und HARLAN, 1994). p150/95 wird aber vorwiegend auf Gewebemakrophagen exprimiert und bindet dort an Fibrinogen und Komplement iC3b (RUF und PATSCHEKE, 1995).

MAC-1 bindet an eine Vielzahl von Liganden, z.B. Komplement iC3b, Fibrinogen und Heparin (DIAMOND, 1995). In Studien wurde gezeigt, dass hauptsächlich Mac-1 die Extravasation der dauerhaft adhärennten Leukozyten nach Schock verursacht (VON ANDRIAN et al, 1991; NOLTE et al, 1994). Als korrespondierender Endothelzellrezeptor ist vorwiegend der ICAM-1 anzutreffen.

ICAM (Interzelluläres Adhäsionsmolekül) gehört zur Superfamilie der Immunglobuline. ICAM-1 (CD54) und ICAM-2 (CD102) können unterschieden werden. ICAM-1 besteht aus 5 extrazellulären immunglobulinähnlichen Domänen und einer zytoplasmatischen Einheit, die am Zytoskelett verankert ist (CARLOS und HARLAN, 1994).

Ein Vertreter der β -1 Integrine stellt das Adhäsionsmolekül CD49-Delta/CD29 dar. β -1 Integrin wird auf Lymphozyten, Monozyten, basophilen und eosinophilen Granulozyten, aber nicht auf Neutrophilen exprimiert. In-vivo konnte gezeigt werden, dass β -1 Integrin sowohl am „Rolling“ als auch an der Adhäsion der Lymphozyten mit anschließender trans-endothelialer Migration der Monozyten beteiligt ist. Dabei wirkt VCAM-1 (monozytenspezifisches Adhäsionsmolekül auf Endothelzellen) mit (ISSEKUTZ, 1995).

3.5.2 Kaskade der Leukozyten-Endothel-Interaktion

Nach GRANGER und KUBES (1994) kann eine Sequenz von mindestens vier aufeinanderfolgenden, andersartigen, jedoch übergreifenden Phasen bei der Emigration von Leukozyten aus dem Intravasalraum ins Gewebe unterschieden werden (siehe Abbildung 5):

Zufallskontakt \rightarrow „Rolling“ \rightarrow feste Haftung \rightarrow Diapedese u. Chemotaxis

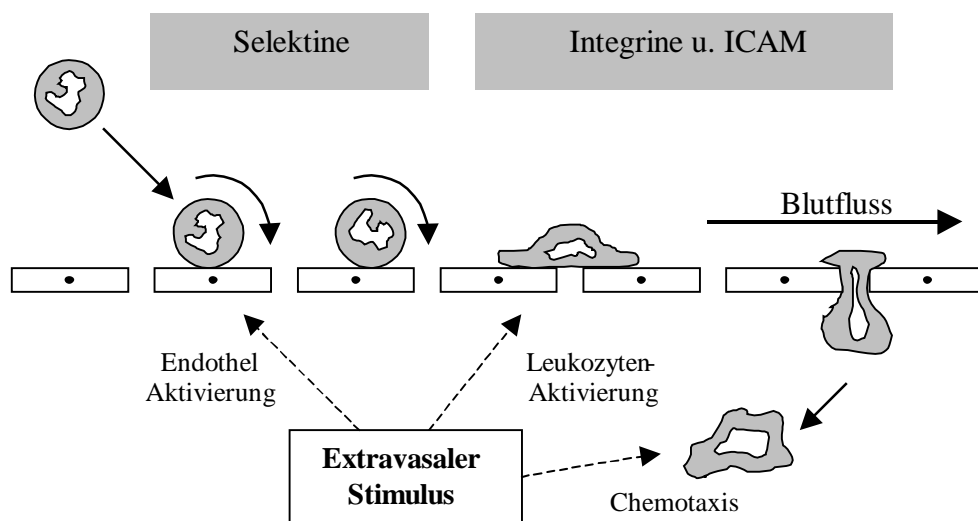


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Adhäsionskaskade, modifiziert nach CARLOS AND HARLAN (1994)

Diese verschiedenen Adhärenzphänomene lassen sich intravitalmikroskopisch im Tierexperiment unmittelbar beobachten. Neben frei fließenden Leukozyten fallen Leukozyten auf, die am Endothel entlang rollen („Slow Rolling“, „Rollers“). Des weiteren können Leukozyten differenziert werden, die kurzzeitig (temporär) oder über einen längeren Zeitraum (permanent) an das Endothel binden („sticking“).

Der Grund für die verschiedenen Adhäsionsarten liegt in der Expression unterschiedlicher, auf der Oberfläche von Leukozyten und Endothelzellen sitzenden Adhäsionsmoleküle sowie in der Ausschüttung diverser Mediatoren (WEBER, 2003).

Der nicht aktivierte, neutrophile Leukozyt zeigt bereits während der Zirkulation im Gefäßsystem L-Selektin und inaktive CD11/CD18-Komplexe auf seiner Oberfläche (JUTILA, 1992). Nach Stimulierung, z.B. durch einen septischen Schock, werden Mediatoren wie TNF- α , IL-1 und Sauerstoffradikale freigesetzt. Die Folge ist eine Aktivierung des Endothels durch Hochregulation der Oberflächenantigenexpression, was vor allem durch eine Mobilisation von Plasmagranula (P-Selektin), d.h. präformiertes Selektin in Weibel-Palade Granula (KLINTMANN et al, 2004) sowie zu einem geringeren Teil durch verstärkte Transkription von ICAM-1 und E-Selektin (CARLOS AND HARLAN, 1994) bewirkt wird. Tritt nun der Leukozyt mit dem Endothel, eventuell begünstigt durch eine inflammatorisch bedingte Strömungsturbulenz, in Kontakt, so können die leukozytären und endothelialen Selektine eine reversible Bindung eingehen. Durch die Scherkräfte des Blutstroms entsteht das sogenannte „Slow Rolling“ der Leukozyten entlang der Gefäßwand (ABBASSI et al, 1993; KLINTMANN et al, 2002). Dieses intravitalmikroskopisch beobachtbare Phänomen lässt sich mit einem Ball mit Saugnäpfen vergleichen, der auf einer abschüssigen Glasplatte herunterläuft (LEY, 1993). Die Nähe zum Endothel und damit auch zu den stimulierenden Zytokinen und Chemotaxinen löst beim Leukozyten nach ein bis drei Sekunden eine Aktivierung aus. Die Folge ist eine nachweisbare Konformationsänderung der Integrine mit konsekutiver Erhöhung der Affinität zu den entsprechenden endothelialen Rezeptoren (CARLOS und HARLAN, 1994). So findet zum Beispiel eine Strukturänderung der LFA-1 von „Niedrig“ bis „Intermediate“ zu „High“ statt (GREEN et al, 2005). Parallel zu diesem Vorgang kommt es zum sogenannten „Shedding“, dem vollständigen Abstoßen der für die erste Leukozyten-Endothel-Interaktion verantwortlichen Selektine von der Zelloberfläche mit Abgabe in die Zirkulation. Dieser Mechanismus wird beispielsweise durch LPS und IL-8 verursacht. Der Verlust der Rezeptoren ist als ein Kontrollmechanismus der Autoregulation aber auch als eine Möglichkeit der Rezirkulation primär adhärenter Leukozytensubpopulationen zu verstehen (JUTILA, 1992). In der Studie von HAFEZI-MONGHADAM et al (2001) konnte gezeigt werden, dass eine Verhinderung der Abscherung zu einem Anstieg der Leukozytenadhäsionen führt. Bei erneutem Kontakt wird nun die zuvor lockere Leukozyten-Endothel-Haftung durch eine feste Integrin/ICAM Bindung ersetzt (KISHIMOTO et al, 1989). In einem letzten Schritt schließt sich die rezeptorabhängige Transmigration an (LUSCINASKAS, 1991). Dazu laufen sowohl am Endothel als auch beim Leukozyten

spezielle Abläufe ab: Unter dem Einfluss von Mediatoren kommt es neben der Aktivierung der Leukozyten auch zu einer Stimulation des Gefäßendothels. Dabei werden vom Endothel Wachstumsfaktoren und Zytokine produziert, die eine Zunahme der Gefäßpermeabilität bewirken. Diese endothelialen Faktoren gelangen auch in den Blutstrom, werden aber fast vollständig von Radikalfängern und Proteasen neutralisiert, so dass kein weiterer Schaden angerichtet wird. Haftet ein dauerhaft adhärenter Leukozyt am Endothel, so bildet sich zwischen den zueinandergewandten Zellmembranen des Leukozyt und der Endothelzelle ein sogenanntes „Microenvironment“ aus. In dieser räumlichen Anordnung und Umgebung liegen die Proteasen, Elastasen, Myeloperoxidasen sowie die toxischen Sauerstoffprodukte in einer relativ hohen Konzentration vor und sind vor einer Neutralisation geschützt. Dabei werden zum Beispiel Proteasen und Sauerstoffradikale sogar direkt durch den Leukozyten ausgeschüttet (VOLLMAR et al, 1995). Unter Mitwirken dieser aggressiven Substanzen kommt es zu einem Endothelschaden und zu einer Auflockerung der interzellulären Bindungen mit folglich erhöhter Permeabilität und schließlich Emigration des Leukozyten. Dabei kann eine parazelluläre und transzelluläre transendotheliale Migration unterschieden werden (YANG et al, 2005).

Im allgemeinen läuft die Leukozytendiapedese für jede inflammatorische Reaktion nach dem oben beschriebenen Modell ab. Bei einer geschätzten Gesamtoberfläche des menschlichen Gefäßendothels von etwa 250 bis 1000 m² kann die Permeabilitätsschranke mit dem Ziel einer geregelte Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe durch diese beachtliche Angriffsfläche empfindlich geschädigt werden.

Der Leukozyten-Endothel-Interaktion kommt dadurch sowohl bei der Entzündung auf lokaler Ebene als auch im Zustand der Generalisierung (SIRS) eine bedeutende Rolle zu.

3.5.3 Besonderheit in der Leber

Der oben beschriebene Ablauf wurde vor allem durch Beobachtungen in postkapillären Venolen des Mesenteriums entdeckt und beschrieben (LEY, 1993). Der Durchmesser dieser Gefäße beträgt 20 bis 40 µm und bietet den Leukozyten ausreichend Volumen, um an der Gefäßwand entlang zu „rollen“. Entsprechend kann in den postsinusoidalen Venolen bei ausreichend großem Gefäßdurchmesser das „Rollen“ beobachtet werden (ATARASHI et al, 2005). Die Lebersinusoiden sind aber mit einem Durchmesser von 9 bis 13 µm deutlich kleiner und liegen bereits in der Größenordnung der weißen Blutkörperchen (7-10 µm) (GENESER,

1990). MARZI et al (1993) vermuteten daher, dass sich statt der punktuellen Selektinbindung zahlreiche Bindungen zirkulär um den Leukozyten ausbilden und somit statt dem „Slow Rolling“ vermehrt temporäre Adhäsionen zu beobachten sind. Dementsprechend wird erst nach einer durchschnittlichen Adhäsionszeit von 2 Sekunden (maximal bis 20 Sekunden) von einer temporären Adhäsion zwischen einem Leukozyten und dem Endothel gesprochen. Hinweise für das Vorhandensein von P-Selektin im Lebersinusoid fanden sich im Rahmen von Versuchen mit dextranhaltiger hyperten-hyperonkotischer Infusionslösung (MARZI et al, 1993). Die sogenannten permanenten Adhäsionen sind definiert als eine Adhäsion von mindestens 20 Sekunden Dauer (MARZI et al, 1993).

3.6 Bisherige Studien und Ideen

In den bisherigen experimentellen Studien über den septischen Schock und MODS wurde versucht, durch die Entschlüsselung der Abläufe, die zu einem Multiorganversagen führen, passende therapeutische Ansätze zu finden. Die bisherigen Methoden setzten daraufhin an den entsprechenden Abschnitten der Entzündungsreaktion an (siehe Abbildung 1). Beispielsweise sah CRONER et al (2004) durch Blockade des C1 in einer durch LPS-induzierten Sepsis im Rattenmodell eine Reduktion der VCAM-1-Expression. Durch rekombinantes humanes IL-10 konnte über eine Supprimierung der Il-1- und TNF- α -Freisetzung eine Verlängerung der Überlebenszeit in einer LPS-induzierten Sepsis nachgewiesen werden (LATIFI et al, 1995).

Die oben genannten Erkenntnisse deckten zwar weitere Details des septischen Schockgeschehens auf, ein therapeutischer Ansatz wurde jedoch letzten Endes nicht gefunden. Die exakte Rolle der Kupfferzellen im Gesamtgeschehen blieb dabei unter anderem weiterhin unklar (DING et al, 2003). Bisher wurde davon ausgegangen, dass den ortständigen Gewebemakrophagen der Leber durch ihre Lokalisation und durch ihre Funktion im Schockgeschehen mit der Ausschütten von Mediatoren eine entscheidende Rolle in der Entstehung des MODS zukommt.

Die vorliegende Arbeit untersucht nun die Rolle der Kupfferzellenaktivierung in der systemischen Entzündungsreaktion während der Frühphase des septischen Schocks an einem standardisierten tierexperimentellen Modell. Die Modulation der Kupfferzellenaktivität wird durch die Gabe zweier Stoffe herbeigeführt:

Gadoliniumchlorid und Dichlormethylendiphosphonat.

3.7 Verwandte Substanzen zur Modulation der Kupfferzellaktivität

Gadoliniumchlorid ($GdCl_3$) ist ein natürlich vorkommendes rares Erdmetallsalz.

Der exakte Wirkungsmechanismus auf die Kupfferzellen ist weiterhin nicht vollständig bekannt. Jedenfalls scheint Gadoliniumchlorid auf zwei Arten zu wirken:

Nach intravenöser Gabe aggregiert das Gadoliniumchlorid bei einem pH-Wert über 6 in eine kolloide Form (KOUDESTAAL et al, 1991) und wird von den Kupfferzellen in der Leber phagozytiert. Aufgrund des sinkenden pH-Werts in den lysosomalen Endosomen wechselt das Gadoliniumchlorid wieder zu seiner ionisierten Form zurück und kann nun in diesem Zustand seine Wirkung entfalten: $GdCl_3$ verdrängt das ionisierte Calcium von seiner Wirkungsstätte an der Membran. Im Rahmen des regelmäßigen Membranrecycling der Endosome gelangt diese veränderte Zellmembran an die Zelloberfläche. Die Zelle verliert daraufhin ihren glykolysierten Rezeptor, wodurch eine Oberflächenanhaftung und eine Phagozytose im ersten Stadium verhindert wird (CALLEY et al, 1990). Die Zellen werden inaktiv und verlieren ihre Integrität im Zellverband.

Neben der Inaktivierung kommt es im weiteren Verlauf zu einer kompletten Zerstörung von speziellen Kupfferzellsubtypen (MIZGERD et al, 1996).

Dichlormethylendiphosphonat (Cl_2MDP oder **DMD)** besteht aus zwei Komponenten: Dem Clodronat, einem anionischen Bisphosphonat, und einem Liposom. Beide Bestandteile sind für den Körper nicht toxisch. Aus chemischer Sicht stellt das Bisphosphonat-Clodronat eine stark hydrophile Substanz dar und kann aufgrund dieser chemischen Eigenschaft die Zellwand nur schlecht durchdringen und somit schwer von der Zelle aufgenommen werden (VAN ROOIJEN und VAN KESTEREN-HENDRIKS, 2002). Zudem besitzt das Bisphosphonat-Clodronat in der Blutbahn eine extrem kurze Halbwertszeit und wird renal eliminiert. Aus diesem Grund werden Liposome, die als Transportmedium für Zell- und Gewebsmedikamente bekannt sind, eingesetzt (JULIANO, 1982; VAN ROOIJEN et al, 1994).

Das Liposom wird von dem Makrophagen phagozytiert. Nach Zerstörung der Phospholipiddoppelschicht durch die Phospholipidasen der Lysosome gelangt der transportierte Stoff, in diesem Fall das Bisphosphonat-Clodronat, in das Zellinnere. Dabei reichert sich umso mehr Bisphosphonat-Clodronat innerhalb der Zelle an, je mehr Liposome von der Zelle ingestiert werden. Ab einer bestimmten intrazellulären Konzentration an MDP kommt es zur Apoptosis der Zelle (VAN ROOIJEN et al 1985 and 1996).

Prinzipiell werden alle Makrophagen unterschiedlichster Gewebe getötet, so dass die Art der Verabreichung eine entscheidende Rolle für die organ- bzw. ortsspezifische Zerstörung spielt. Beispielsweise wird durch eine intravenöse Gabe zum einen die Kupfferzellen in der Leber, zum anderen auch die Makrophagen der Milz zerstört. Einer weiteren Ausbreitung steht dann die Vakuolengröße der Liposome im Bezug zu den Kapillaren im Wege (VAN ROOIJEN et al, 1990 and 1997).

Aus diesem Grunde wurden unsere Versuchsstoffe jeweils intravenös verabreicht.

In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass die Kupfferzellen eine entscheidende Rolle in der Entstehung eines systemischen inflammatorischen Entzündungssyndroms spielen. Unklar blieb aber die Frage, ob gerade die Mediatoren der Kupfferzellen an diesem Ablauf beteiligt sind. Das Ziel dieser Studie war von daher die Beantwortung der Frage, inwiefern eine Modulation der Kupfferzellaktivität die hepatische Mikrozirkulation nach septischem Stressereignis als Ausdruck eines systemischen inflammatorischen Entzündungssyndroms beeinflussen kann. Zur Darstellung und Beurteilung der Mikrozirkulation wurde ein etabliertes Schockmodell mit Intravitalmikroskopie verwandt.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden nach Überprüfung durch die zuständige Tierschutzkommission vom Landrat des Saarpfalzkreises genehmigt und von der Tierschutzbeauftragten vor Ort überwacht.

Die Versuche wurden mit männlichen Ratten des Sprague-Dawely Anzuchtstamms durchgeführt, die von der Charles River GmbH in Sulzfeld (Deutschland) bezogen wurden. Die Tiere wurden bis zum Versuchsbeginn im Institut der Experimentellen Chirurgie untergestellt und mit Trockenfutter (Altronium GmbH, Lage, Deutschland) und Leitungswasser ad libitum ernährt. Dabei wogen die Tiere zwischen 230 bis 280 g und waren im Alter zwischen zehn bis zwölf Wochen.

4.2 Versuch

4.2.1 Versuchsgruppen, verwendete Substanzen und Versuchsvorbereitung

Es wurden drei Versuchsgruppen mit je sechs Tieren sowie eine Nicht Schock-Gruppe gebildet. Die Versuchsdurchführung erfolgte randomisiert und doppelt blind.

Folgende Substanzen wurden den Tieren intravenös appliziert:

Gadolinium(III)Chlorid ($GdCl_3$): Sigma Chemical Co., P.O. Box, 14508 St. Louis, MO 63178 USA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH P.O. 1120, Steinheim

Dichlormethylendiphosphonat-Clodronat (MDP): Department of Cell Biology and Immunology, Faculty of Medicine, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands.

Natriumchlorid (NaCl) 0.9 %

Jeweils ein Milliliter Gadoliniumchlorid, MDP und Natriumchlorid wurden getrennt und verblindet (durch eine dritte Person) in eine Milliliter-Spritze aufgezogen und mit einer Nummer verschlüsselt. Die anschließende Lagerung der fertigen Spritzen erfolgte bei 4° Celsius. Der Grund für die spezielle Lagerung liegt in der Herstellung des MDP: Clodronate können in hohen Konzentration in Liposome eingespritzt werden. Damit keine Leckage an

den Liposomen auftritt, muss die Endsubstanz bei Temperaturen um 4° C gelagert werden (VON ROOIJEN und SANDERS, 1994).

Medikamentenverabreichung (1. Eingriff):

Aufgrund der Halbwertszeit (vor allem von Gadoliniumchlorid) musste exakt 24 h \pm 1 h vor Einleiten des septischen Schocks den Versuchstieren die Substanzen appliziert werden. Dazu wurden die Ratte nach dem Wiegen durch eine Kurznarkose mit Diethylether (DAB 10, rel. Dichte: 0.714-0.716, Otto Fischer GmbH & Co., Stuttgart/Untertürkheim) betäubt. Der zu punktierende Hautbereich wurde anschließend mit Neo-Codanspray (Schülke & Mayer, Norderstedt) desinfiziert und die Schwanzvene mit einem Band gestaut. Nach der Punktion wurde die korrekte Lage des venösen Zugangs durch Anspülen der Braunüle mit wenigen Milliliter Natriumchlorid überprüft. Entsprechend dem Gewicht der Ratte erfolgte dann die Injektion der Testsubstanz. Nach erneutem Durchspülen der Schwanzvene mit wenigen Milliliter Natriumchlorid wurde die Braunüle gezogen. Nach Narkoseende erwachte das Tier und verblieb bis zum Versuch in seinem Käfig. Zwölf Stunden vor Versuchsbeginn wurde der Ratte die Nahrung entzogen.

4.2.2 Narkose und Präparation

4.2.2.1 Narkose

Die Versuchstiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 50 mg/kg/KG Narcoren (Pentobarbital-Natrium, Rhone Merieux GmbH, Laupheim) anästhesiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde bei Bedarf verdünntes Pentobarbital intravenös nachinjiziert. Alle Versuchstiere wurden am Ende des Experimentes mit einer Überdosis Pentobarbital eingeschläfert.

4.2.2.2 Präparation (2. Eingriff)

Nach der Anästhesie des Versuchstieres erfolgte eine sorgfältige Rasur des Abdomens sowie der Halsregion bis zum Sternum. Anschließend wurde die Ratte auf einer Korkplatte mit Wärmefolie (Conrad Electronic, Hirschau) gelagert, welche ein Auskühlen des Tieres während des Versuchs verhinderte.

Um die Sterilität der Präparation zu gewährleisten, wurde mit einer alkoholischen Lösung eine großzügige Desinfektion des rasierten Hautgebietes durchgeführt und das Operations-

gebiet mit sterilen Tüchern abgedeckt. Während der gesamten Präparation wurden zudem ausschließlich sterile Materialien (Instrumente, Katheter, Infusionslösung etc.) verwendet und unter sterilen Bedingungen gearbeitet, um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden.

Zu Beginn der Präparation wurde eine Tracheotomie durchgeführt, um eine funktionelle Belüftung beider Lungen zu gewährleisten, und um den produzierenden Schleim absaugen zu können. Dazu wurde ein etwa drei Zentimeter langer medianer Hautschnitt von der Mandibular bis zum kranialen Rand des Sternums inzidiert, die prätracheale Muskelplatte längs gespalten und die Trachea freipräpariert. Nach Anschlingen derselben mit einem Faden (Vicryl 1.5 metric 4-0, Ethicon, Nordersted, Deutschland) wurde zwischen zwei Knorpelspannen eine Stichinzision durchgeführt, und anschließend mit einem vier Zentimeter langen Polyethylenkatheter (1.8 x 2.4mm, Braun Melsungen) die Trachea intubiert. Die Fixierung des Tubus erfolgte durch einen festen Knoten des vorgelegten Fadens.

Im Anschluss wurde die Arterie carotis sinistra zwischen Musculus sternocleidomastoideus und infrahyaler Muskulatur nach vorsichtiger Trennung vom mitverlaufenden Nervus vagus freipräpariert und nach Kranial ligiert (Vicryl 4-0). Nach Kaudal wurde das Gefäß mit einer Gefäßklemme reversibel verschlossen. Es erfolgte dann die Inzision der Arterie carotis am proximalen Ende, um dort einen mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Polyethylenkatheter (0.58 x 0.96 mm, Portex, Fisher Scientific GmbH, Nidderau) einzulegen und nach Zentral vorzuschieben. Nach Prüfen der korrekten Lage des Katheters sowie nach Verbinden mit einem Druckwandler wurde der arterielle Katheter mit einer vorher gelegten Schlinge verknotet und die distale Gefäßklemme entfernt.

Der arterielle Zugang diente der invasiven Druckmessung sowie der mehrmaligen Gewinnung arteriellen Blutes.

Im weiteren Verlauf wurde der Hautschnitt am distalen Ende nach rechts lateral erweitert. Nach präparatorischer Darstellung der Vena jugularis interna dextra erfolgte die Kanülierung entsprechend dem oben geschilderten Vorgehen bei der Einlage des arteriellen Katheters. Der eingelegte Kunststoffkatheter (0.4 x 0.8 mm Portex) wurde an einen Perfusor (Perfusor ED 1-300, B. Braun Melsungen AG, Type 871272), welcher mit einer Ringerlactat gefüllten Perfusorspritze bestückt war, angeschlossen und mit dem vorgelegten Faden verknotet.

Neben der kontinuierlichen Infusionstherapie diente der venöse Zugang zur intermittierenden, intravenösen Gabe des Anästhetikums, der Injektion des Endotoxins und gegen Ende des Experimentes der Verabreichung des Fluoreszenzmarkers Acridin Orange.

4.3 Versuchsprotokoll

4.3.1 Versuchsablauf

Der zeitliche Versuchsablauf ist in Abbildung 6 dargestellt:

Die operativen Vorbereitungen waren nach circa 35 Minuten (maximal 45 Minuten) beendet.

Es schloss sich eine 15 Minuten dauernde Ruhephase an.

Zum Zeitpunkt 0 h erfolgte die Messung der Ausgangsparameter, d.h. der Systemparameter mit anschließender arterieller Blutentnahme von circa 0.7 Milliliter Vollblut.

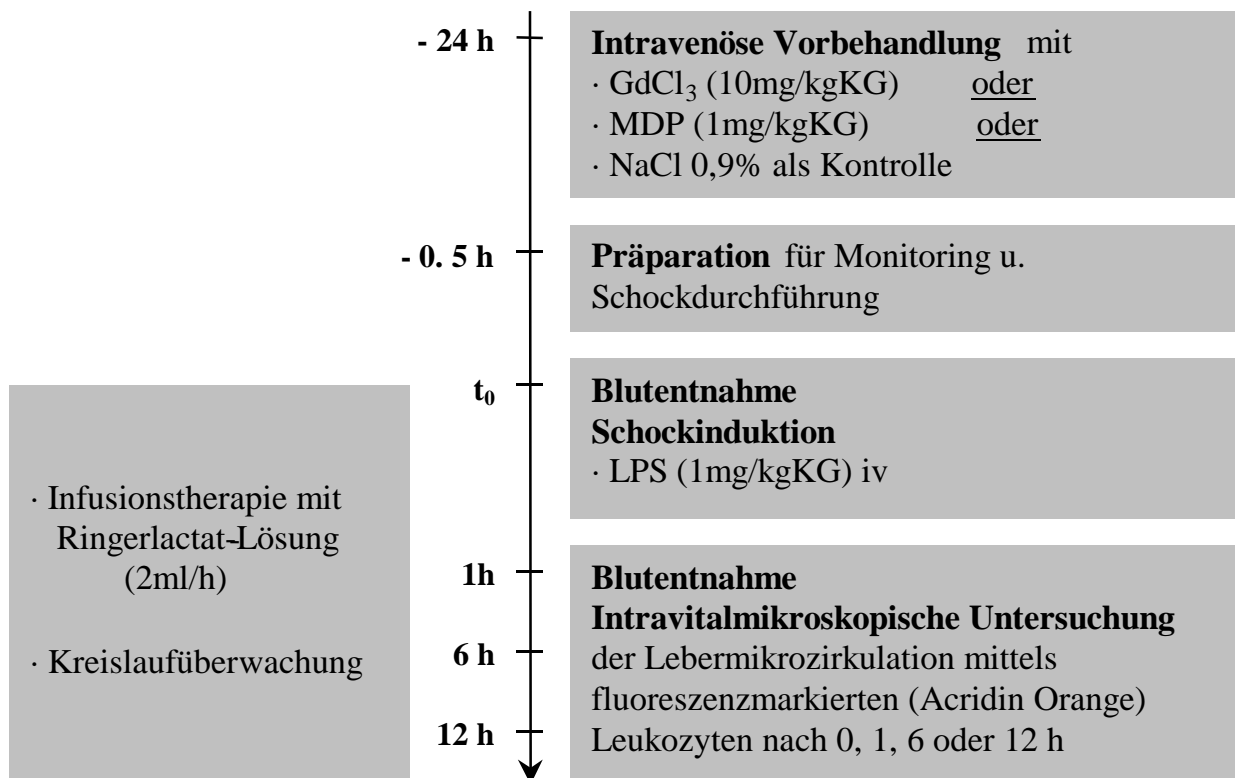


Abbildung 6: Zeitlicher Versuchsablauf

Schockgruppe:

Unmittelbar nach der arteriellen Blutentnahme wurde dem Versuchstier über den venösen Katheter ein Endotoxin-Bolus (gereinigtes Lipopolysaccharid, Escherichia coli, 10 mg/ml) entsprechend dem Gewicht der Ratte (Dosierung: 1mg/kg KG) in Milliliter verabreicht.

