

Einfluss des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Simvastatin auf Überleben und
hämodynamische Parameter im murinen Sepsismodell

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Annette Maria van de Sandt

aus

Emmerich

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Malte Kelm

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Christian Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 9. August 2007

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

Für Meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Sepsis

1.1.1. Epidemiologie und Definition

1.1.2. Pathophysiologie der Sepsis

1.1.3. Hämodynamische Auswirkungen der Sepsis

1.1.4. Therapie der Sepsis

1.2. Statine und pleiotrope Effekte

1.3. Zielsetzung der Studie

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

2.2. Sepsisinduktion durch Coecum Ligatur und Punktion (CLP) bzw. Sham-Operation

2.3. Präoperative Applikation von Simvastatin bzw. eines Placebos

2.4. Überlebenszeiten nach Sepsisinduktion bzw. Sham-Behandlung

2.5. Echokardiographie

2.6. Invasive arterielle Blutdruckmessung in der rechten A. carotis communis

2.6.1. Versuchsaufbau und Präparation

2.6.2. Versuchsdurchführung

2.6.2.1. Messwerte

2.6.2.2. Protokoll der Versuchsdurchführung

2.6.3. Wirkungsmechanismen von Dobutamin und ETU und Auswirkungen auf den arteriellen Blutdruck

2.6.3.1. Dobutamin

2.6.3.2. S- Ethylthioisothiourea (ETU)

2.6.4. Narkosemittel

2.6.4.1. Urethan

2.6.4.2. Ketamin und Xylazin

2.7. Hämodynamische Eigenschaften des isolierten Herzens im Langendorff-Modell

2.7.1. Entwicklung des Langendorff-Modells

2.7.2. Versuchsaufbau

2.7.2.1. Beschreibung des Langendorff-Modells

- 2.7.2.2. Präparation/ Herzentnahme
- 2.7.2.3. Krebs-Henseleit-Lösung
- 2.7.2.4. Ballonkatheter
- 2.7.3. Versuchsdurchführung
 - 2.7.3.1. Messwerte
 - 2.7.3.2. Protokoll der Versuchsdurchführung
 - 2.7.3.3. Wirkungsmechanismen der eingesetzten Substanzen und Effekte am isolierten Herzen
 - 2.7.3.3.1. Bradykinin
 - 2.7.3.3.2. Adenosin
- 2.8. Datenerfassung und Datenverarbeitung der Blutdruck- und Langendorff-Ergebnisse
 - 2.8.1. Datenerfassung
 - 2.8.2. Datenverarbeitung
- 2.9. Statistische Analyse der Messergebnisse

- 3. Ergebnisse**
 - 3.1. Nachweis einer Sepsis mittels Anlage von Blutkulturen
 - 3.2. Überlebenszeiten nach Sepsisinduktion
 - 3.3. Echokardiographie
 - 3.4. Invasive arterielle Blutdruckmessung
 - 3.5. Hämodynamische Eigenschaften des isolierten Herzens im Langendorff-Modell
 - 3.5.1. LVDP
 - 3.5.2. dP/dT_{\max}
 - 3.5.3. Koronarfluss

- 4. Diskussion**
 - 4.1. Sepsisinduktion durch CLP: Ein klinisch relevantes Sepsismodell
 - 4.2. Simvastatin und hämodynamische Stabilisierung durch NO-Modulation
 - 4.2.1. Effekte der Simvastatintherapie auf peripheren Gefäßwiderstand und kardiale Funktion
 - 4.2.2. NO als Mediator vaskulärer Hyporeaktivität und septischer Kardiomyopathie
 - 4.2.3. Simvastatin beeinflusst NO-Freisetzung durch Modulation der eNOS

- 4.2.4. NO-Freisetzung und Modulation der iNOS durch Simvastatin
- 4.3. Stabilisierung der Hämodynamik und Prognoseverbesserung durch NO-unabhängige pleiotrope Effekte des Simvastatins
 - 4.3.1. Simvastatin beeinträchtigt Leukozyten-Endothel-Interaktionen
 - 4.3.2. Antioxidative, antithrombotische und immunmodulatorische Effekte von HMG-CoA-Reduktase- Inhibitoren
- 4.4. Prävention und Prognoseverbesserung einer Sepsis durch HMG-CoA-Reduktase- Inhibitoren

5. Zusammenfassung und Ausblick

6. Literaturverzeichnis

A. Abkürzungsverzeichnis

B. Materialienliste

C. Danksagung

D. Curriculum vitae

1. Einleitung

1.1. Sepsis

1.1.1. Epidemiologie und Definition

Sepsis stellt eine der häufigsten Todesursachen von Patienten auf Intensivstationen dar ¹ und gehört mit einer Mortalitätsrate von über 35- 70% ^{2,3} zu den führenden Todesursachen der Industrieländer. In den USA ist Sepsis die zehnthäufigste Todesursache ². Die jährlichen Krankenhauskosten belaufen sich auf 16,7 Milliarden Dollar. Zwischen 1979 und 2000 stieg die Inzidenz von 82,7/ 100000 auf 240,4/ 100000 Einwohner, was einem prozentualen Anstieg von 8,7% entspricht. Bei ansteigender jährlicher Inzidenz fiel die Mortalitätsrate zwar in den letzten 20 Jahren ab, jedoch stieg die absolute Zahl der Todesfälle in diesem Zeitraum kontinuierlich an ⁴. Mögliche Erklärungen für die ansteigende Inzidenz sind der medizinische Fortschritt mit Zunahme invasiver Verfahren, Einsatz immunsuppressiver Medikamente oder Chemotherapeutika, steigende Prävalenz HIV-infizierter Patienten, verbesserte Möglichkeiten Sepsis zu diagnostizieren und ansteigende Resistenzen mikrobieller Erreger ^{4,5}. Während bis 1987 vor allem gramnegative Erreger, z.B. E.coli, Pseudomonas ae. als verursachende Organismen dominierten, traten in den letzten Jahren die grampositiven Erreger z.B. S.aureus, S. pneumoniae in den Vordergrund. Zudem stieg die Zahl der durch Pilzinfektionen verursachten Sepsisfälle zwischen 1979- 2000 um 207% ⁴.

Sepsis ist definiert als systemische Reaktion des Körpers auf eine Infektion. Da Sepsis als Syndrom ein heterogenes Krankheitsbild darstellt, ist es schwierig eine eindeutige klinische Definition zu stellen. Dadurch wird jedoch das Verständnis der Pathophysiologie und eine standardisierte Analyse der Daten zu Inzidenz, Verlauf und Therapie erschwert ⁵.

Ursprünglich wurde Sepsis mit dem Vorhandensein bakterieller Erreger im Blut (Bakteriämie) assoziiert. Bone et al. erarbeitete 1989 eine Definition des septischen Syndroms basierend auf spezifischen klinischen Symptomen bei gleichzeitig bekanntem Infektionsherd ⁶. Jedoch präsentieren Patienten in 30-50% ⁷ klinische Symptome des septischen Syndroms ohne dass positive Blutkulturen vorliegen z.B.

im Rahmen einer akuten Pankreatitis oder eines Traumas. Diese Diskrepanz wurde überbrückt als 1992 die Konsensuskonferenz des "US Panel for the American College of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine" den Begriff des Systemischen inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS) prägte⁸. Das Systemische inflammatorische Response-Syndrom ist nicht an den Nachweis einer bakteriellen Infektion geknüpft und wird bei Vorhandensein von zwei oder mehr der folgenden Kriterien diagnostiziert:

- Körpertemperatur > 38 °C oder < 36 °C
- Herzfrequenz > 90/ min
- Atemfrequenz > 20/min oder PaCO₂ < 32mmHg
- Leukozyten > 12 x 10⁹/l oder < 4 x 10⁹/l oder Linksverschiebung > 10%

Eine Sepsis liegt vor, wenn ein Patient bei Nachweis oder klinischem Verdacht auf das Vorliegen einer Infektion mindestens zwei der vier SIRS- Kriterien aufweist. Um zwischen den verschiedenen Stadien des Krankheitsbildes unterscheiden zu können, führte die Konsensuskonferenz zudem die Termini der schweren Sepsis und des septischen Schocks ein. Eine schwere Sepsis erfordert den Nachweis mindestens einer Organdysfunktion (z.B. Oligurie, Koagulopathie, Enzephalopathie), Zeichen der Minderdurchblutung z.B. Laktatazidose oder das Vorliegen einer sepsisinduzierten Hypotonie (systolischer Blutdruck < 90mmHg oder Abfall des systolischen Blutdrucks um > 40mmHg des Ausgangswertes). Ist die arterielle Hypotension trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution nicht reversibel, sind die Kriterien des septischen Schocks erfüllt. Die klinischen Stadien der Sepsis, der schweren Sepsis und des septischen Schocks gehen ineinander über und sind assoziiert mit fortschreitenden Organfunktionsstörungen (z.B. Somnolenz, Anstieg harnpflichtiger Substanzen, Hypoxämie, Blutungen und zunehmende Letalität).

1.1.2. Pathophysiologie der Sepsis

Die Beobachtung, dass bei vielen Patienten mit septischen Symptomen keine Infektionsquelle gefunden werden konnte, führte zu der Idee, dass Sepsis durch eine übermäßige Entzündungsreaktion des Körpers auf die Invasion von Mikroorganismen entsteht. Lewis Thomas veröffentlichte 1972 folgende Vermutung: "It is our response to their presence (microorganisms) that makes the disease" ⁹. Bei systemischer Invasion von Bakterien, Viren, Parasiten, Pilzen oder durch systemische Einschwemmung verschiedener Toxine wie Endo- oder Exotoxine, kommt es zu einer generalisierten Aktivierung der Entzündungskaskade. Die Abwehrmechanismen des Körpers bestehen aus der Aktivierung verschiedener Plasmaprotein- Kaskaden einschließlich des Komplement- und Gerinnungssystems, sowie der Aktivierung neuroendokriner Reflexe ⁷ und zellulärer Komponenten z.B. Monozyten/ Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Endothelzellen. Die Antwort des Organismus führt zu einer massiven Freisetzung von unter anderem Zytokinen als Mediatoren, die die Entzündungsreaktion verstärken. Aus der Interaktion der aktivierten Systeme resultiert eine überschießende Antwort auf das Eindringen von Toxinen mit konsekutiver Ischämie und Dysfunktion einzelner Organsysteme bis hin zum Multiorganversagen ⁷.

a. Aktivierung des Immunsystems durch Toxine

Auf der Oberfläche von Mikroorganismen sind verschiedene Oberflächenmoleküle lokalisiert wie Lipopolysaccharide (Endotoxin), Lipoproteine, Peptidoglykane, die von speziellen Rezeptoren des Organismus erkannt werden. In diesem Zusammenhang konnten verschiedene Rezeptoren identifiziert werden. Hierzu gehört die Familie der zehn Toll-like-Rezeptoren (TLR's), denen eine entscheidende Rolle bei der Erkennung mikrobieller Strukturen zukommt ¹⁰. So entspricht der TLR2 dem LPS-Rezeptor, während der TLR4 vorwiegend an der Erkennung Gram-positiver Zellwandstrukturen beteiligt ist. TLR haben eine intrazelluläre Domäne (TIR), die mit dem IL-1-Rezeptor und dem IL-18-Rezeptor übereinstimmt. Nach Binden mikrobieller Oberflächenmoleküle an TLR werden über Signaltransduktion verschiedene Adapter und Kinasen aktiviert ³. Hieraus folgt eine verstärkte Translokation des Faktors NFκB mit vermehrter Transkription von Zytokin-Genen ^{3,10}. Neben den TLR konnten Nod1- und Nod2-Proteine als intrazelluläre Rezeptoren identifiziert werden. Als dritte

Rezeptorengruppe wurde kürzlich die Familie der Peptidoglykan Recognition-Rezeptoren (PGRP) gefunden¹⁰.

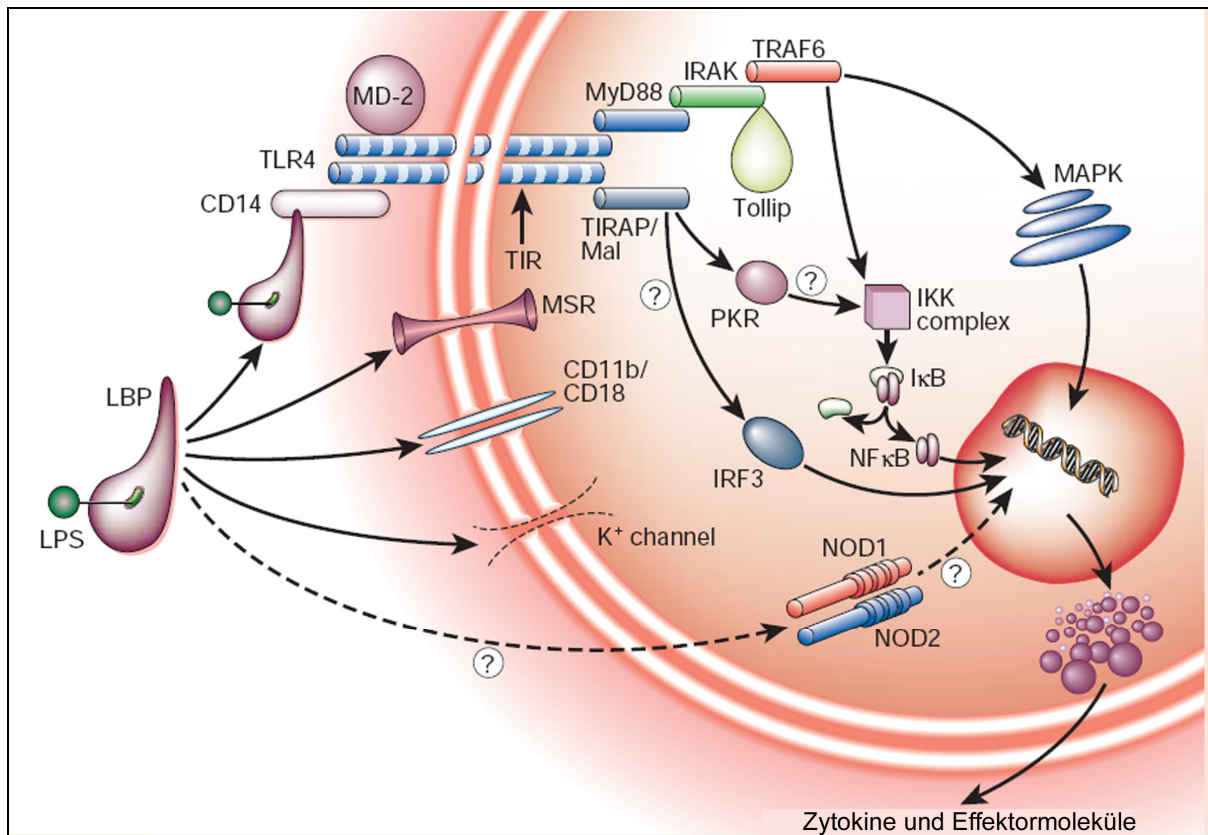


Abb. 1.1. Zelloberflächenerkennung des Lipopolysaccharids LPS. LPS bildet Komplex mit LPS-bindenden Protein (LBP) und löst Signalkaskade aus über TLR4-MD2-Komplex. Auch andere Moleküle identifizieren LPS: MSR (macrophage scavenger receptor), CD11b/CD18 und Ionenkanäle. Die intrazelluläre Signalkaskade ist abhängig von der gebundenen intrazellulären Domäne des TLR TIR (Toll/IL-1-Rezeptor homologe Domäne) an IRAK (IL-1 receptor associated kinase), erleichtert durch zwei Adapterproteine MyD88 (myeloid differentiation protein 88) und TIRAP (TIR domain-containing adapter protein). Negative Rückkopplung erfolgt durch ein drittes Protein: Tollip (Toll-interacting protein). Über TIRAP/MAL existiert ein MyD88-unabhängiger Weg über eine RNA-abhängige Proteinkinase und IRF-3 (interferon regulatory protein-3). Intrazelluläre Rezeptoren für LPS sind NOD1 und NOD2. Die genauen Mechanismen der Identifizierung von LPS im Zytosol durch NOD sind bisher unbekannt, modifiziert nach „The immunopathogenesis of sepsis“; *Nature* 2002; 420:885-91¹⁰

b. Leukozyten und Endothel

Nach der oben genannten Interaktion folgt eine weit reichende Aktivierung des Immunsystems einschließlich humoraler und zellulärer Komponenten. Insbesondere Makrophagen spielen hier eine Schlüsselrolle und aktivieren über die Freisetzung von Interleukin-12 CD4-T-Zellen, die daraufhin Zytokine mit inflammatorischem oder antiinflammatorischem Wirkungsprofil sezernieren. Als Typ-1-Helferzellen (Th-1-Zellen) setzen CD4-T-Zellen inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interferon- γ (INF- γ) und Interleukin-2 (IL-2) frei und als Typ-2-Helferzellen (Th-2-Zellen) kommt es zur Sekretion von Zytokinen mit antiinflammatorischem Profil z.B. Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-10 (IL-10) ¹¹. Die freigesetzten Zytokine wirken ihrerseits wieder auf die Zellen, so führen antiinflammatorische Zytokine zur Inhibition von Makrophagen, während Zytokine mit inflammatorischem Wirkungsprofil Makrophagen und dendritische Zellen aktivieren. Bisher ist unbekannt welche Faktoren entscheiden, ob die CD4-Zellen als Th-1 oder Th-2 Zellen agieren. Möglicherweise wird dieses von der Art des Pathogens, der Lage des Infektionsherdes und der Größe des Bakterieninokulums beeinflusst ¹².

Sind T-Zellen nicht in der Lage auf ein spezifisches Antigen mit der Sekretion von Zytokinen zu reagieren, wird dieser Zustand als Anergie bezeichnet. Heidecke stellte fest, dass Anergie mit der Mortalität von Patienten korreliert bei denen eine intraabdominelle Infektion vorlag ¹³. Möglicherweise wird sepsis-induzierte Anergie durch apoptotische Zellen getriggert. Induktoren für die Apoptose von Zellen wie Lymphozyten sind verschiedene proinflammatorische Mediatoren wie TNF- α . Lymphozyten erfahren während einer Sepsis eine rapide Apoptose ¹⁴. So zeigten Obduktionen von Patienten, die an Sepsis verstarben einen progressiven und apoptotisch-induzierten Verlust von B-Lymphozyten, CD4-Zellen und dendritischen Zellen. Dieser Verlust führt zu einer verminderten Antikörperproduktion, Makrophagen-Aktivierung und Antigen-Präsentation und verschlechtert die Reaktion auf ein Pathogen. Das bedeutet also, dass apoptotische Zellen einen immunsuppressiven Effekt ausüben, während hingegen nekrotische Zellen eine Immunstimulation bewirken und die Abwehrmechanismen verstärken ¹¹.

Neben den Makrophagen kommt den neutrophilen Granulozyten eine Schlüsselrolle zu. Sie werden durch viele Mediatoren aktiviert, sezernieren granuläre Enzyme und

reaktive Sauerstoffmetaboliten wie H_2O_2 , die zur Abtötung der auslösenden Mikroorganismen führen sollen. Während der Wanderung von neutrophilen Granulozyten in inflammatorisches Gewebe werden verschiedene Phasen differenziert: Anrollen, Adhäsion an Endothelzellen, Aktivierung und Aggregation. Bei der Adhäsion an Endothelzellen sind Adhäsionsmoleküle beteiligt, die auf der Oberfläche der Zellen unter dem Einfluss proinflammatorischer Mediatoren verstärkt exprimiert werden¹⁰ z.B. „lymphocyte function associated molecule 1“, „endothelial leucocyte adhesion molecule 1“, „L-Selectin“ und „P-Selectin“⁷. Die sichere Adhäsion der Leukozyten an das Endothel zieht eine Endothelzellschädigung nach sich und erlaubt den Leukozyten die endotheliale Barriere entlang eines chemischen Gradienten zu überwinden, was als Transmigration bezeichnet wird¹⁵. Unkontrollierte Aktivierung von Leukozyten, Adhäsion und Sequestration in die Mikrozirkulation führt zu einer exzessiven Freisetzung von Proteasen und Sauerstoffradikalen, die synergistisch wirken und eine weitere Schädigung des Endothels mit zunehmender Permeabilität der Gefäße bewirken^{7,9}.

c. Aktivierung des Komplementsystems

Die Aktivierung des Komplementsystems ist Bestandteil der Reaktion des Organismus auf Infektion und Inflammation. Über eine Kaskade von Plasmaproteinen werden proinflammatorischen Mediatoren wie Komplementfaktor C5a gebildet. Das Anaphylatoxin C5a wirkt durch verschiedene Mechanismen proinflammatorisch, z.B. über die Freisetzung granulärer Enzyme aus Phagozyten, Verbesserung der Chemotaxis, Vasodilatation und verstärkte Gefäßpermeabilität¹⁴. Ziel ist die Zerstörung des Antigens durch Abtöten, Opsonierung, Phagozytose, Verstärkung der Entzündungsreaktion und Stimulation der Immunantwort. Eine inadäquate und exzessive Aktivierung des Komplementsystems kann schädliche bis potenziell lebensbedrohliche Konsequenzen haben⁷.

d. Aktivierung des Gerinnungssystems

Neben dem Komplementsystem wird über proinflammatorische Zytokine das Gerinnungssystem aktiviert¹⁶, was bei 30-50% der septischen Patienten zu der Komplikation der disseminierten intravasalen Gerinnung führt¹⁰. LPS und andere mikrobielle Komponenten initiieren die Expression von Gewebefaktor auf mononukleären und endothelialen Zellen und nach einer Serie proteolytischer

Kaskaden erfolgt die Aktivierung der Gerinnungskaskade mit Konversion von Prothrombin zu Thrombin. Gleichzeitig kommt es zu einer Störung der Fibrinolyse mit Abnahme der Gerinnungsinhibitoren z.B. Antithrombin III, aktiviertes Protein C. Das Gleichgewicht wird zugunsten der Blutgerinnung verschoben mit Entstehung von Mikrothromben in den kleinen Gefäßen, die zu Störungen der Mikrozirkulation, inadäquater Gewebepfusion und Organversagen führen.

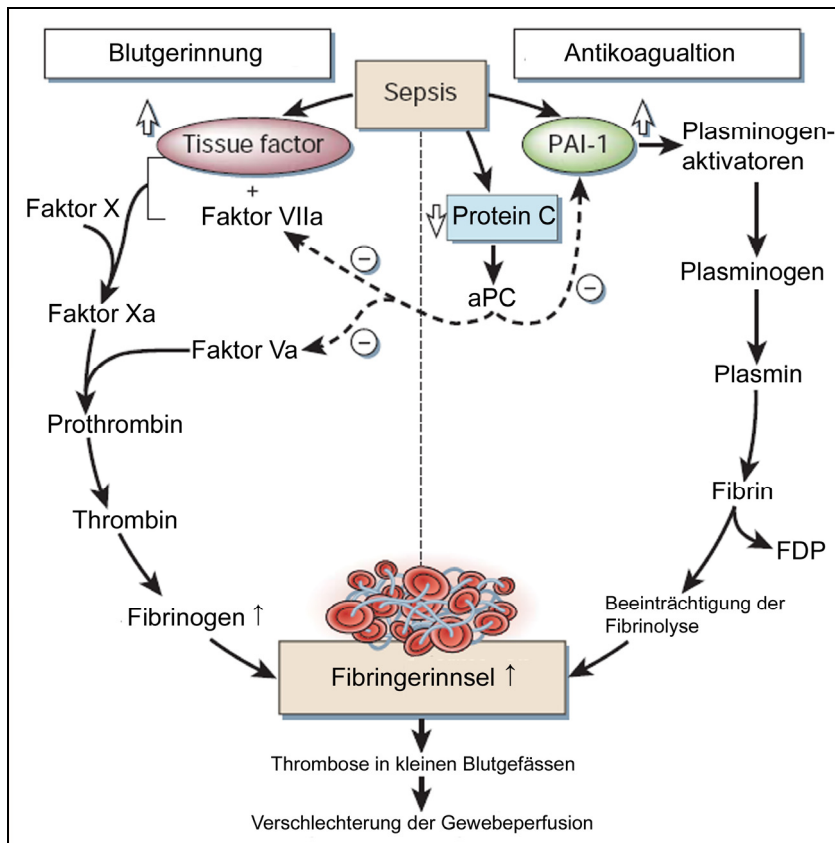


Abb. 1.2. Das Gleichgewicht zwischen Koagulation und Antikoagulation ist unter septischen Bedingungen zugunsten der Koagulation gestört, modifiziert nach „The immunopathogenesis of sepsis“; *Nature* 2002; 420:885-91 ¹⁰

Die beschriebenen proinflammatorischen Mediatoren, die Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems reflektieren den überaktiven Status des Entzündungssystems zu Beginn einer Sepsis. In späteren Stadien überwiegen antiinflammatorische Mediatoren. Dadurch wird vor allem die Funktion der neutrophilen Granulozyten supprimiert und es lässt sich ein hyporeaktives Abwehrsystem bis hin zu einer Immunparalyse beobachten bei gleichzeitig vorliegender unkontrollierter Entzündungsreaktion und konsekutiver Gewebe- und Organschädigung ⁷. Die komplexen Interaktionen der Mediatoren z.B. Zytokine,

Arachidonsäurederivate, NO und reaktive Sauerstoffspezies führen zu verschiedenen pathophysiologischen Veränderungen: Zunahme der Gefäßpermeabilität, Tonusverlust der Arteriolen und Mikrozirkulationsstörungen aufgrund von Mikrothromben bewirken eine Verschiebung der Flüssigkeit ins Interstitium („capillary leakage“) mit Abnahme des Perfusionsdrucks. Zunehmendes Kreislaufversagen führt zu inadäquater Sauerstoffversorgung der Gewebe. Organminderperfusion und Zellhypoxie haben eine diffuse Gewebeschädigung zur Folge bis hin zu Störungen der Organfunktion. Letztlich verstirbt der Patient im Multiorganversagen ¹⁷.