Nicht Schock-Gruppe:

Den Versuchstieren wurde keine intravenöse Bolusgabe des Endotoxins verabreicht.

Nach Anspülen des Katheters mit Ringerlactatlösung wurde in beiden Gruppen eine konstante Infusionstherapie von 2 ml/h Erhaltungsdosis durchgeführt.

Die weitere Kreislaufüberwachung erfolgte in den ersten zwei Stunden jede 15 Minuten und wurde daraufhin auf 30 Minuten ausgeweitet.

Die weiteren arteriellen Blutentnahmen fanden nach einer, sechs und zwölf Stunden statt.

Zu den vorgesehenen Zeiten wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt: Während in der Schockgruppe nach einer, sechs oder zwölf Stunden die Mikroskopie der Leber erfolgte, wurden in der Nicht Schock-Gruppe zusätzlich zum Zeitpunkt 0 h Versuchstiere mikroskopiert.

4.3.2 Monitoring

Die arterielle Blutdruckkurve und die Herzfrequenz wurden über die gesamte Versuchsdauer kontinuierlich abgeleitet.

Mittlerer arterieller Blutdruck

Der MABD konnte durch einen Druckwandler (Statham Gould, P23Db, Oxford, CA, USA) mit angeschlossenem Blutdruckmonitor (Siemens Modell-No 8419178 E 2250, USA) nach initialem Nullabgleich kontinuierlich abgelesen werden.

Herzfrequenz

Durch Auszählen der Pulskurve wurde die Herzfrequenz ermittelt.

4.3.3 Klinisch-chemische Parameter

Zu den oben angegebenen Zeiten wurde dem Tier über den arteriellen Katheter der Arterie carotis sinistra circa 0.7 Milliliter Blut zur Laboranalyse entnommen:

Kleines Blutbild

Zu dieser Messung wurden 200 Mikroliter Vollblut in eine EDTA-Monovette (Sarstedt) gefüllt und in das Analysegerät, dem Coulter AcT diff. Hematology Analyzer (Coulter Electronics, Luton, UK) eingesetzt. Folgende Daten wurden untersucht:

Hämatokrit, Hämoglobingehalt, Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten

Blutgasanalyse

Pro Blutgasanalyse wurden je 150 Mikroliter Vollblut in eine heparinisierte Glaskapillare für Blutgasanalyse eingeträufelt. Zur Aufarbeitung stand das Blutgasanalysegerät 348 Chiron Diagnostics (pH/ blood gas analyzer; Chiron Diagnostics GmbH, Fernwald, Deutschland) zur Verfügung. Folgende Parameter wurden gemessen:

pH-Wert, arterieller Sauerstoffpartialdruck (pO₂), arterieller Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂), Standardbikarbonat und Basenabweichung (Base Excess, BE),

Leberenzyme

Zur Einschätzung des hepatozellulären Schadens wurde eine Bestimmung der Leberenzyme Alanin-Aminotransferase ALT (ALAT/GPT), Aspartat-Aminotransferase AST (ASAT/GOT) und Laktatdehydrogenase LDH durchgeführt. Dazu wurden wenige Milliliter Vollblut nach Einfüllen in ein spezielles Gefäß durch die Zentrifuge Hermle Z 400 K (Hermle Labortechnik, Weinhelm, Deutschland) mit 10000 x /min über drei Minuten bei – 4° C zentrifugiert. Von der Probe wurden dann 200 Mikroliter Plasma in ein maximal 0.7 Milliliter fassendes Reaktionsgefäß mit Deckel (Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg) umpipettiert und anschließend mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bis zur Weiterverarbeitung in einem Tiefkühlfach mit einer Temperatur von mindestens – 70° C.

Im Zentrallabor der Universitätsklinik des Saarlandes wurden die Leberenzyme entsprechend der „optimierten Standardmethode“ der deutschen Gesellschaft für klinische Chemie nach dem Alanin- und Aspartat-Aminotransferase UV-Test sowie nach dem Laktatdehydrogenase UV-Test mit einer standardisierten Methode des BM/Hitachi Systems 71 von Boehringer Mannheim GmbH bestimmt.

4.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

4.4.1 Vorbereitung zur Mikroskopie

Zu den vorgesehenen Zeitpunkten erfolgte die Eröffnung des Abdomens mittels einer medianen Laparotomie, welche über zwei bogenförmige Schnitte nach rechts und links auf Höhe der Umbilikalregion erweitert wurde. Nach Durchtrennung der Ligamenta falciforme hepatis und intrahepatica wurde der linke Leberlappen mit Hilfe eines Natriumchlorid angefeuchteten Stieltupfers mobilisiert. Nach Verschluss des arteriellen und venösen Katheters mit einem Verschlusskonus (Combi rot, Braun, Messung) wurde die Ratte auf einen eigens für die Intravitalkoskopie konstruierten Plexiglastisch in Linksseitenlage fixiert. Ein Teil des Tisches funktioniert dabei als eine Bühne, welche sich durch mehrere Schraubenverbindungen in alle Richtungen des Raums bewegen lassen. Auf diese Bühne wurde eine variabel formbare Trägereinheit aus Knetmasse angebracht, welche die Konvexität des linken Leberlappens in spannungsfreier Lagerung aufnehmen sollte. Die Auslagerung des Leberlappens erfolgte zur Minimierung der Manipulation auf der Leberoberfläche vorsichtig mit zwei Kochsalz getränkten Wattestäbchen. Nach Testung der korrekten Lage mit waagerechter Anordnung der planen Leberoberfläche wurde die konvexe Seite des ausgelagerten Leberlappens zur Vermeidung von Atemartefakte und eines Abgleitens mit Acrylkleber an die Knetmasse fixiert. Zum Schutz vor Austrocknung, Auskühlung und Verletzung wurde die nun oben zum Liegen gekommene, plane Leberoberfläche mit einem passend zurechtgeschnittenen Stück Cellophanfolie abgedeckt und während der Mikroskopie kontinuierlich mit 36.7° C warmer Natriumchloridlösung benetzt.

4.4.2 Intravitalkoskopie

Bereits mit Hilfe des Durchlichtmikroskops war es MCCUSKEY et al (1978 and 1993) gelungen, die Lebermikrozirkulation in dünnen Randgebieten in vivo zu untersuchen. Diese Gebiete sind jedoch nach einem Schockgeschehen kaum für das gesamte Organ repräsentativ. Aus diesem Grund wurde die Fluoreszenzmikroskopie entwickelt, die es ermöglicht, einen beliebigen Bereich auf der Leberoberfläche zu beobachten. Hierzu werden die Leukozyten nach der Methode von JAHANMEHR et al (1987) unmittelbar vor der Beobachtung mit Acridin Orange (Chroma-Gesellschaft, Schmid & Co., Stuttgart/Untertürkheim) angefärbt. Durch dieses Verfahren lässt sich in vivo die hepatische Mikrozirkulation der Rattenleber morphologisch darstellen und quantifizieren (MARZI et al, 1993). Der im folgenden

beschriebene Versuchsaufbau entspricht von daher weitgehend der von MARZI et al (1993 und 1995) entwickelten Technik.

Instrumentation

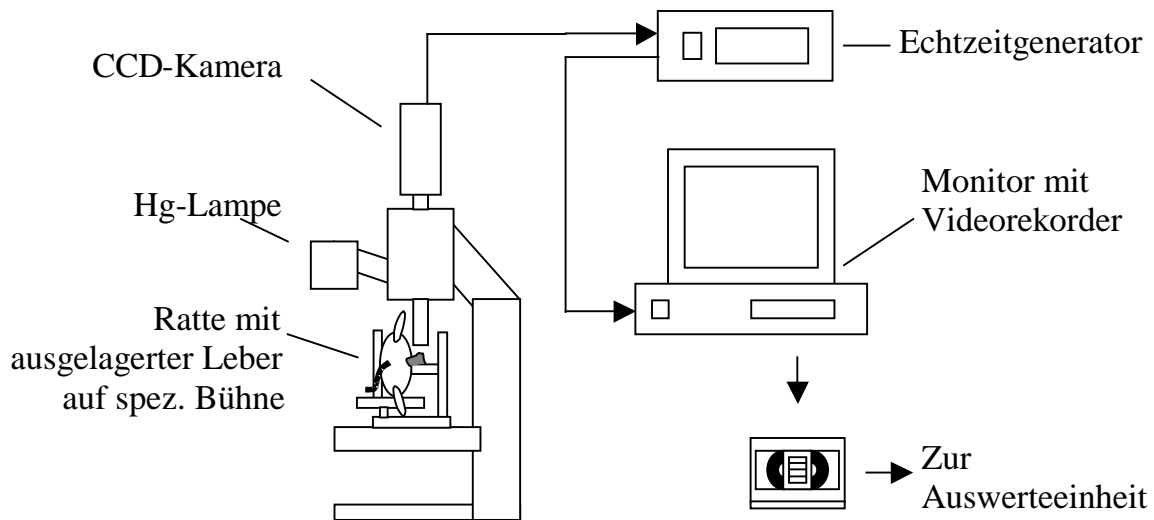


Abbildung 7: Instrumentationsaufbau Mikroskopie

In Abbildung 7 ist der exakte Instrumentationsaufbau bildlich dargestellt. Zur intravitalen, fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurde ein Epifluoreszenzmikroskop des Typs Nikon-MM 11 (Measurescope mm 11, 220V, 50/60 Hz, Japan) verwendet. Zur Erzeugung des zur Auflichtfluoreszenz benötigten Lichtes wurde eine 100 Watt Quecksilberdampf Lampe (Nikon Super High Pressure Mercury Lamp, Power Supply, Modell HB-1010 AF, Japan) seitlich angebracht. Ein im Strahlengang angebrachter Filter (450-490 nm) bündelte die zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes notwendige Lichtfrequenz. Zusätzlich wurden noch zwei beliebig einstellbare ND-Filter mit verschiedenen Graustufen (Nikon, Typ ND2 und ND4) zur Reduktion der Überstrahlung zwischengeschaltet. Vergrößert wurde das mikroskopische Bild durch ein Wasserimmersionsobjektiv von 10 x 10, so dass eine 100-fache Endvergrößerung ermöglicht wurde. Dabei wurde zur Erzeugung des nötigen Wasserfilms, der zugleich auch zur Befeuchtung der Leber diente, eine Natriumchloridlösung hergestellt. Diese Flüssigkeit wurde in einem 50 Liter Kanister gelagert, und durch einen Spülflüssigkeitswärmer (Fenwal Blood Warmer, Modell BW 5, 3.5 Ampere, 50/60 Hz, 220 V, 700 W, Fenwal Laboratories Division of Travenol Laboratories Inc., Deerfield USA / Travenol GmbH München) auf exakt 36.7° C erhitzt. Mit einer Spülflüssigkeitspumpe

(Ismatec mp-4, Ismatec SA, Zürich, Schweiz) wurde dann die Natriumchloridlösung kontinuierlich auf die Leberoberfläche geträufelt.

Die Bilder des Versuches wurden durch eine CCD-Kamera (Charge Coupled Device, Piper FK 6990, Piper GmbH, Düsseldorf/Schwerte) geliefert, die über einen C-Mount Adapter im Strahlengang eingebaut war. Die Aufzeichnung der Bilder erfolgte mit einem S-VHS Videorekorder (Panasonic S-VHS 625 Video Kassette Recorder NV-FS1 HQ, Power Consumption, Matsushita Electric Industrial Co., LTD., Japan). Dabei wurde zur exakten Auswertung ein Echtzeitgenerator (FORA Video Timer, Modell VTG 33, FORA Company Limited, Japan, 220 V, 50/60 Hz, 0.06 Ampere) mit 1/100 Sekundenauflösung zwischengeschaltet. Diese Zeitzählung lief dann in den aufgenommenen Bildern mit. Durch eine zusätzliche Verbindung zu einem Video Monitor (JVC-Modell TM-122(EG)) konnten die Bildaufnahmen zeitgleich mitverfolgt und dadurch exakt gesteuert werden.

Ablauf

Randomisiert wurden zuerst fünf unterschiedliche Leberläppchen eingestellt. Im Bildausschnitt zeigte sich dabei ein Periportalfeld mit korrespondierender Zentralvene. Anschließend erfolgte gleichermaßen die Darstellung von fünf Zentralvenen im Längsdurchmesser. Die Aufnahmedauer betrug jeweils mindestens 30 Sekunden, wobei die Zeitmessung und Aufnahme nach Injektion des Färbemittels gestartet wurde. Zur Markierung der Leukozyten wurde den Ratten vor jeder Aufnahme 0.1 Milliliter Acridin Orange-Lösung über die Vena jugularis dextra injiziert. Dadurch erschienen die angefärbten Leukozyten kurz nach der Verabreichung als fluoreszierender Punkt auf dem Bildschirm. Aufgrund der Eigenschaft der Leukozyten, den Fluoreszenzfarbstoff nach einer gewissen Zeit wieder abzugeben, kam es zu einer stetigen Zunahme der Helligkeit. Der Grund liegt in der Diffusion von Acridin Orange in die Hepatozyten. Ein Ausgleich konnte durch Anpassen der Kameraempfindlichkeit und durch Zwischenschaltung der Graufilter erreicht werden.

Im Anschluss an diese Bildersequenzen schlossen sich fünf Aufnahmen von quergetroffenen Zentralvenen mit einmündenden Sinusoiden an. Die Aufnahmezeit betrug dabei um fünf Sekunden.

4.5 Auswertung

4.5.1 Auswertungseinheit

Wie in Abbildung 8 zu erkennen, enthielt die Auswertungseinheit einen computersteuerbaren Videorekorder (Panasonic Fs 1, AG 7355, Bild-für-Bild Analyse mit einer Bildfolge von 20 Millisekunden), der zur visuellen Bild-Auswertung an einen Monitor (JVC, Colour Video Monitor TM 210 PS) angeschlossen war. Zur digitalen Bildanalyse bestand eine Vernetzung des Videorekorders mit einem Personal-Computer (PC), welcher wiederum mit einem Monitor verbunden war. Angeschlossen an den Personal-Computer fand sich ein Grafiktablett.

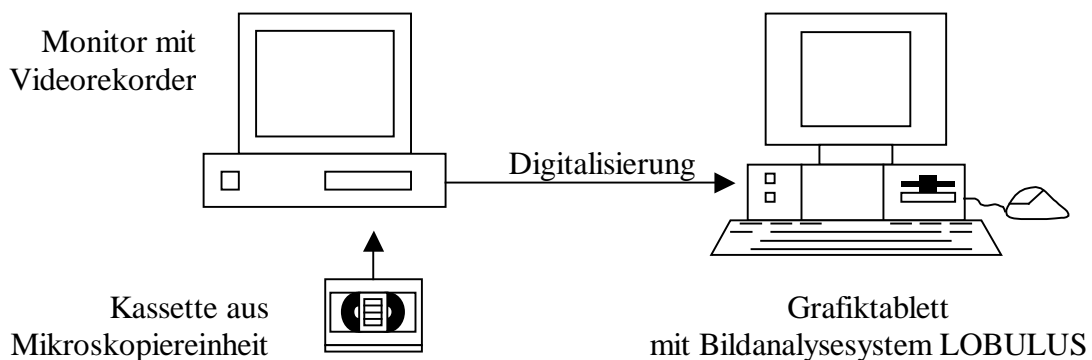


Abbildung 8: Auswerteeinheit

Zur Digitalisierung der auf der S-VHS Kasette aufgezeichneten Bildersequenzen der Intravitalfluoreszenzmikroskopie stand das computergestützte Bildverarbeitungsprogramm Lobulus (Medivis, Homburg) zur Verfügung. Dadurch wurden morphometrische Auswertungen anhand der Bilder ermöglicht.

4.5.2 Leukozyten - Endothel - Interaktion

Durch die selektive Bindung von Acridin Orange an Nukleinsäure erscheinen nur kernhaltige Leukozyten als fluoreszierende Partikel in der Intravitalmikroskopie (JAHANMEHR et al, 1987). Dadurch wurde eine bestmögliche Beobachtung und Beurteilbarkeit der Leukozyten-Endothel-Interaktion gewährleistet.

Leberläppchen mit Periportalfeld

RAPPAPORT (1958) untergliederte den Leberazinus nach anatomischen und funktionellen Aspekten. Zur Beurteilung des Adhäsionsverhalten der Leukozyten zogen wir das Azinzuskonzept von RAPPAPORT (1958) als Einteilung heran. Dabei wurden der Leberarchitektur angepasste Schablonen entworfen, die durch Ihre ellipsoide Form am besten den Verlauf der Sinusoide in einem Läppchenumfeld wiedergaben. Mit dieser Schablone konnte somit ein Sechstel des Leberläppchens erfasst werden. Aufgrund der unterschiedlichen Ausdehnungen der Leberläppchen wurden mehrere Größen angefertigt. Die Auswertung erfolgte dann durch Aufkleben der Schablone mit Klebestreifen an den Videomonitor. Durch Drittelung des Abstandes zwischen Zentralvene und Mittelpunkt des Zentralfeldes führten wir eine sublobuläre Unterteilung des ovalären Auswertungsfeldes durch. Die entstandenen Bereiche wurden als periportales, midzonales und perizentrales Feld bezeichnet. Dabei verhielten sich die Flächeninhalte wie 1 : 1.4 : 1.

Zentralvene

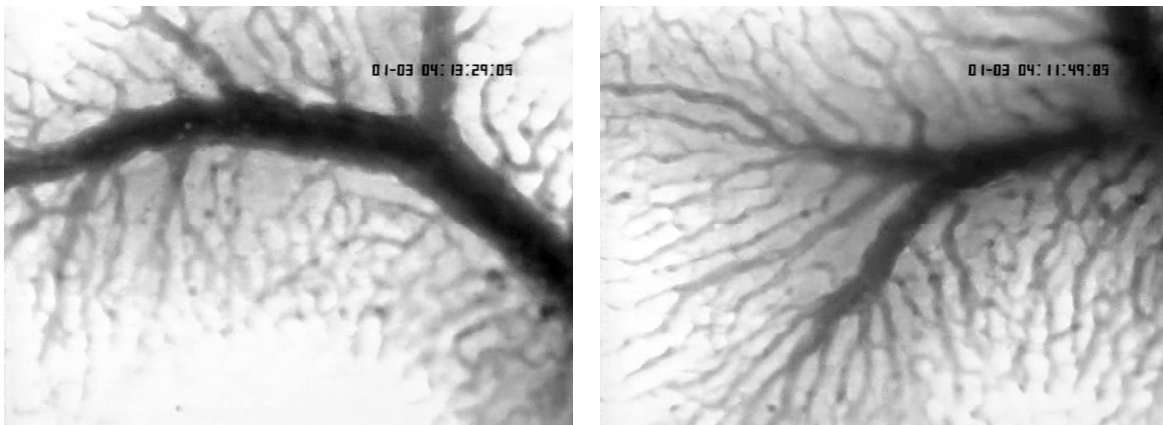


Abbildung 9 : Intravitalmikroskopische Beispiele von Zentralvenen

Zur Beurteilung der Adhärenzen in der Zentralvene (siehe Abbildung 9) wurde ein gewisser Abschnitt der längs angeschnittenen Zentralvene beobachtet. Eine entsprechende Schablone mit einer geraden Strecke von 10 cm wurde angefertigt.

Folgende Größen waren bei der Auswertung von Interesse (MARZI et al, 1993):

Anzahl der frei fließende Leukozyten

Die Zahl der frei fließenden Leukozyten beinhaltet sämtliche Leukozyten, die während des Beobachtungszeitraums das zu untersuchende Schablonenfeld passieren oder sich in diesem aufhalten, ohne eine erkennbare Adhäsion zu zeigen.

Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten

Als temporär adhärenent werden diejenigen Leukozyten bezeichnet, die mindestens 200 Millisekunden (0,2 Sekunden) aber weniger als 20 Sekunden am Endothel der Sinusoide haften bleiben. (siehe Abbildung 10)

Anzahl der permanent adhärenenten Leukozyten

Eine permanente Adhärenz im Lebersinusoid ist definiert als eine feste Haftung am Endothel mit einer Dauer von mindestens 20 Sekunden.

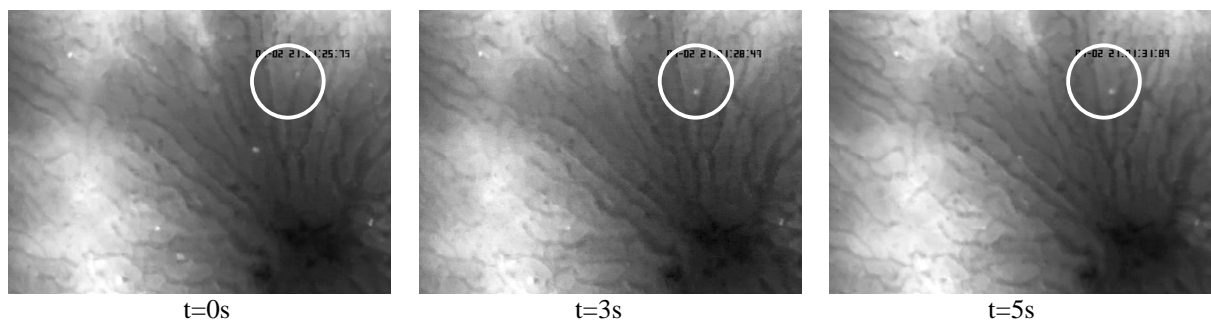


Abbildung 10 : Intravitalmikroskopisches Beispiel für das Eingehen einer adhärenenten Bindung durch einen Leukozyten (gekennzeichnet mit weißem Kreis) im Lobulus

Adhäsionsquotient

Die adhärenenten Leukozyten werden für Ihre jeweilige Adhäsionsart in Relation zu den insgesamt passierten Leukozyten gesetzt. Es ergibt sich somit ein prozentualer Anteil.

Mittlere Adhärenzzeit (MAT)

Die mittlere Adhärenzzeit berechnet sich aus den Mittelwerten der Adhärenzzeiten entweder der temporär adhärenenten oder der dauerhaft adhärenenten Leukozyten.

Slow rolling Leukozyts (SRL)

Als SRL werden in der Zentralvene solche Leukozyten bezeichnet, die optisch an der Gefäßwand entlang rollen (siehe Abbildung 11) und sich somit mit einer Geschwindigkeit von weniger als 10 % des maximalen Flusses bewegen (SCHMID-SCHÖNBEIN et al, 1991).

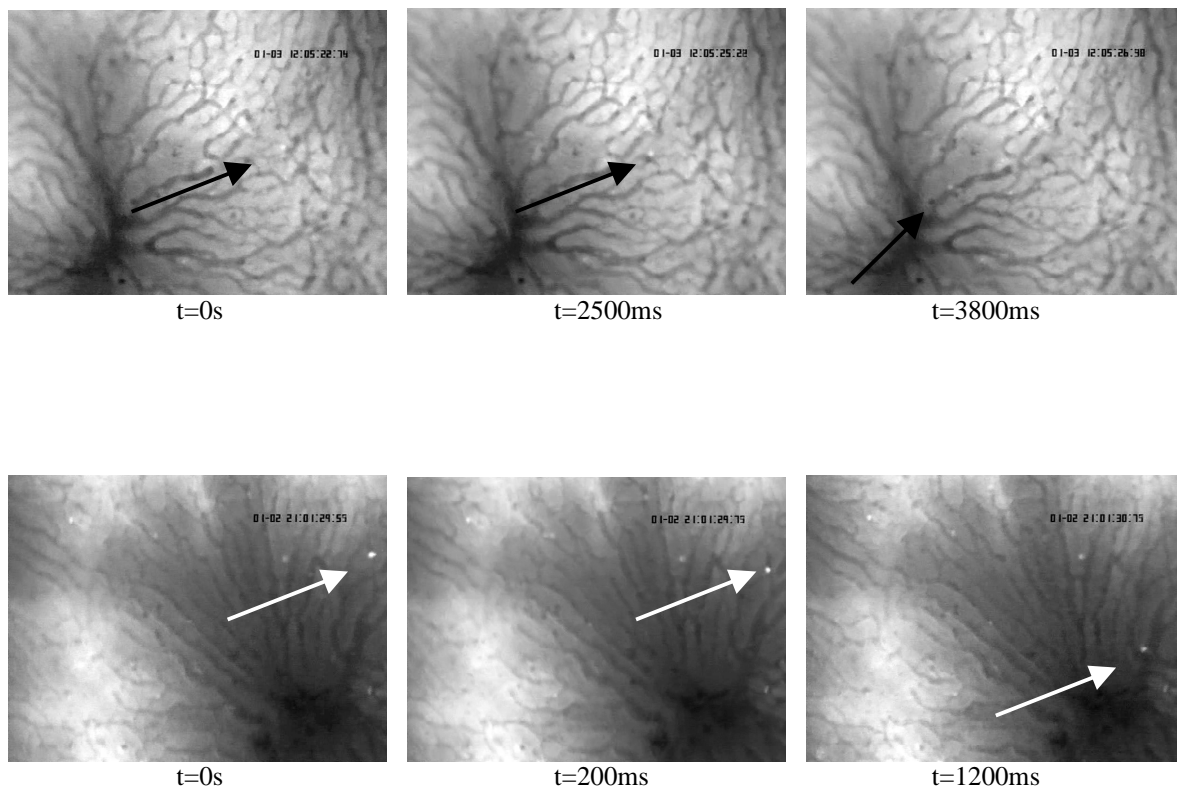


Abbildung 11 : Intravitalmikroskopische Bilder eines Slow rolling Leukozyten (gekennzeichnet mit schwarzem und weißem Pfeil) im Lobulus

4.5.3 Leukozytenfluss

Zur Untersuchung des Leukozytenflusses wurde das computerunterstützte Bildverarbeitungsverfahren benötigt. Als Bildmaterial standen die jeweils 30 Sekunden dauernden Aufnahmen der fünf unterschiedlichen Leberläppchen zur Verfügung. Durch die Darstellung einer Zentralvene mit zugehörigem Periportalfeld im Bildausschnitt konnte der gesamte Flussweg eines angefärbten Leukozyten beobachtet werden.

Nicht jeder markierte Leukozyt konnte zur Bestimmung des Leukozytenflusses herangezogen werden. Vielmehr mussten folgende Kriterien erfüllt sein:

Es wurden nur diejenigen Leukozyten vermessen, die einen geradlinigen Verlauf im Sinusoid aufwiesen, und dabei keine Adhäsion mit dem Gefäßendothel eingingen.

Leukozytengeschwindigkeit

Zur Messung der Leukozytengeschwindigkeit wurde jeweils ein Bild mit der Anfangs- und der Endposition desselben Leukozyten digitalisiert. Dabei wurde die Atemverschieblichkeit des Bildes durch einen Atemausgleich berücksichtigt. Durch die Messung der zurückgelegten Strecke in einer entsprechenden Zeit konnte dann die Geschwindigkeit v nach unten genannter Formel bestimmt werden.

In jedem Leberläppchen wurden die Geschwindigkeiten von mindestens 5 verschiedenen Leukozyten berechnet.

Leukozytenfluß

Der Leukozytenfluß stellt näherungsweise ein Maß für die sinusoidale Perfusion dar.

Zur Berechnung muss zusätzlich zur Leukozytengeschwindigkeit der Durchmesser des durchflossenen Sinusoids bestimmt werden. Dabei wurde nach dem gleichen Prinzip wie zur Bestimmung der Sinusoidweite der Abstand zwischen den gegenüberliegenden Gefäßendothelien als Strecke vermessen.

Der Leukozytenfluß berechnet sich damit wie folgt:

$$\text{Leukozytenfluß} = \frac{\pi \cdot v \cdot d^2}{4}, \quad \text{wobei } v = \frac{s}{t}$$

mit v der Geschwindigkeit, d dem Durchmesser des Sinusoids, s der zurückgelegten Strecke des Leukozyten und t der für die Strecke s benötigten Zeit.

4.5.4 Messung der Sinusoidweite

Zur Messung der Sinusoidweite fanden die jeweils fünf Sekunden dauernden Aufnahmen der quergetroffenen Zentralvenen mit umgebenem Periportalfeld Verwendung (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13). Je Einstellung wurde das jeweils schärfste Bild digitalisiert, insgesamt fünf Messungen pro Tierexperiment. Über vielfältige, prozessgesteuerte Operatoren wie Skalierung, Helligkeitsregulierung oder Linearisierung wurde eine Kontrastverstärkung mit Hilfe des computerunterstützten Bildverarbeitungsverfahrens erreicht.

Auswertung:

In 90 µm Abstand zur Zentralvene wurden alle Sinusoide ausgemessen, welche keine Aufzweigungen oder Einmündungen anderer Sinusoide in unmittelbarer Nähe aufwiesen. Die Messung der Sinusoidweite erfolgte standardisiert nach lotgerechter (von einer Endothelwand des Sinusoids zur Gegenüberliegenden) Einzeichnung der Strecke.

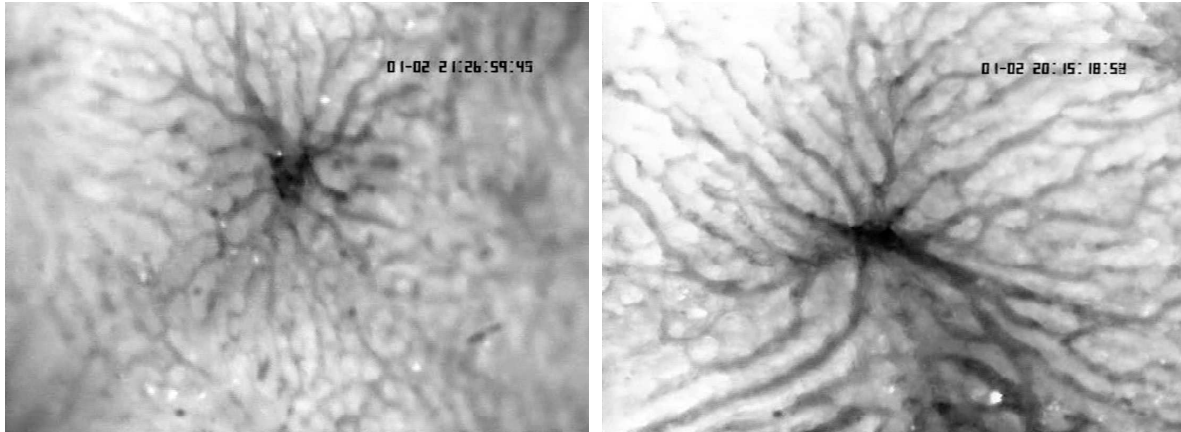


Abbildung 12 : Intravitalmikroskopische Bilder einer quergetroffenen Zentralvene mit Periportalfeld bei Tieren der NaCl-Gruppe mit septischem Schock

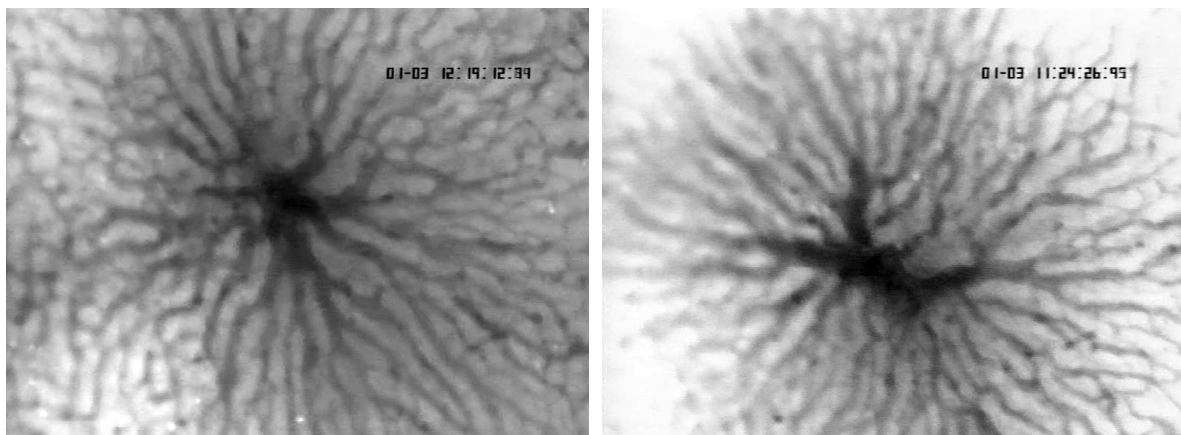


Abbildung 13: Intravitalmikroskopische Bilder einer quergetroffenen Zentralvene mit Periportalfeld bei Tieren ohne septischen Schock (Nicht Schock-Gruppe)

4.5.5 Perfundierte Sinusoide

Der Perfusionsindex beschreibt den prozentualen Anteil der mit Blut durchflossenen Sinusoide im Bezug zur Gesamtzahl der erkennbaren Sinusoide.

Zur Bestimmung des Perfusionsindexes wurden dabei die jeweils fünf Sekunden dauernden Aufnahmen der quergetroffenen Zentralvenen mit umgebenen Periportalfeld herangezogen. In den Abbildung 12 und Abbildung 13 sind exemplarisch Tiere ohne und mit septischen Schock zum Vergleich dargestellt.

Der Perfusionsindex lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$PI = \text{Anzahl perfundierter Sinusoide} / \text{Gesamtzahl der erkennbaren Sinusoiden}$$

4.6 Statistik

Die erhobenen Messdaten wurden zwischen den einzelnen Gruppen verglichen.

Zunächst erfolgte die Prüfung der Messergebnisse auf eine Normalverteilung.

Stellte sich eine parametrische Verteilung dar, so wurde zwischen un- und verbundenen Stichproben unterschieden.

Zur Prüfung mehrerer unverbundenen Stichproben auf einen signifikanten Unterschied kam der One-Way-ANOVA-Test zur Anwendung, eine paarweise Kontrolluntersuchung erfolgte mit dem Student-Newmann-Keuls- oder dem Turkey-Test. Wurde ein unverbundenes Stichprobenpaar miteinander verglichen, so kam der t-Test zur Anwendung.

Zur Testung von verbundenen Stichproben benutzten wir den paired t-Test. .

Stellt sich eine nicht- parametrische Verteilung dar, so wurde ebenfalls zwischen un- und verbundenen Stichproben unterschieden.

Zur Prüfung mehrerer unverbundenen Stichproben auf eine Signifikanz kam der Kruskal-Wallis One-Way-ANOVA Ranks Test zur Anwendung, eine paarweise Kontrolluntersuchung erfolgte mit dem Dunns Test. Wurde ein unverbundenes Stichprobenpaar miteinander verglichen, so kam der Mann-Whitney Rank Sum Test zur Anwendung.

Zur Testung von verbundenen Stichproben benutzten wir den Wilcoxon Signed Rank Test.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0.05$ festgelegt.

Die Ergebnisse der Auswertung in den vorliegenden Tabellen und Grafiken wurden als Mittelwerte und dem dazugehörigen Standardfehler des Mittelwerts, dem sogenannte SEM (Standard Error of the Mean), angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Hämodynamik und Laborparameter

5.1.1 Mittlerer arterieller Druck

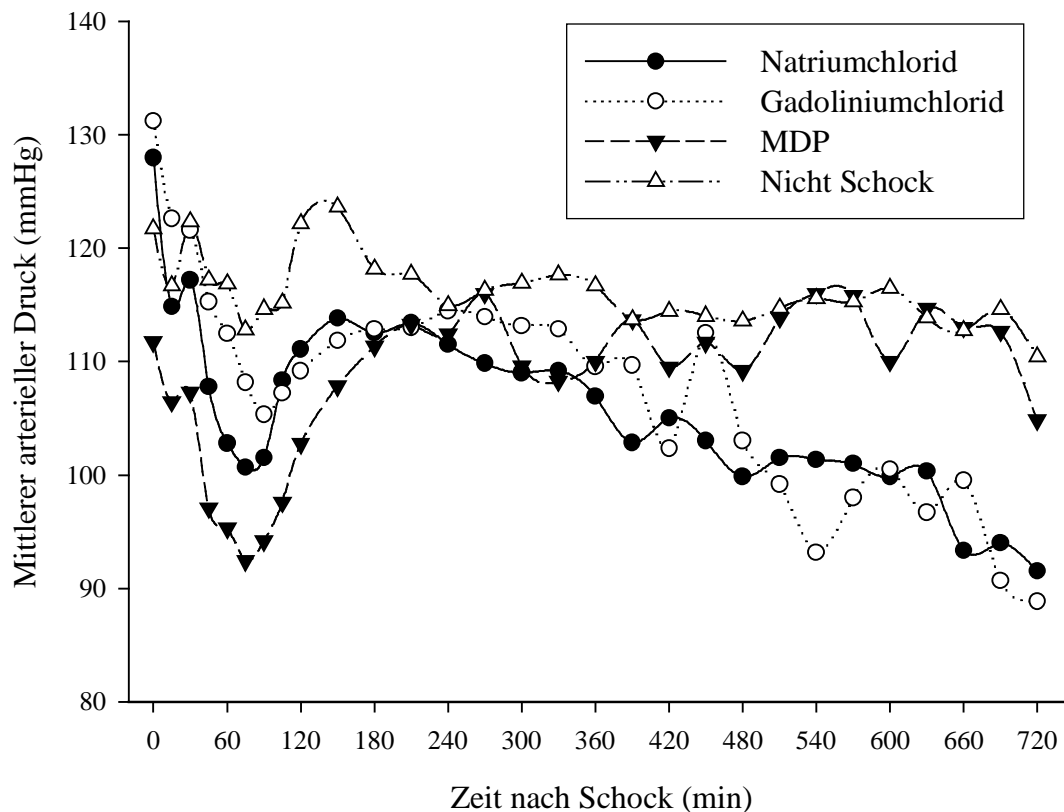


Abbildung 14: Mittlerer arterieller Blutdruck

In den Schockgruppen zeigte sich unmittelbar nach Endotoxingabe ein signifikanter Blutdruckabfall (siehe Abbildung 14). Nach drei Stunden wurde wieder der Ausgangswert erreicht. Im weiteren Verlauf fiel ein Blutdruckunterschied mit tendenziell höheren Werten in der MDP-Gruppe im Vergleich zur NaCl- als auch zur GdCl₃-Gruppe auf. Eine Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt der Intravitalmikroskopie lagen vergleichbare hämodynamische Verhältnisse vor.

5.1.2 Herzfrequenz

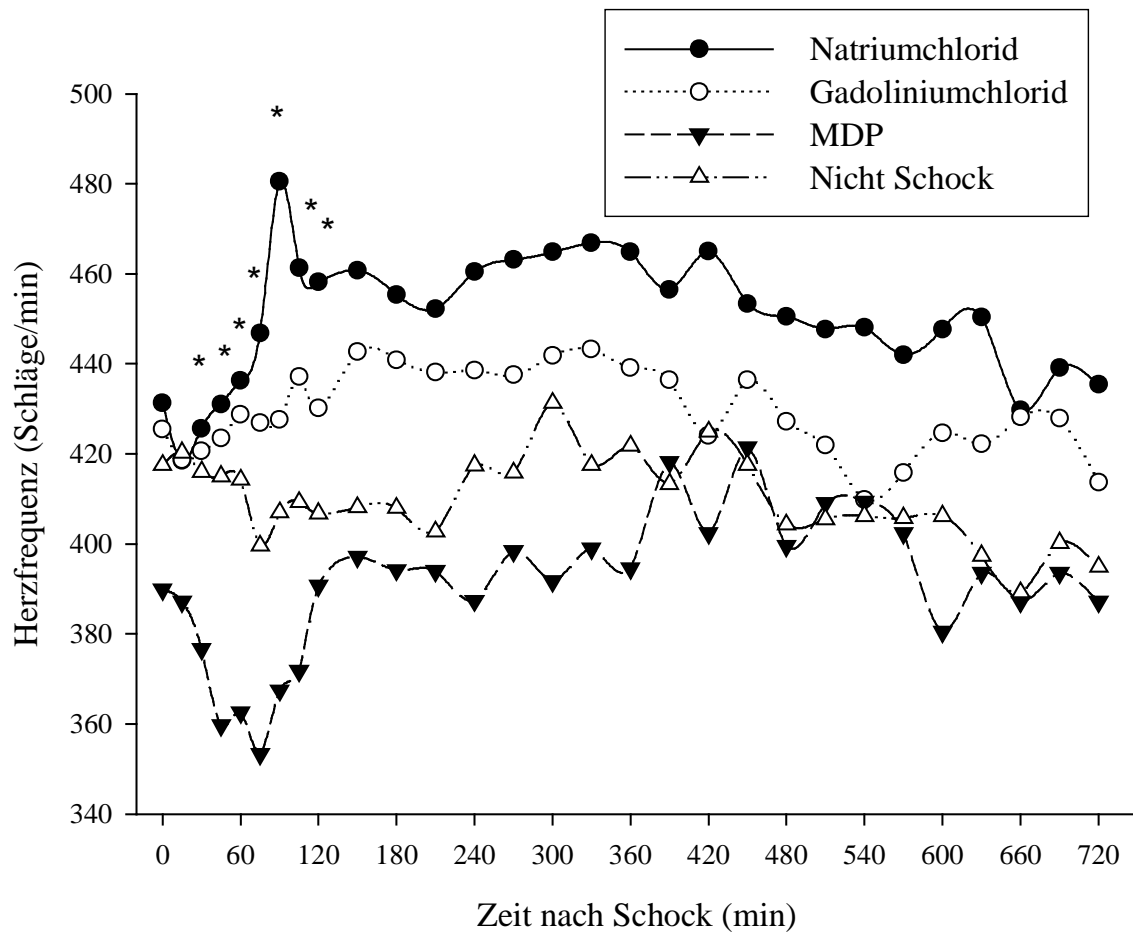


Abbildung 15: Herzfrequenz. * $p < 0.05$ vs. MDP

Wie in Abbildung 15 zu erkennen, kam es in der NaCl-Gruppe nach Endotoxingabe zu einem massiven Anstieg der Herzfrequenz, welche sich nach zwei Stunden auf dem höchsten Herzfrequenzniveau aller Gruppen einpendelte. In der MDP-Gruppe zeigte sich ein entgegengesetzter Verlauf. Unmittelbar nach Endotoxingabe wurde eine Abnahme der Herzfrequenz gemessen, welche sich im weiteren Verlauf stellenweise auf das Niveau der Nicht Schock-Gruppe steigerte. Die MDP-Gruppe stellte die Gruppe mit den niedrigsten Herzfrequenzen.

Aufgrund der Veränderungen der Herzfrequenz nach Endotoxininjektion ergaben sich für die ersten zwei Stunden signifikante Unterschiede zwischen der NaCl-Gruppe und MDP-Gruppe.

5.1.3 Der Säure-Base-Haushalt und Sauerstoffpartialdruck

Der Säure-Base-Haushalt wird mit den wichtigsten Parametern besprochen:

pH-Wert und pO₂

Zwischen den einzelnen Gruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (siehe Tabelle 2 und Tabelle 3).

Tabelle 2: pH-Wert

Zeitpunkt (h)	Nicht Schock		Natriumchlorid		Gadoliniumchlorid		MDP	
	Mittelwert	Std.fehler	Mittelwert	Std.fehler	Mittelwert	Std.fehler	Mittelwert	Std.fehler
0	7,39	0,01	7,39	0,01	7,39	0,01	7,36	0,01
1	7,43	0,02	7,44	0,01	7,41	0,01	7,35	0,02
6	7,48	0,01	7,51	0,01	7,48	0,02	7,45	0,01
12	7,47	0,02	7,43	0,02	7,46	0,02	7,48	0,02

Tabelle 3: pO₂

Zeitpunkt (h)	Nicht Schock		Natriumchlorid		Gadoliniumchlorid		MDP	
	Mittelwert mmHg	Std.fehler	Mittelwert mmHg	Std.fehler	Mittelwert mmHg	Std.fehler	Mittelwert mmHg	Std.fehler
0	67,9	2,3	69,9	2,2	72,7	3,3	65,7	2,6
1	80,5	2,9	83,0	2,2	87,5	3,4	76,4	3,9
6	79,2	2,3	77,3	2,9	84,0	4,5	77,1	3,3
12	75,2	4,8	88,1	3,6	77,0	4,7	82,7	4,9

Standardbikarbonat und Base Exzess

In der MDP-Gruppe wurden erhöhte und in der NaCl-Gruppe verminderte Standardbikarbonatwerte mit zunehmender Schockdauer gemessen (siehe Tabelle 4). Es ergaben sich signifikante Unterschiede zum Zeitpunkt 6 h zwischen der NaCl- und MDP-Gruppe und zum

Tabelle 4: Standardbikarbonat. * p<0.05 vs. MDP. + p<0.05 vs. Nicht Schock

Zeitpunkt (h)	Nicht Schock		Natriumchlorid		Gadoliniumchlorid		MDP	
	Mittelwert mmol/l	Std.fehler	Mittelwert mmol/l	Std.fehler	Mittelwert mmol/l	Std.fehler	Mittelwert mmol/l	Std.fehler
0	26,6	0,5	26,0	0,6	27,0	0,6	27,2	0,4
1	25,9	0,7	23,6	0,9	24,4	0,5	25,6	0,6
6	25,7	0,6	*24,1	0,5	23,5	1,4	28,1	0,9
12	26,9	1,1	*+21,1	1,5	24,7	2,0	28,2	0,8

Zeitpunkt 12 h zwischen der NaCl-Gruppe im Vergleich mit der MDP- und GdCl₃-Gruppe.

Sowohl in der GdCl₃- als auch in der Nicht Schock-Gruppe wurden Normwerte gemessen, wobei in der GdCl₃-Gruppe der Basenüberschuss mit zunehmender Schockdauer abnahm (siehe Tabelle 5). Einen ähnlichen, aber ausgeprägteren Verlauf präsentierte die NaCl-Gruppe mit Umkehrung eines anfänglichen Basenüberschusses (2.1 mmol/l) in ein Basendefizit (-4.3 mmol/l). In der MDP-Gruppe lag zu allen Zeitpunkten die Werte über dem Normbereich (-2 bis +2 mmol/l). Signifikante Differenzen ergaben sich zum Zeitpunkt 6 h zwischen der NaCl- und der MDP-Gruppe sowie zum Zeitpunkt 12 h zwischen der NaCl-Gruppe im Vergleich zur MDP- und Nicht Schock-Gruppe.

Tabelle 5: Base Excess. * p<0.05 vs. MDP. + p<0.05 vs. Nicht Schock

Zeitpunkt (h)	Nicht Schock		Natriumchlorid		Gadoliniumchlorid		MDP	
	Mittelwert mmol/l	Std.fehler	Mittelwert mmol/l	Std.fehler	Mittelwert mmol/l	Std.fehler	Mittelwert mmol/l	Std.fehler
0	2,7	0,7	2,1	0,8	3,0	0,8	4,4	0,6
1	1,2	0,9	-0,6	0,9	0,4	0,6	2,2	0,9
6	1,2	0,9	*-0,3	0,6	-0,5	1,5	4,5	1,1
12	2,8	1,5	*+4,3	1,8	0,4	2,4	4,3	1,1

pCO₂

Auffällig war, dass der gemessene Kohlendioxidpartialdruck in der NaCl-Gruppe zu allen Zeitpunkten den niedrigsten Wert aller Gruppen annahm (siehe Tabelle 6). Dabei fiel der Wert ab dem Zeitpunkt 6 h in den hypokapnischen Bereich ab. In den restlichen Gruppen lagen die pCO₂-Wert bis auf den Zeitpunkt 1 h sowie zum Zeitpunkt 6 h für die MDP-Gruppe mit Nachweis einer leichten Hyperkapnie im Normbereich (32-46 mmHg).

Eine Signifikanz ergab sich zwischen der NaCl- und MDP-Gruppe zu allen Zeitpunkten.

Tabelle 6: pCO₂. * p<0.05 vs. MDP

Zeitpunkt (h)	Nicht Schock		Natriumchlorid		Gadoliniumchlorid		MDP	
	Mittelwert mmHg	Std.fehler	Mittelwert mmHg	Std.fehler	Mittelwert mmHg	Std.fehler	Mittelwert mmHg	Std.fehler
0	46,6	1,6	*45,6	2,1	47,1	2,4	54,5	2,6
1	40,2	2,4	*34,8	1,8	39,7	2,5	52,3	3,2
6	33,6	2,1	*28,8	1,4	32,1	3,4	41,8	2,0
12	38,9	3,1	*29,4	3,1	33,5	3,3	39,6	3,3

5.1.4 Blutbild

Die Blutbildveränderungen werden im Einzelnen besprochen:

Hb-Wert

Bis auf die Nicht Schock-Gruppe nahm der Hb-Wert in den Schockgruppen kontinuierlich mit zunehmender Schockdauer ab (siehe Tabelle 7). Dabei wurde in der NaCl-Gruppe zum Zeitpunkt 12 h der niedrigste Werte gemessen.

Ein signifikanter Unterschied ergab sich zwischen der Nicht Schock- und der NaCl-Gruppe zum Zeitpunkt 6 h und 12 h.

Tabelle 7: Hb-Wert. + p<0.05 vs. Nicht Schock

Zeitpunkt (h)	Nicht Schock		Natriumchlorid		Gadoliniumchlorid		MDP	
	Mittelwert g/dl	Std.fehler	Mittelwert g/dl	Std.fehler	Mittelwert g/dl	Std.fehler	Mittelwert g/dl	Std.fehler
0	13,9	0,3	13,7	0,2	13,7	0,4	14,8	0,2
1	13,2	0,2	12,7	0,3	13,0	0,4	13,3	0,2
6	12,9	0,4	+11,3	0,4	10,6	0,4	12,0	0,2
12	13,0	0,5	+10,2	0,8	10,6	0,7	12,1	0,5

Leukozyten

In allen Gruppen nahm die Leukozytenzahl nach einer Stunde ab (siehe Tabelle 8). Dabei fiel die Reduktion in den Schockgruppen am Ausgeprägtesten aus. Mit zunehmender Schockdauer stiegen in allen Gruppen die Leukozytenzahlen wieder an. Auffällig war, dass die größte Leukozytenschwankung in der MDP-Gruppe gemessen wurde.

Ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich zwischen der Nicht Schock- und der NaCl-Gruppe zum Zeitpunkt 1 h und 6 h.

Tabelle 8: Leukozyten. + p<0.05 vs. Nicht Schock

Zeitpunkt (h)	Nicht Schock		Natriumchlorid		Gadoliniumchlorid		MDP	
	Mittelwert 1/nl	Std.fehler	Mittelwert 1/nl	Std.fehler	Mittelwert 1/nl	Std.fehler	Mittelwert 1/nl	Std.fehler
0	7,1	0,4	7,2	0,6	7,1	1,2	6,5	0,4
1	6,7	0,5	+4,6	0,7	4,2	0,8	3,8	0,3
6	10,6	1,0	+6,9	0,9	6,8	0,6	8,8	0,5
12	12,4	3,7	10,2	3,7	8,3	0,9	11,8	1,4

Thrombozyten

In allen Gruppen wurde eine stetige Abnahme der Thrombozytenanzahl mit zunehmender Schockdauer festgestellt (siehe Tabelle 9). Auffällig war das unterschiedliche Ausmaß der Reduktion: In der NaCl-Gruppe wurden um 255 bis 350 Thrombozyten/nl je Zeitpunkt weniger gemessen. In der GdCl₃-Gruppe nahmen die Thrombozyten an jedem Zeitpunkt zwischen 61 bis 330/nl ab. In der MDP-Gruppe reduzierte sich die Thrombozytenanzahl um 90 Thrombozyten/nl je Zeitpunkt.

Tabelle 9: Thrombozyten. + p<0.05 vs. Nicht Schock. * p<0.05 vs. GdCl₃ (Zeitpunkt 6 h) und vs. MDP

Zeitpunkt (h)	Nicht Schock		Natriumchlorid		Gadoliniumchlorid		MDP	
	Mittelwert 1/nl	Std.fehler	Mittelwert 1/nl	Std.fehler	Mittelwert 1/nl	Std.fehler	Mittelwert 1/nl	Std.fehler
0	890	30	776	58	849	34	932	32
1	791	43	796	58	788	45	843	39
6	748	40	*+443	45	453	50	784	28
12	699	58	*+186	48	378	54	692	59

Zu jedem Zeitpunkt wurde die geringste Thrombozytenanzahl in der NaCl-Gruppe gemessen, während die MDP-Gruppe die jeweils höchste Thrombozytenanzahl aufwies.

Aufgrund der deutlichen Unterschiede konnten signifikante Differenzen zum Zeitpunkt 6 h zwischen der NaCl- und der MDP- als auch zur Nicht Schock-Gruppe sowie zum Zeitpunkt 12 h zwischen der NaCl- und den restlichen Gruppen gefunden werden.

5.2 Intravitalmikroskopische Parameter

Die Intravitalmikroskopie der Leber in Verbindung mit der computergestützten Auswerteeinheit bietet die Möglichkeit, die durch den septischen Schock bedingten Alterationen in der Leber zu erfassen. Dabei können während des Mikroskopiervorganges der Leberlobuli sowie der Zentralvenen die verschiedenen, schockinduzierten Veränderungen beobachtet und morphologisch gemessen werden.

Zur Beurteilung der Mikrozirkulation stehen folgende Parameter nach standardisierter Auswertung zur Verfügung:

5.2.1 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Es folgt eine getrennte Betrachtung der Ergebnisse für die Leberlobuli und die Zentralvenen.

5.2.1.1 Leberläppchen

Feldverteilung

Die meisten Leukozyten-Endothel-Interaktionen fanden in allen Schockgruppen mit über 50% im midzonalen Feld statt. Die weiteren Leukozytenadhäsionen verteilten sich aber je nach Substanzgruppe unterschiedlich (siehe Abbildung 16, Abbildung 17):

Während in der NaCl-Gruppe mehr Leukozyten im Perizentralfeld als im Periportalfeld Endothelbindungen eingingen, fanden in der MDP-Gruppe der zweitstärkste Leukozytenkontakt mit dem Endothel im Periportalfeld anstatt im Perizentralfeld statt.