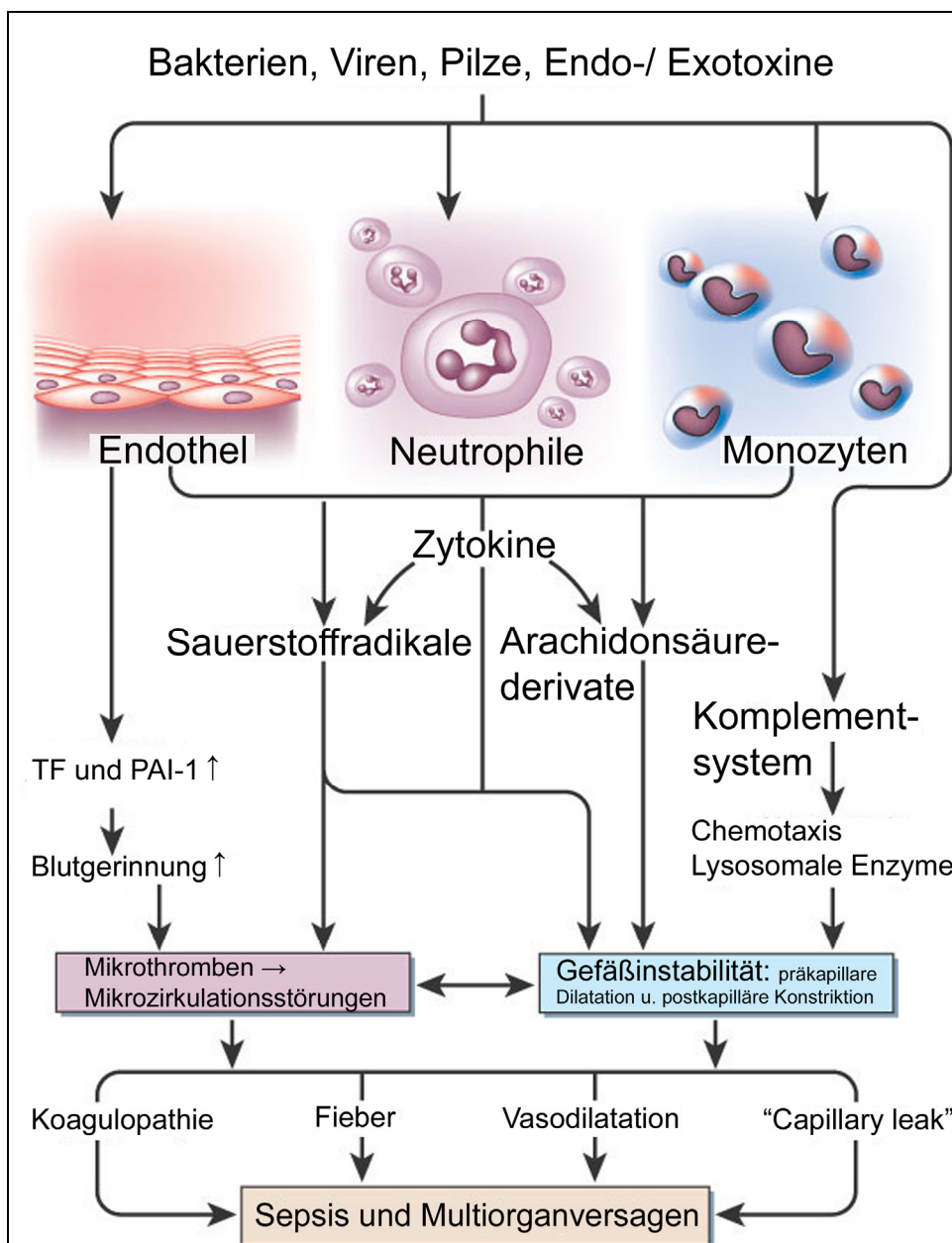


Abb. 1.3. Überblick Pathogenese der Sepsis; modifiziert nach „The immunopathogenesis of sepsis“; *Nature* 2002, Vol. 420:885-91

1.1.3. Hämodynamische Auswirkungen der Sepsis

Während einer Sepsis sind zwei unterschiedliche hämodynamische Phasen zu beobachten: Zunächst kommt es zu einer hyperdynamen Kreislaufsituation, die gekennzeichnet ist durch ein hohes Herz-Zeit-Volumen, einen niedrigen systemischen Gefäßwiderstand, eine Hypotension, die sich als refraktär gegenüber Katecholaminen erweist und eine verminderte Sauerstoffextraktion der Gewebe. Mit Progression der Sepsis nimmt das initiale hohe Herz-Zeit-Volumen bei unverändertem niedrigem systemischem Gefäßwiderstand ab. Es resultiert der hämodynamische Schock. Zugrunde liegen unter anderem eine kardiale Dysfunktion und Veränderungen des Gefäßtonus¹⁷. Die Balance zwischen vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen Einflüssen ist gestört. Erhöhte Nitrit-/ Nitratspiegel als Nebenprodukte des NO¹⁸, die Abnahme des Gefäßtonus während einer Sepsis und die Identifikation des EDRF (endothelium-derived relaxing factor) als NO führte zu der Annahme einer zentralen Rolle des NO in der Pathogenese der Sepsis¹⁹.

Als biologisches Molekül kommt NO ubiquitär vor. Produziert wird es durch verschiedene Zelltypen und entfaltet auf zellulärer und vaskulärer Ebene im Rahmen verschiedener physiologischer Prozesse sowohl schädliche als auch nützliche Effekte²⁰. NO wird durch drei Isoformen der NO-Synthase synthetisiert. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Produktion Calcium-abhängig durch die konstitutiven NO-Synthasen, die vorwiegend durch Neurone (neuronal NOS = nNOS) und Endothelzellen (eNOS), exprimiert werden²¹. Freigesetztes NO diffundiert in benachbarte glatte Muskelzellen, aktiviert die Guanylatzyklase, die zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) bildet, welches wiederum die cGMP-abhängige Proteinkinase aktiviert. Resultat ist die Relaxation der glatten Muskelzellen¹⁷. Die Freisetzung von NO durch die eNOS ist im Gefäßsystem an der Regulation des Blutdrucks, der Durchblutung der Organe, der Inhibition der Plättchenaggregation und der Leukozytenadhäsion an das Endothel beteiligt^{17,22}.

Unter Stressbedingungen wie sie im Rahmen einer Sepsis vorherrschen, fördern unter anderem Entero- und Endotoxine und proinflammatorische Zytokine die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Zellen des Endokards und Makrophagen^{17,23}. Konsekutiv werden Calcium- unabhängig große Mengen NO freigesetzt. Als Mediator des Tonus

der glatten Gefäßmuskulatur verursacht NO eine systemische Vasodilatation mit Abnahme des systemischen Widerstands. Die erhöhte Freisetzung des NO während einer Sepsis, die Downregulation der Adrenorezeptoren an den Zellmembranen glatter Muskelzellen ²⁴ und zusätzlich die Unterdrückung der biologischen Aktivität von Katecholaminen durch NO ²⁵⁻²⁷ erklären das verminderte Ansprechen von Vasokonstriktoren in der Therapie der Sepsis ²⁸. Die Bedeutung der cNOS im Rahmen der Pathogenese der Sepsis konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. eNOS kann in einer Sepsis vorübergehend ansteigen, fällt aber später unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α ab ^{15,22,28}.

Neben den Wirkungen des NO auf vaskulärer Ebene sind auch direkte zelluläre toxische Einflüsse festzustellen. Direkt oder nach Interaktion mit freien Sauerstoffradikalen zu dem toxischen Peroxynitrit beeinträchtigt es die mitochondriale Funktion ²⁸. Als Regulator des Elektronentransfers und der ATP-Synthese bewirkt NO in den Mitochondrien eine Inhibition der Cytochromoxidase, ein Schlüsselenzym der Atmungskette ²⁹. Hieraus resultiert eine verminderte Energieproduktion mit Wechsel des Glucose-Metabolismus von aerob nach anaerob ²², eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoff-Spezies wie H₂O₂ und Beeinflussung der Signaltransduktionswege für Zellproliferation und Apoptose ²⁹.

Im Rahmen der septischen Kardiomyopathie spielt NO eine wichtige Rolle. Septische Kardiomyopathie ist gekennzeichnet durch biventrikuläre Dilatation, Abnahme der linksventrikulären Pumpfunktion und der Ejektionsfraktion ^{21,24}. Die Ursachen sind noch nicht eindeutig geklärt. Zwar wurden viele Mediatoren mit der septischen Kardiomyopathie assoziiert, eine eindeutige Substanz konnte bisher nicht identifiziert werden. Eine frühere Theorie der kardialen Depression war die globale Minderperfusion des Herzens mit nachfolgender Ischämie ²⁴. Eine andere Theorie ist die Annahme einer zirkulierenden Substanz, eine so genannte „myocardial depressant substance“ (MDS) ^{24,27}. Unterstützt wird diese Theorie dadurch, dass Ultrafiltrat von septischen Patienten die Frequenz der Kontraktion von Kardiomyozyten der Ratte senkt. Es wird vermutet, dass die Ätiologie der septischen Kardiomyopathie multifaktoriell ist. NO konnte neben proinflammatorischen Zytokinen als potentieller kardiodepressiver Faktor identifiziert werden ^{24,27}. An isolierten Kardiomyozyten von Meerschweinchen ³⁰ und bei isolierten Rattenherzen ³¹ im

Working-Heart- bzw.- Langendorff-Modell beeinträchtigt NO die myokardiale Energiegewinnung und wirkt negativ inotrop. Die verschiedenen Effekte am Herzen sind sowohl cGMP- abhängig als auch –unabhängig: Abnahme der Calcium-Affinität der Myofilamente, Veränderung der Proteinkinaseaktivität und des L-Typ Calciumkanals, Abnahme des cAMP über die Aktivierung der cGMP-abhängigen Phosphodiesterase, Inhibition der mitochondrialen Atmung und folglich der ATP-Produktion³², zelluläre Dysfunktion durch Peroxynitrit und Induktion von Apoptose in Kardiomyozyten^{21,24}.

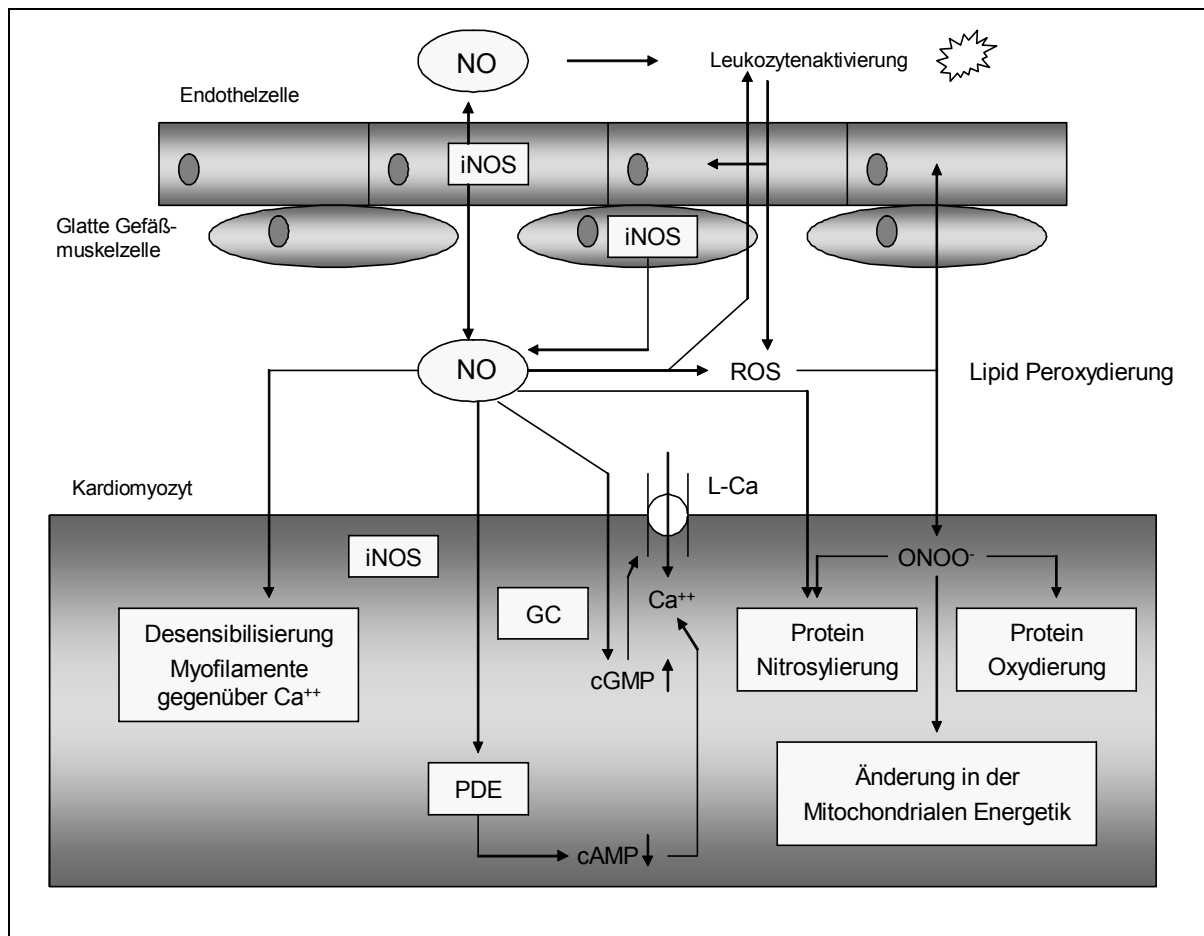


Abb. 1.4. Mögliche Mechanismen von Stickstoffmonoxid (NO) bei der Modulation der myokardialen Funktion unter physiologischen Bedingungen und im septischen Schock. iNOS=induzierbare NO Synthase; ROS=reaktive Sauerstoffspezies; Ca⁺⁺ = Kalzium; GC=Guanylatcyclase; cGMP=zyklisches Guanodinmonophosphat; L-CA=L-Typ Kalziumkanal; PDE=Phosphodiesterase; cAMP=zyklisches Adenosinmonophosphat; ONOO⁻=Peroxynitrit, modifiziert nach Janssens U.: Die septische Kreislauferkrankung, *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2003; 128:803-809²⁴.

NO hat im Rahmen einer Sepsis jedoch nicht ausschließlich negativen Einfluss. Da pharmakologische Inhibition der NO-Synthase zu einer Reduktion der kontraktile Funktion führt^{33,34}, folgerte unter anderem Müller-Strahl et al., dass NO in

physiologischen Konzentrationen die myokardiale Funktion unterstützt ³⁵. Zusätzlich nimmt die Myokardperfusion durch Vasodilatation zu. Hierdurch verbessert sich auch das Sauerstoffangebot. Die Dilatation der Koronarien ist zurückzuführen auf die eNOS-Expression ²¹.

Eine Inhibition der NOS im Rahmen einer septischen Therapie verbessert zwar die systolische kardiale Funktion und den Gefäßmuskeltonus, die positiven Effekte des NO gehen jedoch verloren. Diese lassen sich insbesondere auf die Blockade der eNOS zurückführen mit Verlust der lokalen Blutflusskontrolle, verstärkter Leukozytenmigration und Thrombusbildung ^{3,22}. Als Resultat des erhöhten systemischen Gefäßwiderstands und der konsekutiv erhöhten Nachlast bei fehlendem Anstieg der Herzfrequenz und des Schlagvolumens beobachtete unter anderem Petros et al. eine Abnahme des Herzzeitvolumens und der Gewebepfusion. Eine Beeinträchtigung der rechtsventrikulären Funktion ist zurückzuführen auf eine Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstands und des pulmonal-arteriellen Drucks ²⁴.

1.1.4. Therapie der Sepsis

Trotz des inzwischen fortgeschrittenen Verständnisses der Pathophysiologie der Sepsis ist die Therapie dieses Krankheitsbildes nach wie vor schwierig und mit einer hohen Mortalität verbunden ¹⁰. Das Versagen vieler klinischer Studien im Hinblick auf antiinflammatorische Strategien der letzten 40 Jahre ist unter anderem in der Schwierigkeit einer präzisen klinischen Definition der Sepsis begründet. Zudem ist die Population septischer Patienten nicht homolog ¹⁴.

Zur Verbesserung der Mortalität und Morbidität einer schweren Sepsis und des septischen Schocks wurden 2003 von einem Expertenteam Richtlinien zur Therapie aufgestellt ³⁶. Grundpfeiler der Behandlung sind die Beherrschung der Schocksymptomatik, die Behandlung der Grundkrankheit, Fokussanierung und Antibiotika, eine supportive Therapie des Multiorganversagens und eine additive Therapie der systemisch-entzündlichen Reaktion mit Unterbrechung des Toxin-Mediator-Netzwerks durch verschiedene Strategien (Neutralisation, Antagonisierung und Elimination) ^{24,27}. Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie ist die möglichst frühzeitige Diagnosestellung einer Sepsis ^{7,27} und die Einleitung einer adäquaten Therapie unter intensivmedizinischer Betreuung ³. Periphere Vasodilatation, intravasaler Flüssigkeitsmangel, septische Kardiomyopathie und gesteigerter Metabolismus führen zu einer Diskrepanz zwischen Sauerstoffbedarf und –angebot mit konsekutiver globaler Gewebehypoxie und Entwicklung eines Multiorganversagens. Um dieser Diskrepanz entgegenzuwirken ist eine zielgerichtete Beeinflussung der kardialen Vor- und Nachlast und der Kontraktilität notwendig ³⁷.

Wichtigste Maßnahme ist hier eine frühzeitige aggressive Volumenzufuhr unter invasivem hämodynamischem Monitoring, um ein ausreichendes Blutvolumen und damit einen suffizienten venösen Rückstrom und ein adäquates Herzzeitvolumen zu erzielen ^{10,24,27}. Kann trotz angemessener Flüssigkeitstherapie keine hämodynamische Stabilisierung erreicht werden, ist der Einsatz vasokonstriktorisches wirkender Katecholamine wie Noradrenalin oder Dopamin indiziert gegebenenfalls bei Patienten mit niedrigem Herzzeitvolumen in Kombination mit Dobutamin, welches positiv inotrop wirkt ^{10,27,36}.

Neben der hämodynamischen Stabilisierung sind die Diagnostik mit Abnahme von Blutkulturen, die Einleitung einer Therapie mit einem Breitspektrum-Antibiotikum und falls möglich eine Fokussanierung z.B. durch Drainage eines Abszesses grundlegend zur erfolgreichen Therapie³⁶. Supportive Verfahren bei Multiorganversagen sind unter anderem eine mechanische Beatmung bei Entwicklung eines ARDS und Hämodialyseverfahren bei akutem Nierenversagen³⁶. Von Bedeutung ist zudem eine intensive Insulintherapie und strikte Einhaltung eines Blutzuckerwertes zwischen 80 und 110 mg/dl^{11,36,38}.

In den letzten Jahrzehnten gab es viele erfolglose Versuche der Hyperaktivität des Immunsystems im Rahmen einer Sepsis durch Strategien gegen proinflammatorische Mediatoren zu begegnen. Ein Beispiel ist der hochdosierte Einsatz von Kortikosteroiden^{16,39}. Dieser brachte jedoch in der Therapie der schweren Sepsis und des septischen Schocks keinen Überlebensvorteil, sondern war sogar durch vermehrt auftretende sekundäre Infektionen mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko verbunden^{11,16,40,41}. Experimentelle Studien, die in vitro oder im Tiermodell Erfolg versprachen, zeigten in klinischen Studien keine signifikante Reduktion der Mortalität. Beispiele sind Antiserum gegen Endotoxin¹⁶ oder monoklonale Antikörper in Bezug auf das LPS (HA-1A, E5)^{3,16}. Andere Strategien verfolgten die Inhibition oder Antagonismus bestimmter Mediatoren der Entzündungskaskade: TNF- α ^{42,43}, IL-1⁴⁴, PAF, Arachidonsäurederivate (Prostaglandin E1, Thromboxan), Sauerstoffradikale, Bradykinin, Phosphodiesterase, C1-Esterase und NO-Synthase (unspezifisch)^{3,16}.

2001 wurde eine Studie veröffentlicht, die zeigte, dass Patienten mit schwerer Sepsis oder im septischen Schock vom Einsatz von Kortikosteroiden in „physiologischen“ Dosen profitieren⁴⁵. Tatsächlich konnte Annane 2002 eine signifikante Reduktion der Mortalität bei Patienten im septischen Schock nachweisen Nebenniereninsuffizienz^{46,47}. Kortikosteroide in physiologischen Dosen führen zu einem verbesserten Ansprechen und erhöhter Expression adrenerger Rezeptoren¹¹. Nach den neuen Richtlinien gilt daher für Patienten im septischen Schock die Empfehlung zur intravenösen Gabe von 200-300 mg Hydrokortison pro Tag über sieben Tage³⁶.

Bei Patienten mit hohem Mortalitätsrisiko ist außerdem rekombinantes aktiviertes Protein C (aPC) indiziert^{24,36}. aPc wirkt bei Präsenz des Kofaktors Protein S antikoagulatorisch als proteolytischer Inhibitor der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa. Unter septischen Bedingungen nimmt die Fähigkeit des Organismus zur Generierung von aPC ab, was unter anderem zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der Gerinnung führt¹⁶. Für aktiviertes Protein C konnte eine signifikante Reduktion schwerer Sepsis nachgewiesen werden^{3,10,16,48,49}. Es entfaltet neben antikoagulatorischer Wirkung, antiinflammatorische Effekte⁵⁰ und ist Endothel- protektiv^{14,16,48}. aPC erhöht jedoch auch das Blutungsrisiko mit möglichem Auftreten intrazerebraler Blutungen, so dass sich die Zulassung nur auf Patienten mit schwerer Sepsis, einem APACHE-II-Score > 25 sowie mindestens zwei Organdysfunktionen beschränkt ist^{24,49,51}.

Der Erfolg des aPC und die Entdeckung weiterer Mediatoren lassen auf die Einführung neuer Therapiestrategien hoffen. Einige Beispiele sind C5a und der C5a-Rezeptor^{3,11,14,16,52,53}, HMGB1 (high mobility group box protein 1), ein extrazellulärer Mediator der lokalen und systemischen Entzündung^{3,7,11,14,16}, MIF (macrophage migration-inhibitor factor)^{3,7,14,16,54} und weitere Studien, die der Inhibition intestinaler epithelialer Apoptose^{14,16} und der iNOS^{3,15} nachgehen.

1.2. Statine und pleiotrope Effekte

Die Entdeckung der Statine, ursprünglich abstammend vom *Penicillium citrinum*, in den 70er Jahren revolutionierte die Therapie der Hypercholesterinämie als wichtigen Risikofaktor der Atherosklerose⁵⁵. Statine inhibieren kompetitiv die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase über Seitenketten, die an die aktive Seite des Enzyms binden. Da HMG-CoA-Reduktase das reaktionsgeschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterinbiosynthese ist, bewirken Statine eine 30-50%ige Reduktion des Cholesterinspiegels im Plasma. Daneben kommt es zu einer vermehrten Expression des LDL-Rezeptors in der Leber mit Abnahme des LDL-Cholesterins in der Peripherie und Zunahme des HDL-Cholesterins um 5-10%⁵⁶⁻⁵⁸. Verschiedene klinische Studien konnten zeigen, dass der Einsatz von Statinen als Lipidsenker sowohl in der primären (z.B. die WOSCOPS Studie) als auch in der sekundären Prävention (z.B. die Scandinavian Simvastatin Survival Studie) kardiovaskulärer Erkrankungen zu einer signifikanten Reduktion der Morbidität und Mortalität führt^{56,59}. Atherosklerose wird beschrieben als komplexer Entzündungsprozess charakterisiert durch verschiedene Komponenten wie Rekrutierung von Entzündungszellen z.B. Makrophagen und T-Zellen, Sklerose, Zellproliferation und Neovaskularisation. Es konnte gezeigt werden, dass Statine die Progression einer koronaren Artherosklerose verlangsamen und zu einer Regression führen^{59,60}. Interessanterweise stellen sich die angiographischen Veränderungen unter Statintherapie als wenig beeindruckend dar im Vergleich zur signifikanten Reduktion der Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse⁶⁰. Diese Beobachtung und die Erkenntnis, dass Atherosklerose ein Entzündungsvorgang ist, lassen vermuten, dass Statine neben ihrer lipidsenkenden Wirkung so genannte pleiotrope Effekte aufweisen. In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise für pleiotrope Effekte von Statinen. So zeigten z.B. die Heart-Protection-Studie⁶¹ und Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Studie -Lipid Lowering Arm⁶², dass Patienten mit und ohne vaskuläre Erkrankungen unabhängig von ihren LDL- Cholesterin- Werten von einer Statintherapie profitieren. Tierexperimentell konnte bei konstant gehaltenen Plasmalipidspiegeln z.B. für Simvastatin nachgewiesen werden, dass es unabhängig von den lipidsenkenden Eigenschaften bei Schweinen mit Hypercholesterinämie zu einer Verbesserung der endothelialen Funktion der Koronarien und Plaquestabilisierung kam⁶³. Ebenso zeigte Williams dieses Phänomen bei Pravastatin-therapierten Affen⁶⁴. Eine vierwöchige Behandlung mit Ezetimib,

ebenso ein lipidsenkendes Medikament aber kein Statin, führte im Vergleich zur Therapie mit Simvastatin zu keiner Verbesserung der endothelialen Funktion von Patienten⁶⁵. Statine reduzieren das Risiko einer Transplantat-assoziierten Arteriopathie bei Herz-transplantierten Patienten⁶⁶. Immunmodulatorische Eigenschaften der Statine werden auch unterstützt durch Patientenstudien mit anderen Immun- bzw. Entzündungserkrankungen wie Osteoporose, Alzheimerdemenz, Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis und Asthma bronchiale^{55,67}.