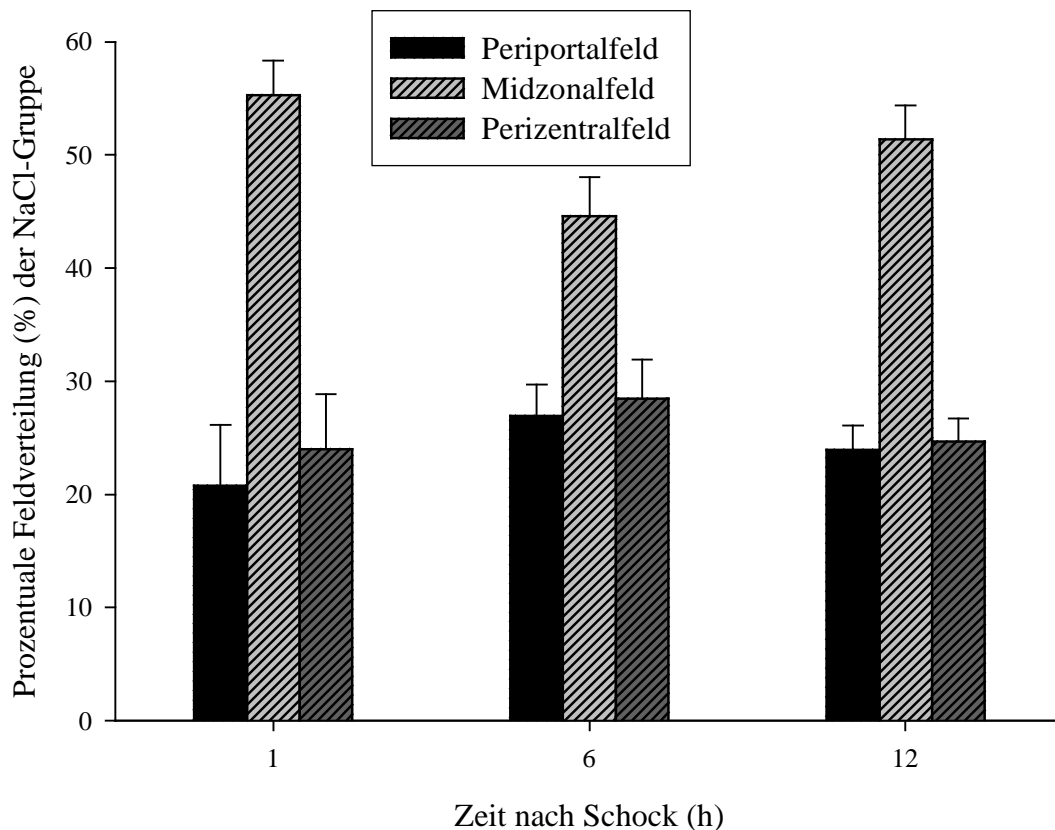


Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der Leukozytenadhärenzen im Bezug zur Lobulusaufteilung und im Bezug zur jeder Substanzgruppe

In der $GdCl_3$ -Gruppe wechselte die Leukozytenadhäsionsverteilung nach Schockdauer. Zum Zeitpunkt 1 h ließ sich eine der MDP-Gruppe vergleichbare Aufteilung aufzeigen. Zum Zeitpunkt 6 h und 12 h entsprach das Diagramm der Verteilung in der NaCl-Gruppe.

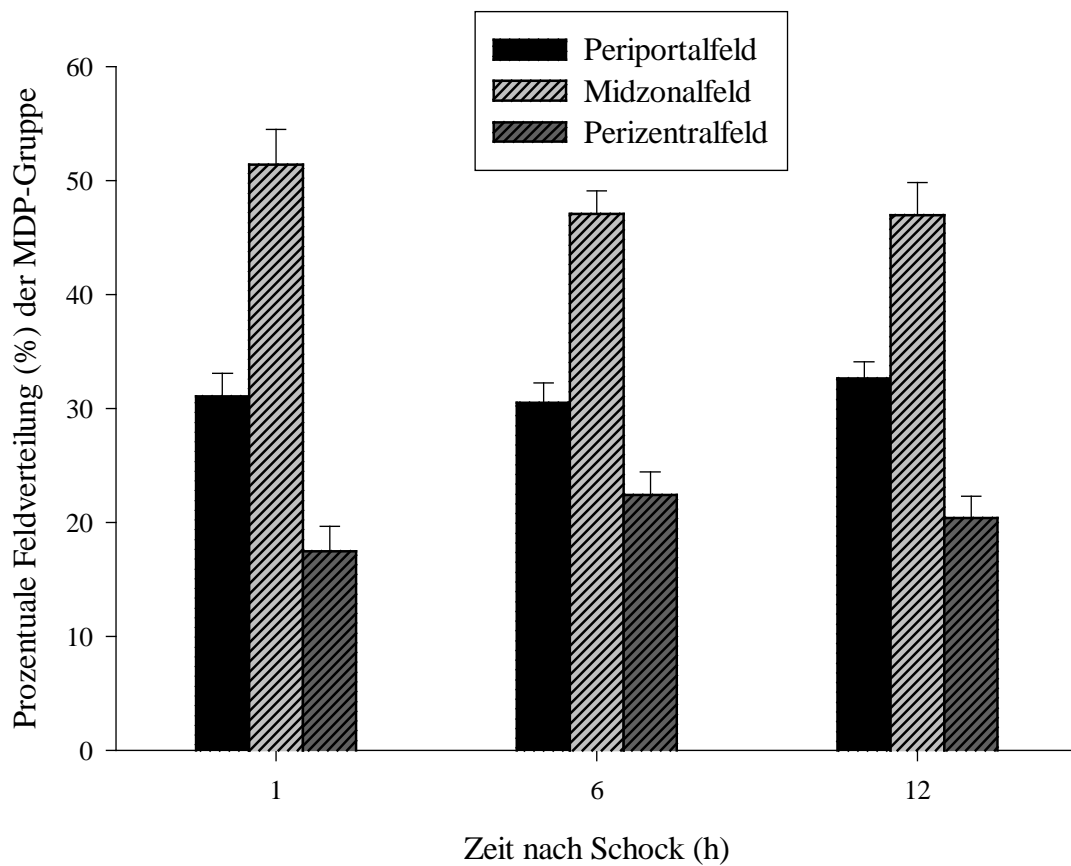
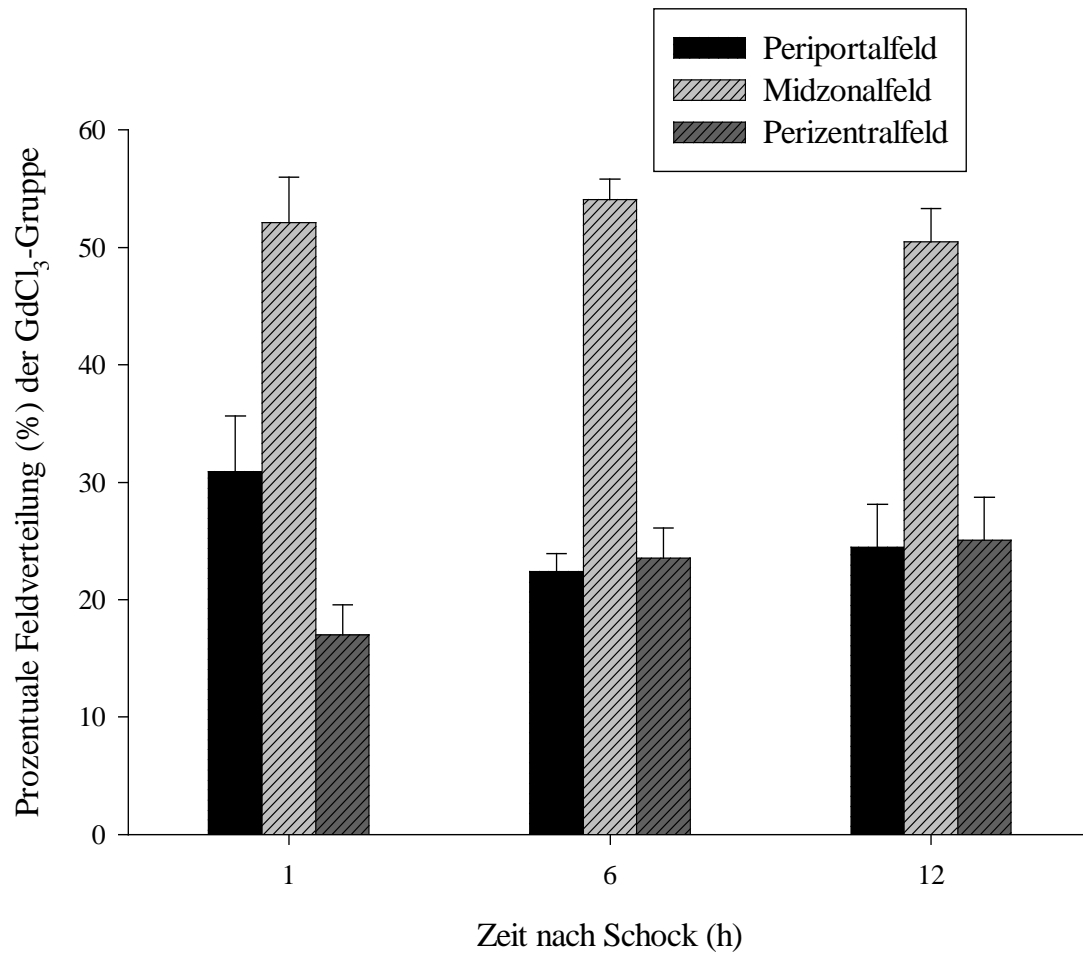


Abbildung 17: Prozentuale Verteilung der Leukozytenadhärenzen im Bezug zur Lobulusaufteilung und im Bezug zur jeder Substanzgruppe

Temporär adhärenente Leukozyten (TAL)

In allen Gruppen nahm der prozentuale Anteil an temporär adhärenenten Leukozyten stetig, aber vor allem zwischen dem Zeitpunkt 1 h und 6 h zu (siehe Abbildung 18). Während zum Zeitpunkt 1 h und 6 h die GdCl₃-Gruppe die meisten temporär adhärenenten Bindungen in Relation zur Gesamtleukozytenzahl aufwies, verzeichnete die MDP-Gruppe zum Zeitpunkt 12 h die größte prozentuale Anzahl an TAL.

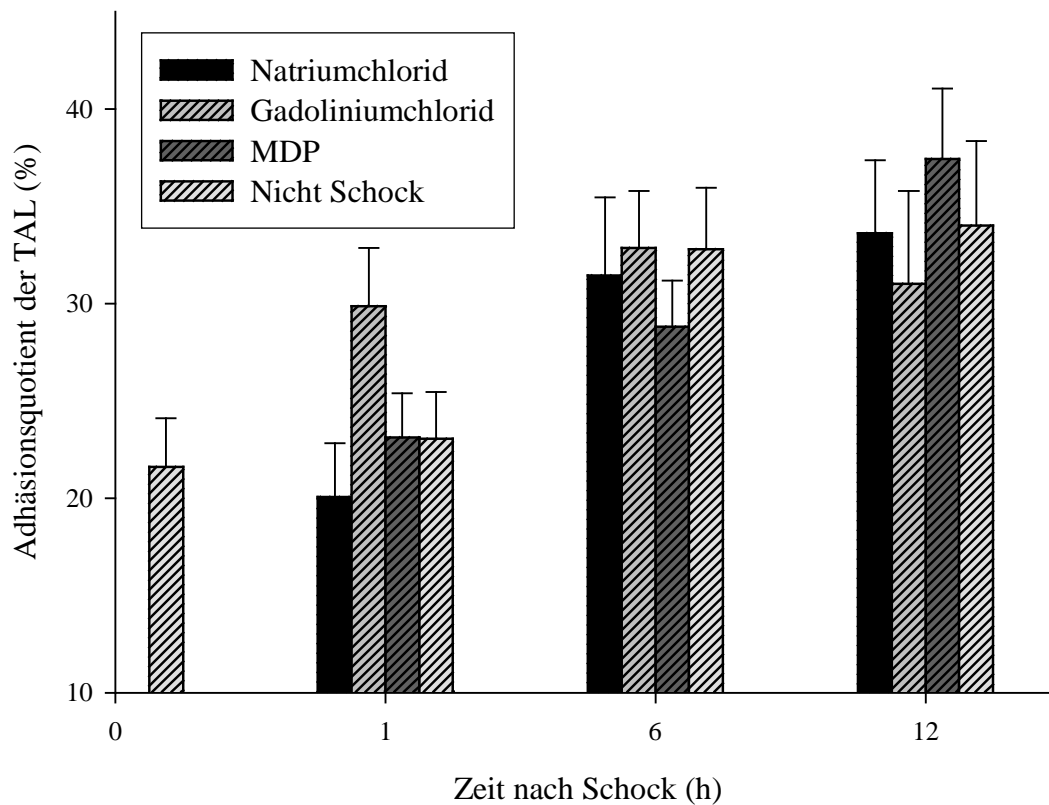


Abbildung 18: Adhäsionsquotient der temporär adhärenenten Leukozyten

Einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht festgehalten werden.

Mittlere Adhäsionszeit

Die mittleren Adhäsionszeiten der Nicht Schock-Gruppe zeigten sich während des Beobachtungszeitraums auf einem konstant tiefen Niveau.

Auffällig war, dass die mittleren Adhäsionszeiten in den Schockgruppen bereits zum Zeitpunkt 1 h den höchsten Wert annahmen (siehe Abbildung 19). Während in der NaCl-Gruppe dabei der Maximalwert aller Gruppen aufgestellt wurde, lagen die Adhäsionszeiten der MDP-Gruppe nur wenig über denen der Nicht Schock-Gruppe. Mit zunehmender Schockdauer reduzierten sich die mittleren Adhäsionszeiten in allen Schockgruppen auf das Niveau der Nicht Schock-Gruppe.

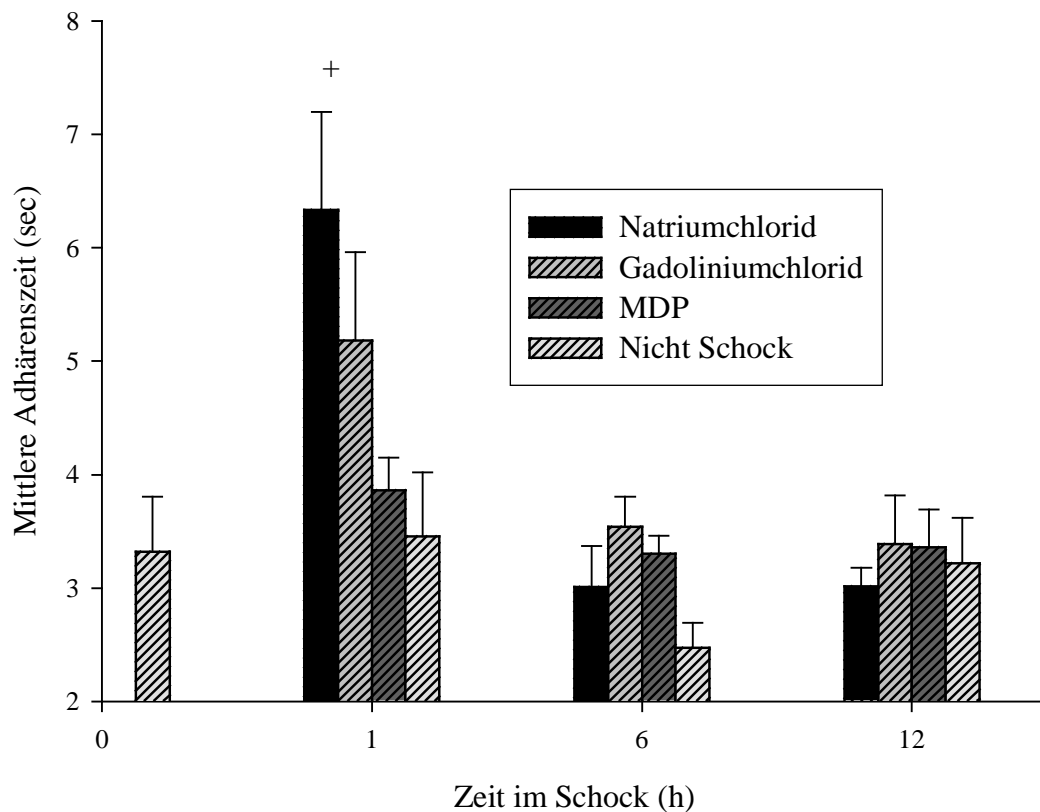


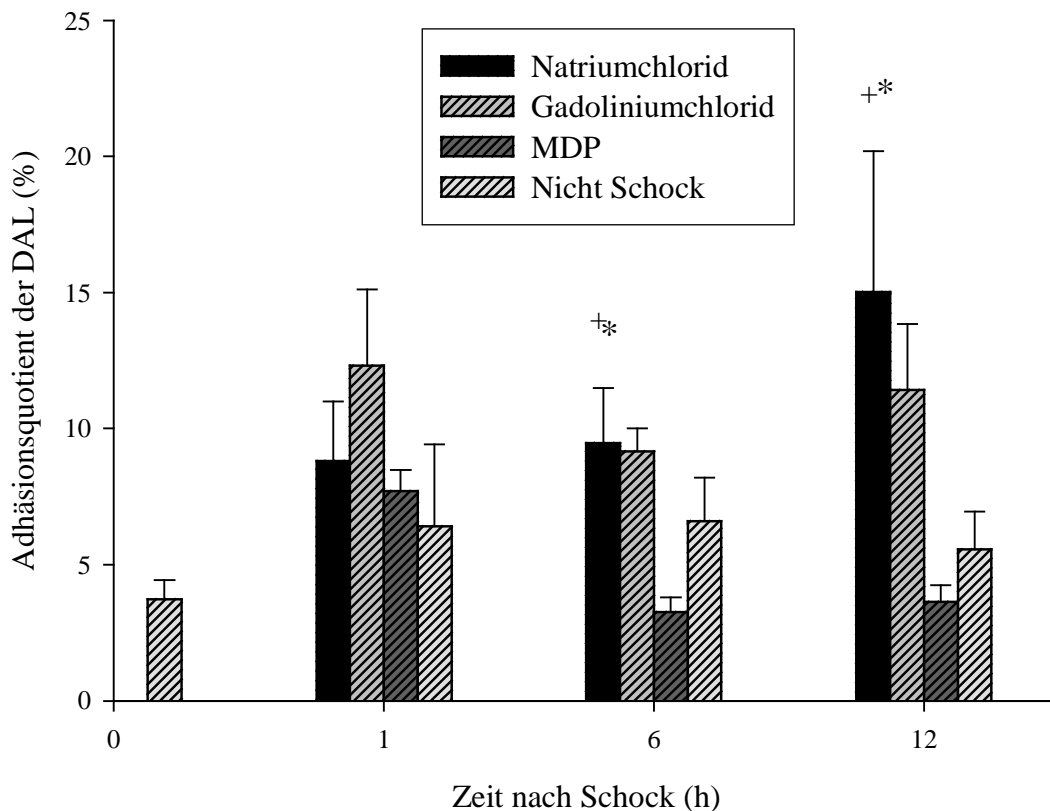
Abbildung 19: Mittlere Adhäsionszeit. + p=0.025 vs. Nicht Schock

Signifikante Unterschiede ergaben sich nur für den Zeitpunkt 1 h zwischen der NaCl- und der Nicht Schock-Gruppe.

Permanent adhärenente Leukozyten (DAL)

Sowohl die Nicht Schock- als auch die GdCl₃-Gruppe wiesen eine konstante prozentuale Verteilung mit nicht signifikanten Schwankungen auf (siehe Abbildung 20), wobei in der GdCl₃-Gruppe wesentlich mehr dauerhafte Endothelbindungen zu beobachten waren als in der Nicht Schock-Gruppe.

Während in der NaCl-Gruppe mit zunehmender Schockdauer eine stetige Zunahme an permanenten Adhärenzen gesehen wurden, gingen die Leukozyten in der MDP-Gruppe im Vergleich zu den restlichen Gruppen die wenigstens dauerhaften Endothelbindungen ein. Die NaCl-Gruppe stellte somit zum Zeitpunkt 12 h die größte Anzahl an DAL.



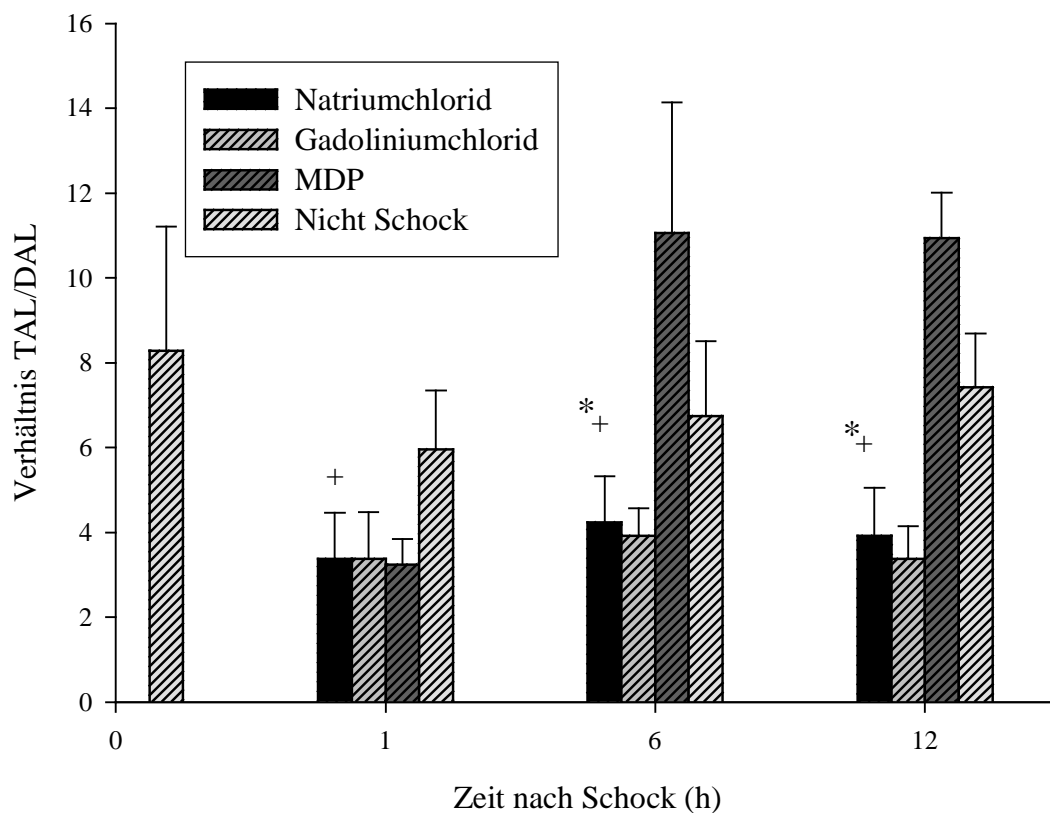
**Abbildung 20: Adhäsionsquotient der dauerhaft adhärenenten Leukozyten. * p<0.05 vs. MDP
+ p<0.05 vs. Nicht Schock**

Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen der NaCl- und der Nicht Schock- sowie der MDP-Gruppe zum Zeitpunkt 6 h und 12 h.

Verhältnis TAL/DAL

Das Verhältnis zwischen temporär und permanent adhärenenten Leukozyten nahm bis auf Ausnahme der MDP-Gruppe in allen Gruppen einen unveränderten Wert über die gesamte Schockdauer ein (siehe Abbildung 21). Dabei wurde für die $GdCl_3$ -Gruppe der tiefste Wert berechnet.

In der MDP-Gruppe ließ sich zwischen dem Zeitpunkt 1 h und 6 h eine relevante Änderung des TAL/DAL-Verhältnisses zu Gunsten der nicht dauerhaft adhärenenten Bindungen bei deutlichem Anstieg des berechneten Wertes festhalten.



**Abbildung 21: Verhältnis temporäre zu dauerhaft adhärenenten Leukozyten. * $p < 0.05$ vs. MDP
+ $p < 0.05$ vs. Nicht Schock**

Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen der NaCl- und der Nicht Schock-Gruppe zu den Zeitpunkten 1 h, 6 h und 12 h sowie zwischen der NaCl- und der MDP-Gruppe zu den Zeitpunkten 6 h und 12 h .

5.2.1.2 Zentralvene

Roller

Der prozentuale Anteil an rollenden Leukozyten nahm in der Nicht Schock-Gruppe während des Beobachtungszeitraums einen konstant tiefen Wert ein (siehe Abbildung 22).

In den Schockgruppen ließ sich dagegen eine stetige Zunahme des prozentualen Anteils an rollenden Leukozyten mit zunehmender Schockdauer festhalten, so dass zum Zeitpunkt 12 h die meisten rollenden Leukozyten in den Schockgruppen gezählt werden konnten.

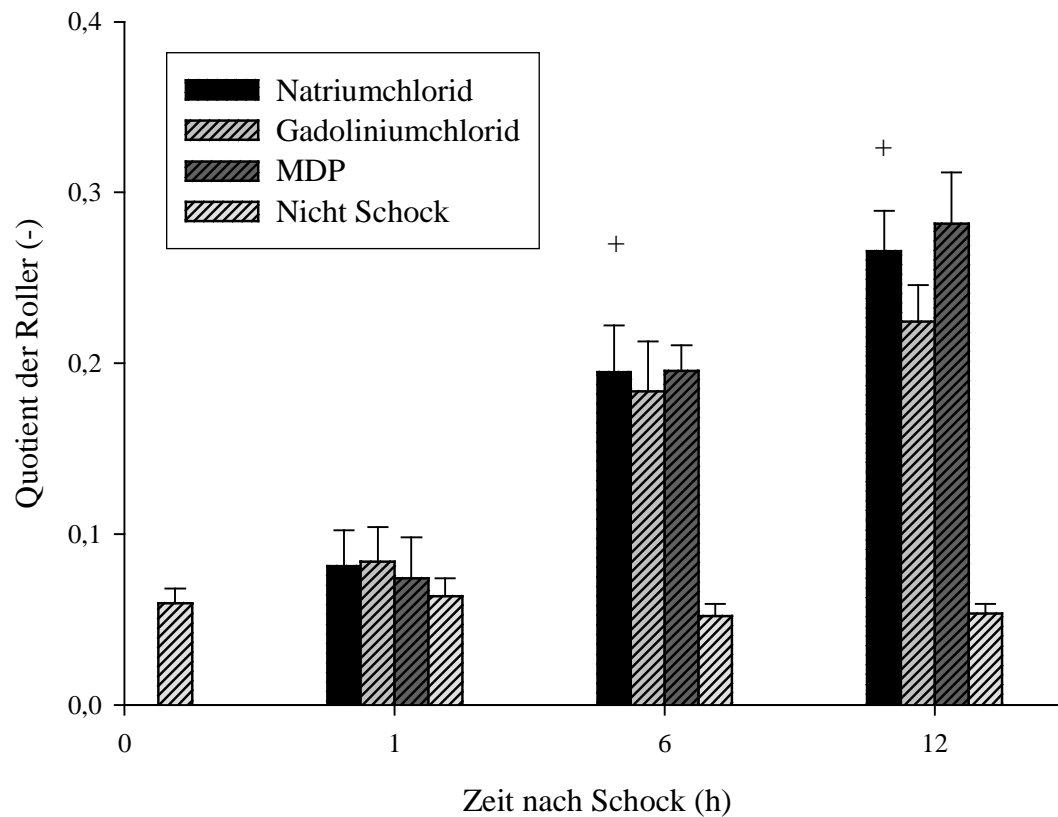


Abbildung 22: Roller. + $p < 0.05$ vs. Nicht Schock

Ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich zwischen der NaCl- und der Nicht Schock-Gruppe zu den Zeitpunkten 6 h und 12 h.