Pleiotrope Effekte der Statine umfassen antiinflammatorische und immunmodulatorische Wirkungen. Ein klinischer Beweis für antinflammatorische Eigenschaften ist die Beobachtung, dass Statintherapie innerhalb einer Woche die Plasmakonzentrationen des Entzündungsmarkers CRP senkt⁶⁸. Bei human-CRP transgenen Mäusen bewirkte eine Statintherapie die Reduktion von erhöhten CRP-Spiegeln nach IL-1 β -Induktion⁶⁹. Zugrunde liegende Mechanismen sind Modulationen verschiedener Prozesse der Entzündungskaskade. So konnte nachgewiesen werden, dass Statine Einfluss nehmen auf Leukozyten-Endothel-Interaktionen durch Reduktion der Leukozytenrekrutierung und -aktivierung und Inhibition der Leukozytenadhäsion⁷⁰⁻⁷³.

Crisby M et al demonstrierte eine reduzierte Anzahl von T-Zellen in atherosklerotischen Plaques⁷⁴. Statine üben immunmodulatorische Eigenschaften aus über eine Inhibition Antigen-präsentierender Zellen, T-Zell-Aktivierung und -differenzierung, indem sie die Expression von MHC-Klasse II-Proteinen reduzieren^{58,75,76}. Konsekutiv vermindert sich auch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Th1-Zellen.

In der Pathogenese der Sepsis nimmt die massive Freisetzung von NO durch Induktion der iNOS eine zentrale Rolle ein. Statine modulieren die Freisetzung von NO. So wies Pahan et al. eine verminderte LPS-induzierte NO-Produktion nach Gabe von Lovastatin nach, was er einer verminderten Expression der iNOS durch HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren zuschrieb⁷⁷.

Zytokine und Hypercholesterinämie sind Stimuli der endothelialen Dysfunktion, die mit einer verschlechterten Synthese und Freisetzung von NO einhergeht. NO, synthetisiert durch die endotheliale NOS (eNOS), vermittelt wichtige Funktionen des Endothels mit vaskulärer Relaxation, Inhibition von Plättchenaggregation, und Verminderung von Interaktionen zwischen Endothel und Leukozyten⁵⁸. Unter anderem zeigte Laufs, dass eine verbesserte endotheliale Funktion durch Statine zurückzuführen ist auf die Induktion der eNOS durch Statine auch unter hypoxischen Bedingungen⁷⁸⁻⁸⁰. Dadurch erhöht sich die endotheliale Bioverfügbarkeit von NO. Neben antiinflammatorischen, immunmodulatorischen und endothel-protectiven Effekten, werden den Statinen antithrombotische^{58,81} und antioxidative mit Effekte zugeschrieben^{58,82}.

Die pleiotropen Effekte lassen sich zum Teil durch die Lipidsenkung erklären. Da Hypercholesterinämie endotheliale Dysfunktion induziert, wird allein durch Reduktion des Cholesterins die Bioverfügbarkeit von NO erhöht. Die signifikante Abnahme eines Pfortenödems induziert durch Carrageenan, ein Rotalgenprodukt, nach Gabe von Simvastatin⁸³ zeigt jedoch auch, dass pleiotrope Effekten allein durch Lipidsenkung nicht zu erklären sind.

Neben der Inhibition der endogenen Cholesterinbiosynthese wirken sich Statine auch auf die Isoprenoide als Zwischenprodukte der Cholesterinsynthese aus. Isoprenoide wie Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) sind wichtig für die posttranslationale Modifikation verschiedener Proteine^{57,70}. Durch eine solche Prenylation von Proteinen werden diese lipophiler und erlauben Interaktionen zwischen Proteinen oder mit lipophilen Zellmembranen, die notwendig ist zur vollen Aktivierung der Proteine. Beispiele sind das kleine GTP-bindende Protein Ras und Ras-ähnliche Proteine wie Rho, Rab, Rap, Rac etc. Diese Proteine werden durch Prenylation aktiviert und spielen eine wichtige Rolle für verschiedene zelluläre Prozesse wie Signaltransduktion, Zelldifferenzierung, –proliferation, Plättchaktivierung und Generierung reaktiver Sauerstoffspezies.

Via Förderung der Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB in den Zellkern stimulieren kleine GTP- bindende Proteine die Transkription von Genen, deren Produkte für proinflammatorische Mechanismen verantwortlich sind. NF-κB ist

normalerweise im Zytoplasma lokalisiert gebunden an den Inhibitor I- κ B. Rho- und Rac-Proteine stimulieren die Phosphorylierung von I- κ B mit nachfolgender Akkumulation von NF- κ B im Zellkern. Rho- Proteine potenzieren außerdem die Transkription von AP-1 (activator-protein1) in T-Zellen. In Bezug auf die antiinflammatorischen Eigenschaften der Statine bedeutet dies, dass sie über den Mevalonatweg die Aktivierung von AP-1 und NF- κ B vermutlich via verstärkter Expression von I- κ B supprimieren ⁵⁵.

Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass Statine antiinflammatorische Eigenschaften über die Induktion weiterer Faktoren wie KLF2 (Kruppel-like factor 2) und PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) entfalten. KLF2 ist ein Transkriptionsfaktor. Eine verstärkte Expression dieses Faktors hat verschiedene antiinflammatorische Mechanismen zur Folge: Induktion der eNOS und Thrombomodulin-Expression, Inhibition der Zytokin-vermittelten Aktivierung z.B. prothrombotischer Faktoren wie PAI-1 ^{84,85}. KLF2 ist auch beteiligt an einer Inhibition der T-Zell-Aktivierung und hat insofern auch immunmodulatorische Effekte ⁵⁵. PPAR- α und PPAR- γ gehören zur PPAR-Familie der Transkriptionsfaktoren. Es konnte nachgewiesen werden, dass Statine über Induktion dieser Transkriptionsfaktoren antiinflammatorisch wirken z.B. via Inhibition von NF κ B und AP-1 ^{55,67,69}.

Unabhängig von der Mevalonatproduktion sind auch direkte Effekte der Statine nachzuweisen, z.B. die Blockade von LFA-1 durch direkte Bindung ⁸⁶.

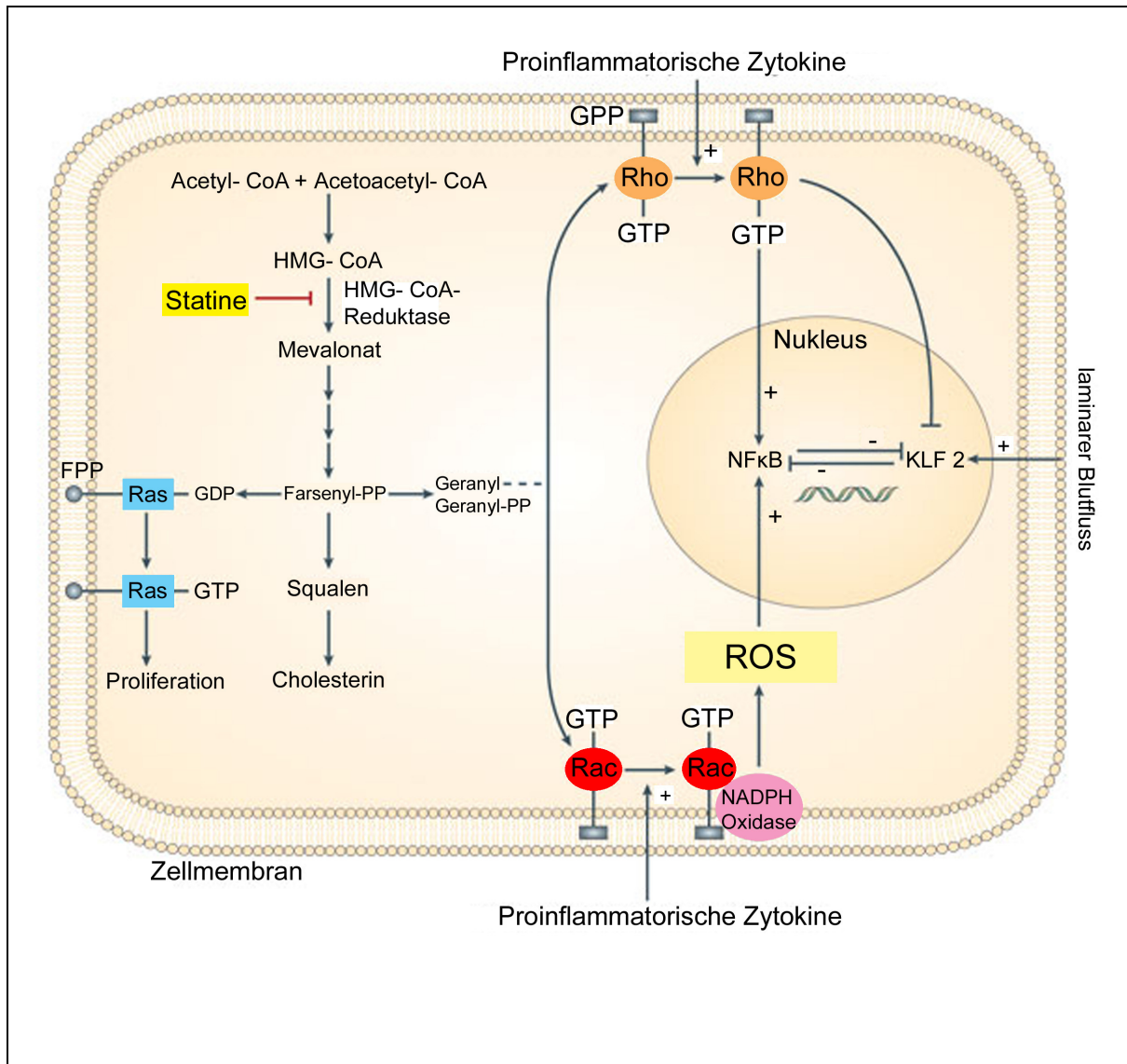


Abb. 1.5. Schematische Darstellung der zellulären Effekte von Statinen:

Inhibition der HMG-CoA Reduktase blockiert die endogene Cholesterinsynthese. Gleichzeitig kommt es über den Mevalonatweg zu einer verminderten Prenylation kleiner GTP-bindender Proteine wie Rho, Rac ect. mit konsekutiver verminderter Translokation von NFKB in den Zellkern. Die Expression von KLF2 wird verstärkt; modifiziert nach Jain MK und Ridker PM: anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms; Nat. Reviews Drug Discovery 2005; 4:977-987

1.3. Zielsetzung der Studie

Die pleiotropen Effekte der Statine in verschiedenen Studien und Modellen der akuten und chronischen Entzündung, lassen die Hypothese zu, dass Statine auch in einem Modell der systemischen Entzündung zu einer Prognoseverbesserung führen könnten. Im Gegensatz zu vielen gescheiterten Ansätzen der Therapie einer Sepsis z.B. Tumor-Nekrose-Faktor-Antagonisten, beeinflussen Statine durch die Vielzahl ihrer pleiotropen Effekte verschiedene Komponenten der Pathogenese der Sepsis.

Ziel der vorliegenden Studie ist die Untersuchung des Einflusses von Simvastatin auf das Überleben und hämodynamische Parameter im murinen Sepsismodell. Zur Sepsisinduktion wählten wir die Induktion mittels „cecal ligation and puncture“, ein etabliertes Modell zur Sepsisinduktion der Maus, welches der Pathophysiologie der humanen Sepsis ähnelt⁸⁷. Wir verwendeten den Mäusestamm C57 Black 6, weil für diesen Wildtypstamm auch eNOS Knock-Out (eNOS^{-/-}) und iNOS überexprimierte (iNOS^{+/+})- Mäuse existieren. Da Statine im Rahmen ihrer pleiotropen Effekte die Expression der NO-Synthasen beeinflussen und NO eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Sepsis zukommt, könnte unsere Studie Anlass für weitere Studien sein. Vor Sepsisinduktion mittels CLP applizierten wir intraperitoneal Simvastatin. Bei Simvastatin handelt es sich um ein sowohl im experimentellen z.B.^{72,73,88,89} als auch im klinischen Bereich breit eingesetztes Statin, dessen Bedeutung zum Beispiel im Rahmen Simvastatin, Survival Studie oder der Heart Protection Study hervorgehoben wurde^{56,59}.

Folgende Fragestellungen liegen der vorliegenden Arbeit zugrunde:

- Wie wirkt sich die Applikation von Simvastatin vor Sepsisinduktion mittels CLP auf die Überlebensrate aus?
- Welchen Einfluss hat Simvastatin auf hämodynamische Parameter? Wie verhält sich der arterielle Blutdruck? Wie lässt sich dieser durch vasoaktive Agenzien beeinflussen?
- Wie wirkt sich Simvastatin auf die Kontraktilität des septischen Herzens aus?
- Wie verhält sich der koronare Fluss auch nach Applikation von Vasodilatoren?

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Verwendet wurden männliche C57-Black6 Mäuse mit einem Körpergewicht zwischen 25-35g und einem Mindestalter von sechs Wochen. Unterbringung und Pflege sowie Räumlichkeiten und Personal wurden vom Institut für Versuchstierkunde der RWTH Aachen zur Verfügung gestellt. Die medizinische Versorgung erfolgte durch den Versuchsleiter mit Unterstützung von Veterinärmedizinern des Instituts für Versuchstierkunde. Die Tiere wurden in Käfigen vorgeschriebener Größe (Typ 3) in Gruppen auf Holzgranulat (3/4) gehalten bei einer Raumtemperatur von 19-21°C und einer angestrebten Luftfeuchtigkeit von 50-60%. Es bestand ein 12-Stunden-Tag/Nacht-Zyklus inklusive einer halbstündigen bis einstündigen Dämmerungsphase. Die Tiere erhielten Altromin Ratte/ Maus- Zuchtfutter und ein spezielles keimarmes Tränkewasser ad libitum.

2.2. Sepsisinduktion durch Coecum Ligatur und Punktion (CLP) bzw.

Sham- Operation

Die Anästhesie der Mäuse erfolgte durch intraperitoneale Injektion von Esketaminhydrochlorid (Ketanest S, Parke-Davis, Pfizer; 60µg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (Xylazin 2% Bernburg, medistar; 10µg/kg Körpergewicht). Die ausreichende Narkosetiefe wurde durch „tail pinch“ (Setzen eines Schmerzreizes z.B. mit einer chirurgischen Pinzette am Mausschwanz) überprüft. Unter Narkose entfernten wir der Maus mittels eines Kleintierrasiergerätes (Aeskulap Favorita II) das Fell im Bereich des Abdomens. Vor Operationsbeginn wurde die Maus auf dem 37°C beheizten Operationstisch auf dem Rücken liegend an Schwanz und Extremitäten fixiert. Anschließend führten wir im Operationsgebiet eine Hautdesinfektion mit Povidon-Iod (Betaisodona Lösung, Mundipharma) durch. Zu Operationsbeginn wurden die Mäuse einer medianen Laparotomie unterzogen. Es erfolgte eine Hautinzision von 10-15 mm mit einer gebogenen chirurgischen Schere (FST 14075-11) entlang der Linea alba. Zur Eröffnung der Bauchhöhle wurde mit einer geraden feinen Schere (FST 14088-10) das Peritoneum ebenfalls in einer Länge von ca. 10 mm in medianer Schnitfführung durchtrennt. Mit Hilfe zweier mit Kochsalzlösung (NaCl) befeuchteter Wattestäbchen mobilisierten wir vorsichtig, ohne umliegende Strukturen zu schädigen, das Coecum aus der Bauchhöhle und stellten es im gesamten Verlauf auf einer hinterlegten mit NaCl getränkten sterilen 10cm x 10cm

großen Kompresse dar. Das Coecum wurde anschließend unmittelbar distal der Ileocoecalklappe mit einem 5-0 Seidenfaden ligiert, wobei wir streng darauf achteten, das Lumen von Ileum und Colon nicht einzuengen. Nach erfolgter Ligatur wurde das Coecum mittels einer Kanüle (20G) nach der Punktionsmethode „durch und durch“ einmalig punktiert, wobei die Kanüle innerhalb des Coecum- Lumens vorgeschoben und weiter distal wieder hinausgeführt wurde, so dass zwei Punktionsstellen entstanden. Die Kanüle wurde wieder entfernt und aus den beiden Punktionsstellen wurde eine kleine Stuhlmengung manuell herausgedrückt. Beide Öffnungen waren nun mit einer diskreten Stuhlmengung versehen. Mit Hilfe der mit NaCl befeuchteten Wattestäbchen reponierten wir das Coecum anschließend wieder vorsichtig in die Bauchhöhle. Peritoneum und Muskelschicht wurden adaptiert und mit 4-0 Seide in Einzelknopfnahntechnik verschlossen. Ebenso erfolgte die Adaptation und Naht der Haut. Abschließend wurde die Hautnaht mit Betaisodona Lösung desinfiziert.

Die Sepsisinduktion mittels CLP führten wir sowohl bei mit Simvastatin vorbehandelten Mäusen als auch bei einer Gruppe von Mäusen durch, die lediglich ein Placebo erhielten. Zwei andere Gruppen wurden nur einer Sham-Behandlung unterzogen. Wie in der oben beschriebenen CLP-Methode eröffneten wir zunächst die Bauchhöhle, mobilisierten das Peritoneum und stellten das Coecum dar. Im Unterschied zur CLP-Methode erfolgte jedoch weder eine Ligatur noch eine Punktion des Coecums. Das Coecum wurde also unversehrt in die Bauchhöhle reponiert. Es ist davon auszugehen, dass bei den Sham behandelten Tieren keine Sepsis induziert wurde.

Zur Volumensubstitution erhielten alle Mäuse unmittelbar postoperativ 0,9% NaCl (0,05 ml/g Körpergewicht) subkutan. Bis zum Narkoseende wurden die Tiere unter eine Wärmelampe bei etwa 37°C plaziert. Im postoperativen Verlauf applizierten wir zur Schmerzmedikation alle sechs Stunden (\pm 1 Stunde) Tramadol (20 μ g/kg Körpergewicht) und zur Volumensubstitution NaCl 0,9% (0,05 ml/g Körpergewicht) subkutan. Wasser und Futter wurden ad libitum bereitgestellt.

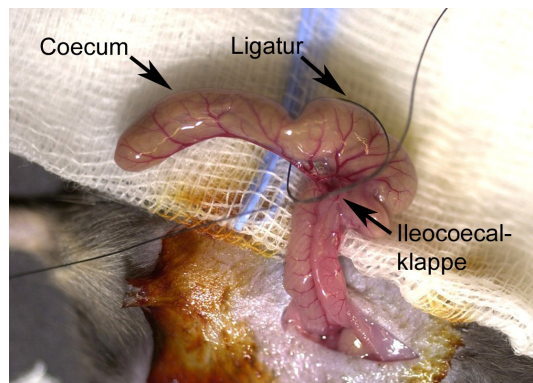
In Rückenlage fixierte narkotisierte Maus; abrasiertes Fell im Bereich des Abdomens, Hautdesinfektion mit Betaisodona Lösung



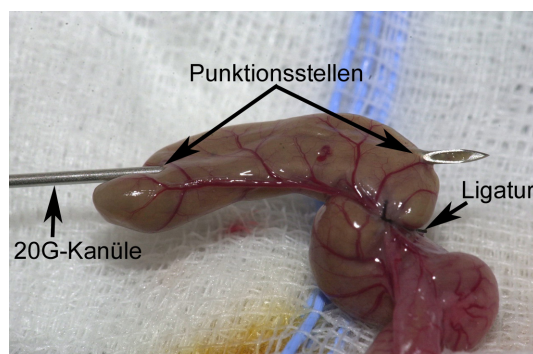
Eröffnung des Abdomens: Hautinzision und Durchtrennung des Peritoneums über 10-15 mm in medianer Schnitfführung



Mobilisation des Coecums und Ligatur unmittelbar distal der Ileocoecal-klappe unter Erhalt der Darmkontinuität



Punktion des Coecums nach der Punktionmethode „durch und durch“, Herausdrücken einer kleinen Stuhlmenge und Reposition de Coecums



Verschluss des Abdomens in zwei
Schichten und abschließende
Hautdesinfektion



Postoperative Volumensubstitution mit
NaCl 0,9% (0,05ml/ g Körpergewicht)
s.c.

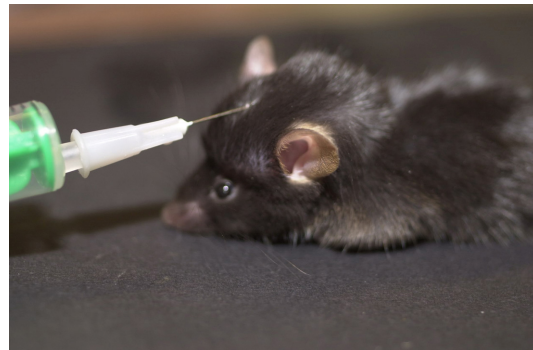


Abb. 2.1. Sepsisinduktion mittels CLP (cecal ligation and puncture)

2.3. Präoperative Applikation von Simvastatin bzw. eines Placebos

Vor Sepsisinduktion durch Coecum Ligatur und Punktion bzw. Sham-Operation wurde den Mäusen zweimalig 18 ± 2 Stunden und 3 ± 1 Stunde präoperativ Simvastatin bzw. ein Placebo verabreicht. Insgesamt ergaben sich vier Versuchstiergruppen:

- CLP und präoperative Simvastatin- Applikation
- CLP und präoperative Placebo- Applikation
- Sham- Operation und präoperative Simvastatin- Applikation
- Sham- Operation und präoperative Placebo-Applikation

Das Simvastatin (Merck Biosciences; $0,2 \mu\text{g/g}$ Körpergewicht) wurde in Ethanol als Trägerlösung zu einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst und mit NaCl $0,9\%$ anschließend auf $1:1000$ verdünnt, so dass die Endkonzentration $10 \mu\text{g}$ Simvastatin/ ml Trägerlösung enthielt. Die endgültige Verdünnungslösung wurde der Maus mit einem Injektionsvolumen von $0,02 \text{ ml/g}$ Körpergewicht appliziert. Das Placebo enthielt ausschließlich die Trägerlösung Ethanol und wurde entsprechend dem Simvastatin mit NaCl $0,9\%$ ebenfalls auf eine Endkonzentration von $1:1000$ verdünnt und der Maus mit $0,02 \text{ ml/g}$ Körpergewicht injiziert.



Abb. 2.2. intraperitoneale Injektion von Simvastatin ($0,02 \text{ ml/ g KG}$)

2.4. Überlebenszeiten nach Sepsisinduktion bzw. Sham-Behandlung

In einem ersten experimentellen Versuchsansatz wurden die Überlebenszeiten der vier Versuchstiergruppen gegenübergestellt. Bei zwei Gruppen (präoperative Simvastatin-Gabe vs. präoperative Placebogabe; jeweils n=10) wurde eine Sepsis mittels CLP induziert, bei den anderen beiden Gruppen (präoperative Simvastatin-Gabe vs. präoperative Placebo-Gabe; jeweils n=10) erfolgte eine Sham-Behandlung. Alle vier Gruppen wurden postoperativ in stündlichen Kontrollen engmaschig über einen Zeitraum von mindestens 168 Stunden überwacht und die jeweilige Überlebenszeit des einzelnen Versuchstiers festgehalten.

2.5. Echokardiographie

20±2 Stunden postoperativ nach Sepsisinduktion mittels CLP bzw. Sham-Behandlung führten wir in den vier Versuchstiergruppen (pro Gruppe n=12) eine Echokardiographie durch. Um eine Beeinflussung der Herz- Kreislauffunktion durch Narkotika zu vermeiden, wurden die Tiere bei vollem Bewusstsein geschallt. Vor der Untersuchung führten wir eine Trainingsphase von drei bis vier Untersuchungen durch, um den Stress für die Tiere zu vermindern. So zeigten die Mäuse schließlich bei der Ultraschalluntersuchung keine Anzeichen von Stress. Zur Untersuchung wurde das jeweilige Versuchstier am Nackenfell aufgenommen und vorsichtig in der Handfläche des Untersuchers fixiert. Vor Beginn des Schallvorgangs erfolgte eine Rasur der Brust der Maus, anschließend wurde zur besseren akustischen Kopplung das Untersuchungsgebiet mit angewärmtem Ultraschallgel bedeckt. Die Echokardiographie wurde mit einem Schallkopf durchgeführt, der aus einer 12MHz Sonde und einem vorgesetzten 15 mm langem Gel-Kissen bestand. Der Schallkopf war mit einem Sonos 5500 Ultraschallgerät (Agilent Technologies) verbunden. Dieses Echokardiographie- Gerät verfügt über eine optimierte räumliche und zeitliche Auflösung, welche bei einer Herzfrequenz der Mäuse von 500- 600 Schlägen pro Minute notwendig ist. Während der Untersuchung wurde zunächst das Herz der Maus in der parasternalen langen Achse im zweidimensionalen Modus (2D) dargestellt. Auf Papillarmuskelebene konnten so unter 2D- Kontrolle M- Mode-Sequenzen gewonnen werden. Aus diesen Schnitten erfolgte offline eine Berechnung der Dimensionen der linken Herzhöhle und der Wandstärke des linken Ventrikels. Im nächsten Schritt folgte die Darstellung der Aortenwurzel im M-Mode. Zudem konnte unmittelbar über der Aortenwurzel und unter sorgfältiger Einstellung

des Winkels parallel zur Aorta ascendens die aortale Flussgeschwindigkeit mittels eines gepulsten Dopplers bestimmt werden. Offline fanden im Anschluss weitere Berechnungen statt. So wurde das Integral über die Zeit der aortalen Flussgeschwindigkeit (VTI) und der Durchmesser der Aortenwurzel bestimmt. Zur weiteren Analyse wurden die Mittelwerte von 3-6 Herzschlägen verwendet.