Temporär adhärenente Leukozyten

In allen Gruppen nahm mit zunehmender Schockdauer der prozentuale Anteil an temporär adhärenente Leukozyten zu (siehe Abbildung 23).

Während die Nicht Schock-Gruppe zu jedem Zeitpunkt die wenigsten temporär adhärenente Bindungen in Relation zu allen Leukozyten aufwies, konnten in der NaCl-Gruppe zum Zeitpunkt 1 h und 6 h sowie in der GdCl₃-Gruppe zum Zeitpunkt 12 h die jeweils größte prozentuale Anzahl an TAL gemessen werden.

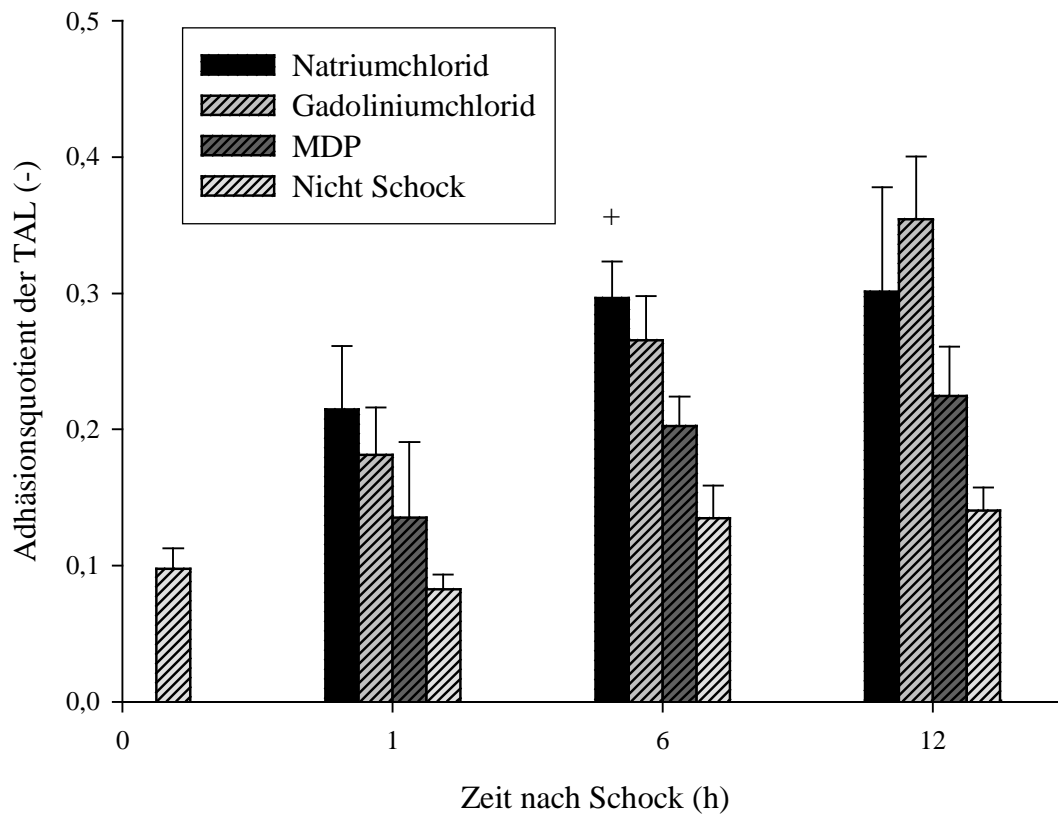


Abbildung 23: Temporär adhärenente Leukozyten. + p<0,05 vs. Nicht Schock

Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen der Nicht Schock- und der NaCl-Gruppe zum Zeitpunkt 6 h.

Mittlere Adhäsionszeit (MAT)

Während in der Nicht Schock-Gruppe die mittleren Adhäsionszeiten stetig abnehmen, steigerten sich die mittleren Adhäsionszeiten in der NaCl-Gruppe mit zunehmender Schockdauer (siehe Abbildung 24). Dabei wurden in der NaCl-Gruppe zu jedem Zeitpunkt die höchsten mittleren Adhäsionszeiten gemessen. Im Gegensatz dazu wiesen die Leukozyten in der MDP-Gruppe jeweils die geringsten Kontaktzeiten mit dem Endothel auf. Auffällig dabei war, dass sowohl in der MDP- als auch in der GdCl₃-Gruppe die längsten Verweilzeiten der Leukozyten am Endothel zum Zeitpunkt 6 h gemessen wurden, in der NaCl-Gruppe zum Zeitpunkt 12 h.

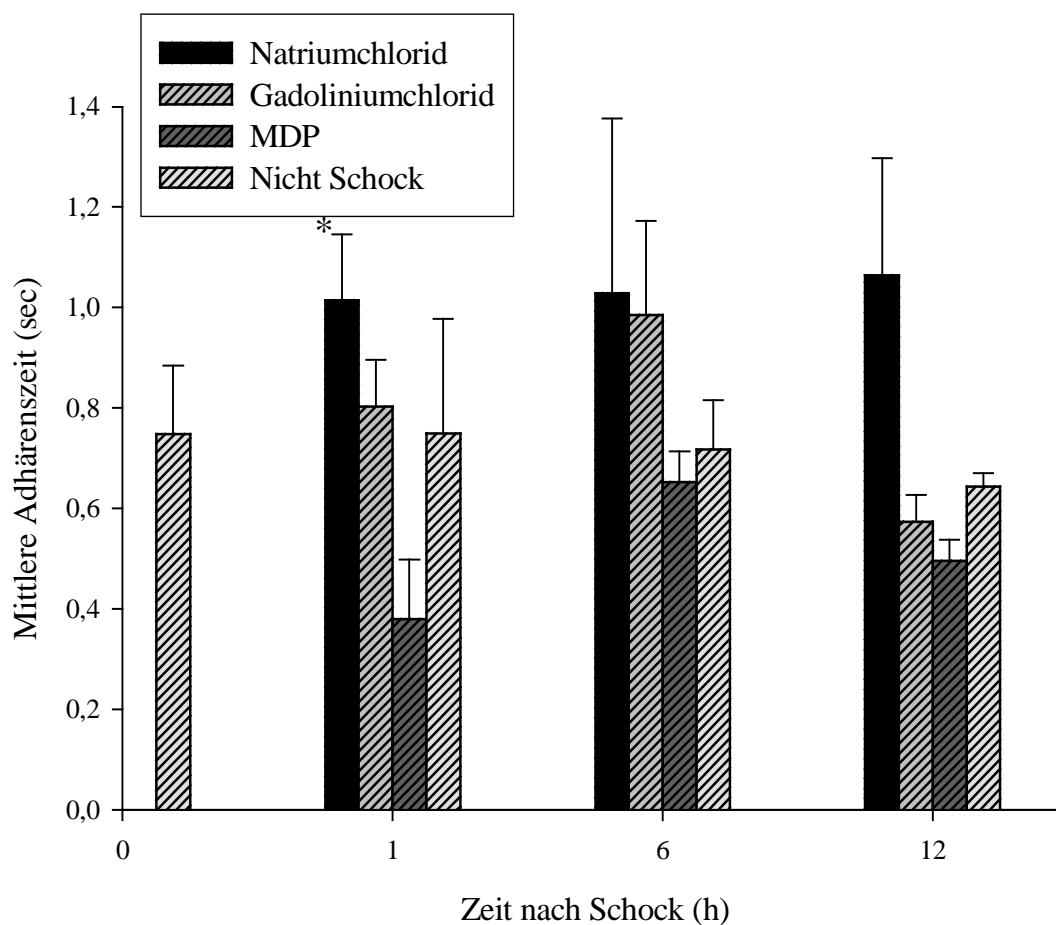


Abbildung 24: Mittlere Adhäsionszeit. * $p < 0.05$ vs. MDP

Ein signifikanter Unterschied konnte für den Zeitpunkt 1 h zwischen der NaCl- und der MDP-Gruppe erhoben werden.

Permanent adhärenente Leukozyten (DAL)

Im Gegensatz zur konstanten prozentualen Verteilung an DAL in der Nicht Schock-Gruppe ließen sich in allen Schockgruppen eine stetige Zunahme an DAL verzeichnen (siehe Abbildung 25). Dabei stellte die NaCl-Gruppe zu jedem Zeitpunkt, gefolgt von der GdCl₃-Gruppe, den größten Anteil an permanent adhärenente Leukozyten im Bezug auf die Gesamtleukozytenzahl.

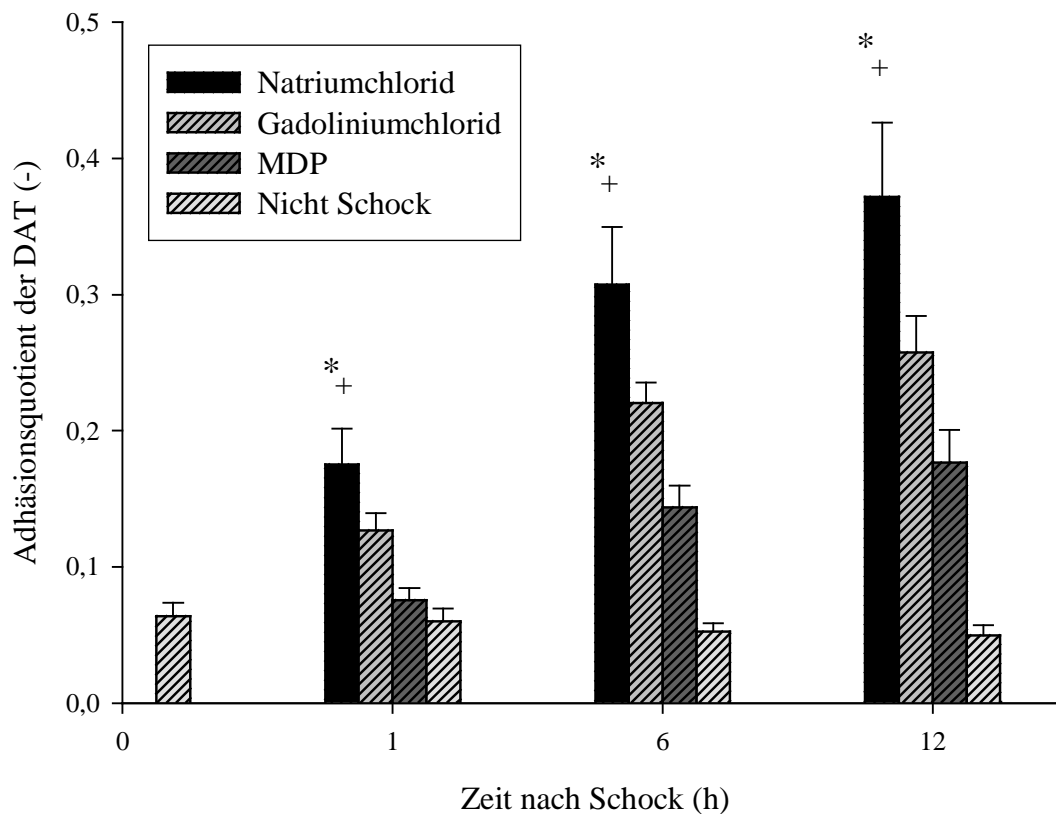


Abbildung 25: Dauerhaft adhärenente Leukozyten. + $p < 0.05$ vs. Nicht Schock

* $p < 0.05$ vs. GdCl₃ (Zeitpunkt 6 h) und vs. MDP

Signifikante Unterschiede ergaben sich dadurch zum einen zwischen der Nicht Schock und der NaCl-Gruppe sowie zum anderen zwischen der MDP- und der NaCl-Gruppe zu jedem Zeitpunkt. Zusätzlich konnte zwischen der GdCl₃- und der NaCl-Gruppe zu den Zeitpunkten 6 h und 12 h eine statistisch signifikante Differenz erhoben werden.

Prozentuale Verteilung

In der Nicht Schock-Gruppe stellten die frei fließenden Leukozyten (FFL) zu allen Zeitpunkten den größten prozentualen Anteil an Leukozyten. Mit zunehmender Schockdauer ließ sich eine minimale Zunahme der temporär adhärenen Leukozyten beobachten. Im Gegenzug nahm der prozentuale Anteil an frei fließenden Leukozyten, an permanent adhärenen Leukozyten und an rollenden Leukozyten ab.

Werden die Substanzgruppen betrachtet, so sehen die Veränderungen unterschiedlich aus:

In der NaCl-Gruppe wurde ein deutliche Abnahme des Anteils an frei fließenden Leukozyten zu Gunsten adhärenen Leukozyten gesehen. Dabei konnte vor allem eine Zunahme der rollenden Leukozyten und der permanent adhärenen Leukozyten festgestellt werden. Zum Zeitpunkt 6 h stellten bereits die permanent adhärenen Leukozyten den größten prozentualen Anteil aller gezählten Leukozyten dar.

In der GdCl₃-Gruppe konnte ebenfalls eine Zunahme des prozentualen Anteils an adhärenen Leukozyten verzeichnet werden. Dabei ließ sich vor allem eine Zunahme an rollenden Leukozyten und temporär adhärenen Leukozyten beobachten. Zum Zeitpunkt 12 h bestand die stärkste Fraktion aller Leukozyten aus temporär adhärenen Leukozyten.

Zwar nahmen in der MDP-Gruppe die frei fließenden Leukozyten zu allen Zeitpunkten den größten prozentualen Anteil aller Leukozyten ein, mit zunehmender Schockdauer wurde aber eine deutliche Zunahme an adhärenen Leukozyten gesehen. Dabei stieg der prozentuale Anteil an rollenden Leukozyten am Stärksten an.

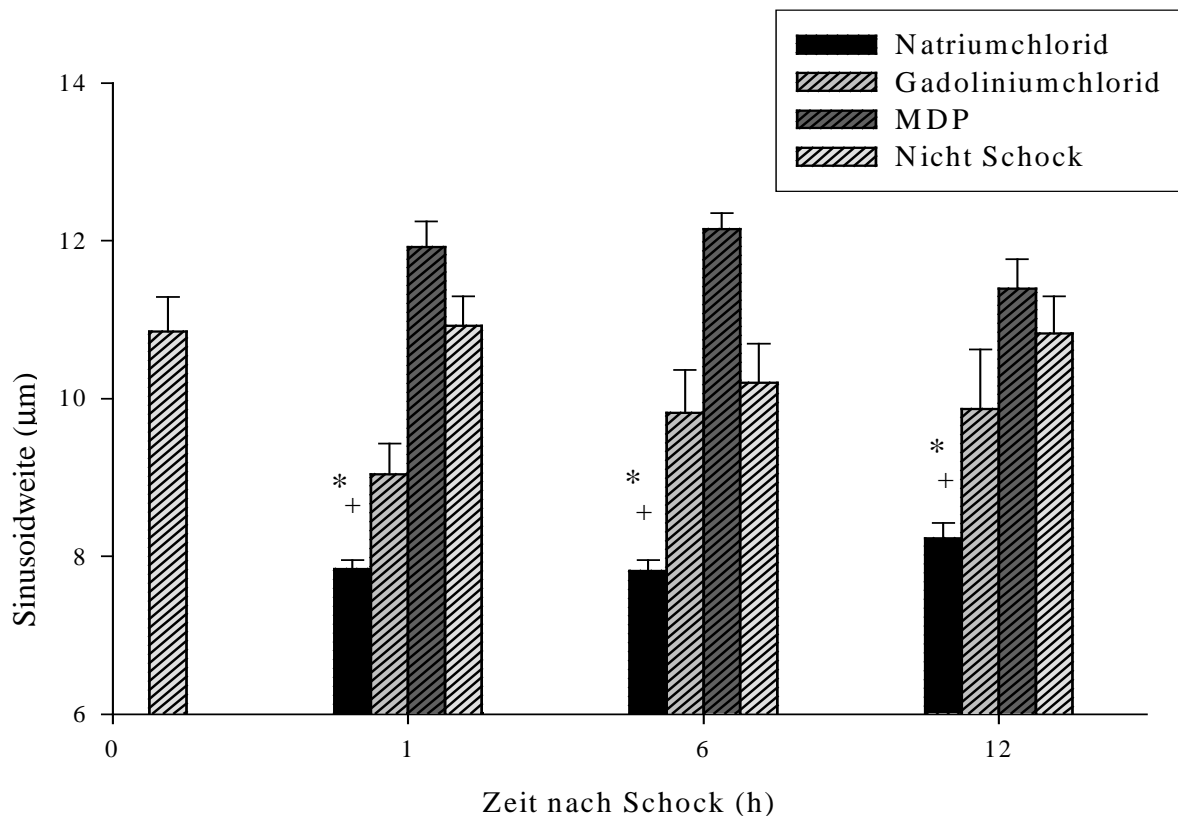
Der jeweils höchste prozentuale Anteil an Leukozyten wurde getrennt nach Substanzgruppe zu jedem Zeitpunkt in Tabelle 10 zusammengefasst:

Tabelle 10: Aufteilung nach stärkster Leukozytenfraktion je Substanzgruppe zu jedem Zeitpunkt (FFL= frei fließender Leukozyt, TAL= temporär adhärenen Leukozyt, DAL= dauerhaft adhärenen Leukozyt)

Zeit [h]	NaCl	GdCl ₃	MDP
1	FFL	FFL	FFL
6	DAL	FFL	FFL
12	DAL	TAL	FFL

5.2.2 Sinusoidweite

Die Sinusoidweite der Nicht Schock-Gruppe präsentierte sich während des Beobachtungszeitraums mit einem geringen Schwankungsmaß (siehe Abbildung 26). Sowohl die NaCl- als auch die GdCl₃-Gruppe wiesen dagegen einen stetigen Anstieg der Sinusoidweite mit zunehmender Schockdauer auf. Dabei nahmen die Sinusoidweiten der NaCl-Gruppe jeweils den tiefsten Wert aller Gruppen an. Die Werte der GdCl₃-Gruppe lagen zwischen der NaCl- und der Nicht Schock-Gruppe. In der MDP-Gruppe wurde bereits nach sechs Stunden der Maximalwert erreicht. Auffällig war, dass die Sinusoidweiten zu jedem Zeitpunkt den größten Wert einnahmen.



**Abbildung 26: Sinusoidweite. * $p < 0.05$ vs. GdCl₃ und vs. MDP
+ $p < 0.05$ vs. Nicht Schock**

Signifikante Unterschiede lagen zwischen der NaCl- und den restlichen Gruppen (Nicht Schock-, MDP- und GdCl₃-Gruppe) zu allen Zeitpunkten vor.

5.2.3 Funktionelle Sinusoiddichte

Der Wert der funktionellen Sinusoiddichte änderte sich in allen Gruppen trotz zunehmender Schockdauer zu den jeweiligen Zeitpunkten unwesentlich (siehe Abbildung 27). Der Maximalwert je Gruppe wurde jeweils zum Zeitpunkt 6 h erreicht.

Die MDP-Gruppe wies zu jedem Beobachtungszeitpunkt die größte funktionelle Sinusoiddichte auf, während in der NaCl-Gruppe, prozentual gesehen, jeweils die wenigsten Sinusoiden von allen gezählten Sinusoiden perfundiert wurden. In der GdCl₃-Gruppe lag der Prozentsatz an perfundierten Sinusoiden zwischen der NaCl- und der Nicht Schock-Gruppe.

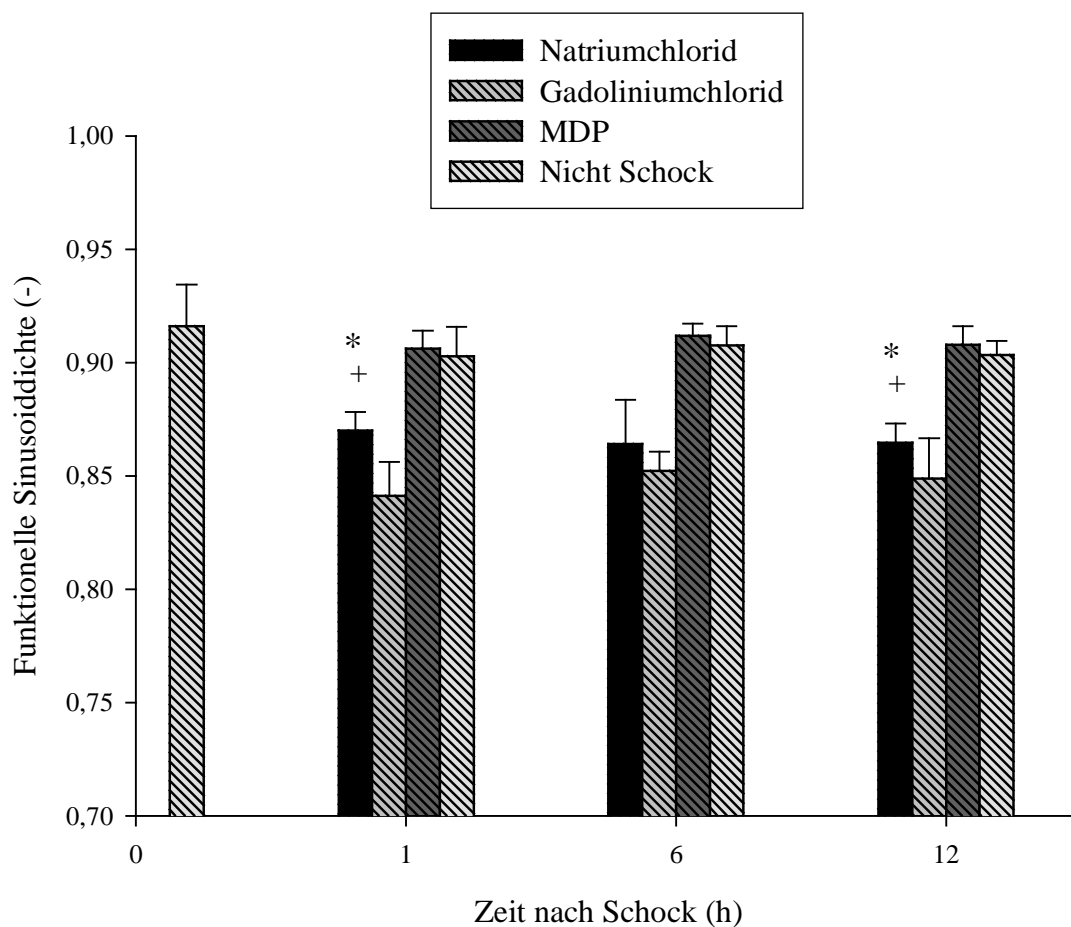


Abbildung 27: Funktionelle Sinusoiddichte. * $p < 0.05$ vs. MDP
+ $p < 0.05$ vs. Nicht Schock

Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen der NaCl- und der Nicht Schock- als auch zur MDP-Gruppe zu den Zeitpunkten 1 h und 12 h.

5.2.4 Leukozytenfluss

Der Leukozytenfluss in der Nicht Schock-Gruppe bewegte sich in einem stabilen Schwankungsbereich (siehe Abbildung 28). In der NaCl-Gruppe reduziert sich dagegen der Leukozytenfluss mit zunehmender Schockdauer stetig, und nahm dabei zu jedem Zeitpunkt den tiefsten Wert aller Gruppen an. In der GdCl₃-Gruppe zeigte sich ein bogenförmiger Verlauf mit Erreichen des maximalen Leukozytenflusses nach sechs Stunden, was gleichzeitig der Maximalwert alle Gruppen darstellte. Einen umgekehrten (u-förmig) Verlauf präsentierte der Leukozytenfluss in der MDP-Gruppe, wobei zum Zeitpunkt 1 h und 12 h der Maximalwert aller Gruppen erreicht wurde.

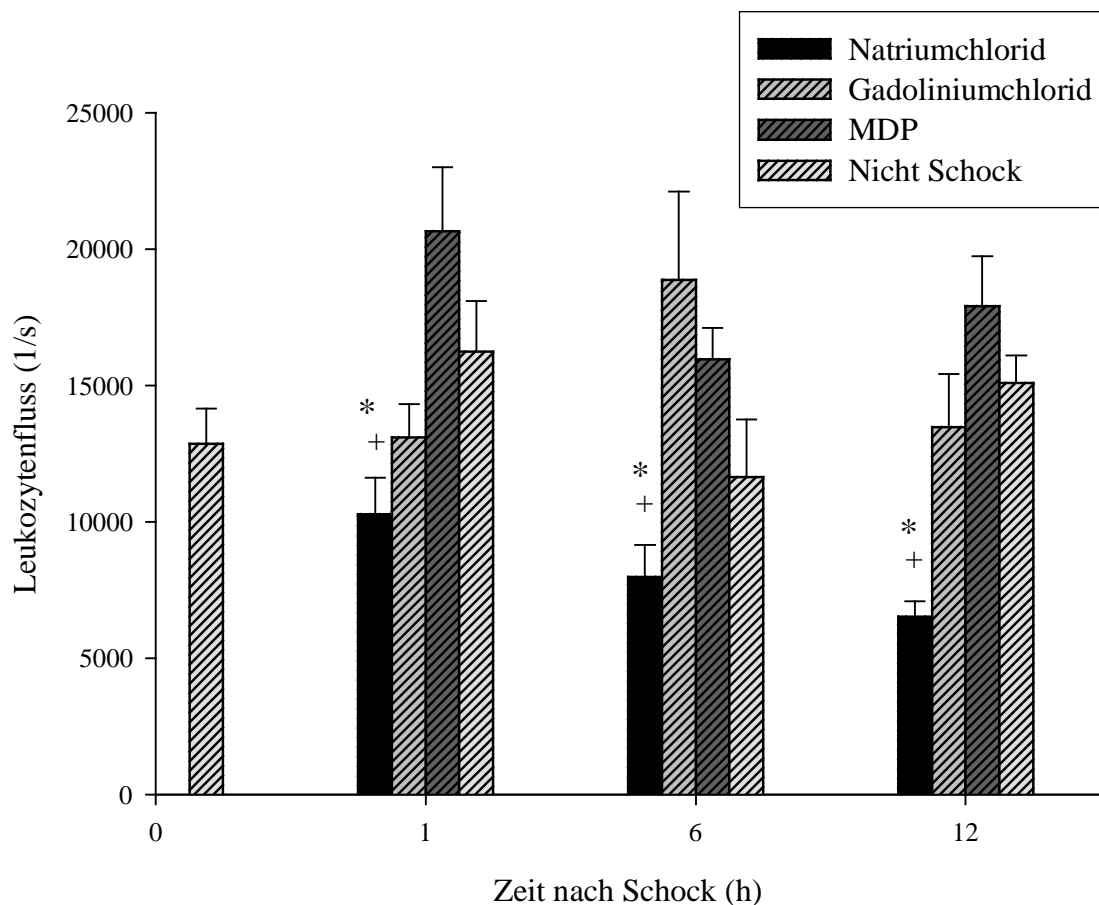


Abbildung 28: Leukozytenfluss. * $p < 0.05$ vs. GdCl₃ (Zeitpunkt 6 h und 12 h) und vs. MDP
+ $p < 0.05$ vs. Nicht Schock

Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen der NaCl- und der Nicht Schock-Gruppe zu den Zeitpunkten 1 h und 12 h, zwischen der NaCl- und der MDP-Gruppe zu allen Zeitpunkten und zwischen der NaCl- und der GdCl₃-Gruppe zu den Zeitpunkten 6 h und 12 h.

5.2.5 Sinusoidale Leukozytengeschwindigkeit

Die Nicht Schock-Gruppe wies eine unwesentliche Schwankung in der sinusoidalen Leukozytengeschwindigkeit über den Beobachtungszeitraum auf (siehe Abbildung 29). In der NaCl-Gruppe konnte dagegen eine stetige Abnahme der sinusoidalen Leukozytengeschwindigkeit mit zunehmender Schockdauer festgestellt werden. Die Leukozyten der NaCl-Gruppe besaßen dabei zu allen Zeitpunkten die geringste Geschwindigkeit. Durch einen bogenförmigen Verlauf erreichten die Leukozyten der $GdCl_3$ -Gruppe zum Zeitpunkt 6 h die höchste Geschwindigkeit, was gleichzeitig die Höchstgeschwindigkeit aller Gruppen bedeutete. Einen umgekehrten (u-förmig) Verlauf präsentierte die sinusoidale Leukozytengeschwindigkeit in der MDP-Gruppe, wobei zum Zeitpunkt 1 h und 12 h der Maximalwert aller Gruppen erreicht wurde.