Durch die Echokardiographieuntersuchung konnten schließlich folgende Parameter erhoben werden:

- HF= Herzfrequenz [Schläge pro Minute]
- VTI= Integral über die Zeit der aortalen Flussgeschwindigkeit
- AoD= Durchmesser der Aorta

$$CSA = \pi \left(\frac{AoD}{2} \right)^2$$

- CSA= Querschnitt der Aorta:
- SV= Schlagvolumen: $SV = CSA * VTI$
- CO= Herzzeitvolumen: $CO = SV * HF$

Die gesamte Echokardiographieuntersuchung wurde anschließend in allen vier Versuchstiergruppen 7- 11 Minuten nach intraperitonealer Applikation von Dobutamin wiederholt. In vorherigen Experimenten hatte sich gezeigt, dass nach dieser Zeit ein Plateau der Dobutaminwirkung erreicht wurde. Das Dobutamin wurde in einer Konzentration von 1,5 µg/ g Körpergewicht verabreicht.

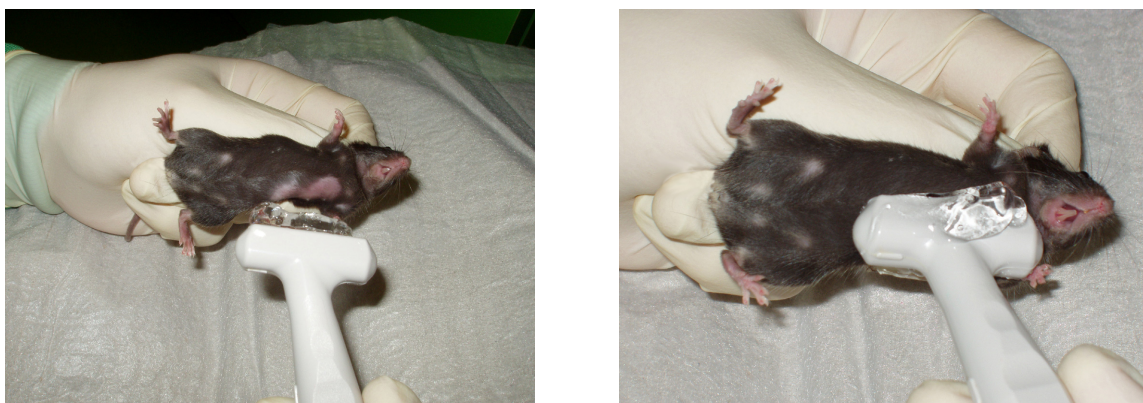


Abb. 2.3. Echokardiographie in parasternalen Achse mit Sonos 5500 Ultraschallgerät

2.6. Invasive arterielle Blutdruckmessung in der rechten A. carotis communis

Die invasive arterielle Blutdruckmessung in der rechten A. carotis communis wurde 20±2 Stunden postoperativ nach Sepsisinduktion mittels CLP bzw. Sham-Behandlung durchgeführt. Wir verglichen die vier unterschiedlichen Versuchstiergruppen hinsichtlich der arteriellen Blutdruckwerte miteinander, dabei wurden sowohl Werte der Baseline als auch nach Applikation von Dobutamin und S-Ethylisothiourea (ETU) aufgezeichnet.

2.6.1. Versuchsaufbau und Präparation

Die Anästhesie der Mäuse erfolgte mit Urethan (1 molar) körpergewichtsadaptiert (1,5g/ kg Körpergewicht). Die ausreichende Narkosetiefe wurde per „tail pinch“ überprüft. Anschließend fixierten wir das jeweilige Versuchstier auf dem Rücken liegend an Schwanz und Extremitäten auf einem auf 37°C erwärmten Operationstisch. Zu Operationsbeginn wurde mit einer gebogenen chirurgischen Schere (FST 14075-11) auf der rechten Seite des Halses in Höhe des Kehlkopfes eine circa 2cm lange von kranial nach kaudal laufende Hautinzision gesetzt und die Haut vorsichtig mit gebogenen Mikropinzetten (Aesculap BD333R) retrahiert.

Die weiteren Präparationsschritte erfolgten zur besseren Darstellung der anatomischen Strukturen unter Zuhilfenahme eines Lichtmikroskops (Leica MZ9-5). Die unter der Haut liegenden Faszien der geraden Halsmuskulatur wurden vorsichtig mit den gebogenen Mikropinzetten auseinander gezogen, ohne dabei umliegende Strukturen zu schädigen. Nach Mobilisation der geraden Halsmuskulatur kam die Trachea zur Darstellung. In der Tiefe wurde nun die ca. 2 mm lateral der Trachea liegende Gefäßnervenscheide mit der Arteria carotis communis, der Vena jugularis interna und des Nervus vagus sichtbar. Nach Eröffnung der Gefäßnervenscheide erfolgte unter Zuhilfenahme der gebogenen Mikropinzetten eine vorsichtige Mobilisierung der A. carotis communis. Unter sorgfältiger Schonung umliegender Gefäße und Nerven, insbesondere des N. vagus, wurde die A. carotis communis in ihrem Verlauf von circa 2 cm bis zur Bifurcatio carotis dargestellt. Es folgte die Ligatur der A. carotis communis mit 5-0 Seide unmittelbar kaudal der Bifurkation. Zur Erleichterung der nachfolgenden Arbeitsschritte wurde der Faden nach Ligatur unter leichte Spannung gesetzt. Etwa 1-2 cm kaudal der Gefäßligatur wurde die Arterie mit

einem Gefäßclip (Micro-serrendines FST #18055-04) abgeklemmt, so dass zwischen der Gefäßligatur und dem Gefäßclip eine von der Blutzirkulation ausgeschaltete Gefäßstelle entstand. Mit einer geraden Sprungschere (FST 15003-8) wurde in die Gefäßwand dieser ausgeschalteten Stelle vorsichtig ein kleines Loch geschnitten. Über diese Öffnung führten wir nun mit Hilfe eines Katheterhalters (S&T 00608) ein Polyethylenkatheter ein.

Der Katheter war aus einem Polyethylenschlauch selbständig hergestellt und hatte im Bereich der Spitze, die in die A. carotis communis eingeführt wurde, einen Innendurchmesser von ca. 0,4 mm und einen Außendurchmesser von ca. 0,6 mm, der im weiteren Verlauf ca. 0,8 mm betrug. Nach ca. 11- 12 cm war in den Verlauf des Katheters ein T-Schenkel eingefügt über den Medikamente appliziert werden konnten. Dieser Schenkel konnte mit einer Klemme blockiert werden. Im weiteren Verlauf des Katheters war zusätzlich ein Drei-Wege-Hahn integriert, über den zur einen Seite eine NaCl/ Heparin- Lösung (im Verhältnis 90% NaCl/ 10% Heparin-Natrium 25000 I.E.) appliziert werden konnte. Vor Beginn des Versuchs wurde das gesamte Kathetersystem über diesen Zugang luftblasenfrei mit der NaCl/ Heparin-Lösung gefüllt. Im Verlauf des Versuchs diente die NaCl/ Heparin-Lösung als Spülflüssigkeit des Kathetersystems und zusätzlich bewirkte das Heparin eine Antikoagulation des Blutes in der Maus und im Katheter. Auf der anderen Seite des Drei-Wege-Hahns befand sich der Druckmesser (Isotec der Firma Hugo Sachs Elektronik), über den während des Versuchs das Blutdrucksignal aufgenommen werden konnte.

Nach Einführen des Katheters über die zuvor verursachte Öffnung der Gefäßwand der A. carotis communis wurde der Katheter in dieser Position mit Hilfe einer Fadenligatur (5-0 Seide) fixiert. Anschließend wurde die Gefäßklemme gelöst und somit der Blutstrom in den Katheter geleitet. Über den sich am anderen Ende des Kathetersystems befindlichen Druckmesser konnte nun das Blutdrucksignal aufgenommen werden. Wir kalibrierten den Druckmesser vor jedem Versuch neu mit Festlegung einer oberen Grenze des Messbereichs von 180 mmHg und einer unteren Grenze von 0 mmHg.

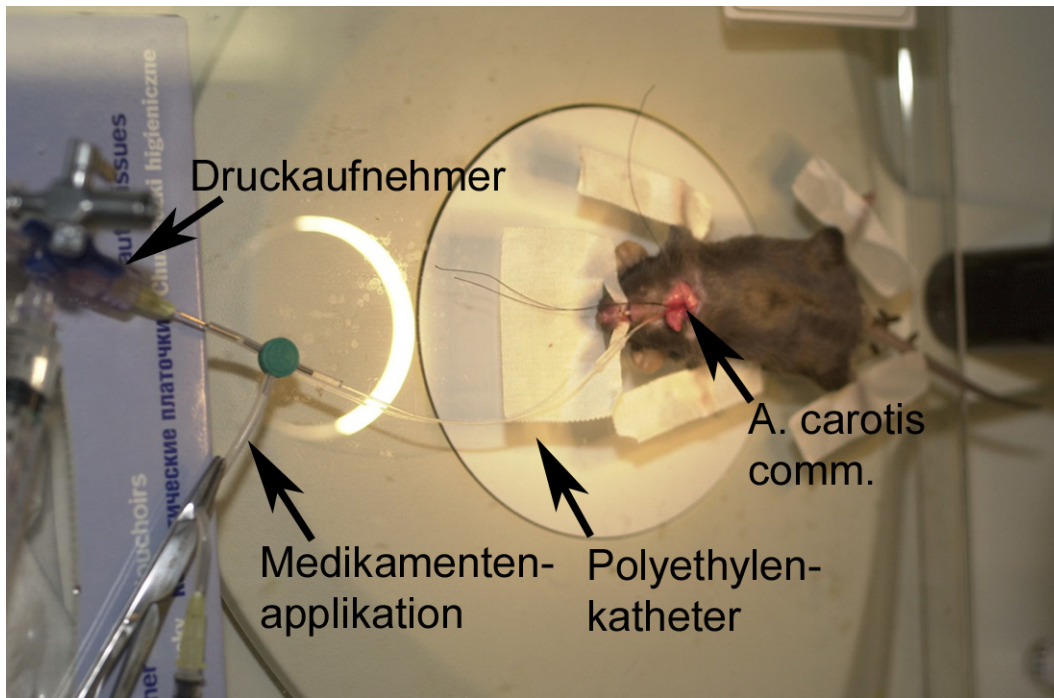
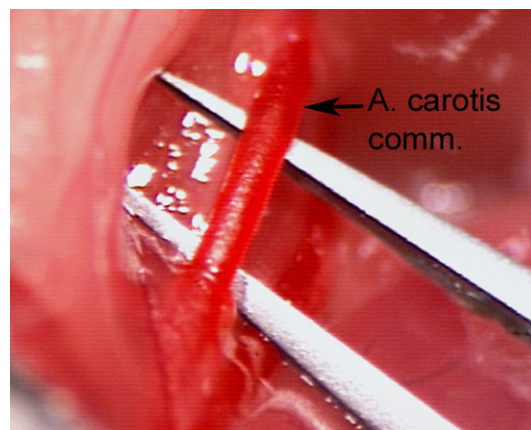
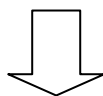
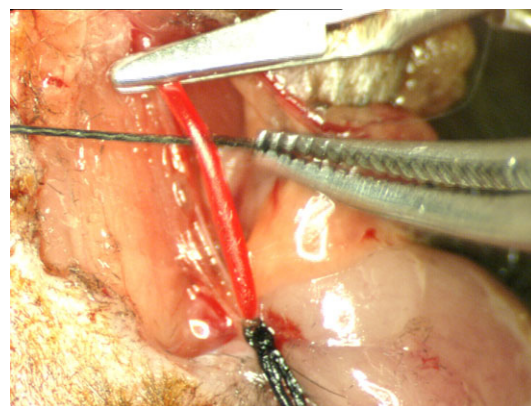
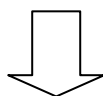


Abb. 2.4. Übersicht invasive Blutdruckmessung

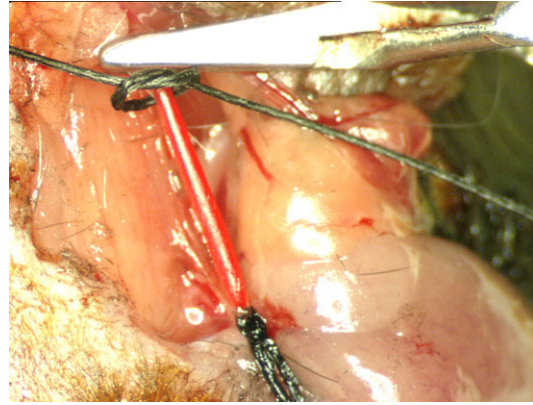
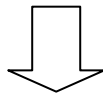
Darstellung der A. carotis comm. dextra lateral der Trachea unter sorgfältiger Schonung umliegender Gefäße und Nerven insbesondere des N. vagus



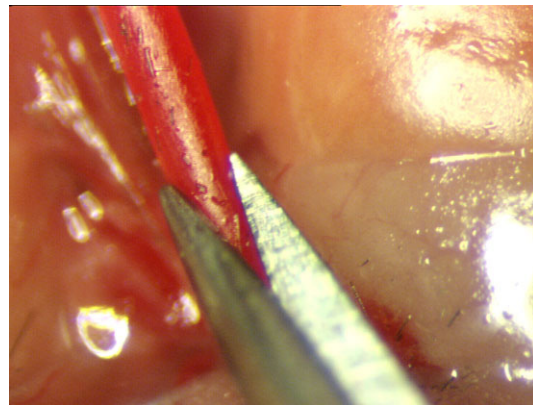
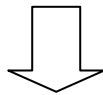
Ligatur unmittelbar kaudal der Bifurcatio carotis, Position einer Gefäßklemme 1-2 cm kaudal der Ligatur



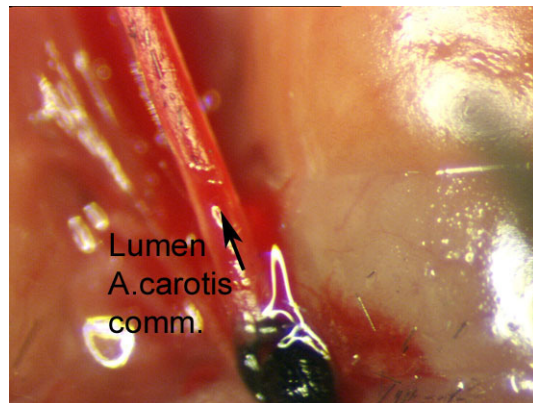
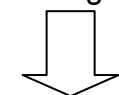
Vorbereiten einer Fadenligatur zur späteren Fixierung des Katheters in der A. carotis comm.



Vorsichtiges Einschneiden der Gefäßwand im Bereich der durch Ligatur und Gefäßklemme zuvor von der Blutzirkulation ausgeschalteten Gefäßstelle



Über sichtbar werdendes Lumen wird mit Hilfe des Katheterhalters der Katheter vorgeschoben und mittels zuvor vorbereiteter Fadenligatur fixiert



Lösen der Gefäßklemme und Messung des Blutdrucksignals über den sich am anderen Ende des Kathetersystems befindlichen Druckmesser



Abb. 2.5. Vorgehen der invasiven arteriellen Blutdruckmessung

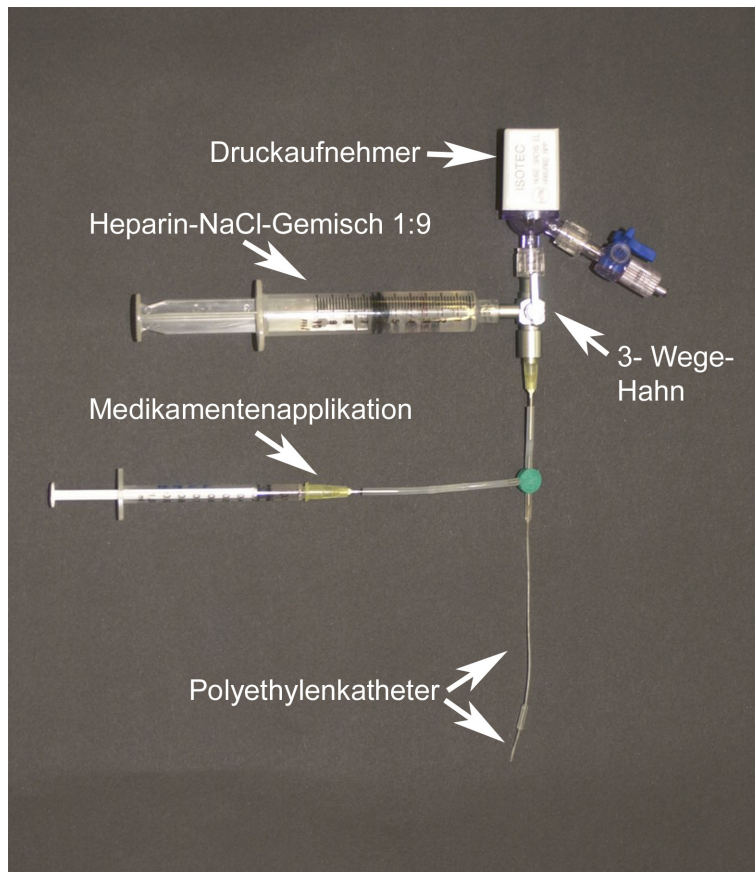


Abb. 2.6. Karotiskatheter in Übersicht

2.6.2. Versuchsdurchführung

2.6.2.1. Messwerte

Folgende Parameter konnten aus der Blutdruckkurve kontinuierlich in Echtzeit abgeleitet werden:

- Systolischer Blutdruck [mmHg]
- Diastolischer Blutdruck [mmHg]
- Blutdruckamplitude [mmHg]
- Mittlerer Blutdruck [mmHg]
- Herzfrequenz [Schläge pro Minute]
- Cardiac Power = Produkt aus Herzfrequenz und systolischem Blutdruck

2.6.2.2. Protokoll der Versuchsdurchführung

Das Protokoll der Versuchsdurchführung wurde vorher festgelegt und durch das Software-Programm IOX geschrieben und nach diesem abgearbeitet.

Nach diesem Protokoll ergab sich eine Einteilung der invasiven Blutdruckmessung in folgende vier Phasen:

- Baseline 1
- Injektion von Dobutamin (Anflutphase, Plateau und Rückbildungsphase)
- Baseline 2
- Injektion von ETU (Anflutphase, Plateau und Rückbildungsphase)

Die einzelnen Abschnitte des Versuchs konnten so zeitlich genau festgelegten Speicherphasen zugeordnet werden und die Ergebnisse der einzelnen Versuchstiergruppen miteinander verglichen werden.

Es folgt eine detaillierte Darstellung der Versuchsdurchführung:

Unmittelbar nachdem durch das Lösen der Gefäßklemme der Blutstrom in den Katheter geleitet wurde, spülten wir zunächst das Kathetersystem mit NaCl/ Heparin. Nachfolgend wurde der Drei-Wege-Hahn auf den Druckmesser umgestellt, so dass das Blutdrucksignal aufgenommen werden konnte. Über einen Zeitraum von einer Minute wurde nun die Baseline der in 2.6.2.1. aufgeführten Parameter erfasst und gespeichert.

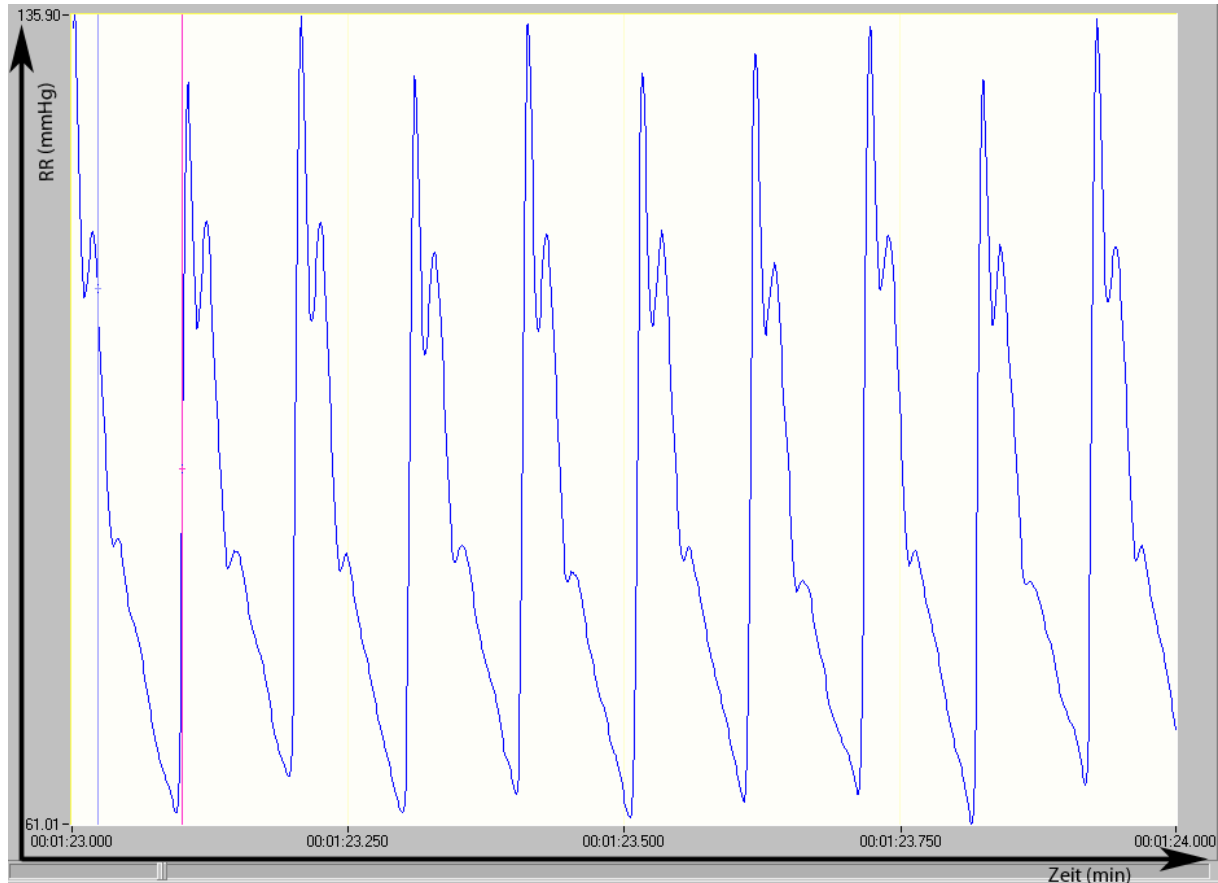


Abb. 2.7. Darstellung des arteriellen Blutdrucksignals während der Baseline-Phase (1 Minute)

Im Anschluss an die einminütige Baseline- Phase applizierten wir Dobutamin (0,5 μ molar) in einer Konzentration von 1,5 μ g/g Körpergewicht über den Medikamentenschenkel. Es erfolgte eine Spülung, um auch das sich im Kathetersystem befindliche restliche Dobutamin intraarteriell zu injizieren. Da aufgrund der intraarteriellen Applikation ein rasches Anfluten des Medikamentes zu erwarten war, musste der Drei-Wege-Hahn zügig auf den Druckmesser umgestellt werden. Nach der Anflutphase kam es zur Ausbildung eines Plateaus, anschließend stellte sich eine Rückbildungsphase ein, welche bis zum Abklingen des Effektes dokumentiert wurde. Die Speicherung der Daten wurde nun kurzzeitig unterbrochen. Im Anschluss an eine weitere Spülung des Kathetersystems wurden die einzelnen Parameter in einer Baseline 2 über den Zeitraum von einer Minute erneut aufgenommen. Nachfolgend applizierten wir S- Ethylisothiourea (ETU; 0,1 molar) in einer Konzentration von 185,1 μ g/g Körpergewicht. Hier war darauf zu achten, dass das Medikament sehr langsam über einen Zeitraum von ca. einer Minute verabreicht wurde, um die unerwünschten Arzneimittelwirkungen des ETU's durch zu rasches Anfluten zu vermeiden. Direkt nach der Injektion wurde das Kathetersystem mit NaCl/ Heparin gespült und die Daten wurden nachfolgend gespeichert mit Anflutphase, Plateau und Rückbildungsphase. Nach Abklingen des Effektes war der Versuch beendet. Die A. carotis communis wurde mit der oben erwähnten Gefäßklemme abgeklemmt, so dass der Katheter vorsichtig entfernt werden konnte.

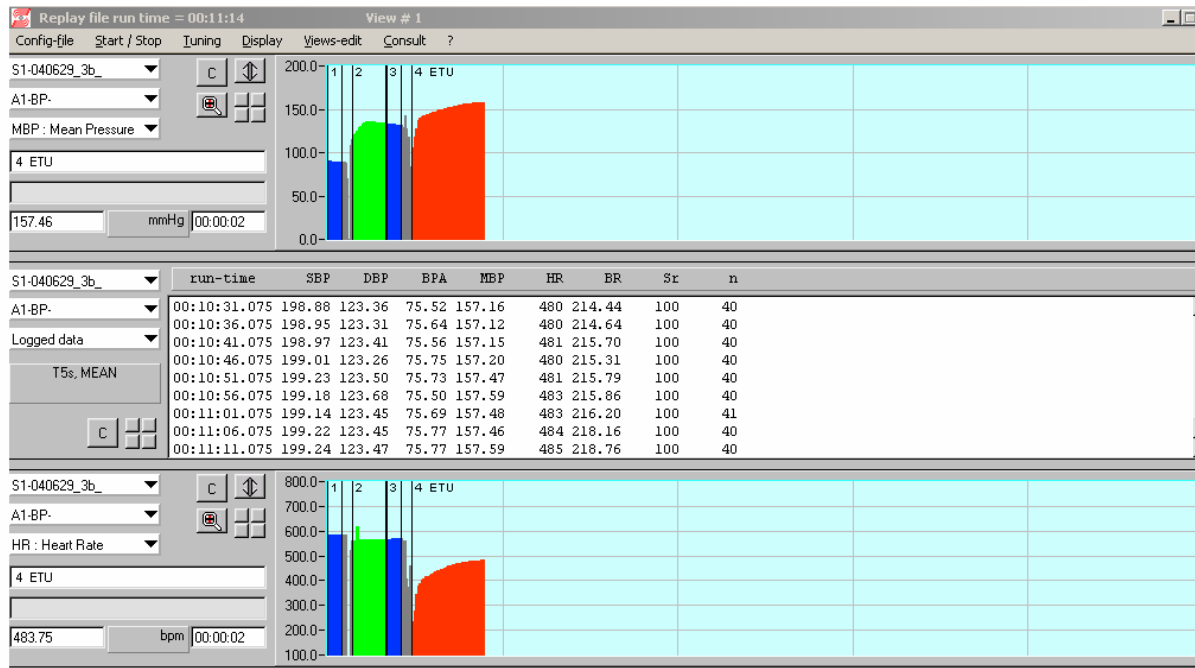


Abb. 2.8. Screen Shot nach Abschluss eines Versuchsablaufes:

Im oberen Teil der Abbildung Darstellung des Verhaltens des arteriellen Blutdrucks in den einzelnen Speicherphasen: 1 = Baseline (1 Minute), 2 = Applikation von Dobutamin, 3 = Baseline 2 (1 Minute), 4 = Applikation von ETU

Im mittleren Teil numerische Darstellung der einzelnen Parameter und im unteren Teil Verhalten der Herzfrequenz in den einzelnen Speicherphasen 1-4

2.6.3. Wirkungsmechanismen von Dobutamin und ETU und Auswirkungen auf den arteriellen Blutdruck

2.6.3.1. Dobutamin

Dobutamin ist ein synthetisches Katecholamid mit einer Plasmahalbwertszeit von zwei Minuten. Aufgrund dieser Halbwertszeit ist Dobutamin oral nicht wirksam und muss kontinuierlich intravenös bzw. intraarteriell appliziert werden. Die Wirkungsmechanismen von Dobutamin sind komplex. Es liegt als Racemat vor, wobei das l-Isomer ein potenter Agonist am α_1 -Rezeptor ist, während das d-Isomer ein potenter Agonist am β_1 - und am β_2 -Rezeptor ist selektiver β_1 -Stimulation⁹⁰. Hieraus erklären sich die kardiovaskulären Effekte des Dobutamins. Durch selektive Stimulation der myokardialen β_1 -Rezeptoren am Herzen wird ein prominenter positiv inotroper Effekt mit einer Zunahme des Herz-Zeit-Volumens erreicht. Zudem bewirkt ein gering ausgeprägter chronotroper Effekt eine leichte Erhöhung der Herzfrequenz. Im Kreislauf erfolgt durch die Stimulation der β_2 -Rezeptoren eine Vasodilatation durch Abnahme des Gefäßtonus, in erster Linie Skelettmuskel- und Koronararterien.

Hieraus resultiert eine Senkung des totalen peripheren Widerstandes, die jedoch nicht stark ausgeprägt ist, aufgrund der gleichzeitig vorhandenen α 1-vermittelten Vasokonstriktion, wobei die β 2-sympathomimetische Vasodilatation gegenüber der α -sympathomimetischen Vasokonstriktion überwiegt. Aus den Wirkungsmechanismen des Dobutamin ist also eine Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) und des Herzzeitvolumens durch Steigerung der Kontraktilität und demzufolge des Schlagvolumens zu erwarten⁹¹. Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen bestehen insbesondere in einer Arrhythmieeigung.

2.6.3.2. S- Ethylthioisourea (ETU)

ETU ist ein unspezifischer kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase. NO und L-Citrullin werden in einer zweischrittigen Oxidation von L-Arginin durch drei verschiedene Isozyme der NO-Synthase synthetisiert: nNOS, eNOS und iNOS⁹². Die meisten beschriebenen NO-Synthase-Inhibitoren sind Aminosäure-Analogs des Substrates L-Arginin. Das von uns verwendete ETU gehört zu den Isothioureas, welche als „non-amino acid analogs“ des L-Arginin beschrieben werden. ETU ist kompetitiv dem Substrat L-Arginin und bindet ähnlich diesem in der Nähe des Häms⁹³.

NO ist ein Mediator der glatten Gefäßmuskulatur und verursacht eine systemische Gefäßdilataion. Umgekehrt führt eine Blockade der NO-Synthase durch ETU zu einer systemischen Vasokonstriktion, einer Erhöhung des systemischen Gefäßwiderstandes und folglich des arteriellen Blutdrucks. Die unerwünschten Nebenwirkungen des ETU bestehen in Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstands mit konsekutiver Rechtsherzbelastung²⁸. Aufgrund der ausgeprägten systemischen Auswirkungen war die Injektion des Medikamentes nur sehr langsam vorzunehmen.

2.6.4. Narkosemittel

2.6.4.1. Urethan

Urethan ist ein vielfach bei Tierversuchen eingesetztes Anästhetikum, da es nur minimale Auswirkungen auf das autonome und kardiovaskuläre System hat. Seine Vorteile bestehen außerdem darin, dass es eine lang anhaltende konstante Narkosetiefe hervorruft, insofern also für chirurgische Eingriffe von langer Dauer geeignet ist. Es kann über verschiedene parenterale Zugänge appliziert werden. Da es kanzerogen ist, eignet es sich nicht für die Anästhesie beim Menschen. Bei Tieren wird Urethan aufgrund der kanzerogenen und hepatotoxischen Eigenschaften nur zur finalen Narkose eingesetzt. Zudem zeigen Tiere, die mit Urethan anästhesiert wurden, eine sehr lange Erholungszeit⁹⁴.

Im Unterschied zu vielen anderen Anästhetika wirkt Urethan an verschiedenen Ionenkanälen und übt dort sowohl inhibitorische als auch exzitatorische Effekte aus. So potenziert Urethan die Stimulation des neuronalen nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors, des GABA(a)-Rezeptor und des Glyzin-Rezeptors. Gleichzeitig erfolgt eine moderate Depression der glutaminergen Transmitterrezeptoren N-methyl-D-aspartat (NMDA) und α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-Isoxazol-propionsäure (AMPA)⁹⁵.

Da angenommen wird, dass Tiere, die mit Urethan anästhesiert wurden, ein ähnliches physiologisches und pharmakologisches Verhalten zeigen, wie nicht-anästhesierte Tiere, eignet sich Urethan besonders zur Untersuchung hämodynamischer Parameter in der invasiven Blutdruckmessung und den nachfolgenden Langendorff-Experimenten. Urethan wurde ausschließlich zur finalen Narkose verwandt und in einer Konzentration von 1 molar intraperitoneal appliziert.

2.6.4.2. Ketamin und Xylazin

Die Anästhesie vor Sepsisinduktion bzw. Sham- Behandlung erfolgte durch intraperitoneale Injektion von Esketaminhydrochlorid (Ketanest S, Parke-Davis, Pfizer; 60 μ g/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (Xylazin 2% Bernburg, medistar; 10 μ g/kg Körpergewicht). Diese Narkotisierung ist eine zuverlässige Methode zum Erreichen von Relaxation, Sedation und Analgesie⁹⁶.

Esketaminhydrochlorid zeigt einen komplexen Wirkungsmechanismus an verschiedenen Rezeptoren. Es wirkt als kompetitiver Inhibitor des NMDA-Rezeptors. NMDA-Rezeptoren vermitteln nozizeptive Neurotransmission ins ZNS und spielen eine wichtige Rolle für das Gedächtnis ⁹⁵. Esketaminhydrochlorid ist zudem ein Agonist an Opiatrezeptoren und beeinflusst die zentrale und periphere monoaminerge und cholinerge Übertragung. Unter dem Einfluss dieses Narkotikums kommt es zum Zustand der „dissoziativen Anästhesie“, ein katalepsieähnlicher Zustand mit Bewusstseinsverlust, Analgesie und Amnesie ⁹⁰.

Xylazinhydrochlorid ist ein α_2 - Agonist mit sedativen, analgetischen und muskelrelaxierenden Eigenschaften. Esketaminhydrochlorid und Xylazinhydrochlorid werden in der Regel in Kombination appliziert, um eine verbesserte Muskelrelaxation und verlängerte Analgesie zu erreichen. Obwohl für Esketaminhydrochlorid nur leichte kardiodepressive Effekte beschrieben werden, kommt es in Kombination mit Xylazinhydrochlorid zu negativ inotropen und negativ chronotropen Effekten. Dieses beruht vermutlich vor allem auf der Inhibition des Sympathikotonus durch den α_2 - Agonisten Xylazin ⁹⁷. Im Gegensatz zu den Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System führt die Narkose mit Ketamin und Xylazin nur zu einem leichten Absinken der Atemtätigkeit ohne erforderliche Intubation und Beatmung des Versuchstieres ⁹⁶.

2.7. Hämodynamische Eigenschaften des isolierten Herzens im Langendorff-Modell

2.7.1. Entwicklung des Langendorff-Modells

Die Entwicklung eines isoliert perfundierten Herzens begann bereits vor mehr als 100 Jahren und ging einher mit einer Fülle neuer Erkenntnisse über die Funktion des Myokards, der Regulation des koronaren Blutflusses und des Metabolismus des Herzens. Im Gegensatz zu der zuvor üblichen in-vivo Präparation entwickelte Oscar Langendorff 1895 eine Präparation, die mit der Explantation eines Säugetierherzens einherging. In diesem Modell werden die Koronargefäße retrograd über die Aorta mit einer geeigneten Nährlösung perfundiert. Nachfolgend beschrieb Neely das so genannte „working-heart“- Modell. Hier erfolgt die Perfusion des Herzens anterograd über den linken Vorhof und linken Ventrikel in die Aorta und anschließend in die Koronargefäße⁹⁸.

Langendorff- und „Working Heart“ – Modelle des isolierten Herzens bieten die Grundlage zu biochemischen, physiologischen, morphologischen und pharmakologischen Untersuchungen mit detaillierter Analyse der Reaktionen des Ventrikels, der Koronargefäße und des Metabolismus. Des Weiteren eignen sie sich zur Untersuchung mechanischer Parameter z.B. Untersuchungen von inotropen (Kontraktilität), chronotropen (Herzfrequenz) oder koronarmuskulotropen Effekten (koronarer Fluss), sowie bioelektrischen Parametern z.B. Untersuchungen von dromotropen oder bathmotropen Reaktionen. Außerdem können metabolische Parameter untersucht werden z.B. der Verbrauch von Sauerstoff, Glucose oder anderen Substraten. Unter strengen standardisierten Bedingungen repräsentieren diese Modelle des isolierten Herzens ein funktionell und metabolisch stabiles System über mehrere Stunden. Ein großer Vorteil von Untersuchungen am isolierten Herzen liegt darin, dass diese unabhängig von systemischen Einflüssen sind wie z.B. vom autonomen Nervensystem oder zirkulierenden neurohormonalen Faktoren.

2.7.2. Versuchsaufbau

2.7.2.1. Beschreibung des Langendorff-Modells

Für die Experimente am isolierten Herzen der Maus wurde die Aorta des Herzens über eine Kanüle mit dem Langendorff-Modell (Hugo Sachs Elektronik/ Harvard Apparatus) verbunden. Über diese Kanüle erfolgte die retrograde Perfusion des Herzens mit einer Perfusionslösung (Krebs-Henseleit-Lösung). Aufgrund der Elastizität der Aorta war es möglich, die Aorta über die Kanüle zu streifen, obwohl der äußere Durchmesser, der aus rostfreiem Stahl gefertigten Kanüle wesentlich größer als der Durchmesser der Aorta war. Der innere Durchmesser der Kanüle entsprach dem der Aorta und betrug 1,3 mm. Die Länge der Kanüle war so kurz wie möglich gewählt worden. Um eine Perfusion der Koronararterien sicher zu stellen, platzierten wir die Kanüle oberhalb der Aortenklappe und fixierten sie mittels einer Fadenligatur.

Als Perfusat setzten wir die modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung ein, welche in einem Wasserbad konstant auf 37,5 °C erwärmt wurde. Zudem erfolgte eine Oxygenierung des Perfusats durch Begasung mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) über eine Glasfritte. Ausgehend vom Reservoir wurde das oxygenierte und erwärmte Perfusat mit Hilfe einer Rollenpumpe (Firma Isma Tec) mit einem Volumen von ca. 25 ml/min zur Herzkammer weiterbefördert, die das isolierte Herz umgab. Diese Herzkammer war aus Plexiglas gefertigt und wurde seitlich mit warmem Wasser durchströmt, um für das temperaturempfindliche Herz der Maus eine thermostabile Umgebung zu schaffen. In der Herzkammer wurde das Perfusat weitergeleitet in den Aortenblock, an dessen Ende sich die Aortenkanüle befand. Wir stellten die Langendorff-Apparatur auf einen konstanten Perfusionsdruck ein, der sich aus dem hydrostatischen Druck der Perfusat-Säule und dem Druck des Gases zusammensetzte. Ein konstanter Perfusionsdruck konnte unter anderem dadurch erreicht werden, dass die Rollenpumpe mehr Perfusat förderte als für das Herz erforderlich war. Das überschüssige Perfusat strömte über einen Flusswiderstand zurück zum Reservoir. Der Flusswiderstand bestand aus einer Membran, durch welche das Perfusat von einer Seite hindurchgeleitet wurde, während auf der anderen Seite mit Hilfe einer drehbaren Kontroll-Druckpumpe ein Druck appliziert wurde. Diese Druckpumpe war mit einem analogen Druckmanometer verbunden, um

den aktuellen Perfusionsdruck anzuzeigen. Zudem wurde der Perfusionsdruck durch einen Druckwandler (ISOTEC) gemessen. Ein Durchflussmesser (PLUGSYS Modul FLOW MEASUREMENT, FM Typ 662) nahm den resultierenden koronaren Fluss auf. Bevor das Perfusat die Aortenkanüle erreichte, wurde es durch ein Ventil und anschließend durch eine zum Teil mit Luft gefüllte Kammer geleitet, die die Funktion erfüllen sollte, eventuell im Perfusat noch vorhandene Luftblasen abzufangen, um eine Luftembolie des Herzens zu verhindern.

Zusätzlich zum Perfusionsdruck und dem resultierenden koronaren Fluss wurde die mechanische Aktion des Herzens als isovolumetrische Kontraktionen des linken Ventrikels durch einen flüssigkeitsgefüllten Ballon aus Polyvinylchlorid gemessen. Vor Beginn der Messungen führten wir diesen Ballon über den linken Vorhof in den linken Ventrikel ein und füllten ihn über eine spezielle Spritze mit Flüssigkeit, um die Vorlast des Herzens zu simulieren. Der Ballon war außerdem mit einem Druckwandler verbunden.

Zusätzlich zur Untersuchung physiologischer Parameter des Herzens eignet sich das Langendorff-Modell auch zur Untersuchung von Reaktionen auf die Applikation von Medikamenten z.B. die Applikation von inotropen oder vasoaktiven Substanzen. Die Pharmaka wurden mittels einer Infusionspumpe (Predictor Infors AG) über einen seitlichen Zugang dem System unmittelbar oberhalb der Aortenkanüle zugeführt, wodurch eine Kontamination des gesamten Systems verhindert werden konnte.

- | | |
|---|---|
| [20] Intraventrikulärer Ballon zur Simulation der Vorlast; über Katheter mit einem Druckwandler verbunden | den Ballon einen diastolischen Druck von min. 5mmHg zu erreichen |
| [21] Druckwandler am Ballon zur Messung des isovolumetrischen linksventrikulären Drucks | [23] Oberer Teil der Herzkammer aus Plexiglas, die seitlich mit warmem Wasser durchströmt wird, um für das Herz eine thermostabile Umgebung zu schaffen |
| [22] Spezielle Spritze zur präzisen Volumenfüllung des Ballons, um über | [24] Unterer Teil der Herzkammer |

2.7.2.2. Präparation/ Herzentnahme

Die Anästhesie der Mäuse erfolgte körperrgewichtsadaptiert mit Urethan (1 molar) intraperitoneal. Um nach Explantation des Herzens die Bildung von Thromben im Herzen zu verhindern, wurde den Tieren vor Injektion des Urethans Heparin in einer Dosierung von 5IU/g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die ausreichende Narkosetiefe wurde mittels „tail pinch“ überprüft. Anschließend fixierten wir das jeweilige Versuchstier zur Herzentnahme auf dem Rücken liegend an Schwanz und Extremitäten auf einem Präparationstisch.

Es erfolgte nun eine Thorakotomie. Dazu wurde unterhalb des Xiphoids mit einer gebogenen chirurgischen Schere (FST 14075-11) eine circa 1 cm lange vertikale Hautinzision gesetzt. Zur Eröffnung des Thorax wurde das Xiphoid mit einer feinen anatomischen gebogenen Pinzette (Aesculap OC021 R) leicht angehoben und die thorakale Faszie inzisiert. Zur weiteren Eröffnung des Thorax erfolgten bilaterale Schnitte in kranialer Richtung unter Durchtrennung der Rippen. Diesen Vorgang führten wir mit besonderer Vorsicht durch, um intrathorakal gelegene anatomische Strukturen nicht zu schädigen. Unter kontinuierlicher Fixierung des Xiphoids mittels der Pinzette, wurde der zuvor mobilisierte vordere Teil des Thorax vorsichtig deflektiert, um Herz und Lunge gut darstellen zu können.

Im Folgenden entnahmen wir das gesamte Herz-Lungen-Paket aus dem Thorax. Dazu wurden die Aorta descendens und die Vena cava inferior mit Hilfe der Pinzette fixiert und mit einer chirurgischen Schere durchtrennt. Entlang der Wirbelsäule führten wir mit der Schere kleine Inzisionen von kaudal nach kranial durch, um auch die Gefäßäste zu durchtrennen. Unter vorsichtiger Deflexion der fixierten Gefäße nach ventral konnte schließlich nach Durchtrennung der kranialen Gefäße, Aorta

ascendes und Vena cava superior, das Herz-Lungen-Paket aus dem Thorax entfernt werden, während die Pinzette weiterhin die Aorta descendens und Vena cava inferior fixierte. Bei der Präparation war darauf zu achten, die Strukturen des Herzens und die Aorta ascendens nicht zu schädigen.

Unmittelbar nach Mobilisierung des Herz-Lungen-Paketes aus dem Thorax legten wir es in eine auf 4°C gekühlte Präparierschale gelegt. Diese Präparierschale enthielt 4°C gekühlte, präoxygenierte und heparinisierte (5IU Heparin/ml) modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung. So konnte erreicht werden, dass sich das Herz während der nachfolgenden Präparation in einer nährstoff- und sauerstoffreichen Lösung befand. Zudem wurde durch die Kühlung auf 4°C eine Reduktion des Herzmetabolismus erzielt.

Zu Beginn der Präparation entfernten wir vorsichtig die Lungenflügel, den Thymus, die Bronchien und den Ösophagus mit einer feinen, geraden Schere (FST 14088-10), ohne das Herz oder die Aorta ascendens zu schädigen. Alle weiteren Präparationschritte erfolgten unter Zuhilfenahme eines Lichtmikroskops (Leica MZ9-5). Die Aorta wurde in einer Länge von circa 1cm dargestellt und mittels Mikropinzetten (Aesculap BD 331 R) und der feinen geraden Schere frei präpariert. Unmittelbar proximal des Abgangs des Truncus brachiocephalicus durchtrennten wir die Aorta. Außerdem wurde unter Durchtrennung der Venae pulmonales ein Zugang zum linken Vorhof geschaffen, über den im späteren Verlauf ein Ballon in den linken Ventrikel platziert werden sollte. Mittels feiner gerader Pinzetten erfolgte nun eine Fixierung des distalen Endes der Aorta. So konnte die Aorta vorsichtig ohne starken Zug auszuüben über die mit Perfusat gefüllte Aortenkanüle gezogen werden. Die Aorta wurde mit 5/0 Seide unter mikroskopischer Kontrolle auf der Kanüle ligiert. Um später eine ungehinderte Perfusion des Perfusats im koronaren Gefäßsystem zu gewährleisten, erfolgte zum Schluss eine Inzision der Arteria pulmonalis, welche sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur Aorta befindet.

Das isolierte Herz wurde schließlich über die Aortenkanüle an die Langendorff-Apparatur angeschlossen, wobei darauf zu achten war, dass aus der Apparatur an dieser Stelle bereits Perfusat tropfte und die Kanüle in schiefem Winkel mit der Apparatur verbunden wurde, um eine Luftembolie des Herzens zu vermeiden. Von

der Eröffnung des Thorax bis zum Anschluss des isolierten Herzens an die Langendorff-Apparatur sollten maximal sieben Minuten vergehen zur Vermeidung einer langen Ischämiezeit des Herzens.

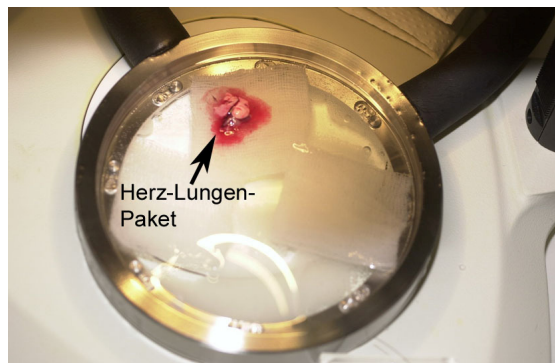
Eröffnung des Thorax im Bereich des Xiphoids, Anheben des Xiphoids und bilaterale Durchtrennung der Rippen in kranialer Schnitfführung
Deflexion des Thoraxschildes zur Darstellung des Herz- Lungen- Paketes



Zur Mobilisation des Herz- Lungen- Paketes Durchtrennung der Gefäße kranial, kaudal und entlang der Wirbelsäule und vorsichtige Entnahme des Herz- Lungen- Paketes



Entnommenes Herz- Lungen- Paket in gekühlte Präparierschale;
Resektion von Thymus, Lungenflügeln, Bronchien, Trachea und Ösophagus;
Präparation der proximalen Aorta bis Truncus brachiocephalicus;
Durchtrennung der Vv. pulmonales für Zugang zum linken Vorhof



Positionierung der Aorta auf Aortenkanüle
und Fixierung mittels Fadenligatur;
Abschließende Inzision der A. pulmonalis