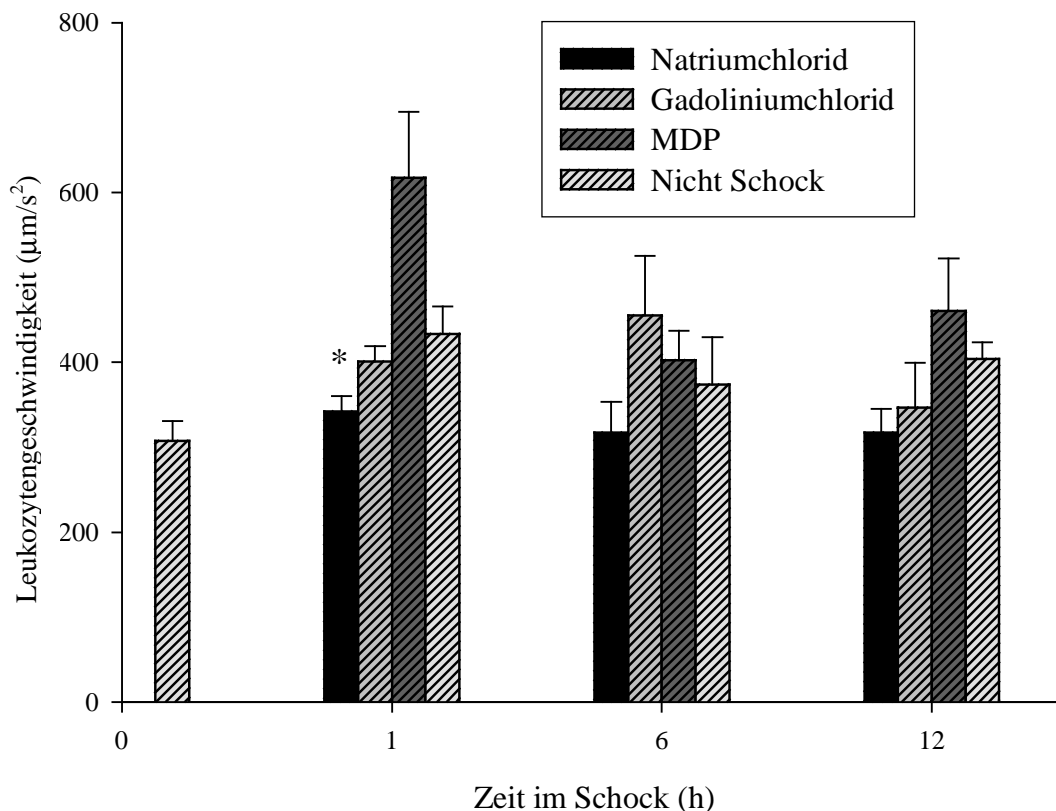


Abbildung 29: Sinusoidale Leukozytengeschwindigkeit. * $p < 0.05$ vs. MDP

Eine statistisch signifikante Differenz konnte zwischen der NaCl- und der MDP-Gruppe zum Zeitpunkt 1 h erhoben werden.

5.3 Organschaden an der Leber

Zur Bestimmung des Leberschadens wurde eine Leberenzymdiagnostik zu den bekannten Zeitpunkten durchgeführt. Im Folgenden werden die einzelnen Leberenzymwerte betrachtet:

Glutamatoxalacetattransaminase/ Aspartataminotransferase (GOT/ASAT):

Auffällig war, dass sowohl die GdCl₃- als auch die MDP-Gruppe mit einer höheren Leberenzymaktivität im Vergleich zur NaCl-Gruppe starteten (siehe Abbildung 30). Im weiteren Verlauf erreichten sowohl die GdCl₃- als auch die MDP-Gruppe bereits zum Zeitpunkt 6 h die maximale Leberenzymaktivität, um anschließend mit zunehmender Schockdauer wieder abzunehmen. Die NaCl-Gruppe offenbarte dagegen einen stetigen Anstieg der Leberenzymaktivität und erreicht zum Zeitpunkt 12 h den Maximalwert. Die Leberenzymaktivität der NaCl-Gruppe lag zu diesem Zeitpunkt über der von der MDP- und GdCl₃-Gruppe.

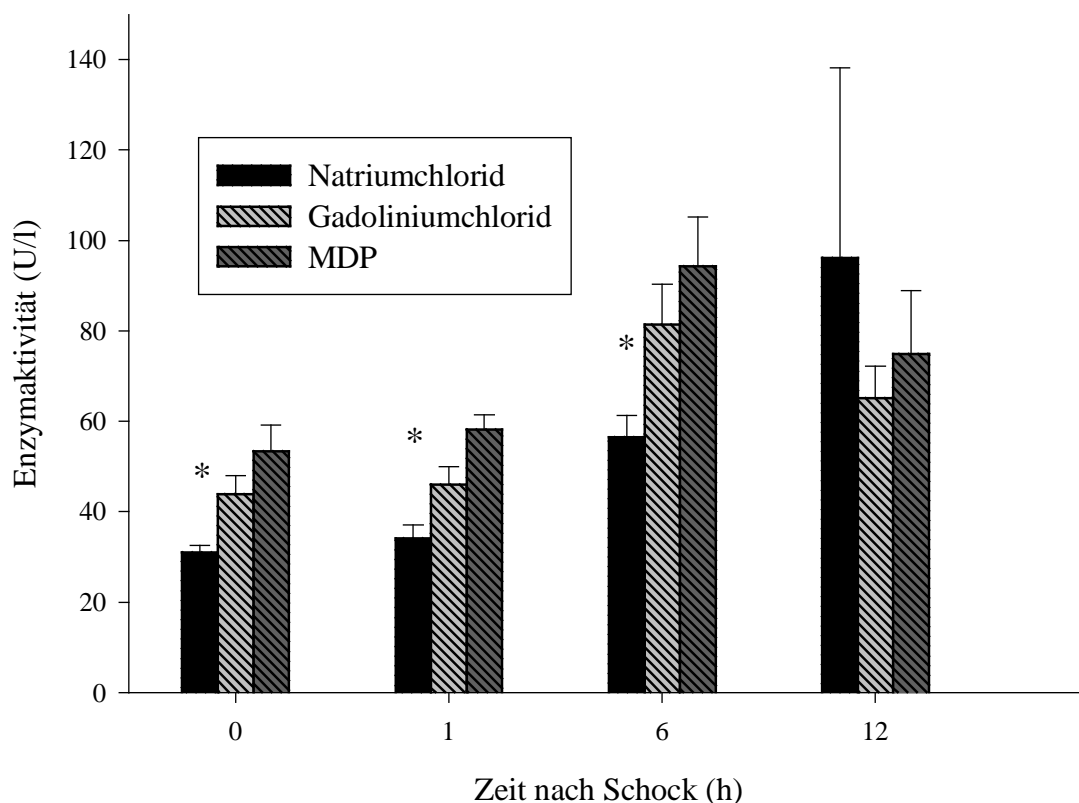


Abbildung 30: Glutamatoxalacetattransaminase. * $p < 0.05$ vs. MDP und vs. GdCl₃

Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen der NaCl- und der GdCl₃- als auch zur MDP-Gruppe zum Zeitpunkt 1 h und 6 h.

Laktatdehydrogenase (LDH):

Sowohl die GdCl₃- als auch die MDP-Gruppe starteten im Vergleich zur NaCl-Gruppe mit höheren Leberenzymwerten (siehe Abbildung 31), was bei stetiger Zunahme der Leberenzymaktivität bis zum Zeitpunkt 6 h anhielt. Auffällig war dabei eine massive Erhöhung der Leberenzymwerte in der MDP- und vor allem in der GdCl₃-Gruppe, welche die maximale Aktivität aller Gruppen zum Zeitpunkt 6 h erreichte. Während die Leberenzymaktivität im weiteren Verlauf in der GdCl₃- und MDP-Gruppe wieder rapide abnahm, verzeichnete die Leberenzymwerte in der NaCl-Gruppe eine stetige Zunahme bis zum Zeitpunkt 12 h.

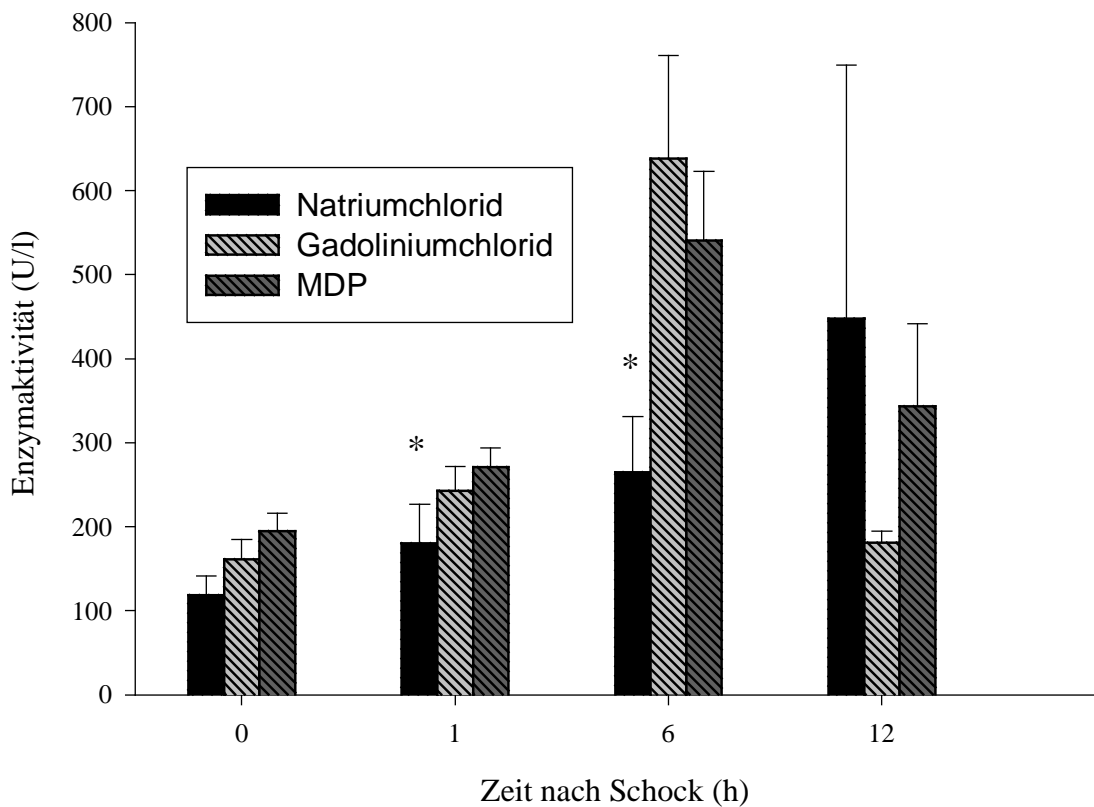


Abbildung 31: Laktatdehydrogenase. * p<0.05 vs. MDP und vs. GdCl₃

Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen der NaCl- und der GdCl₃- als auch zur MDP-Gruppe zum Zeitpunkt 1 h und 6 h.

Glutamatpyruvattransaminase/Alaninaminotransferase (GPT/ALAT)

In der NaCl-Gruppe nahm die Leberenzymaktivität zu jedem Zeitpunkt zu, und erreichte nach zwölf Stunden den Maximalwert, was gleichzeitig auch der Maximalwert aller Gruppen darstellte (siehe Abbildung 32). Die Leberenzymwerte der GdCl₃- und MDP-Gruppe schwankten zwischen 28 und 34 U/l bzw. 32.75 und 38.75 U/l.

Zwischen den Gruppen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

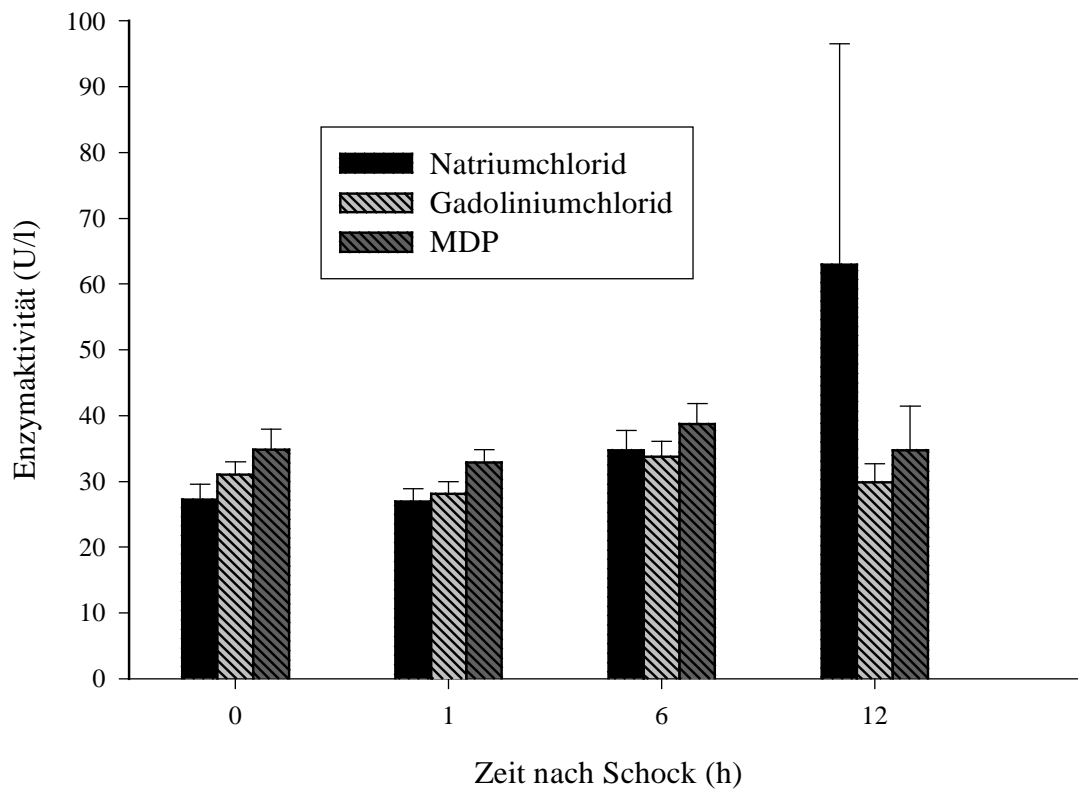


Abbildung 32: Glutamatpyruvattransaminase.

6 Diskussion

Die Sepsis besitzt im klinischen Alltag nach wie vor einen bedeutenden Stellenwert. Vor allem durch die hohe Komplikationsrate führt die septische Infektion direkt oder indirekt durch Ausbildung eines Multiorganversagens häufig zum Tode.

Veränderungen in der Mikrozirkulation und der Endothelzellmorphologie mit konsekutiv erhöhter Gefäßpermeabilität und verstärkter Migration aktivierter Leukozyten ins Gewebe stellen dabei wichtige pathophysiologische Mechanismen bei der Entstehung der multiplen Organdysfunktion dar. Wie durch vorangegangene Studien bereits bekannt, kommt der Leber und ihren nichtparenchymalen Zellen als „Motor“ (SIEGEL, 1992) und „Verstärker“ der Entzündung (MARZI, 1994) eine zentrale Bedeutung zu. Die gewebeständigen Makrophagen, die sogenannten Kupfferzellen, stellen 90 % des gesamten retikuloendothelialen Systems und scheinen durch ihre phagozytären und sekretorischen Eigenschaften einen entscheidenden Einfluss auf lokale wie systemische Antworten zu nehmen. Über eine Induktion der Adhäsionsrezeptoren resultiert eine verstärkte Leukozyten-Endothel-Interaktion, was mikrovaskuläre Schäden verursacht und so zum Mikrozirkulationsversagen beiträgt.

Aus dem oben Genannten wird ersichtlich, dass die Art und Weise der Antwort sehr stark von der Aktivität und der Funktion der Kupfferzellen abhängt. Inwiefern die Blockade der Kupfferzellen die inflammatorische Entzündungsreaktion nach Endotoxingabe beeinflussen oder sogar stoppen kann, wurde in der vorliegenden Arbeit durch experimentelle Untersuchungen erforscht. Dabei zeigte sich, dass eine Modulation der Kupfferzellen eine Veränderung der hepatischen Entzündungsreaktion bewirkt. Vor allem konnte eine Verschiebung der Leukozyten-Endothel-Interaktion zu Gunsten weniger adhärenenten Leukozyten bei zudem steigender Leukozytengeschwindigkeit und Sinusoidweite gesehen werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse im Detail diskutiert.

6.1 Modell zur Untersuchung des septischen Schocks

Die Untersuchung des septischen Schocks erfolgte an einem etablierten Tiermodell (BAUER et al, 1994). Die Kupfferzellen wurden durch die Verabreichung zweier bekannter Stoffe, Gadoliniumchlorid und MDP, in ihrer Funktion blockiert bzw. zur Apoptosis (VAN ROIJEN und NIEUWMENGEN, 1984; YAMAGUCHI et al, 2006) geführt. Als Vergleichsgruppe diente eine unbehandelte Natriumchlorid- und eine Nicht Schock-Gruppe. Der septische

Schock wurde anschließend nach einer anerkannten Methode durch eine dosisgerechte Bolusinjektion von Endotoxin (WAHYUNI et al, 2002) induziert.

Die Grundlage der Datenerhebung in dieser Studie basiert auf der etablierten Methode der Intravitalmikroskopie und der dazugehörigen computerunterstützten Datenauswertung. Das bereits 1978 von MCCUSKEY beschriebene Modell der intravitalmikroskopischen Darstellung der Lebermikrozirkulation wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen modifiziert und weiterentwickelt, unter anderem durch die Arbeiten von MCCUSKEY et al (1982) zur Endotoxinwirkung an der Leber. Eine intensivere Untersuchung der Mikrozirkulationsveränderungen fand unter anderem durch MENGER und LEHR (1993) sowie in verschiedenen Studien von MARZI et al (1993, 1994) statt. Unsere intravitalmikroskopischen Daten wurden nach einer standardisierten Methode erhoben. Dabei wurde vor allem die Leukozyten-Endothel-Interaktion aufgrund ihrer direkten Beobachtbarkeit (MENGER et al, 1991) zur Beurteilung herangezogen.

Die hepatozelluläre Integrität wurde laborchemisch durch die standardisierte Analyse der Leberenzyme untersucht.

Die Resultate der systemisch gemessenen Parametern (MABD, HF) zeigten zum Zeitpunkt der Intravitalmikroskopie keine signifikanten Unterschiede, so dass vergleichbare hämodynamische Bedingungen vorlagen und somit eine qualitative und quantitative Aussage zur hepatischen Mikrozirkulation ermöglicht wurde.

6.2 Pathophysiologisch messbare Veränderungen bei septischem Schock

Zur Beurteilung der pathophysiologischen Abläufe nach Induktion eines septischen Schocks wurde die NaCl-Gruppe herangezogen. Als Vergleichsgruppe diente die Nicht Schock-Gruppe. Die Ergebnisse entsprechen dem typischen Verlauf eines septischen Schockgeschehens ohne therapeutische Maßnahmen:

Hämodynamik

Als Erstreaktion auf die Gabe des Endotoxins LPS fiel bei Betrachtung der hämodynamischen Verhältnisse ein signifikanter Abfall des Blutdrucks nach wenigen Minuten mit kompensatorischem, aber verzögertem Anstieg der Herzfrequenz auf. Nach NAKAO und SHIMOHARA (1985) werden innerhalb von fünf Minuten bereits zwischen 98 und 99,9 % einer injizierten Endotoxinmenge durch Phagozytose eliminiert. Die frühen hämodynamischen Veränderungen scheinen somit vor allem durch die Endotoxinwirkung über eine

Ausschüttung von vasoaktiven Substanzen (KMIEC, 2001) verursacht zu sein. Die Stabilisierung der Blutdruckwerte auf dem Niveau vor Schockbeginn wurde neben der kontinuierlichen Infusionstherapie vor allem auf die gegenregulatorischen Maßnahmen des Organismus wie Ausschüttung von antiinflammatorischen Zytokinen zurückgeführt. Die nicht signifikante Abnahme der Blutdruckwerte im weiteren Schockverlauf wurde nach KMIEC (2001) durch eine überschüssige Ausschüttung von vasoaktiven Substanzen und durch einen Flüssigkeitsverlust in den dritten Raum im Sinne eines Fortschreitens der systemischen inflammatorischen Entzündungsreaktion angesehen. Tatsächlich ließ sich eine Erweiterung der Sinusoide, eine massive Zunahme der Leukozyten-Endothel-Interaktionen sowie ein Rückgang des Leukozytenflusses beobachten. AYALA et al (1994) und SAKAMOTO et al (2004) konnten in ihren Studien diese Annahme durch Nachweis der Auswirkung von Leukozyten-Endothel-Interaktionen auf die Gefäßwandpermeabilität mit entsprechendem Verlust von Flüssigkeit in den dritten Raum vor allem zwölf Stunden nach Endotoxingabe bestätigen. In ihren Studien war diese Phase zeitgleich mit dem Beginn des hypodynamischen-hypometabolischen Stadiums der Sepsis assoziiert. Hinweise für ein hypodynames Stadium ergaben sich in unserer Studie nicht.

Der Blutdruck zeigte sich bis auf die tendenzielle Hypotonie im weiteren Schockverlauf in allen Schockgruppen vergleichbar. Zum Zeitpunkt der Intravitalmikroskopien lagen keine signifikanten makrohämodynamischen Veränderungen vor.

Intravitalmikroskopie

Die intravitalmikroskopischen Ergebnisse ergaben mit zunehmender Schockdauer eine Verschlechterung der hepatischen Mikrozirkulation.

Eine signifikante Änderung in den extrahepatischen Parametern fand sich nicht. Aus hämorrheologischer Sicht ließ sich zwar ein leichter Rückgang des Hb-Wertes mit zunehmender Schockdauer (wie in allen Gruppen) festhalten, der auch durch die kontinuierliche Infusionstherapie im Sinne einer Blutverdünnung bedingt sein kann. Der gemessene Hb-Tiefstwert garantierte aber weiterhin eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoffträgern. Gegen eine prähepatische Komponente sprachen die makrohämodynamischen Parametern.

Die Störung der hepatischen Mikrozirkulation führten wir auf die intrahepatischen Veränderungen zurück. Entsprechend den Beobachtungen an einem Endotoxin-Modell von SINGER et al (2006) fiel in der Intravitalmikroskopie eine Reduktion an perfundierten Sinusoiden mit zunehmender Schockdauer auf. SINGER et al (2006) vermutete als Ursache einen thrombotischen Verschluss der entsprechenden Gefäße. Eine ätiologische Aussage konnte in unserer Studie nicht getroffen werden. Auffällig war eine im Vergleich zur Nicht

Schock-Gruppe statistisch signifikante Verengung der Sinusoidweiten, deren Ursachen in den Endotoxin bedingten Veränderungen bei sinusoidaler Heterogenität liegen (ROSE und MARZI, 1996). Mit der Reduktion an perfundierten Sinusoiden sowie mit der Abnahme der Sinusoidweite versucht der Organismus eine Aufrechterhaltung der Leberdurchblutung unter Inkaufnahme von minderperfundierten Leberregionen zu erreichen.

Unerwartet für ein hyperdynamisches Stadium zeigte sich in unserer Studie ein zunehmender Rückgang der sinusoidalen Leukozytengeschwindigkeit mit entsprechender Abnahme des Leukozytenflusses der NaCl-Gruppe im Vergleich zur Nicht-Schock-Gruppe. Als Erklärung kommt das Ausdehnen der Sinusoide im weiteren Schockverlauf in Betracht, welche möglicherweise auf die überschüssige Produktion von Stickstoffmonoxid zurückzuführen ist. Andererseits bewirkt der verminderte Blutfluss über eine Zunahme der Scherkräfte sowie über Rezeptoren- und Mediatorenabhängige Reaktionen eine vermehrte Leukozyten-Endothel-Interaktion. Als Konsequenz der Leukozytentransmigration in das Gewebe wird eine Gefäßwandschädigung durch den Leukozyten mit Aufhebung der Permeabilitätsschranke verursacht. Die Folge ist ein Flüssigkeitsverlust in den dritten Raum mit Reduktion der Leukozytenflußgeschwindigkeit und demzufolge eine erneute Zunahme der Leukozyten-Endothel-Interaktionen. Dieser Kreislauf führt letzten Endes zu einer Verschlechterung der Mikrozirkulation mit zunehmender Organschädigung (VOLLMAR, 1995).

Tatsächlich konnte intravitalmikroskopisch eine im Vergleich zur Nicht-Schock-Gruppe signifikante Zunahme der Leukozyten-Endothel-Interaktionen, vor allem der dauerhaft adhärennten Leukozyten und der rollenden Leukozyten, bestätigt werden. Die mittlere Adhäsionszeit als Ausdruck der Verweildauer eines Leukozyten am Endothel verlängerte sich signifikant im Vergleich zur Nicht-Schock-Gruppe (zum Zeitpunkt 1 h) und nahm in den Zentralvenen jeweils den höchsten Wert aller Schockgruppen an. Die Abnahme der mittleren Adhäsionszeit im Lobulus mit zunehmender Schockdauer mag auf die weitere Reduktion der perfundierten Sinusoiden und damit auf ein ausgeprägtes Shunten der Leberdurchblutung zurückzuführen sein.

Die Auswertung der Leukozytenadhäsionen im Bezug auf die funktionellen Einheiten der Leber ergab den höchsten Anteil an Adhäsionen im midzonalen Feld, weniger Bindungen im Perizentral- als schließlich im Periportalfeld. Unser Ergebnis entsprach den Erkenntnissen von MAROTTO et al (1988). Die höhere Leukozytenfraktion im midzonalen Feld in der Frühphase nach einer ischämischen Leberzellschädigung wurde auf eine vermehrte Radikalbildung im mittleren Bereich des Azinus zurückgeführt. Diese Verteilung widersprach

aber der von BOUWENS et al (1986) beschriebenen Mikroarchitektur und funktionellen Unterteilung des Leberazinus. Entsprechend dem „typischen“ Verteilungsmuster mit Abnahme der Leukozytenfraktion mit der Blutflussrichtung im Leberläppchen wurde die höchste Anzahl an Kupfferschen Sternzellen im portalen Gebiet vermutet. Durch eine Stimulation der Gewebemakrophagen mit Endotoxin wurde eine vermehrte Ausschüttung von lokal wirkenden Mediatoren (insbesondere TNF- α und Il-1) angenommen, was zu einer gesteigerten Leukozytenaktivität mit entsprechender Zunahme der Endotheladhäsionen im Periportalfeld führte. In einigen veröffentlichten Forschungsarbeiten, wie MARZI et al (1995) und BAUER et al (1996) zeigten sich entsprechende Beobachtungen. Allerdings fielen bereits in der Studie von MARZI et al (1993) verhältnismäßig hohe midzonale und perizentrale Leukozytenzahlen auf. Eine mögliche Erklärung bietet die Untersuchung von BAUER et al (1994), bei der das sublobuläre Verteilungsmuster nach Verabreichung verschiedener Endotoxindosen genauer betrachtet wurde. So konnte eine Korrelation zwischen der ansteigenden Menge an injiziertem Endotoxin und einer Zunahme an Adhäsionen im midzonalen und perizentralen Bereich mit Abnahme im periportalen Feld gesehen werden. Der Hauptanteil ging aber Bindungen im Periporalfeld ein, was nicht unseren Beobachtungen entsprach. Außerdem betrug die maximale Dosis 5 mg/kg KG, was das 5-fache unserer verwandten Dosis betrug. Auffälligerweise zeigte sich in der Studie bei niedrigeren Dosen ein höherer prozentualer Anteil im midzonalen Feld. Als Erklärung für die Umverteilung wurden von BAUER et al (1994) eine Überbeanspruchung bzw. ein Untergang der periportal Kupfferzellen mit Rekrutierung der midzonalen und perizentralen Makrophagen postuliert. Der genaue Grund für die Verteilung der Leukozytenadhäsionen in unserem Versuch bleibt somit unklar. Als mögliche Erklärung ist vielleicht die „Priming-Hypothese“ von Bedeutung (MARZI, 1993). Durch die präexperimentellen Manipulationen (Kurznarkose, intravenöse Punktion) kann eine inflammatorische Reaktion ausgelöst werden. BANKEY et al (1989) zeigten, in welchem umfangreichen Maße Hypoxie zu einer Sensibilitätssteigerung bei Makrophagen führt, insbesondere gegenüber Reizen wie LPS. So wurde auch durch NOLAN (1981) von einer 10- bis zu 1000-fachen Empfindlichkeitssteigerung der Leber gegenüber Endotoxin nach einer vorausgegangenen hepatischen Schädigung berichtet.