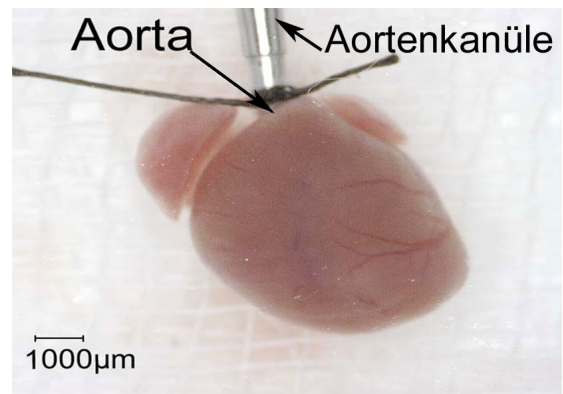


Abb. 2.10. Thorakotomie, Herzentnahme und Herzpräparation

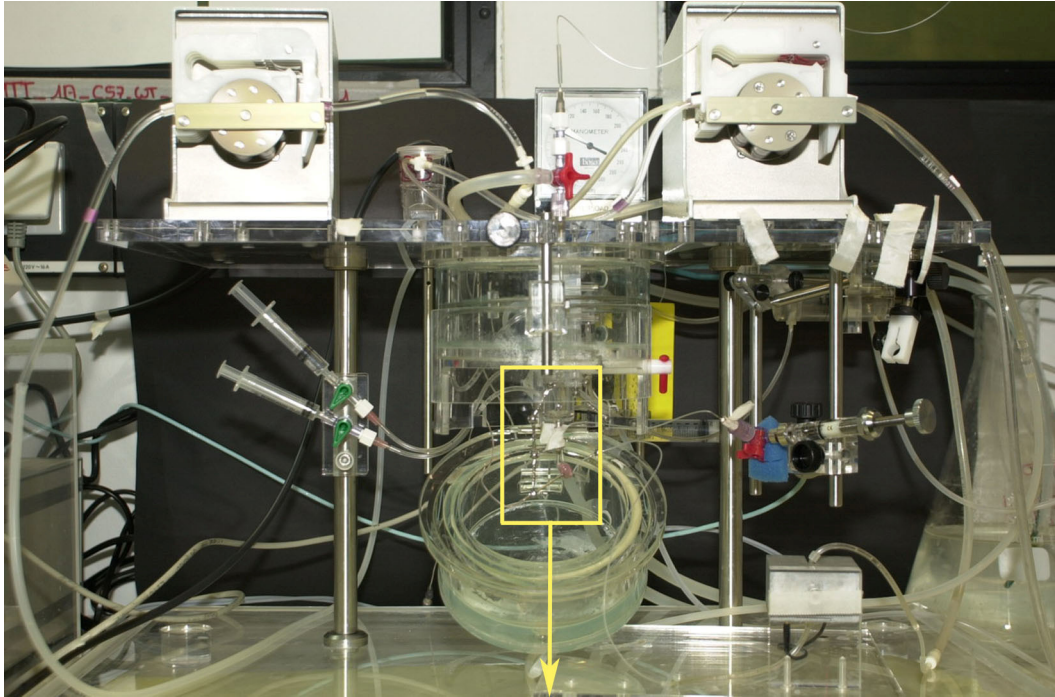


Abb. 2.11. Übersicht: isoliertes Herz in der Langendorff- Anlage

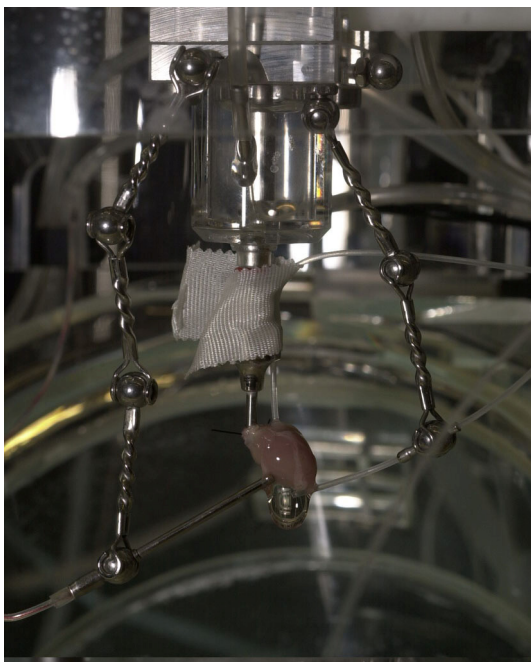


Abb. 2.12. isoliertes Herz in der Langendorff- Anlage

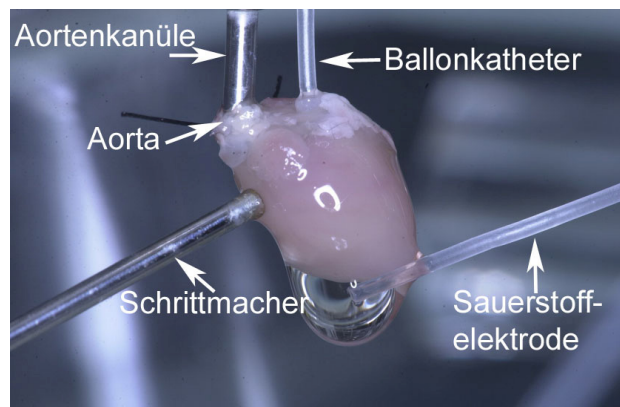


Abb. 2.13. isoliertes Herz in der Langendorff- Anlage in Vergrößerung

2.7.2.3. Krebs-Henseleit-Lösung

Für unsere Versuche an der Langendorff- Apparatur und zur Präparation des Herzens verwendeten wir eine modifizierte saline Lösung nach Krebs-Henseleit. Die Lösung wurde kurz vor Beginn des Versuchs hergestellt, da sie mit ihren Substraten bei längerem Stehen ein gutes Medium zum Wachstum von Bakterien darstellen würde. Die Funktion des Perfusats war die Versorgung des isolierten Herzens mit Nährstoffen und Sauerstoff unter Aufrechterhaltung der Ionen- und pH- Homöostase. Die saline Perfusionslösung basierte auf der von Krebs und Henseleit entwickelten „physiologischen“ Perfusionslösung (1932) und setzte sich folgendermaßen zusammen: NaCl 116 mmol/l, KCl 4,6 mmol/l, MgSO₄ 1,1 mmol/l, NaHCO₃ 24,9 mmol/l, CaCl₂ 2,5 mmol/l, KH₂PO₄ 1,2 mmol/l, Glucose 8,3 mmol/l und Pyruvat 2 mmol/l. Aufgrund des Risikos, dass die sich in der Lösung befindlichen Calcium- und Phosphat-Ionen Präzipitate bildeten, fügten wir das Calcium als letzte Komponente nach Begasung der Lösung mit Carbogen hinzu. Ziel der Begasung mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) war das Erreichen eines pH-Wertes von 7,4 und außerdem die Oxygenierung des Perfusats zur Sicherstellung der Sauerstoffversorgung des Herzens. Eine adäquate Sauerstoffversorgung des Herzens ist wichtig, um einen normalen Metabolismus zu gewährleisten. Dieser ist wiederum durch eine aerobe ATP-Produktion gekennzeichnet, welche eine Grundlage für das Überleben des isolierten Herzens bietet. Saline Lösungen besitzen eine niedrige Sauerstofftransportkapazität. Aus diesem Grund war eine Begasung des Perfusats mit Carbogen notwendig. In Abhängigkeit vom umgebenden O₂-Druck konnte dadurch ein pO₂ im Überschuss von 650 mmHg erreicht werden. Zudem erfolgte die Begasung mindestens 30 Minuten vor Versuchsbeginn und kontinuierlich während des gesamten Versuchs. In Kombination mit einem höheren koronaren Fluss bei Verwendung saliner Perfusionslösungen im Vergleich zu sanguinen Perfusionslösungen wurde so eine adäquate Sauerstoffversorgung gewährleistet. Vor Einsatz des hergestellten Perfusats musste dieses gefiltert werden, wobei Filter mit einer Porengröße von 5µm oder kleiner verwendet wurden. Das Perfusat wurde so gereinigt von Mikropartikeln, welche ansonsten eine Embolie im Herzen der Maus verursachen könnten. Vor Versuchsbeginn erwärmten wir das Perfusat in einem Wasserbad auf 37,5°C und begasteten es außerdem mindestens 30 Minuten mit Carbogen, um eine optimale Versorgung des isolierten Herzens mit Nährstoffen und Sauerstoff zu gewährleisten.

2.7.2.4. Ballonkatheter

Zur Messung der isovolumetrischen Kontraktionen des linken Ventrikels führten wir einen flüssigkeitsgefüllten Ballon aus Polyvinylchlorid über den linken Vorhof in den linken Ventrikel ein. Der Ballon war selbstständig hergestellt. Seine Größe war so gewählt, dass er den linken Ventrikel optimal ausfüllte. Zur Herstellung wurde die Oberfläche eines elastischen vorgedehnten Stücks Folie aus Polyvinylchlorid mit Millipore benetzt und anschließend auf einen etwa 10 cm langen Polyethylen- Tubus gesetzt. Der entstehende Ballon wurde vorsichtig mit Millipore aufgefüllt, wobei darauf zu achten war, dass sich keine Luftblasen im Ballon befanden. Abschließend erfolgte eine Ligatur mit 2/0 Seide. Der Polyethylen- Tubus war über eine 26G Kanüle mit einem Druckmesser (Isotec) verbunden. Über den Dreiwegehahn am Druckmesser und eine spezielle Spritze konnte der Ballon mit Millipore gefüllt werden. Hierbei war darauf zu achten, dass das gesamte Ballonkathetersystem luftblasenfrei mit Flüssigkeit befüllt wurde. Um die Vorlast des Herzens während des Versuchs zu simulieren, stellten wir den Ballon so ein, dass ein enddiastolischer Druck von mindestens 5 mmHg vorherrschte.

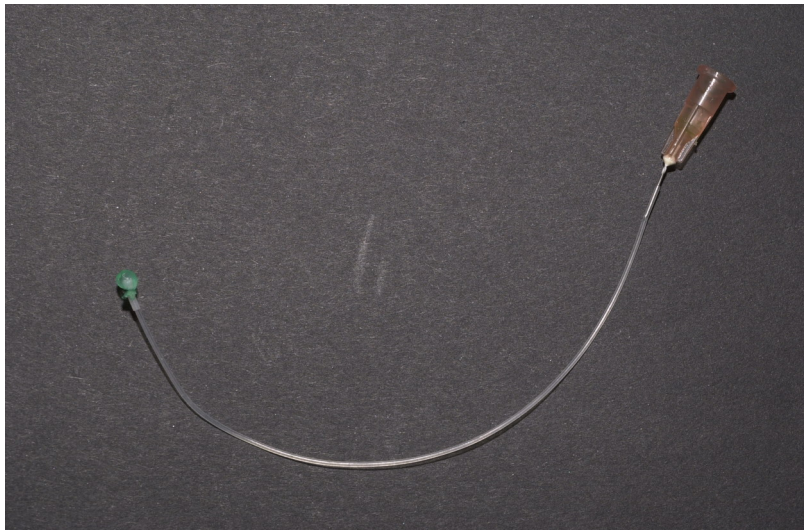


Abb. 2.14. Ballonkatheter

2.7.3. Versuchsdurchführung

2.7.3.1. Messwerte

Die Langendorff- Apparatur eignet sich zur Untersuchung mechanischer Parameter des Herzens z.B. inotroper (Kontraktilität), chronotroper (Herzfrequenz) oder

koronarmuskulotroper Effekte (koronarer Fluss), sowie zur Untersuchung bioelektrischer und metabolischer Parameter (s. 2.7.1.)

In der Versuchsdurchführung wurden im Einzelnen folgende Parameter erfasst:

Messparameter	Einheit	Erläuterung
HF	Schläge/ min	Herzfrequenz
Pmax	mmHg	maximaler Druck während eines Herzschlags
Pmin	mmHg	minimaler Druck während eines Herzschlags
Pbd	mmHg	Druck zu Beginn der Diastole
Ped	mmHg	Druck am Ende der Diastole
Pes	mmHg	Druck am Ende der Systole
DP	mmHg	Differenz aus maximalem und minimalem Druck
LVDP	mmHg	linksventrikulär entwickelter Druck
LVEDP	mmHg	linksventrikulär enddiastolischer Druck
dP/ dTmax	mmHg	maximale Rate des Druckanstiegs während der Kontraktion (positive slope)
dP/ dTmin	mmHg	maximale Rate der Druckabnahme während der Relaxation (negative slope)
SEP	msec	Zeit vom Beginn bis zum Ende der Ejektion
DFP	msec	Zeit vom Beginn bis zum Ende der Diastole
MSP	mmHg	Hauptdruck während der SEP
MDP	mmHg	Hauptdruck während der DFP
AOP	mmHg	Aortendruck
RT	msec	Dauer der isovolumetrischen Relaxation
CI (cardiac index)	sec-1	Quotient aus dP/dTmax und dem Druck zu diesem Zeitpunkt (dP/dTmax / P)
Tau	msec	Konstante Zeit der Relaxation (vom Peak des systolischen Drucks bis zum Beginn der nächsten Diastole)
Sr	%	Prozentsatz aus der Anzahl der akzeptierten Herzschläge gegenüber der totalen Anzahl der Herzschläge in der Datenlinie
N		gemittelte Anzahl der Herzschläge in der Datenlinie
MaxF	ml/ min	höchster Fluss innerhalb eines Herzschlags
MinF	ml/ min	niedrigster Fluss innerhalb eines Herzschlags
MBF	ml/ min	Mittlerer Fluss über einem gültigen Herzschlags
KorF	ml/ min/ g	Koronarer Fluss pro Minute pro Gramm Herzgewicht

Tab. 2.1. gemessene Parameter des isolierten Herzen in der Langendorff- Apparatur

2.7.3.2. Protokoll der Versuchsdurchführung

Ziel der Experimente war die Untersuchung der kontraktile Funktion und des koronaren Flusses in den isolierten Herzen der vier unterschiedlichen Versuchstiergruppen. Zusätzlich wurden die Reaktionen auf die Applikation zweier Pharmaka, Adenosin und Bradykinin, untersucht. Hier stand vor allem die Analyse des Einflusses der Pharmaka auf den koronaren Fluss im Vordergrund.

Die Experimente wurden 20 ± 2 Stunden nach Sepsisinduktion durch CLP bzw. nach Sham- Operation durchgeführt. Vor Beginn des ersten Versuchs an einem Versuchstag musste zunächst das sich in der Langendorff-Apparatur befindliche Millipore durch Perfusat getauscht werden. Die Funktion des Millipores lag zum einen in der Reinigung des Systems nach einem Versuchstag, zum anderen sollte dadurch vermieden werden, dass das System während der jeweiligen Versuchstage austrocknete. Vor Beginn der Versuche war es außerdem erforderlich, das Perfusat auf $37,5^{\circ}\text{C}$ zu erwärmen und zu oxygenieren. Das erwärmte und oxygenierte Perfusat wurde durch die Langendorff- Apparatur geleitet, um auch das System auf $37,5^{\circ}\text{C}$ zu erwärmen. Zu den Versuchsvorbereitungen gehörte zudem die Prüfung des Systems auf das Fehlen jeglicher Luftblasen, die eine Luftembolie des isolierten Herzens verursachen könnten. Außerdem erfolgte eine Kalibrierung des Druckwandlers am Ballon mit Festlegung einer oberen Grenze des Messbereichs von 150 mmHg und einer unteren Grenze von 0 mmHg.

Nach Anschluss des isolierten Herzens an die Langendorff-Apparatur über die Aortenkanüle stellten wir zur Perfusion des Herzens einen initialen aortalen Perfusionsdruck von 60 mmHg ein. Im Folgenden wurde der Ballon über den linken Vorhof in den linken Ventrikel vorgeschoben und zur Simulation der Vorlast auf einen enddiastolischen Druck von 5 mmHg konstant eingestellt. Zur Messung der kontraktile Parameter (dP/dT_{max}) stimulierten wir das Herz über einen externen Herzschrittmacher rhythmisiert auf eine Herzfrequenz von 600 Schlägen pro Minute. Die Platzierung des externen Schrittmachers erfolgte am Kammermyokard. Zur Einstellung der Herzfrequenz wurde die Reizschwelle (in der Regel 0,5- 2,5 Volt) bei konstanter Impulsdauer bestimmt. Die Stimulationsamplitude betrug das Doppelte der Reizfrequenz.

Es folgte der Start des Versuchsprotokolls. In Analogie zur Versuchsdurchführung der invasiven Blutdruckmessung (2.6.2.2.) war das mit dem Software- Programm IOX geschriebene Protokoll vorher festgelegt. Zum Vergleich der Ergebnisse aus den vier Versuchstiergruppen waren die einzelnen Abschnitte des Versuchs zeitlich genau festgelegten Speicherphasen zugeordnet. Mit dem Starten des Versuchsprotokolls erfolgte zunächst eine kurze Speicherphase aller Messparameter über einen Zeitraum von einer Minute als Initiationsphase. Vor Beginn dieser Initiationsphase erhöhten wir den ursprünglichen Perfusionsdruck von 60 mmHg auf 100 mmHg, welcher nachfolgend während des gesamten Versuches beibehalten wurde.

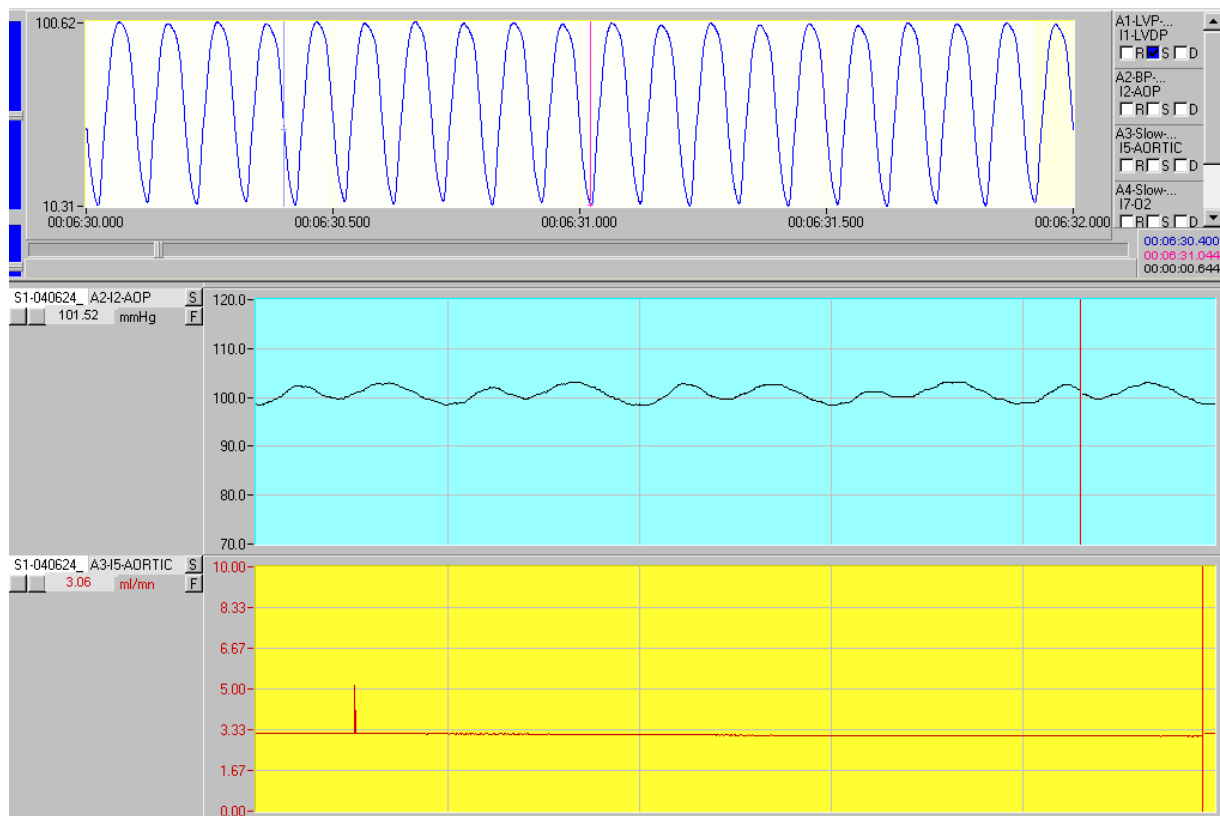


Abb. 2.15. Screen Shot der initialen Speicherphase mit den Parametern LVDP, AOP und koronarer Fluss: Obige Darstellung des linksventrikulären Drucks gemessen durch den im linken Ventrikel platzierten Ballons zeigt Druckschwankungen während des Herzzyklus; mittig Darstellung des aortalen Drucks, der während des Experimentes druckkonstant bei 100 mmHg gehalten wurde und im unteren Teil Anzeige des aortalen Flusses, der in der Regel zwischen 3-4 ml/min/g Herzgewicht lag.

An die Speicherung der initialen Messparameter schloss sich eine Äquilibrationsphase von 20 Minuten Dauer an. Anschließend führten wir zur Ermittlung der reaktiven Hyperämie des Herzens einen Ischämie-Reperfu-sionsversuch durch. Dazu wurden die Messparameter über eine Minute als Baseline- Parameter gespeichert. Es folgte eine globale Ischämie von 20 Sekunden

Dauer durch Unterbindung des Perfusatflusses an einem Ventil oberhalb der Aortenkanüle. Im Anschluss an die Ischämie wurde das Herz in der fünfminütigen Reperfusionphase wieder mit einem Perfusionsdruck von 100 mmHg perfundiert. Zu Beginn der Reperfusionphase ermittelten wir den maximalen koronaren Fluss. Die fünfminütige Reperfusionphase diente der Erholung des Herzens, die sich auch in der Normalisierung des koronaren Flusses am Ende dieser Phase zeigte.

Nach dem Ischämie- Reperfusion- Versuchsabschnitt applizierten wir Bradykinin und anschließend von Adenosin. Vor jeder Applikation wurden die Messparameter jeweils eine Minute als „Baseline Bradykinin“ bzw. als „Baseline Adenosin“ ermittelt. Im Anschluss an die Baseline- Phase erfolgte die kontinuierliche Gabe der Pharmaka jeweils über einen Zeitraum von fünf Minuten. Die Dosierung der Medikamente wurde über eine exakte Infusionspumpe in Anpassung an den koronaren Fluss geregelt. Entsprechend der Steigerung des koronaren Flusses als Reaktion auf die Medikamentenapplikation musste die Medikamentendosis nachreguliert werden. Diese Nachregulierung erfolgte während der Applikationsphase maximal dreimal. Während der Applikationsphase achteten wir besonders darauf, den Perfusionsdruck bei 100 mmHg konstant zu halten, um die Auswirkungen der Pharmaka auf den koronaren Fluss bei konstantem Perfusionsdruck zu vergleichen. Als Reaktion auf die Pharmaka kam es sowohl beim Bradykinin als auch beim Adenosin zu einem Anstieg des koronaren Flusses unterschiedlicher Ausprägung. Schließlich wurde ein Plateau erreicht, welches wir für die jeweilige Auswertung herangezogen.

Zwischen den Applikationen von Bradykinin bzw. Adenosin erfolgte eine Spülung des Systems mit Krebs-Henseleit-Lösung, um gegenseitige Beeinflussungen der beiden Substanzen zu vermeiden und um eine Normalisierung des koronaren Flusses vor Applikation des Adenosins zu erreichen. Dazu wurde das Herz während des Spülvorgangs über einen Zeitraum von 10 Minuten mit Perfusionslösung bei konstantem Perfusionsdruck von 100 mmHg perfundiert.

Nach Einstellung eines Plateaus als Reaktion auf die Adenosinapplikation war der Versuch beendet, wir entfernten Ballon und externen Schrittmacher. Die Fadenligatur wurde über der Aortenkanüle gelöst und das Herz von dieser abgezogen. Abschließend bestimmten wir das Feuchtgewichts des Herzens.

Versuchsabschnitt	Beschreibung
Versuchsbeginn	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anschluss des kanülierten Herzens an das Langendorff-Modell; ▪ Einstellen eines Perfusionsdrucks von 60mmHg ▪ Einführen des Ballons in den linken Ventrikel ▪ Stimulation der Herzfrequenz auf 600/ min über externen Schrittmacher ▪ Erhöhen des Perfusionsdrucks auf 100 mmHg ▪ Starten des Versuchsprotokolls
Initiationsphase (1)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Speicherung aller Messparameter über 1 Minute
Äquilibrationsphase	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Äquilibration aller Messparameter über 20 Minuten unter konstanten Druckbedingungen
Ischämie- Reperfusionphase (2-3)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baseline: Speicherung aller Messparameter über 1 Minute ▪ Ischämie: Globale Ischämie über 20 Sekunden durch Absperren des Perfusionsflusses ▪ Reperfusion: Ermittlung des maximalen koronaren Flusses in der fünfminütigen Reperfusionphase
Bradykinin- Applikation (4-6)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baseline: Speicherung aller Messparameter über 1 Minute ▪ Bradykininapplikation über 5 Minuten: Dosierung in Adaptation an den koronaren Fluss und Speicherung aller Messparameter ▪ Ausbildung eines Plateaus: Ende der Bradykininapplikation
Spülphase	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 10- minütige Spülphase mit Perfusat
Adenosin- Applikation (7-9)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baseline: Speicherung aller Messparameter über 1 Minute ▪ Adenosin- Applikation über 5 Minuten: Dosierung in Adaptation an den koronaren Fluss und Speicherung aller Messparameter ▪ Ausbildung eines Plateaus: Ende der Adenosin- Applikation
Versuchsende	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Entfernung des Herzens aus der Langendorff- Apparatur Bestimmung des Feuchtgewichtes des Herzens

Tab. 2.2: Versuchsablauf des Langendorff- Experimentes

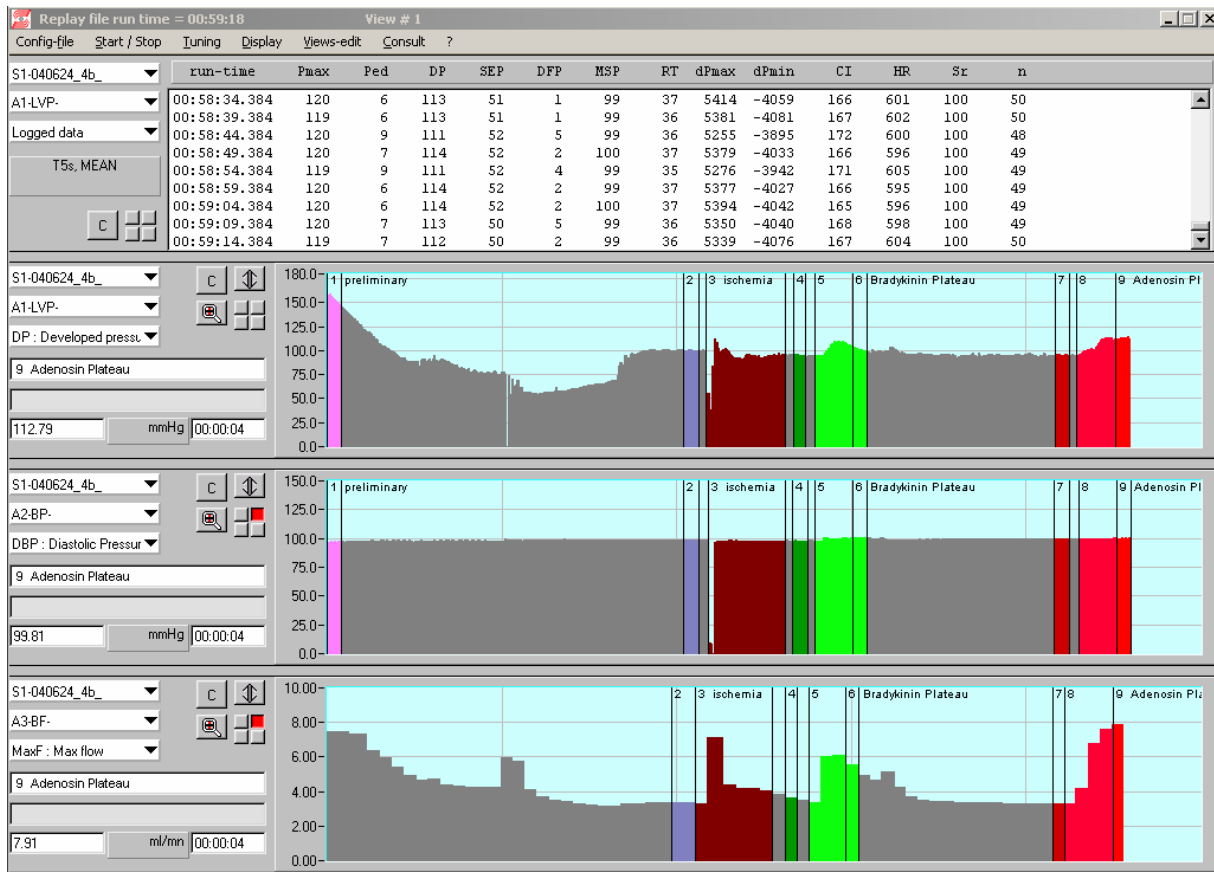


Abb. 2.16. Screen Shot nach Abschluss eines Versuchsablaufes:

Zeile 1 numerische Darstellung folgender Parameter von links nach rechts: Run-time: Zeitpunkt des Versuchs, Pmax, Ped, DP, SEP, DFP, MSP, RT, dPmax, dPmin, CI, HR, SR, n (Erläuterung s. 2.7.3.1.), Zeile 2 Verhalten des linksventrikulären Drucks, Zeile 3 Verhalten des diastolischen Drucks, Zeile 4 Darstellung des maximalen Flusses während der einzelnen Speicherungsphasen des Versuchs; Speicherphasen: Lila (1): Initiationsphase, Grau: 20- minütige Äquilibrationsphase, Blau (2): Baseline der Ischämie- Reperusionsphase, Braun (3): Ischämie- Reperusionsphase mit globaler Ischämie über 20 Sekunden und anschließende reaktive Hyperämie, Ermittlung des max. Flussanstieges während der 5- minütigen Reperusionsphase, Grün (4): Baseline der Bradykinin- Applikationsphase, Grün (5): Bradykinin- Applikation über 5 Minuten mit Anstieg des LVP und des koronaren Flusses, Grün (6): Ausbildung eines Plateaus und Ende der Bradykinin- Applikation, Grau: 10- minütige Spülphase mit Perfusat, Rot (7): Baseline der Adenosin- Applikation, Rot (8): Adenosin- Applikation über 5 Minuten, Rot (9): Ausbildung eines Plateaus, Ende der Adenosin- Applikation und Versuchsende

2.7.3.3. Wirkungsmechanismen der eingesetzten Substanzen und Effekte am isolierten Herzen

2.7.3.3.1. Bradykinin

Bradykinin (BK) ist ein Nonapeptid und entsteht durch die Aktivierung des Kallikrenin-Kinin-Systems ausgehend vom hochmolekularen Kininogens, einem Plasma- α 2-Globulin, welches durch Plasmakallikrenin gespalten wird. Die Plasmahalbwertszeit von Bradykinin ist kurz. Es hat sowohl pathophysiologische als auch physiologische Auswirkungen. Bradykinin fungiert als proinflammatorischer Mediator und Neuromediator, ist beteiligt an der Regulation verschiedener Funktionen des Gefäß- und Nierensystems, zudem vermutet man antiproliferative und kardioprotektive Effekte⁹⁹. Seine Wirkung vermittelt Bradykinin durch die Stimulation spezieller Rezeptoren, die als BK1- bzw. als BK2-Rezeptoren klassifiziert werden. BK1-Rezeptoren werden vor allem unter pathologischen Bedingungen z.B. einer Gewebeschädigung exprimiert. Sie vermitteln die Entstehung von Schmerz und Entzündung z.B. durch die Stimulation von Phospholipasen und nachfolgender Freisetzung von Arachidonsäure. BK2-Rezeptoren lösen die meisten der bekannten kardiovaskulären Effekte der Kinine aus. Bradykinin hat eine sehr potente vasodilatatorische Wirkung durch die endotheliale Freisetzung von Prostacyclin, EDHF (endothelium-derived hyperpolarising factor) und NO. Im Gefäßsystem erfolgt durch Bradykinin über die Aktivierung der endothelialen BK2-Rezeptoren eine Stimulation der endothelialen NO-Synthase (eNOS). Dieses geht mit einer erhöhten NO-Synthese einher. Sowohl BK2-Rezeptoren als auch Aktivität der NOS wurden in kardialen Myozyten nachgewiesen, zudem fand man ein intaktes Kallikrenin- Kinin-System im Herzen finden¹⁰⁰. Die Akkumulation des Bradykinins im Interstitium des Herzens kann jedoch auch schädliche Auswirkungen haben. So hat die direkte Interaktion des Bradykinins mit Nervenendigungen und Fibroblasten möglicherweise schädliche Auswirkungen mit verstärkter Freisetzung von Noradrenalin und verstärkter perivaskulärer/ myokardialer Fibrose¹⁰⁰. Positive Effekte des Bradykinins liegen vor allem in der Interaktion mit Endothelzellen des Gefäßsystems, die mit einer verstärkten NO-Synthese und nachfolgender Vasodilatation einhergeht. Bradykinin wurde in einer Konzentration von 5 μ molar appliziert.