Blutparameter

Die Veränderungen im Säure-Base-Haushalt weisen auf einen schweren Krankheitszustand hin. Zwar zeigte sich der pH-Wert bis zwölf Stunden nach Endotoxingabe ausgeglichen. Aufgrund der Abnahme des Standardbikarbonats mit konsekutiver Hyperventilation

(Abnahme des Kohlendioxidpartialdruckes) lag aber eine kompensierte metabolische Azidose vor, was eine typische Stoffwechsellage in einem Schockgeschehen darstellt. Auffällig präsentierte sich auch der Abfall der Thrombozytenanzahl. Als Ursache vermuteten wir einen höheren Verbrauch, wie er typischerweise für ein septisches Schockgeschehen beschrieben wird. Dafür sprach ebenfalls der Verlauf der Leukozytenanzahl. In der ersten Messung nach Endotoxingabe war ein Abfall der Leukozytenanzahl mit deutlich tieferen Werten im Vergleich zur Nicht Schock-Gruppe zu verzeichnen. Dieser vermutlich vermehrte Verbrauch konnte im weiteren Schockverlauf im Vergleich zu den restlichen Gruppen nicht adäquat ausgeglichen werden. Eine Erklärung lieferte die Zunahme der Leukozyten-Endothel-Interaktionen und damit eine vermehrte Migration von weißen Blutkörperchen in das Gewebe. Anzunehmen ist auch eine verminderte Neubildung nach einer toxischen Schädigung des Knochenmarks sowie eine beginnende Anergie des Immunsystems, wie von COHEN (2002) beschrieben.

Organschaden

Die Serumkonzentration der mitochondrialen Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und der zytoplasmatischen Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) sind klinisch anerkannte Indikatoren für eine hepatozelluläre Schädigung. Kommt es zu einer Zerstörung der Zellmembran, so treten diese Enzyme mit dem Resultat erhöhter Plasmaspiegel in die Zirkulation über. Die Blutwerte reflektieren demnach den momentanen Schädigungsgrad in der Leber (LANGDALE et al, 1993). Trotz Veränderung der hepatischen Lebermikrozirkulation und Steigerung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen waren die Leberenzymwerte zum Zeitpunkt 1 h im Vergleich zum Zeitpunkt 0 h kaum angestiegen. Auch VOLLMAR und GLASZ (1993) konnten nach Endotoxingabe innerhalb einer Stunde keine Erhöhung der Leberenzymwerte beobachten, was eine direkte Parenchymschädigung durch Endotoxin ausschließt. Die Ursache des verzögert einsetzenden Organschadens liegt unter anderem im Mechanismus der Leukozytentransmigration. Das Eindringen des Leukozyten in das umliegende Gewebe benötigt aufgrund des komplexen Ablaufes eine gewisse Zeit. Außerdem steht die maximale Transmigrationskapazität erst nach frühestens 4 Stunden mit vermehrten Anbieten von Adhäsionsrezeptoren zum Anbinden der Leukozyten ans Endothel zur Verfügung. Die Neusynthese der Adhäsionsrezeptoren beruht auf einer Mediatorenstimulation und benötigt dazu mehrere, zeitintensive Schritte: Transkription, Translation und Proteinsynthese (DEGITZ et al, 1991). So konnte JAESCHKE et al (1993) ein verzögertes Expressieren der Integrine mit Erreichen des Maximums erst nach vier bis vierundzwanzig Stunden zeigen. Auch CRONER et al (2006) und SINGER et al (2006) beobachteten das

Auftreten der meisten Leukozyten-Endothel-Interaktionen erst nach vier bis sechs Stunden. Tatsächlich erfuhren die Leberenzymwerte innerhalb der nächsten Stunden unseres Experimentes eine signifikante Steigerung und erreichten nach zwölf Stunden den maximalen Wert. Die gemessenen Leberenzymwerterhöhungen entsprachen dabei den Ergebnissen aus den Studien von YUAN et al (1998) und KLINTMANN et al (2004).

6.3 Veränderungen nach Blockade der Kupfferzellen

In unserer Studie wurde der Frage nachgegangen, inwiefern die Blockade der Kupfferzellaktivität über verschiedene Mechanismen einen Einfluss auf die systemische Entzündungsreaktion nehmen kann. Die Ergebnisse weisen eine unterschiedlich starke Abschwächung der septischen Reaktionen in beiden Gruppen auf.

Im Folgenden werden die Substanzgruppen einzeln analysiert:

6.3.1 Gadoliniumchlorid

Intravitalmikroskopie

Bei Betrachtung der hepatischen Mikrozirkulation ließ sich in der GdCl₃-Gruppe eine bessere Leberperfusion im Vergleich zur NaCl-Gruppe festhalten. Als Ursache konnte in der GdCl₃-Gruppe neben einer verminderten Anzahl an nichtperfundierten Sinusoiden ein erhöhter Leukozytenfluss gemessen werden. Dabei reduzierte sich die Sinusoidweite im Vergleich zur NaCl-Gruppe weniger, gleichzeitig nahm die Leukozytengeschwindigkeit der GdCl₃-Gruppe im Vergleich zur NaCl-Gruppe mit zunehmender Schockdauer nicht ab. Unter anderem scheinen Veränderungen auf Gefäßebene zu diesen Resultaten geführt zu haben. SHARPIE et al (1996) fand in seiner Studie eine deutliche Abschwächung der ultrastrukturellen Veränderungen in den Gefäßwänden durch Gadoliniumchlorid mit konsekutiver Reduktion des Gefäßwiderstandes.

Zeitgleich fand sich intravitalmikroskopisch in der GdCl₃-Gruppe ein vermindertes Adhäsionsverhalten mit signifikant weniger temporären und permanenten Adhärenzen im Vergleich zur NaCl-Gruppe. HUANG et al (1995) und CARLOS und HARLAN (1994) nahmen eine Verminderung der Selektin vermittelten reversiblen Bindung des Leukozyten an das Endothel als Hauptgrund an, und führten diese Änderung des Adhäsionsverhalten auf eine Blockierung der LPS-abhängigen Produktion von TNF- α und Il-1 mit konsekutiv

verminderter Expression der Adhäsionsmoleküle zurück. Im weiteren Schockgeschehen nahmen die Leukozyten-Endothel-Interaktionen mit prozentualer Steigerung der adhärenenten Leukozyten in der $GdCl_3$ -Gruppe trotzdem zu. Im Gegensatz zur $NaCl$ -Gruppe mit Dominanz der permanent adhärenenten Leukozyten stellten die temporär adhärenenten Leukozyten in der $GdCl_3$ -Gruppe die stärkste Fraktion zum Zeitpunkt 12 h.

Auffällig zeigte sich auch die Leukozytenverteilung im Lobulus. Mit zunehmender Schockdauer ließ sich in der $GdCl_3$ -Gruppe im Gegensatz zur $NaCl$ -Gruppe eine Verschiebung der Leukozytenadhäsionen im Leberläppchen beobachten. Nach BOUWENS et al (1986) liegen die Kupfferzellen aufgrund des Blutflusses durch das Leberläppchen vor allem im Periportalfeld in größter Anzahl vor. Nach intravenöser Injektion phagozytieren diese Zellen als erste Makrophagen das Gadoliniumchlorid und werden blockiert. Die Aktivierung der Leukozyten wird dadurch in das midzonale Feld verschoben, wodurch in diesem Bereich die meisten Leukozyten-Endothel-Interaktionen stattfinden müssen. Unsere Ergebnisse wenige Stunden nach Schockbeginn bestätigten diese Verteilung. Im Verlaufe des weiteren Schockgeschehen ließen sich aber vermehrt Leukozytenadhäsionen im perizentralen Feld als im Periportalfeld nachweisen. Als Erklärung konnten die Studien von KOUDSTAAL et al (1991) und CEACIUC et al (1993) herangezogen werden, welche nach einer gewissen Zeit eine Zerstörung der Kupfferzellen durch Gadoliniumchlorid beobachteten. Die Restaktivität der blockierten Kupfferzellen im periportalen Feld kam durch die Kupfferzellzerstörung somit vollständig zum Erliegen. Durch eine Reduktion der Mediatorenausschüttung hafteten die Leukozyten entsprechend unseren Ergebnissen weniger im periportalen und vermehrt im midzonalen und perizentralen Feld.

Organschaden

Die Aktivität der Leberenzyme lag im Rahmen der Ergebnisse anderer Forschungsgruppen, zum Beispiel der GOT-Werte bei KONO et al (2002). Der Maximalwert der Leberenzymaktivität wurde in der $GdCl_3$ -Gruppe bereits nach einer Schockdauer von sechs Stunden erreicht, während der Aktivitätsgrad in der $NaCl$ -Gruppe bei bis dahin vergleichbaren Leberenzymwerten ab diesem Zeitpunkt sprunghaft anstieg. Dies würde bedeuten, dass das Fortschreiten der Organschädigung sistieren würde. Entgegengesetzt der Meinung, dass eine Leberzellschädigung mit der Transmigration des Leukozyten ins Gewebe korreliert, konnte nach sechs Stunden kein Rückgang der Leukozyten-Endothel-Interaktionen gesehen werden. Eine mögliche Erklärung für den Rückgang der Leberenzymaktivität mag nach DING et al (2003) in der hepatotoxischen Nebenwirkung des Gadoliniumchlorids in höheren Konzentration liegen. Entsprechende Dosen wurden aber in unserer Studie nicht erreicht.

Hinweise für eine frühexperimentelle Schädigung ergaben sich aus unseren Beobachtungen nicht. Die Ursache sahen wir nach KOUDSTAAL et al (1991) und CEACIUC et al (1993) in der Zerstörung der Kupfferzellen durch Gadoliniumchlorid nach einer gewissen Zeit. Die Produktion an Mediatoren durch die Kupfferzellen wird dadurch entsprechend der Studie von KONO et al (2002) reduziert.

Ergebnisse

Im Vergleich zur NaCl-Gruppe zeigt sich in der GdCl₃-Gruppe eine Abschwächung der systemischen Entzündungsreaktion. Unsere Ergebnisse bestätigen somit die Beobachtungen mehrerer Studien, unter anderem von HARDSTAD und KLAASSEN (2002) und LAZAR et al (2002), welche durch die intravenöse Injektion von Gadoliniumchlorid eine deutliche Abschwächung bzw. Verhinderung des septischen Schockgeschehens gesehen haben. Bisher wurde angenommen, dass diese Wirkung durch eine Blockierung der Kupfferzellen zustande kommt, indem die Calciumionen an der Oberflächenmembran durch Gadoliniumchlorid ersetzt werden (HISAMA et al, 1996). Über diesen Mechanismus sollte es zu einer verminderten Ausschüttung von Mediatoren durch die Kupfferzellen kommen. Aus der Studie von KONO et al (2002) ist aber bekannt, dass die Kupfferzellen im weiteren zeitlichen Verlauf durch Gadoliniumchlorid zerstört werden. Inwieweit die Entzündungsreaktion dadurch verzögert bzw. abgeschwächt wurde oder vollständig zum Erliegen kam, bleibt unklar. Viele Parameter sprechen in unserer Studie aufgrund ihres Verlaufes für ein Fortschreiten der Entzündungsreaktion, zum Beispiel die Zunahme der Leukozyten-Endothel-Interaktion mit vermehrter Transmigration im Verlaufe des Schockgeschehens. So fand auch AYALA et al (1994) trotz Blockierung der Kupfferzellen keine Änderung der TNF- α und Il-1 Blutspiegelwerte. Dies würde aber bedeuten, dass es weitere Zellen und Mechanismen geben muss, die das Fortbestehen des erhöhten Mediatorenspiegel des Schockgeschehens bewirken. Ein Ursache liegt wohl in der Wirkweise des Gadoliniumchlorids auf die Kupfferzellen. Nach KONO et al (2002) kann eine funktionale Heterogenität der Kupfferzellen unterschieden werden. Die Aufteilung erfolgte dabei in „small“, „intermediate“ und „large“ Kupfferzellen. Die beiden zuletzt genannten besitzen die größere Eigenschaft zur Phagozytose und werden durch Gadoliniumchlorid zerstört. Dadurch fallen die „Hauptzellen“ zur Mediatorenproduktion aus. Aufgrund des Verbleibes der „small Kupffer cells“ persistiert eine IL-6 Produktion, die auch in der Studie nach AYALA et al (1994) gesehen wurde. Nach SALKOWSKI et al (1995) kann Il-6 über Zellkontakte eine systemische Reaktion bewirken. Die Il-6 Serumkonzentration korreliert nach BIFFL et al (1996) und HOLZHEIMER et al (2000) mit der Schwere einer Sepsis. Ob dieser Mechanismus ausreicht, um die systemische

Entzündungsreaktion fortzuführen oder ob weitere Zellen daran beteiligt sind, muss in Langzeitmodellen geklärt werden.

6.3.2 MDP

Intravitalmikroskopie

Im Vergleich zur NaCl-Gruppe stellte sich die hepatische Mikrozirkulation in der MDP-Gruppe signifikant besser dar. Die gemessenen Parameter in der MDP-Gruppe nahmen häufig sogar Werte der Nicht Schock-Gruppe an. So waren zum Beispiel die Sinusoide in der MDP-Gruppe im Vergleich zur Nicht Schock-Gruppe weiter. Im Vergleich zur NaCl-Gruppe wurde als Hinweise für eine bessere Leberdurchblutung neben einer signifikant höheren Anzahl an perfundierten Sinusoiden ein höherer Leukozytenfluss gemessen.

Die intravitalmikroskopischen Parameter offenbarten in der MDP-Gruppe im Vergleich zur NaCl-Gruppe einen deutlichen Rückgang der Leukozyten-Endothel-Interaktionen mit verminderter Transmigration. Zu jedem Zeitpunkt stellten die frei fließenden Leukozyten den höchsten Anteil aller Leukozyten dar. Die mittlere Adhäsionszeit lag in den Zentralvenen der MDP-Gruppe unterhalb derer der NaCl-Gruppe. Trotzdem zeigten die Leukozyten mit zunehmender Schockdauer ein vermehrtes Adhäsionsverhalten, welches aber gegenüber der NaCl-Gruppe deutlich geringer ausfiel. Für diese Veränderungen wurde die Wirkung des MDP verantwortlich gemacht. Nach VAN ROOIJEN und SANDERS (1997) werden durch eine intravenöse Injektion von MDP über 95 % der Kupfferzellen zerstört. Entsprechend reduzierten sich die von den Kupfferzellen durch Endotoxin ausgeschütteten Mediatoren wie IL-1 β , IL-6, IL-10 und IL-12. SALKOWSKI et al (1995) beobachtete aber in seiner Studie eine nur 50 bis 75 %-igen Reduktion der TNF- α mRNA mit entsprechender Persistenz der TNF- α -sowie IL-6 Produktion nach MDP-Gabe, und vermutete als Erklärung eine weitere Produktionsstätte von Mediatoren. Erhärtet wird diese Annahme durch die Verteilung der Leukozytenadhärenzen über dem Leberläppchen. Die Analyse ergab zum einen ein erwartetes Muster mit Betonung des midzonalen Feldes aufgrund der 95 %-igen Zerstörung der Kupfferzellen im periportalen Feld. Interessanterweise zeigte sich weiterhin ein prozentual höher Anteil an Leukozyten-Endothel-Bindungen im periportalen Feld, deren Ätiologie unklar blieb.

Blutparameter

Im Blutbild war der Leukozytenverlauf auffällig. Nach raschem Abfall mit Ausbildung einer peripheren Leukopenie konnte nach zwölf Stunden Schock eine ausgeprägte Leukozytose gesehen werden. SALKOWSKI et al (1995) sah in seiner Studie auch eine Steigerung der Anzahl an Leukozyten in der MDP-Gruppe. Die erhöhten Werte der MDP-Gruppe im Vergleich zur NaCl-Gruppe sind unter anderem durch eine verminderte Transmigration verursacht. Andererseits können aufgrund der schwächeren Entzündungsreaktion mit entsprechend geringeren Schäden mehr Leukozyten aus dem Knochenmark aktiviert werden. Die Thrombozytenanzahl sowie der Säure-Base-Haushalt sprachen ebenfalls gegen das Vorliegen einer ausgeprägten Entzündung.

Organschaden

Seltsamerweise nahmen die Leberenzymwerte der MDP-Gruppe in den ersten sechs Stunden die höchsten Werte aller Schockgruppen an. Nach zwölf Stunden ließ sich ein Abfall der Leberenzymaktivität im Vergleich zur NaCl-Gruppe nachweisen. Das Fortschreiten der Organschädigung scheint somit zumindest gebremst worden zu sein. Die Ursache für diese Messergebnisse bleibt unklar. Eine Erklärung liegt wahrscheinlich in der Wirkung bzw. dem Nebenwirkungsprofil des MDP. Vielleicht wurde durch die Apoptose der Kupfferzellen eine lokale Entzündungsreaktion mit entsprechenden Schädigungen ausgelöst.

Ergebnis

Die systemische Entzündungsreaktion präsentierte sich im Vergleich zur NaCl-Gruppe deutlich abgeschwächer. Über das Fortschreiten lagen unterschiedliche Ergebnisse vor. Zum einen konnte eine langsame, aber stetige Zunahme der Leukozyten-Endothel-Interaktionen gesehen werden. Zum anderen lag ein nicht erklärbarer Leberenzymverlauf vor, welcher eine Abnahme der Organschädigung erst nach zwölf Stunden nachwies.

6.4 Vergleich Gadoliniumchlorid und MDP

Beide Substanzen entfalten bereits nach einer einmaligen Bolusgabe ihre Wirkung (DEACIUC et al, 1993). In unserer Studie ergaben sich beim Vergleich beider Substanzen eine vermehrte Abschwächung der systemischen Entzündungsreaktion in der MDP-Gruppe.

Intravitalmikroskopie

Die hepatische Mikrozirkulation stellte sich in der MDP-Gruppe im Vergleich zur $GdCl_3$ -Gruppe besser dar. Dabei nahmen sowohl der Leukozytenfluß als auch die Sinusoidweiten in der MDP-Gruppe im Vergleich zur $GdCl_3$ -Gruppe höhere Werte ein.

Bei Betrachtung des Adhäsionsverhaltens der Leukozyten ließen sich ebenfalls teils signifikante Unterschiede nachweisen. Zum Zeitpunkt 12 h stellten zum Beispiel in der $GdCl_3$ -Gruppe die temporär adhärenenten Leukozyten die höchste Anzahl an gezählten Leukozyten, während in der MDP-Gruppe die frei fließenden Leukozyten diese Position einnahmen. Das TAL/DAL Verhältnis im Lobulus war deutlich zu Gunsten der MDP-Gruppe verschoben, d.h. weniger dauerhaft adhärente Bindungen wurden eingegangen.

Blutbild

Während der Abfall des Base Exzess mit Tendenz zu verminderten pCO_2 -Werten (beginnende Hyperventilation) in der $GdCl_3$ -Gruppe auf eine azidotische Stoffwechsellage hinweist, ergaben sich in der MDP-Gruppe keine solchen Veränderungen. Die Thrombozytenanzahl sprach durch den rapiden Abfall in der $GdCl_3$ -Gruppe bei stabilem Verlauf in der MDP-Gruppe ebenfalls für eine ausgeprägtere systemische Inflammation.

Organschäden

Die Leberenzymwerte lagen als Indikator für eine Leberzellschädigung in der MDP-Gruppe kurze Zeit nach Schockinduktion signifikant über denen der $GdCl_3$ -Gruppe. Die genaue Ursache blieb dafür unklar. Als mögliche Erklärung kommt ein unterschiedliches Nebenwirkungsprofil beider Substanzen in Betracht.

Ergebnis

Die Prämedikation sowohl mit MDP als auch mit Gadoliniumchlorid schwächt die in unserer Studie erhobenen Parameter nach Endotoxinexposition im Vergleich zur NaCl-Gruppe ab. Durch MDP wurde die systemische Entzündungsreaktion am stärksten gebremst.

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse beider Substanzgruppen auf die Endotoxingabe liegt in der spezifischen Wirkweise der einzelnen Substanzen. Während die

Kupfferzellen durch Gadoliniumchlorid erst über eine Blockade mit zeitlicher Verzögerung einer Apoptose zugeführt werden (SALKOWSKI et al, 1995), induziert MDP unmittelbar diesen Zellvorgang. Ein weiterer Unterschied liegt im Angriffspunkt der beiden Substanzen. Nach VAN ROOIJEN et al (1989) und KONO et al (2002) können die Makrophagen immunhistochemisch in verschiedene Untergruppen unterteilt werden: Monoklonale Antikörper reagieren spezifisch auf Rattenmakrophagen, zum Beispiel ist der monoklonale Antikörper ED-1 (IgG1) spezifisch für Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Während Gadoliniumchlorid nur auf ED-2 positive Zellen wirkt (KONO et al, 2002; LEE et al, 2004), zerstört MDP sowohl ED-2, ED-1 als auch ED-3 Zellen (VAN ROOIJEN et al, 1989). Aufgrund der intravenösen Injektion werden zudem nicht nur Zellen in der Leber sondern auch Zellen, welche der Leber im Blutstrom nachfolgen (z.B. die Lunge) oder durch die Verabreichungsform ebenfalls direkt angeströmt werden (z.B. die Milz), miteinbezogen. So zerstört die Substanz MDP neben den ED-1 positiven Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen, auch ED-2 ortsansässige Makrophagen in der Milz sowie eine ED-3 Subgruppe der Makrophagen, welche in Lymphorganen vorkommen. Ausgenommen sind die ED-7 positiven Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten. Wie daraus ersichtlich, werden nicht alle phagozytosefähigen Makrophagen im Bereich der Leber durch beide Substanzen inaktiviert. Diese Tatsache könnte eine mögliche Erklärung für das festgestellte Fortschreiten der Entzündungsreaktion sein.

Unsere Ergebnisse widersprechen der Studie von ASHARE et al (2006). Durch eine vollständiger Zerstörung der Kupfferzellen mit entsprechendem Verlust der hepatischen Bakterienreinigungsfunktion kam es dort zu einer akuten Verschlimmerung des Schockgeschehens. Ähnliche bedenken bezüglich einer Kupfferzellenblockade bei einem Schockgeschehen äußerte auch AYALA et al. (1994), der eine Abnahme der immunologischen Abwehr gegenüber Infektionen mit Anstieg der Mortalität in Ratten beobachten konnte. Dabei kam es zur Eskalation von sogar einfachen Infektionen.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass zusätzliche, auch immunkompetente Zellen an den Abläufen eines Schockgeschehens in der Leber beteiligt sein müssen, und dabei eine wichtige Rolle zu spielen scheinen.

6.5 Therapeutische Relevanz und Schlussfolgerung

In der Beurteilung unserer Ergebnisse gilt zu berücksichtigen, dass die Daten allein für den Organismus der Ratte erhoben wurden. Eine Übertragung auf den Menschen ist somit nicht ohne weiteres möglich. Des Weiteren wurden unsere getesteten Substanzen vor Schockbeginn verabreicht.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Kupfferzellen entsprechend den Ergebnissen vorheriger Studien eine entscheidende Rolle im septischen Schockgeschehen spielen. Durch eine Veränderung der Kupfferzellenaktivität konnte die systemische Entzündungsreaktion beeinflusst werden. Die Substanz MDP schwächte dabei durch eine Apoptose der Kupfferzellen den inflammatorischen Prozess am Stärksten ab. Die beschriebene Wirkung des Gadoliniumchlorids aus vorherigen Studien konnte mit Nachweis einer Verlangsamung der Entzündungsreaktion bestätigt werden.

Unsere Ergebnisse legten aber auch mit Nachweis eines Fortschreitens der Inflammation die Vermutung nahe, dass zusätzliche Mechanismen bzw. Zellen existieren müssen, die zum SIRS bzw. MODS führen bzw. beitragen.

Zukünftige Studien sollten sich daher mit den Auswirkungen von Endotoxin auf den Gesamtorganismus beschäftigen und dabei auch die Veränderungen in Milz und Lunge berücksichtigen. Das Ziel stellt die Entschlüsselung der zusätzlich involvierten Zellen bzw. der weiteren Mechanismen dar. Dafür müssten zudem Langzeitstudien zu den beiden getesteten Substanzen durchgeführt werden. In diesem Rahmen könnte die Frage geklärt werden, inwieweit eine Blockade oder Apoptose der Kupfferzellen während einer systemischen Entzündungsreaktion einen therapeutischen Ansatz darstellt.

7 Literaturverzeichnis

1. Abbassi O, Kishimoto TK, McIntire LV, Anderson DC, Smith CW (1993) E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J Clin Invest.* 92:2719-2730
2. Abraham E, Laterre PF, Gary R, Levy H, Thalwar D, Traskoma BL, Trancois B, Guy JS, Bruckmann M, Rea-Neto A, Rossaint R, Perotin D, Sablotzki A, Arkins N, Utterback BG, Macias WL, Administration of Drotrecoginalfa (activated) in early stage severe sepsis (ADDRESS) study group (2005, Sept) Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death. *N Engl J Med.* 353(13):1332-1341
3. American College of chest physicians/society of critical care medicine consensus conferences (1992) Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Critical Care Medicine* 20:864-874
4. Angus DC, Linde-Zwirbel WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome and associated costs of care. *Crit Care Med.* 29:1303-1310
5. Asfarm P, De Backer D, Meier-Hellmann A, Radermacher P, Sakka SG (2004) Clinical review: Influence of vasoactive and other therapies on intestinal and hepatic circulations in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 8:170-179
6. Ashare A, Monick MM, Powers LS, Yarovinsky T, Hunninghake GW (2006) Severe bacteremia results in a loss of hepatic bacterial clearance. *Am J Respir Crit Care Med.*
7. Atarashi K, Hirata T, Matsumoto M, Kanemitsu N, Mivasaka M (2005) Rolling of Th1 cells via P-selectin glycoprotein ligand-1 stimulates LFA-1-mediated cell binding to ICAM-1. *J Immunol.* 174:1424-1432
8. Ayala A, Deol ZL, Lehman DL (1994) Polymicrobial sepsis but not low dose endotoxin infusion causes decreased splenocyte IL-2/IFN-gamma release while increasing IL-4/IL-10 production. *J Surg Res.* 56:579
9. Balkwill FR, Burke F (1989) The cytokine network. *Immunol Today* 10:299-304
10. Bankey P, Fiegel V, Singh R, Knighton D, Cerra FB (1989) Hypoxia and endotoxin induce macrophage-mediated suppression of fibroblast proliferation. *J Trauma* 29:972-980
11. Bankey PE, Cerra FB (1993) Hepatic dysfunction in shock and organ failure. In: Schlag G, Redl H (eds) Pathophysiology of shock, sepsis and organ failure. Schlag G, Redl H, Heidelberg, pp 948-960
12. Baue AE (1994) Multiple organ failure, multiple organ dysfunction syndrome and the systemic inflammatory response syndrome - Where do we stand? *Shock* 2:385-397

13. Bauer C, Bauer M, Fellger H, Rose S, Marzi I (1994) Interleukin-1 Rezeptorantagonist reduziert Leukozyten-Endothel-Interaktion nach hämorrhagischen Schock. *Langenbecks Arch Chir. (Suppl Chir Forum):*253-257
14. Bauer C, Marzi I, Thuma B, Bach F, Bühren V, Larsen R (1994) Dose-related pattern of sinusoidal leukocyte adhesion in sublobular regions of the liver after systemic endotoxin challenge in the rat. *Shock* 1:135
15. Bauer C, Roth W, Bahrami S, Marzi I (1996) Attenuation of shock-induced inflammation in the rat liver depends on the time of TNF-Alpha inhibition. *J Mol Med.* 74:51-58
16. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainant JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr, Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in severe sepsis (PROWESS) study group (2001) Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 344 (10):699-709
17. Beutler B, Cerami A (1989) The biology of cachectin/TNF- a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol.* 7:625-655
18. Beutler B, Poltorak A (2000) Positional cloning of LPS and the general role of toll-like receptors in the innate immune response. *Eur Cytokine Netw.* 11:143-152
19. Boivin A, Mesrobeaunu L (1935) Recherches sur les antigens somatique et sur les endotoxines des bacteries. Considerations générales et expose des techniques utilisée. *Rev Immunol. (Paris)* 1:553
20. Bone RC (1993) Gram-negative sepsis: A dilemma of modern medicine. *Clin Microbiol Rev.* 6:57-68
21. Bossi F, Fischetti F, Pellis V, Bulla R, Ferreri E, Mollnes TE, Regoli D, Tedesco F (2004) Platelet-activating factor and kinin-dependent vascular leakage as a novel functional of the soluble terminal complement complex. *J Immunol.* 173:6921-6927
22. Bouwens L, Baekeland M, De Zanger R, Wisse E (1986) Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology* 6:718-722
23. Brade H, Rietschel ET (1986) Die Endotoxine gram-negativer Bakterien: Chemische Struktur und biologische Wirkung. *Z Gastroenterol.* 24:25-31
24. Caille V, Bossi P, Grimaldi D, Vieillard-Baro A (2004) Physiopathology of severe sepsis. *Presse Med.* 33:256-261, Discussion 269
25. Calley MP, Kamei T, Flye WQ (1990) Kupffer cell blockade increases mortality during intraabdominal sepsis despite improving systemic immunity. *Arch Surg* 125:36-41

26. Carlos TM, Schwartz B, Kovach NL, Yee E, Rosa M, Osborn L, Chi-Rosso B, Newman B, Lobb R, Harlan JM (1990) Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood* 76:965
27. Carlos TM, Harlan JM (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84:2068-2101
28. Cohen J (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420:885-891
29. Croner RS, Hoerer E, Kulu Y, Hackert T, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E (2006) Hepatic platelet and leukocyte adherence during endotoxemia. *Crit Care Med.* 10:15
30. Croner RS, Lehmann TG, Fallsehr C, Herfarth C, Klar E, Kirschfink M (2004) C1-inhibitor reduces hepatic leukocyte-endothelial interaction and the expression of VCAM-1 in LPS-induced sepsis in the rat. *Microvasc Res.* 67:182-191
31. Curran RD, Billiar TR, Stueh DJ, Ochoa JB, Harbrecht BG, Flint SG, Simmons RL (1990) Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Ann Surg.* 212:462
32. Decker K (1990) Signal Paths and regulation of superoxide, eicosanoid and cytokine formation in macrophages of rat liver. *Biological Reactive Intermediates IV*:507-520
33. Degitz K, Lian-Jie L, Caughman SW (1991) Cloning and characterization of the 5' transcriptional regulatory region of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *J Biol Chem.* 266:14024
34. Dempfle CE (2005) Sepsis-associated coagulation disorders. *Hamostaseologie* 25:183-189
35. Diamond MS, Alon E, Parkos CA, Quinn MT, Springer TA (1995) Heparin is an adhesive ligand for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biology*:1473-1482
36. Diao H, Kohanawa M (2005) Endogenous interleukin-6 plays a crucial protective role in streptococcal toxic shock syndrome via suppression of tumor necrosis factor alpha production. *Infect Immun.* 73:3745-3748
37. Dinarello CA (1997) Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 112:312-329
38. Ding H, Peng R, Reed E, Li QQ (2003) Effects of Kupffer cell inhibition on liver function and hepatocellular activity in mice. *Int J Mol Med.* 12:549-557
39. Dixon B (2004) The role of microvascular thrombosis in sepsis. *Anaest Intensive Care* 32:619-629
40. Flaatten H (2004) Epidemiology of sepsis in Norway in 1999. *Crit Care Med.* 8 (4):180-184

41. Flohe L, Giertz H (1987) Endotoxins, arachidonic acid and superoxide formation. *Reviews of Infectious Diseases* 9:553-561
42. Furie MB, McHugh DD (1989) Migration of neutrophils across endothelial monolayers is stimulated by treatment of the monolayers with Interleukin-1 or tumor necrosis factor-Alpha. *J Immunol.* 143:3309-3317
43. Gando S, Kameue T, Matsuda N, Havakawa M, Hoshino H, Kato H (2005) Serial changes in neutrophil-endothelial activation markers during the course of sepsis associated with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res.* 116:91-100
44. Geneser F (1990) *Leber.* Geneser F *Histologie.* Deutscher Ärzte Verlag Köln
45. Granger DN, Kubes P (1994) The microcirculation and inflammation: Modulation of leucocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukocyte Biol.* 55:662-675
46. Green CE, Schaff UY, Sarantos MR, Lum AF, Staunton DE, Simon SI (2005) Dynamic shifts in LFA-1 affinity regulate neutrophil rolling, arrest and transmigration on inflamed endothelium. *Blood*
47. Habenicht A (1990) Arachidonsäuremetaboliten in der Inneren Medizin. *Fortschr Med.* 108:222-223
48. Hack CE, Hart M, Van Schijndel RJ, Eerenberg AJ, Nuijens JH, Thijs LG, Aarden LA (1992) Interleukin-8 in sepsis: Relation to shock and inflammatory mediators. *Infect Immun.* 60:2835-2842
49. Hafezi-Moghadam A, Thomas KL, Prorock AJ, Huo Y, Ley K (2001) L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *J Exp Med.* 193:863-872
50. Holzheimer RG, Capel P, Cavaillon JM, Cainzos M, Frileux P, Haupt W, Marie C, Mueller E, Ohmann C, Schoffel U, Lopez-Boado MA, Sganga G, Stefani A, Kronenberger L (2000) Immunological surrogate parameters in a prognostic model for multi-organ failure and death. *Eur J Med Res.* 19:283
51. Huang K, Fishwild DM, Wu HM, Dedrick RL (1995) Lipopolysaccharid-induced E-selectin expression requires continuous presence of LPS and is inhibited by bactericidal permeability increasing protein. *Inflammation* 19:389-404
52. Issekutz AC (1995) In vivo blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, Il-1-Alpha, TNF-Alpha, IFN-Gamma and C5a utilizes LFA-1, Mac-1 and VLA-4. *J Immunol.* 154:6533-6540
53. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ, Smith CW (1993) Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* 17:915
54. Jahanmehr SAH, Hyde K, Geary CG, Cinkotai KI, Maciver JE (1987) Simple technique for fluorescence staining of blood cells with acridine orange. *J Clin Path.* 40:926-929

55. Jimenez R, Belcher E, Sriskandan S, Lucas R, McMaster S, Vojnovic I, Warner TD, Mitchell JA (2005) Role of Toll-like receptors 2 and 4 in the induction of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci.* 102:4637- 4642
56. Juliano RL (1982) Liposomes and the reticuloendothelial system: Interactions of liposomes with macrophages and behaviour of liposomes in vivo. *Targetin of drugs* (G Gregoriadis et al., NATO Adv. Study Institute) 47:Series A
57. Jutila MA (1992) Leukocyte traffic to sites of inflammation. *APMIS* 100:191-201
58. Keshav S, Chung L-P, Gordon S (1990) Macrophage products in inflammation. *Diagn Microbiol Infect Dis.*13:439-447
59. Kishimoto T (2005) Interleukin-6: From basic science to medicine - 40 years in immunology. *Annu Rev Immunol.* 23:1-21
60. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC (1989) Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 245
61. Klintmann D, Li X, Thorlacius H (2004) Importance role of P-Selectin for leukocyte recruitment, hepatocellular injury and apoptosis in endotoxemic mice. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11:56-62
62. Klintmann D, Schramm R, Menger MD, Thorlacius H (2002) Leukocyte recruitment in hepatic injury: Selectin-mediated leukocyte rolling is a prerequisite for CD18-dependent firm adhesion. *J Hepatol.* 36:53-59
63. Kmiec Z (2001) Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 161:1-151
64. Kono H, Fukji H, Asakawa M, et al (2002) Functional heterogeneity of the Kupffer cell population is involving in the mechanism of Gadolinium in rats administered endotoxin. *Journal of Surgical Research* 106:179-187
65. Koudstaal J, Dijkhuis FWJ, Hardonk MJ (1991) Selective depletion of Kupffer cells after intravenous injection of gadolinium chloride. *Cells of the Hepatic Sinusoid* (E Wisse, DL Knook, RS McCuskey)
66. Langdale LA, Flaherty LC, Liggitt HD, Harlan JM, Rice CL, Winn RK (1993) Neutrophils contribute to hepatic ischemia reperfusion injury by a CD-18 independent mechanism. *J Leukoc Biol.* 53:511-517
67. Latifi SQ, O'Riordan MA, Levine AD (2002) Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. *Infect Immun.* 70:4441-4446
68. Lazar Gj, Paszt A, Kaszaki J, Duda E, Szakacs J, Tiszlavicz L, Boros M, Balogh A, Lazar G (2002) Kupffer cell phagocytosis blockade decreases morbidity in endotoxemic rats with obstructive jaundice. *Inflamm Res.* 51:511-518
69. Leaf A (1973) Cell swelling. A factor in ischemic tissue injury. *Circulation* 48:455

70. Lee CM, Yeoh GC, Olynyk JK (2004) Differential effects of gadolinium chloride on Kupffer cells in vivo and in vitro. *Int J Biochem Cell Biol.* 36: 481-488
71. Lefer AM (1989) Significance of lipid mediators in shock states. *Circ Shock* 27:3
72. Lefer AM, Lefer DJ (1993) Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 33:71
73. Levi M, Ten Cate H (1999) Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med.* 341:586-592
74. Ley K (1993) Leukocyte rolling: Transient adhesion mediated by vascular selectins. *Eur J Physiol Suppl.* R8
75. Linde-Zwirble WT, Angus DC (2004) Severe sepsis epidemiology: Sampling, selection and society. *Crit Care Med.* 8:222-226
76. Loppnow H, Flad H-D, Rietschel ET, Brade H (1993) The active principle of bacterial lipopolysaccharids (endotoxins) for cytokine induction. In: Schlag G, Redl H (eds.) *Pathophysiology of shock, sepsis and organ failure.* G Schlag and H Redl, pp 405-414
77. Luscinaskas FW, Cybulsky MI, Kiely J-M, Peckins CS, Davis VM, Gimbrone MAJ (1991) Cytokine-activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol.* 146:1617-1625
78. Marotto ME, Thurman RG, Lemasters JJ (1988) Early midzonal cell death during low-flow hypoxia in the isolated, perfused rat liver: protection by allopurinol. *Hepatology* 8:585-590
79. Martins GA, Da Gloria Da Costa Carvalho M, Rocha Gattass C (2003) Sepsis: A follow-up of cytokine production in different phases of septic patients. *Int J Mol Med.* 11:585-591
80. Marzi I (1993) Ischämie/Reperfusionssyndrome der Leber: Intravitalmikroskopische Charakterisierung zur Entwicklung therapeutischer Ansätze. *Habilitationsschrift Homburg/Saar*
81. Marzi I, Bauer C, Hower R, Bühren V (1993) Leukozyte-endothel cell interactions in the liver after hemorrhagic shock in the rat. *Circ Shock* 40:105-114
82. Marzi I (1994) Bedeutung der Leber für den Verlauf des SIRS nach Schock, Trauma und in der Sepsis. *AINS* 29:41-46
83. Marzi I, Bauer M, Reisdorf E, Walcher F (1994) Beteiligung des Plättchen-aktivierungsfaktors (PAF) an pathologischen Leukozyten-Endothel-Interaktionen in der Leber nach hämorrhagischen Schock. *Zentralbl Chir.* 119:814-821
84. Marzi I, Bauer M, Secchi A, Bahrami S, Redl H, Schlag G (1995) Effect of anti-tumor necrosis factor on leukocyte adhesion in the liver after hemorrhagic shock: Intravital microscopy study in the rat. *Shock* 3:27-33

85. Marzi I, Oda M (1995) Liver microcirculation. Clinically applied microcirculation research (J Barker, G Anderson, MD Menger). CRC Press:249-262
86. McCusky RS, Reilly FD, McCusky PA, Dimlich RVW (1978) In vivo microscopy of the hepatic microvascular system. *Bibliothca Anat* 18:73-76
87. McCusky RS, Urbaschek R, McCusky PA, Urbaschek B (1982) In vivo microscopic studies of the response of the liver to endotoxin. *Klin Wochenschr.* 60:749
88. McCusky RS (1988) Hepatic microcirculation. Sinusoids in human liver: Health and disease (P. Bioulac-Sage, C. Balabaud) Kupffer Cell Foundation, Rijswijk, Netherlands:151-164
89. McCusky RS, Reilly FD (1993) Hepatic microvasculature: Dynamic structure and its regulation. *Semin Liver Dis.* 13:1-12
90. McCusky RS (2000) Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver* 20:3-7
91. Menger MD, Marzi I, Messmer K (1991) In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res.* 23:158
92. Menger MD, Lehr H-A (1993) Scope and perspectives of intravital microscopy-bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 14:519
93. Mizgerd JP, Molina RM, Stearns RC, Brain JD, Warner AE (1996) Gadolinium induces macrophage apoptosis. *J Leukoc Biol* 59:189-195
94. Nakao A, Shimohara M (1985) Changes of circulating blood endotoxin analysed by quantitative assay after intravenous administration of endotoxin. *Jpn J Gastroenterol.* 82:296-300
95. Nimah M, Brill R (2003) Coagulation dysfunction in sepsis and multiple organ system failure. *Crit Care Med.* 19:441-458
96. Nishino M, Tanaka H, Ogura H, Inoue Y, Koh T, Fujita K, Sugimoto H (2005) Serial changes in leukocyte deformability and whole blood rheology in patients with sepsis and trauma. *J Trauma* 59:1425-1431
97. Nolan JP (1981) Endotoxin, reticuloendothelial function and liver injury. *Hepatology* 1:458-465
98. Nolte D, Hecht R, Schmid P, Botzlar A, Menger MD, Neumueller C, Sinowatz F, Vestweber D, Messmer K (1994) Role of Mac-1 and ICAM-1 in ischemia reperfusion injury in a microcirculation model of BLAB/C mice. *Am J Physiol.* 267:1320-1328
99. O'Leary MJ, Koll M, Ferguson CN, Coakley JH, Hinds CJ, Preedy VR, Garlick PJ (2003) Liver albumin synthesis in sepsis in the rat: influence of parenteral nutrition, glutamine and growth hormone. *Clin Sci. (Lond)* 105:691-698

100. Palluy O, Bonne C, Modat G (1991) Hypoxia/reoxygenation alters endothelial prostacyclin synthesis-protection by superoxide dismutase. *F Rad Biol Med.* 11:269
101. Pfeiffer R (1892) Untersuchungen über das Cholera Gift. *Z Hyg Infektionskr.* 11:393-412
102. Pober JS, Cotran RS (1990) Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev.* 70:427-451
103. Racanelli V, Rehermann B (2006) The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43:54-62
104. Rappaport AM (1958) The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *Anat Rec.* 130:673
105. Rietschel ET, Brade L, Brandenburg K, Flad H-D, De Jong-Leuveninck J, Kawahara K, Lindner B, Loppnow H, Lüderitz T, Schade U, Seydel U, Sidorczyk Z, Tacke A, Zähringer U, Brade H (1987) Chemical structure and biologic activity of bacterial and synthetic lipid A. *Infect Dis.* 9:527
106. Ring A, Stremmel W (2000) The hepatic microvascular responses to sepsis. *Semin Thromb Hemost.* 26:589-594
107. Rose S, Marzi I (1996) Pathophysiologie des Organversagens nach Trauma. *Zentralbl Chir.* 121:896-913
108. Sakamoto A, Matsumura J, Mii S, Gotoh Y, Ogawa R (2004) A prostaglandin E2 receptor subtype EP4 agonist attenuates cardiovascular depression in endotoxin shock by inhibiting inflammatory cytokines and nitric oxide production. *Shock* 22:76-81
109. Sakamoto M, Ueno T, Ohira H, Torimura T, Gondo K, Inzuzuka S, Sata M, Tanikawa K (1993) Effect of Endothelin-1 and substance P on Ito cell contraction. *Cells of the hepatic sinusoid (E Wisse, DL Knook)* 4:165-167
110. Saluk-Juszczak J, Wachowicz B (2005) The proinflammatory activity of lipopolysaccharide. *Postepy Biochem.* 51:280287
111. Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier AH (2002) Assembly and activation of the plasma kallikrein/kinin system: a new interpretation. *Int Immunopharmacol.* 2:1841-1849
112. Shariat-Madar Z, Schmaier AH (2004) The plasma kallikrein/kinin and renin-angiotensin systems in blood pressure regulation in sepsis. *J Endotoxin Res.* 10:3-13
113. Siegel JH (1992) The liver as modulator of the host-defense response: Host-defense failure as a manifestation of hepatic decompensation. *Shock, sepsis and organ failure (G. Schlag, H. Redl, J.H. Siegel) Second Wiggers-Bernard-Conference:*149-206
114. Simpson R, Alon R, Valeri R, Shepro D, Hechtman HB (1993) Integrin dependent neutrophil adhesion following gut ischemia and reperfusion. *Behring Inst. Mitt.* 92:210-217

115. Singer G, Urakami H, Specian RD, Stokes KY, Granger DN (2006) Platelet recruitment in the murine hepatic microvasculature during experimental sepsis: role of neutrophils. *Microcirculation* 13:89-97
116. Teah VL, Vukajlovich SW, Morrison DC (1988) Endotoxin interactions with serum proteins and relationships to biological activity. *Prog Clin Biol Res* 272:47-61
117. Tonnensen MG, Smedley L, Hendson PM (1984) Neutrophil-endothelial cell interactions. Modulation of neutrophil adhesiveness induced by complement fragments C5a and C5a arg and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in vitro. *J Clin Invest* 74:1581-1592
118. Tracy KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Volpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ, Zentella A, Albert JD, et al (1986) Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234:470-474
119. Tslotou A.G. SGH, Anagnostopoulos G., Bramis J. (2005) Septic shock: Current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit.* 11:76-85
120. Urban, Schwarzenberg (1987) Roche Lexikon. Urban und Schwarzenberg
121. Van Amersfoort ES, Van Berkel TJC, Kuiper J (2003) Receptors, mediators and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev.* 16:379-414
122. Van Berkel TJC, De Rijke YB, Kruijt JK (1991) Different rate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats. Recognition by various scavenger receptors on Kupffer and endothelial liver cells. *J Biol Chem* 266:2282-2289
123. Van Bossuyt H, Bouwens L, Wisse E (1988) Isolation, purification and culture of sinusoidal liver cells. *Sinusoids in human liver: Health and disease (P. Bioulac-Sage, C. Balabaud):*1-16
124. Van der Poll T, De Jonge E, Levi M, Van Deventer SJ (1999) Pathogenesis of DIC in sepsis. *Sepsis* 3:103-110
125. Van Rooijen N, Van Nieuwmegen R, Kamperdijk EWA (1985) Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. Ultrastructural aspects of elimination of marginal zone macrophages. *Virchows Arch B (Cell Pathol.)* 49:375-383
126. Van Rooijen N, Kors N, Van der Ende M, Dijkstra CD (1990) Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver after intravenous treatment with liposome encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell Tissue Res.* 260:215-222
127. Van Rooijen N, Sanders A (1994) Liposome mediated depletion of macrophages: Mechanism of action, preparation of liposomes and application. *J Immunol Meth.* 174:83-93

128. Van Rooijen N, Sanders A, Van der Berg T (1996) Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of drugs. *J Immunol Method.* 193:93-99
129. Van Rooijen N, Bakker J, Sanders A (1997) Transient suppression of macrophage functions by liposome-encapsulated drugs. *Trends Biotechnol.* 15:178-185
130. Van Rooijen N, Van Kesteren-Hendriks E (2002) Clodronate liposomes: Perspectives in research and therapeutics. *Journal of Liposome Research* 12:81-94
131. Vollmar B, Glasz J (1993) Role of leukocytes in the initial hepatic microvascular response to endotoxemia. *Zentralbl Chir.* 118:691-696
132. Vollmar B, Lang G, Post S, Menger MD, Messmer K (1993) Die Mikrozirkulation der Leber im hämorrhagischen Schock der Ratte und ihre Bedeutung für Energiestoffwechsel und Funktion. *Zentralbl Chir.* 118:218
133. Vollmar B (1995) Mikrozirkulation und Sauerstoffversorgung der Leber bei hämorrhagischen Schock und Sepsis. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerztherapie*:52-54
134. Von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors K-E, Butcher EC (1991) Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: Distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte Beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 88:7538-7542
135. Wake K, Kishiye T, Yamamoto H, Bhunchet E, Sakamoto Y (1993) Kupffer cells modulate configuration and contractility of perisinusoidal stellate cells. *Cells of the Hepatic Sinusoid (E Wisse, DL Knook)* 4
136. Walport M (1989) Complement. *Immunology (IM Roitt, J Brostoff and male, DK Harper and row)* New York:13.11-13.16
137. Wang X, Andersson R (1995) The role of endothelial cells in the systemic inflammatory response syndrome and multiple system organ failure. *Eur J Surg.* 161:703-713
138. Weber C (2003) Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines and junctional molecules. *J Mol Med.* 81:4-19
139. West MA, Billiar TR, Mazuski JE, Curran RJ, Cerra FB, Simmons RL (1988) Endotoxin modulation of hepatocyte secretory and cellular protein synthesis is mediated by Kupffer cells. *Arch Surg.* 123:1400
140. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990) CD 14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433
141. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW (2005) ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood* 106:582-592

142. Yuan J, Zhou L, Qin X (1998) The relationship between LPS-induced apoptosis in hepatocyte, Kupffer cell and hepatocytic damage. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 78:423-425
143. Zaitseva L, Vaisburd M, Shaposhnikova G, Mysyakin E (2000) Role of eicosanoids in regulation of macrophage phagocytic functions by platelet-activating factor during endotoxic shock. *Bull Exp Biol Med.* 130:879-881
144. Zhou X, Gao XP, Fan J, Liu Q, Anwar KN, Frey RS, Malik AB (2005) LPS activation of Toll-like receptor 4 signals CD 11b/CD 18 expression in neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 288:655- 662
145. Zivot JB, Hoffmann WD (1995) Pathogenic effects of Endotoxin. *New Horizons* 3:267-275

Publikationen:

Die Ergebnisse der Arbeit wurden als Poster auf dem Deutschen Anästhesisten Kongress 2000 präsentiert und anschließend als Abstract in der Zeitschrift „Anästhesiologie & Intensivmedizin“ 2000, Band 41, Seite 478, veröffentlicht.

8 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. I. Marzi und Herrn Prof. Dr. R. Larsen für die Möglichkeit der Dissertation. Besonders möchte ich Herrn PD Dr. C. Bauer danken, dass er die Betreuung meiner Dissertation übernahm und mich bei der schriftlichen Ausführung in hohem Maße unterstützte.

Herrn Dr. C. Herzog gilt mein Dank für seine Unterstützung bei meiner Einarbeitung in die chirurgische und mikroskopische Technik, die zeitaufwendige Betreuung während den Versuchen, für den fachkompetenten Informationsaustausch sowie für die Publikationen.

Bei Herrn Dr. W. Kuntz, der mir als Ersatzbetreuer stets zur Seite stand, möchte ich mich ebenso herzlich bedanken wie bei Herrn Dr. D. Henrich für sein Korrekturlesen mit hilfreichen Anmerkungen.

Meinem Doktorandenkollegen Herrn Alexander Di Liberto danke ich für die gute Zusammenarbeit während der gesamten Projektzeit.

Die tierexperimentellen Untersuchungen und die computer-unterstützte Auswertung erfolgten in den Räumlichkeiten der experimentellen Chirurgie, außerdem wurde ein Teil der laborchemischen Untersuchungen an den Geräten der experimentellen Chirurgie durchgeführt. In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Menger und allen seinen hilfsbereiten Mitarbeitern, vor allen den medizinisch-technischen Assistentinnen und den Tierpflegern, recht herzlich bedanken.

Für die weiteren laborchemischen Auswertungen danke ich auch dem klinischen Zentrallabor der Universitätskliniken unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Herrmann und seinem Team.

Im Rahmen der Auswertung gilt mein Dank auch Herrn Dr. Plusczyk, der mir für Nachauswertungen sein Computer-Programm zur Verfügung stellte.

Für die Bereitstellung des MDP danke ich Herrn Prof. Dr. N. Van Rooijen und Herrn Dr. A. Sander vom Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Amsterdam.

In besonderem Maße gilt mein Dank meiner Familie, der ich meine Doktorarbeit widme.

9 Lebenslauf

Name: Stephan Niederländer
Geburtsdatum: 14.11.1974 in Saarbrücken
Familienstand: verheiratet, ein Sohn
Staatszugehörigkeit: deutsch

Schulbildung

08/81 – 07/85 Grundschule in Schwalbach
08/85 – 05/94 Gymnasium in Saarlouis, Abschluss Abitur

Zivildienst

07/94 – 09/95 Ausbildung zum Rettungssanitäter, Rettungswache in Dillingen

Hochschulausbildung

10/95 – 10/01 Studium der Humanmedizin, Universität des Saarlandes, Homburg.
26.10.2001 Abschluss mit der ärztlichen Prüfung

Praktische Ausbildung

Famulaturen

03/98 – 04/98 Praxis für Allgemeinmedizin, Ensdorf
08/98 – 10/98 Urologische Klinik, Kantonsspital Winterthur, Schweiz
08/99 – 10/99 Innere Medizinische Abteilung, Allg. Krankenhaus Altona, Hamburg
02/00 – 03/00 Abteilung für Orthopädie, Landeskrankenhaus Feldkirch, Österreich.

Praktisches Jahr

10/00 – 01/01 Department of Medicine, Mayo General Hospital Castlebar, Irland
02/01 – 06/01 Dermatologie, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg
06/01 – 09/01 Chirurgische Klinik, Spitalzentrum Biel-Bienne, Schweiz

Assistenzzeit

01/02 – 08/02 Klinik für Chirurgie, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Trier
09/02 – 12/02 Klinik für Innere Medizin, Klinikum Konstanz
01/03 – 12/04 Klinik Medizin, Spital Lachen, Schweiz
seit 01/05 Klinik für Innere Medizin, Zuger Kantonsspital, Schweiz

Oberrieden, 26.06.2007