2.7.3.3.2. Adenosin

Adenosin ist ein Nukleosid, welches sich aus der Purinbase Adenosin und dem Monosaccharid Ribose zusammensetzt. Es hat eine sehr kurze Halbwertszeit (HWZ ≤ 10 sec). Die Bedeutung des Adenosins liegt in der Reduktion von Zellfunktionen und dem Energieverbrauch von Organen. Es gilt als negativer Feedback-Modulator¹⁰¹. Am Herzen wirkt es durch direkte Beeinflussung der Kardiomyozyten, der Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen, außerdem beeinflusst es indirekt Transmissionen an Synapsen im Bereich des autonomen Nervensystems¹⁰². Wie die meisten Zellen des Körpers verfügen auch kardiovaskuläre Zellen über membranständige Adenosinrezeptoren, welche zur G-Protein-gekoppelten Rezeptorfamilie gehören. Adenosinrezeptoren lassen sich in vier Subtypen unterteilen: Adenosin A1-, A2A-, A2B- und A3- Rezeptoren, die unterschiedliche Wirkungen des Adenosins vermitteln.

A1- Rezeptoren befinden sich vor allem im Gehirn, im Rückenmark, in den Hoden und im Fettgewebe. In der Niere, der Milz und dem Herzen sind sie in geringerer Zahl vorhanden. Am Herzen vermitteln sie eine Vielzahl von Effekten wie die Reduktion der Herzfrequenz (negativ chronotrop), der AV-Knoten-Überleitung (negativ dromotrop) und eine Verminderung der Vorhofkontraktion (negativ inotrop). A1- Rezeptoren sind mit inhibitorischen G- Proteinen gekoppelt mit Inhibition der Adenylatcyclase. Dadurch erfolgt eine Abschwächung der stimulierenden Effekte von Katecholaminen auf β - adrenerge Rezeptoren. Im Vorhof- und AV-Knoten-Gewebe erhöht Adenosin den Ionenfluss über einem einwärts gerichteten Kalium- Kanal¹⁰³. Es resultiert eine Hyperpolarisation der Zellmembran und eine verkürzte Dauer des Aktionspotentials im supraventrikulären Gewebe. Außer der Kopplung der A1- Rezeptoren mit der Adenylatcyclase, beeinflusst Adenosin auch andere zelluläre second- messenger-Systeme. So erfolgt über den Inositolphospholipidweg eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC)¹⁰⁴. Diese wiederum aktiviert ATP-sensitive K^+ -Kanäle, die im Zusammenhang steht mit kardioprotektiven Wirkungen des Adenosins während kardialer Hypoxie bzw. Ischämie¹⁰⁵.

A2A- oder A2B- Rezeptoren sind lokalisiert auf endothelialen und vaskulären glatten Muskelzellen. Im Gegensatz zu den A1- Rezeptoren sind sie mit der Adenylatcyclase über stimulatorische G-Proteine gekoppelt und führen zu einer Erhöhung von cAMP.

Ihre Bedeutung liegt in der Vermittlung einer systemischen Vasodilatation und einer Vasodilatation der KoronargefäÙe. Dieser Effekt wird vor allem den A_{2A}-Rezeptoren zugeschrieben¹⁰¹. Als wichtige Mechanismen der vom Endothelium unabhängigen Vasodilatation konnten eine Aktivierung von Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanälen in Koronararterien und von ATP-sensitiven K⁺-Kanälen in glatten GefäÙmuskelzellen nachgewiesen werden^{106,107}. Möglicherweise spielen auch vom Endothelium abhängige Mechanismen der Vasorelaxation über NO eine Rolle¹⁰⁸. A_{2A}- und A_{2B}-Rezeptoren vermitteln neben der Vasodilatation auch positiv inotrope Effekte.

Die A₃-Rezeptoren sind vergleichbar den A₁-Rezeptoren mit inhibitorischen G-Proteinen gekoppelt und inhibieren die Aktivität der Adenylatcyclase. Zudem vermitteln sie eine erhöhte Aktivität der Phospholipase C¹⁰¹. Wie A₁-Rezeptoren scheinen sie eine Rolle im Zusammenhang mit Kardioprotektion gegen Reperfusion-induzierter kontraktiler Dysfunktion zu spielen¹⁰².

2.8. Datenerfassung und Datenverarbeitung der Blutdruck- und Langendorff- Ergebnisse

2.8.1. Datenerfassung

Die Blutdrucksignale der invasiven arteriellen Blutdruckmessung wurden kontinuierlich über einen Druckmesser (Isotec der Firma Hugo Sachs Elektronik) aufgenommen. Die Verstärkung der Signale erfolgte mittels eines Verstärkers (Transducer Amplifier Modul TAM A), einem universellem Messwertaufnehmer zur Messung von Kraft, Druck oder Weg. Anschließend wurden die Signale an den Personal Computer weitergeleitet.

Im Langendorff-Modell erfolgte eine kontinuierliche Aufnahme des Perfusionsdrucks über einen Druckwandler (Isotec der Firma Hugo Sachs Elektronik), des koronaren Flusses über einen Durchflussmesser (PLUGSYS Modul FLOW MEASUREMENT, FM Typ 662), der Vorlast und des linksventrikulären Drucks über den Druckmesser (Isotec der Firma Hugo Sachs Elektronik) am Ballon. Ebenso wie bei der Blutdruckmessung mussten alle aufgenommen Signale verstärkt werden. Dabei wurden unterschiedliche Verstärkermodule verwendet: Zur Verstärkung der aufgenommenen Signale der Druckmesser setzten wir den analogen Messwertaufnehmer Transducer Amplifier Modul TAM A ein. Die Signale des Durchflussmessers wurden mittels eines einkanaligen Ultraschall-Flussmessers (Transit Time Flowmeter TTFM Typ 700) verstärkt.

Die verschiedenen Verstärkermodule TAM A und TTFM Typ 700 waren in einem Plugsys® Grundgehäuse der Firma Hugo Sachs Elektronik integriert, um die unterschiedlichen Funktionseinheiten aufnehmen zu können.

2.8.2. Datenverarbeitung

Die Signale der einzelnen Verstärkermodule wurden simultan an einen Personal Computer weitergeleitet. Dort erfolgte die weitere Bearbeitung und Speicherung der Messdaten in Echtzeit unter Verwendung des IOX-Software-Programms der Firma EMKA Technologies, welches speziell für Experimente in vitro und in vivo entwickelt wurde. Die Rohdaten wurden mit Hilfe eines A/D-Wandlers erzeugt, welcher die analogen elektrischen Signale der Verstärker in digitale numerische umwandelte.

Dabei zeigt das analoge Signal einen kontinuierlichen Verlauf, während das digitale Signal einer Zahlenfolge entspricht. Das Zeitintervall dieser Zahlenfolge ist die Sampling Rate, die in unseren Experimenten 2000 Hz betrug. Die weitere Bearbeitung der Rohdaten erfolgte durch spezielle Teilprogramme des Systems, so genannte „Analyzer“, welche die Rohdaten aufnahmen und spezifische Parameter von ausgewählten Inputs berechneten. Die Parameter sind abhängig von der ausgewählten Quelle, in unserem Fall den Druck- oder Flusssignalen. Jeder Versuch lief standardisiert nach einem vorher im Softwareprogramm IOX festgelegten Versuchsprotokoll ab. Dieses Versuchsprotokoll entsprach einer Sequenz von Befehlen, die bei jedem Versuch abgerufen wurden und den Versuchsverlauf in definierte Zeitintervalle unterteilte.

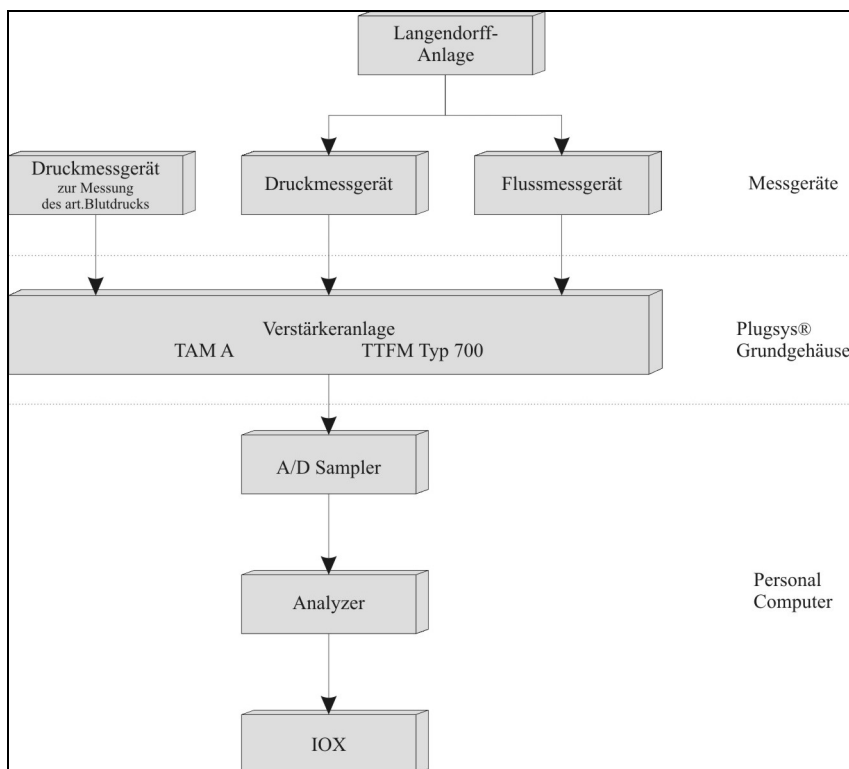


Abb. 2.17. Übersicht über die Reihenfolge der Verschaltungen von Hard- und Software: Aufnahme der Rohdaten der Blutdruckmessung bzw. der Messung hämodynamischer Parameter im Langendorff-Modell durch die Messgeräte, Verstärkung der Signale durch die Verstärkermodule und endgültige Bearbeitung der Daten am Personal Computer

2.9. Statistische Analyse der Messergebnisse

Aus den Einzeldaten erfolgte zunächst die Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichungen. Für den Vergleich der Mittelwerte aus den vier unterschiedlichen Versuchstiergruppen wurde unter der Voraussetzung normalverteilter Messwerte der „Student’s t-Test“ für unabhängige Stichproben angewandt. Zur Signifikanztestung wurde als Signifikanzindikator ein p-Wert von $\leq 0,05$ festgelegt. Hieraus folgt, dass ein p-Wert von $< 0,05$ als signifikant betrachtet wurde. Unterschiede bei wiederholten Messungen wurden durch das „multiple“ Auswertungsverfahren „ANOVA“ und dem nachfolgenden „Bonferroni post hoc test“ analysiert.

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis einer Sepsis mittels Anlage von Blutkulturen

Zum Nachweis einer Bakteriämie als Hinweis auf eine vorliegende Sepsis wurden 20 Stunden nach Sepsisinduktion mittels CLP sowohl von den Simvastatin- behandelten als auch von den Placebo- behandelten Versuchstiergruppen Blutkulturen angelegt. Die Sham- Tiere dienten als Kontrolltiergruppen. Aus ihrem Blut konnte kein pathogener Keim isoliert werden. Im Gegensatz dazu wiesen wir sowohl bei den Simvastatin- behandelten als auch bei den Placebo- behandelten Versuchstieren 20 Stunden nach Sepsisinduktion eine Bakteriämie nach. Folgende pathogene Keime wurden nach Bebrütung aus dem Blut beider CLP- Gruppen isoliert:

- *Enterococcus cloacae*
- *Escherichia coli*
- *Proteus mirabilis*
- *Alcaligenes faecalis*

Die nachgewiesene Bakteriämie sowohl bei den Simvastatin- behandelten als auch bei den Placebo- behandelten Versuchstieren weist auf eine erfolgreiche Sepsisinduktion mittels CLP in beiden Versuchstiergruppen hin. Gleichzeitig gilt, dass die Sham- Behandlung ebenfalls erfolgreich war, da aus dem Blut der Sham- Tiere kein Keim isoliert werden konnte.

3.2. Überlebenszeiten nach Sepsisinduktion

In einem ersten experimentellen Versuchsansatz stellten wir die Überlebenszeiten von Simvastatin- und Placebo- behandelten Versuchstieren einander gegenüber. Nach Applikation des Simvastatins bzw. des Placebos erfolgte die Induktion einer Sepsis durch CLP bzw. die Durchführung einer Sham- Behandlung. Wie in 2.3. beschrieben ergaben sich hieraus insgesamt vier Versuchstiergruppen.

Die Sham-operierten Tiere dienten als Kontrolltiere. Sowohl bei den Simvastatin- als auch bei den Placebo- behandelten Sham- Tieren zeigten sich während des Beobachtungszeitraums von 168 Stunden im Überlebensversuch keine Todesfälle. Bei den CLP- behandelten Tieren lagen hingegen deutliche Unterschiede zwischen den Simvastatin- und den Placebo- behandelten septischen Tieren vor (Abb. 3.1.). Die Abbildung gibt den prozentualen Anteil der überlebenden CLP- Tiere im zeitlichen postoperativen Verlauf wieder. Hier zeigt sich deutlich, dass die Simvastatin-behandelten Tiere von der Applikation des Medikamentes profitierten:

In der Gruppe der Placebo-behandelten Tiere überlebte kein Tier länger als 49 Stunden. Der erste Exitus letalis trat bereits nach 19 Stunden ein.

Bei den Mäusen, die präoperativ mit Simvastatin behandelt wurden, lebten nach 168 Stunden noch 20 % der Tiere. Das erste Tier starb nach 33 Stunden.

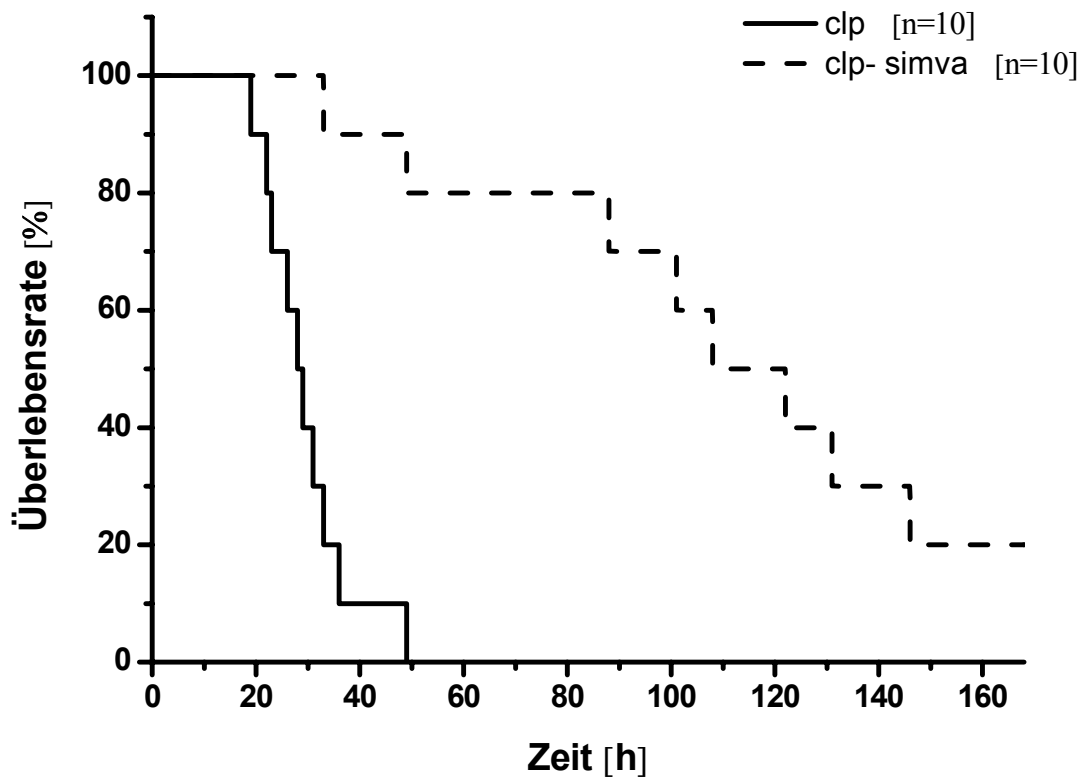


Abb. 3.1. Überlebensrate in Prozent der Placebo- und der Simvastatin- behandelten CLP- Tiere im zeitlichen postoperativen Verlauf. Die blau markierte Linie zeigt die prozentuale Überlebensrate der Simvastatin- behandelten Tiere und die grün markierte Linie die Überlebensrate der Placebo- behandelten Tiere bei einer Gruppengröße von jeweils 10 Versuchstieren.

Betrachtet man die mediane Überlebenszeit der Placebo- und Simvastatin- behandelten CLP- Tiere, so ist der Unterschied zwischen den beiden Versuchstiergruppen signifikant mit 28 Stunden bei den unbehandelten Tieren versus 108 Stunden bei den behandelten Tieren ($n=10$; $*** p < 0,005$).

3.3. Echokardiographie

Präoperativ und 20±2 Stunden postoperativ nach Sepsisinduktion bzw. Sham-Behandlung führten wir in den vier verschiedenen Versuchstiergruppen (pro Gruppe n=12) eine Echokardiographie zur Untersuchung kardialer und hämodynamischer Parameter durch mit dem Ziel, das Herzzeitvolumen zu berechnen. Aus den Untersuchungen mittels Echokardiographie haben wir folgende Ergebnisse abgeleitet: 20±2 Stunden postoperativ nach Sepsisinduktion sank das Herzzeitvolumen bei den Placebo- behandelten Mäusen von 1,24±0,09 ml/min/g auf 0,87±0,11 ml/min/g (***) p < 0,005; n=12). Bei den Simvastatin- behandelten CLP-Tieren blieb das präoperativ berechnete Herzzeitvolumen im Vergleich zur postoperativen Untersuchung nahezu unverändert. Präoperativ betrug es 1,21±0,08 ml/min/g und postoperativ 1,15±0,10 ml/min/g (p= n.s. = nicht signifikant; n=12). Die Sham-operierten Tiere dienten lediglich als Kontrolltiergruppen. Prä- und postoperativ waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar. Postoperativ zeigte sich in der Simvastatin- Sham- Gruppe ein Herzzeitvolumen von 1,20±0,12 ml/min/g. In der Placebo- Sham- Gruppe herrschte ein Herzzeitvolumen von 1,18±0,10 ml/min/g vor.

Die Unterschiede der ermittelten Herzzeitvolumina zwischen der prä- und postoperativen Echokardiographieuntersuchung der Simvastatin- und Placebo-behandelten CLP- Gruppen sind in Abb. 3.2. dargestellt.

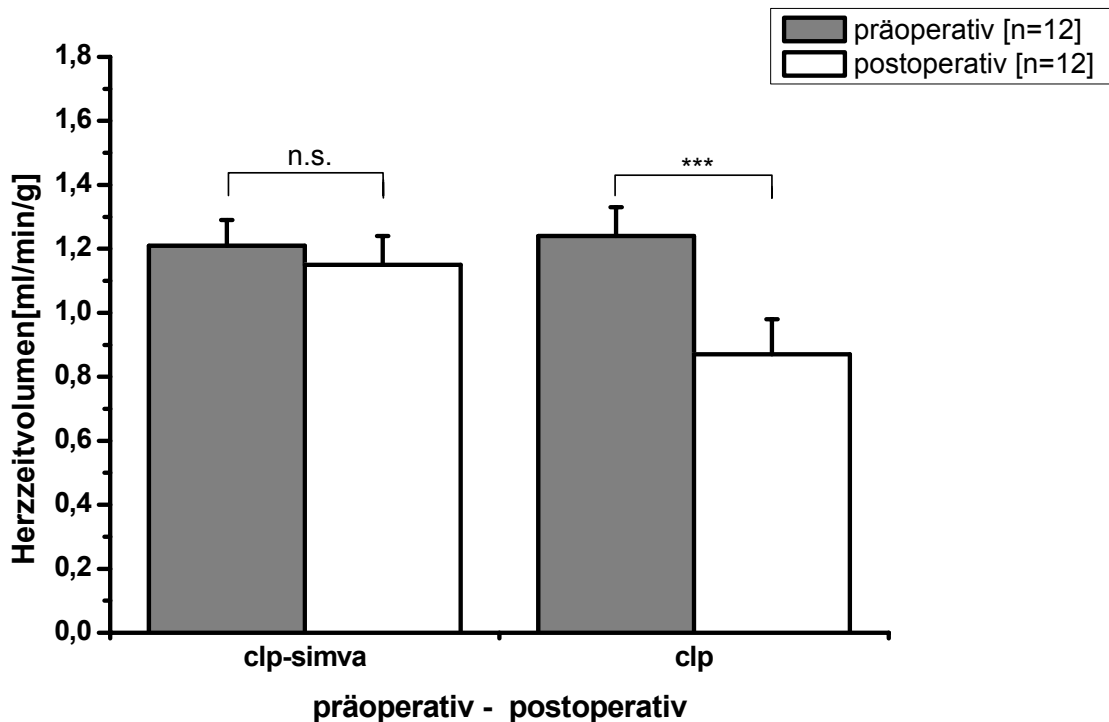


Abb. 3.2. Prä- und 20 ±2 Stunden postoperativ ermittelte Herzzeitvolumina in der CLP-Simvastatin-Gruppe ($p = \text{n.s.}$; $n=12$) im Vergleich zur CLP-Gruppe ($*** p < 0,005$; $n=12$)

Im Anschluss an die postoperative Echokardiographieuntersuchung erfolgte eine weitere Echokardiographie der vier Versuchstiergruppen 7- 11 Minuten nach intraperitonealer Applikation von Dobutamin in einer Konzentration von 1,5 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht. Zu diesem Zeitpunkt liegt ein Plateau effekt der Dobutaminwirkung vor. Als potenter Agonist am β_1 - Rezeptor und positiv inotrope Substanz ist durch die Applikation von Dobutamin eine Erhöhung des Herzzeitvolumens zu erwarten, die bei den Sham- Tieren und den Simvastatin- behandelten CLP- Tieren eintrat (clp-simva, sham-simva und sham $## p < 0,001$; $n=12$). Die Placebo- behandelten CLP- Tiere zeigten hingegen keine signifikante Reaktion auf die β - Stimulation des Dobutamins mit Herzzeitvolumina von $0,87 \pm 0,11 \text{ ml/min/g}$ und $0,91 \pm 0,19 \text{ ml/min/g}$ nach Dobutamingabe ($p = \text{n.s.}$; $n=12$).

Aus diesen Untersuchungsergebnissen folgt, dass sich die Placebo- behandelten CLP- Tiere als refraktär gegenüber der β - Stimulation durch Dobutamin erwiesen. Interessanterweise lag diese Katecholaminresistenz bei den Simvastatin - behandelten CLP- Tieren nicht vor. In Abb. 3.3. sind die in den vier Versuchstiergruppen postoperativ ermittelten Herzzeitvolumina denen nach Dobutamin- Gabe einander gegenüber gestellt.

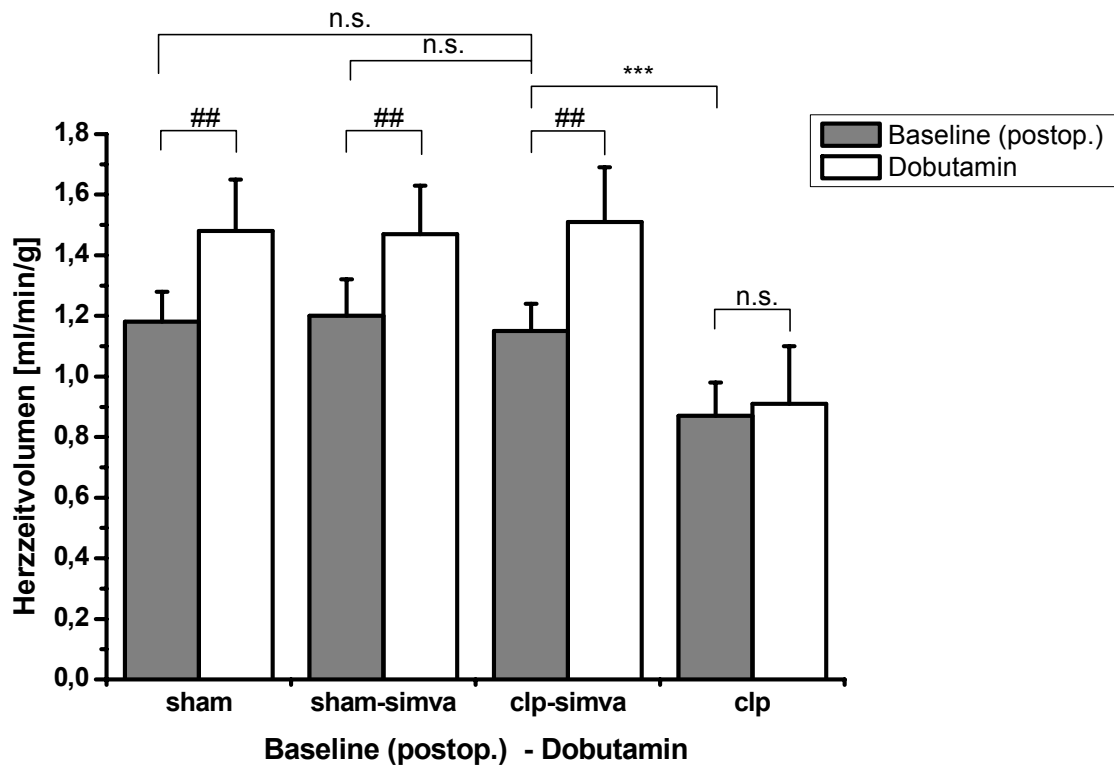


Abb. 3.3. Signifikant niedrigeres Herzzeitvolumen 20 ± 2 Stunden nach Sepsisinduktion in der CLP-Gruppe versus Simvastatin-CLP-Gruppe (clp vs. clp-simva: *** $p < 0,005$; $n=12$), während zwischen letzterer und den Sham-Gruppen kein Unterschied der ermittelten Herzzeitvolumina vorlag (clp-simva, sham-simva und sham: $p = n.s.$; $n=12$).

Nach Dobutamingabe stieg das Herzzeitvolumen in allen Versuchstiergruppen (clp-simva, sham-simva und sham: ## $p < 0,001$; $n=12$) mit Ausnahme der unbehandelten CLP-Gruppe (clp: $p = n.s.$; $n=12$).

3.4. Invasive arterielle Blutdruckmessung

Wie die Echokardiographieuntersuchung führten wir die invasive arterielle Blutdruckmessung 20 ± 2 Stunden postoperativ nach Sepsisinduktion mittels CLP bzw. Sham- Behandlung durch und verglichen die vier Versuchstiergruppen hinsichtlich der arteriellen Blutdruckwerte.

Zurückzuführen auf freiwerdende Mediatoren im Rahmen der Sepsis wie proinflammatorische Zytokine und NO liegt zu diesem Zeitpunkt eine hypodynamie Kreislaufsituation vor mit Abnahme des systemischen Widerstands und Hypotension. In der arteriellen Blutdruckmessung stellten wir eine signifikante Abnahme des mittleren arteriellen Drucks um 25 ± 6 mmHg ($P < 0,001$; $n=12$) bei den unbehandelten CLP- Tieren im Vergleich zu den Sham- Tieren fest. Diese im Rahmen einer Sepsis zu erwartende Hypotension stellte sich bei den Simvastatin- behandelten CLP- Tieren nicht ein. Bei den Sham- Tieren hatte die Simvastatin- Behandlung keinen Einfluss auf den mittleren arteriellen Druck.

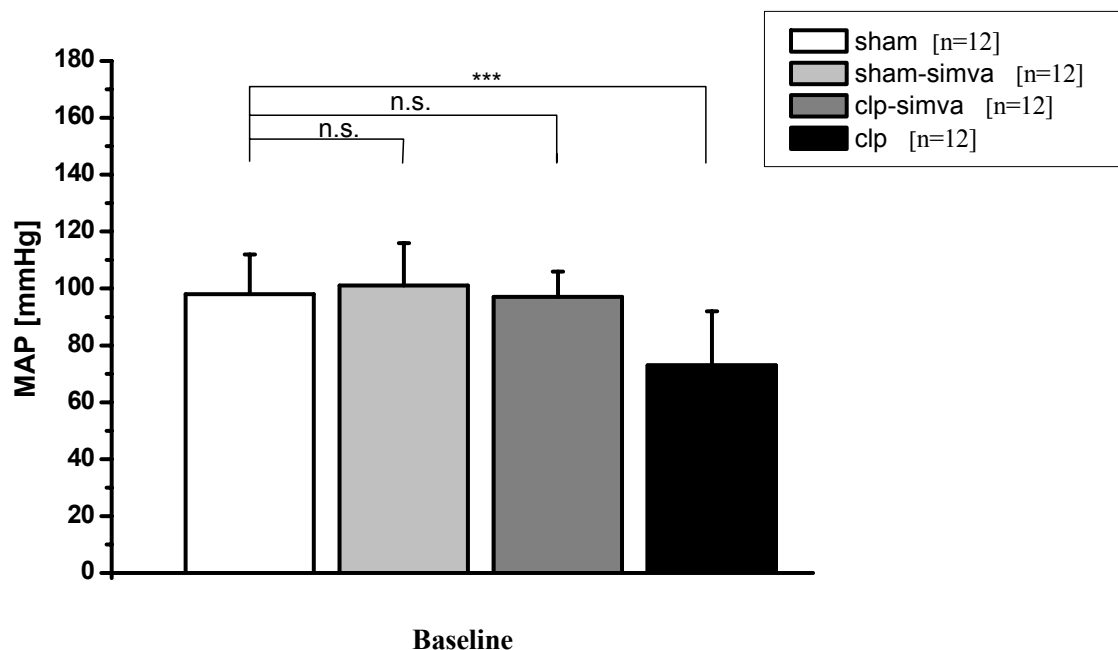


Abb. 3.4. Darstellung der 20 ± 2 Stunden nach Sepsisinduktion mittels CLP bzw. Sham- Behandlung ermittelten MAP- Werte (MAP= mittlerer arterieller Druck) der vier unterschiedlichen Versuchstiergruppen (pro Gruppe $n=12$). Allein in der unbehandelten CLP- Gruppe trat eine Hypotension ein mit Reduktion des MAP um 25 ± 6 mmHg ($p > 0,001$; $n=12$) im Vergleich zu den unbehandelten Sham- Tieren, dagegen ist zwischen den Simvastatin- behandelten CLP- Tieren und den Sham- Tieren kein signifikanter Unterschied erkennbar. Gleiches gilt für die Simvastatin- behandelten Sham- Tiere.

Im Anschluss an die Aufzeichnung der Baseline- Werte erfolgte die Applikation von Dobutamin. Als positiv inotrope Substanz resultiert aus der Dobutamin- Gabe eine Erhöhung des Herzzeitvolumens und infolge dessen auch des mittleren arteriellen Drucks. Im Vergleich zur Echokardiographieuntersuchung zeigten sich hier entsprechende Versuchsergebnisse: Beide Sham- Tiergruppen und die Simvastatin-behandelten CLP- Tiere reagierten auf die Dobutamin- Applikation mit einer signifikanten Zunahme des mittleren arteriellen Drucks mit folgenden Werten:

- Sham- Tiere: Anstieg von 98 ± 14 mmHg auf 128 ± 14 mmHg
- Sham- Simvastatin- Tiere: Anstieg von 101 ± 15 mmHg auf 133 ± 12 mmHg
- CLP- Simvastatin-: Anstieg von 97 ± 9 mmHg auf 133 ± 9 mmHg

Dieser prozentualen Steigerung des mittleren arteriellen Drucks um > 30% steht eine prozentuale Zunahme des mittleren arteriellen Drucks von 9,6% bei den unbehandelten CLP- Tieren gegenüber. Hier nahm der arterielle Druck von 73 ± 19 mmHg auf 80 ± 20 mmHg zu.

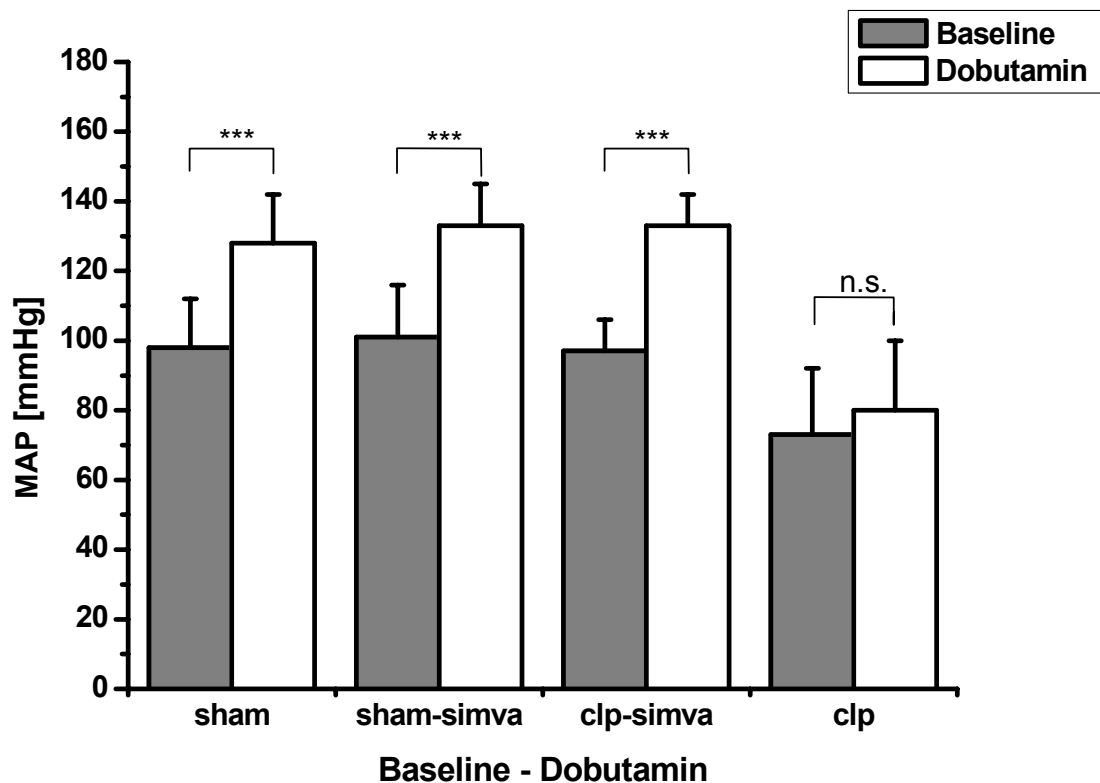


Abb. 3.5. Darstellung der Baseline- Werte im Vergleich zu den Werten nach Gabe von Dobutamin in den vier verschiedenen Versuchstiergruppen: Dobutamin- Gabe führte zu einem signifikanten Anstieg des MAP in den Versuchstiergruppen 1-3 (sham, sham-simva, clp-simva: *** $p < 0,005$, $n=12$), keine signifikante Steigerung des MAP in der Gruppe der unbehandelten CLP- Tiere (clp: $p = n.s.$, $n=12$)

Analog den Resultaten der Echokardiographie wiesen auch hier die unbehandelten septischen Tiere nach Dobutamingabe eine Katecholaminresistenz auf, die interessanterweise bei den Simvastatin- behandelten CLP- Tieren nicht vorlag. Sie reagierten auf das Katecholamin mit einer deutlichen Zunahme des mittleren arteriellen Drucks.

Nach Abklingen des Dobutamineffektes erfolgte im nächsten Schritt die Applikation von ETU. ETU führt als unspezifischer Inhibitor der NO-Synthase zu einer systemischen Vasokonstriktion mit Erhöhung des systemischen Widerstandes und demzufolge auch des mittleren arteriellen Drucks. Im Vergleich zur Baseline kam es unmittelbar nach ETU- Gabe zu einer Steigerung des mittleren arteriellen Drucks um > 50% in den Sham- Gruppen und der Simvastatin- CLP- Gruppe (sham: 149 ± 10 mmHg, sham- simva: 154 ± 9 mmHg, clp-simva: 149 ± 9 mmHg). Im Gegensatz zur Katecholaminapplikation nahm in diesem Versuchsabschnitt auch der mittlere arterielle Druck bei den unbehandelten CLP- Tieren um 46,6% zu auf 107 ± 17 mmHg. Letzterer liegt jedoch unter Betrachtung der absoluten Werte deutlich unter den ermittelten Werten in den anderen drei Versuchstiergruppen (Abb.3.6.).

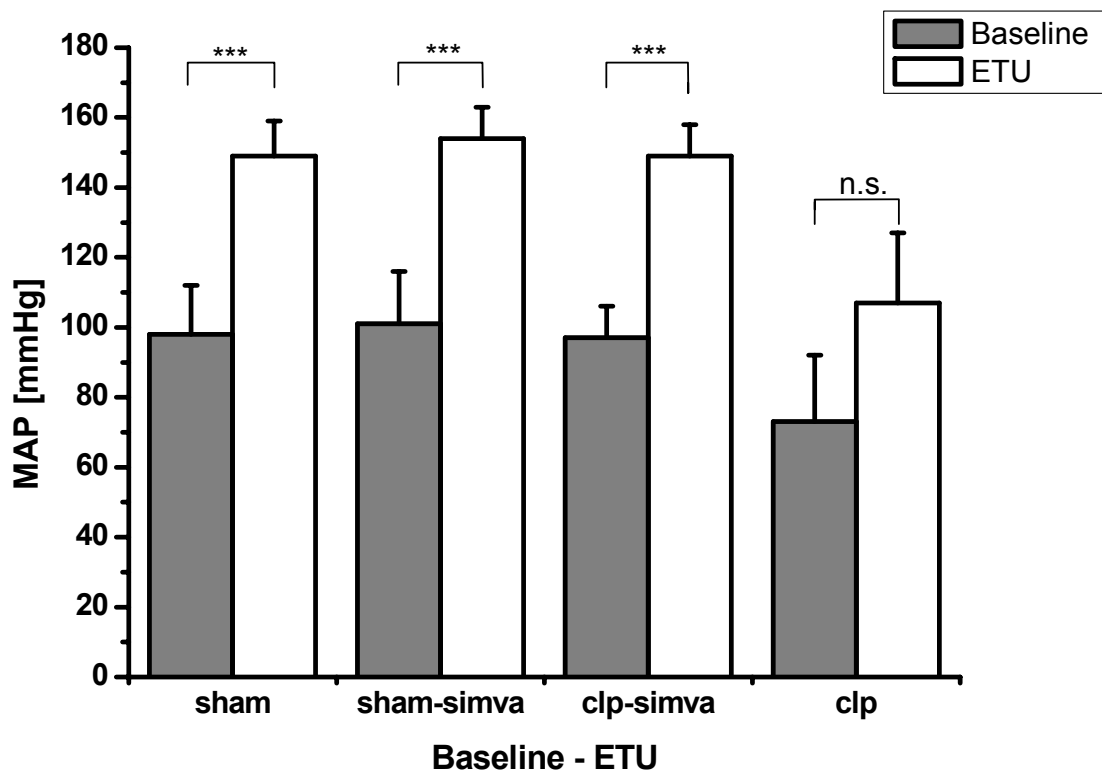


Abb. 3.6. Baseline- Werte im Vergleich zu den Werten nach Gabe von ETU in den vier verschiedenen Versuchstiergruppen: ETU- Gabe führt zu einem Anstieg des MAP in den allen Versuchstiergruppen (clp: * $p < 0,01$; clp-simva, sham-simva und sham: *** $p < 0,005$, $n=12$)

Zusammenfassend zeigen die Versuchsergebnisse aus der invasiven Blutdruckmessung und der Echokardiographieuntersuchung, dass es bei den unbehandelten CLP- Tieren mit Induktion der Sepsis zu einer Reduktion des Herzzeitvolumens und einer Hypotension kam, die sich als refraktär gegenüber der Stimulation mit Dobutamin erwies. Jedoch führte die Gabe von ETU als unspezifischer Inhibitor der NO- Synthase zu einer Steigerung des mittleren arteriellen Drucks, was die Rolle des NO als Mediator der systemischen Vasodilatation in der Pathophysiologie Sepsis widerspiegelt.

Durch Gabe von Simvastatin vor Induktion der Sepsis reagierten die CLP- Tiere auf Dobutamin mit einer Steigerung des Herzzeitvolumens und des mittleren arteriellen Drucks, sie erwiesen sich also nicht als refraktär gegenüber der Stimulation mit einem Katecholamin.

3.5. Hämodynamische Eigenschaften des isolierten Herzens im Langendorff-Modell

3.5.1. LVDP

In der Echokardiographie zeigten die CLP- Mäuse im prä- und postoperativen Vergleich nach Induktion der Sepsis ein signifikant vermindertes Herzzeitvolumen, während hingegen bei den Simvastatin- behandelten Tieren kein signifikanter Unterschied nachzuweisen war. In Übereinstimmung mit diesen Versuchsergebnissen kam es bei den isolierten Herzen der CLP- Mäuse im Rahmen der Untersuchung der kontraktile Funktion des Herzens im Langendorff-Modell zu folgenden Ergebnissen: Der LVDP der isolierten Herzen unbehandelter CLP- Mäuse war mit $\text{LVDP} = 86,7 \pm 14,6 \text{ mmHg}$ (* $p < 0,01$, $n=8$) signifikant vermindert im Vergleich zu Herzen der Sham- operierten Mäuse mit $\text{LVDP} = 110,8 \pm 7,3 \text{ mmHg}$ (sham) und $\text{LVDP} = 112,4 \pm 7,6 \text{ mmHg}$ (sham-simva). Die Herzen der Simvastatin-behandelten CLP- Mäuse wiesen hingegen keine signifikante Verminderung des LVDP auf mit $\text{LVDP} = 111,7 \pm 8,2 \text{ mmHg}$ (Abb. 3.7.).

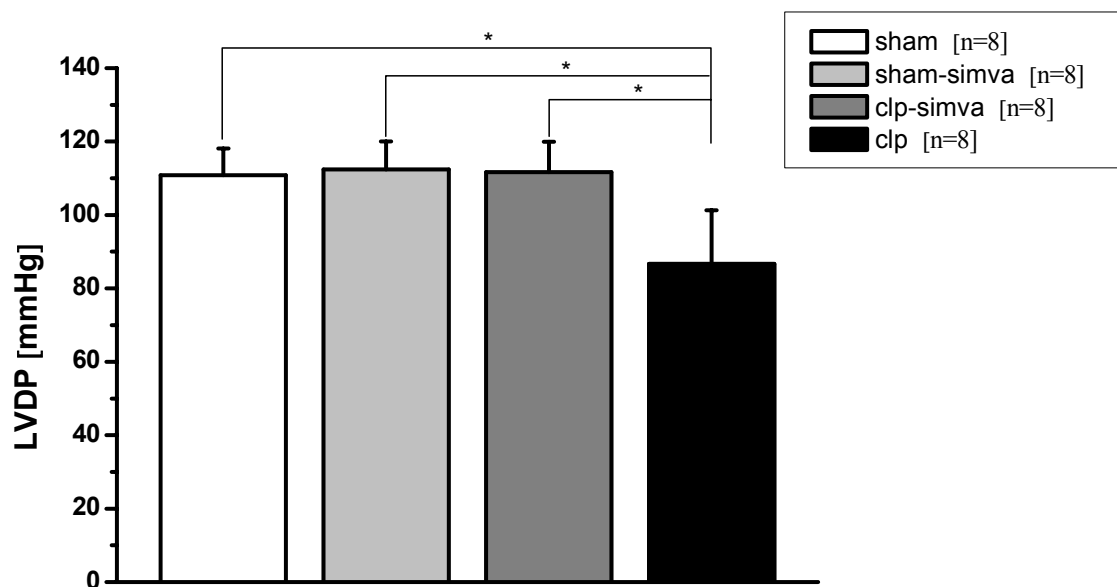


Abb. 3.7. Signifikante Verminderung des LVDP der Herzen der CLP- Tiere (clp: * $p < 0,01$, $n=8$) im Vergleich zu den anderen drei Versuchstiergruppen ($n=8$ pro Gruppe)

3.5.2. dP/dT_{max}

Der dP/dT_{max} entspricht der maximalen Rate des Druckanstiegs während der Kontraktion und spiegelt insofern die kontraktile Funktion des isolierten Herzens wider. Analog den Versuchsergebnissen aus 3.5.1. stellten wir bei den Herzen der unbehandelten CLP- Tiere eine signifikante Verschlechterung der kontraktilen Funktion fest mit einem dP/dT_{max} von 3687 ± 933 mmHg. Im Vergleich zu den Sham-operierten Versuchstiergruppen (sham: $dP/dT_{max} = 4723 \pm 637$ mmHg, sham- simva: $dP/dT_{max} = 4995 \pm 665$ mmHg) entspricht dieser Wert einer Abnahme der kontraktilen Funktion (* $p < 0,01$, $n=8$) um 28%. Bei den Herzen der Simvastatin- behandelten CLP- Mäuse stellte sich keine signifikante Verschlechterung des dP/dT_{max} ein: $dP/dT_{max} = 4845 \pm 665$ mmHg (Abb. 3.8.).

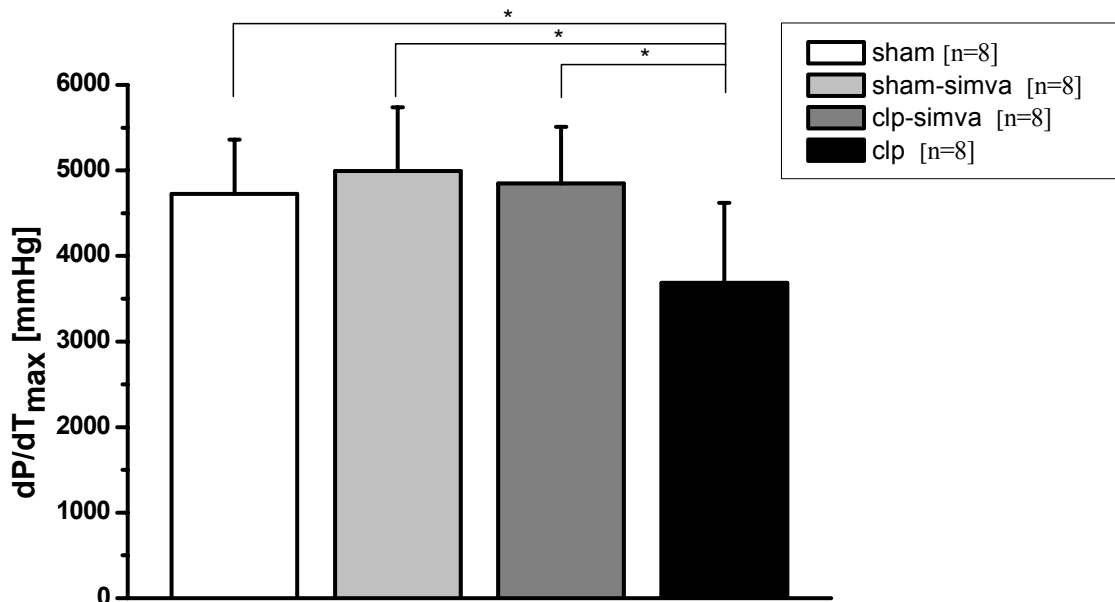


Abb. 3.8.: Darstellung der dP/dT_{max} - Werte mit signifikanter Verminderung des dP/dT_{max} - Wertes der unbehandelten CLP- Tiere (* $p < 0,01$, $n=8$) im Vergleich zu den Werten für die Versuchstiergruppen 1-3

3.5.3. Koronarfluss

Im Rahmen der Untersuchungen der hämodynamischen Parameter am isolierten Herzen im Langendorff- Modell betrachteten wir des Weiteren die prozentuale Änderung des Koronarflusses gegenüber der Baseline nach Applikation von zunächst Bradykinin und anschließend Adenosin. Nach Gabe von Bradykinin nahm bei den Herzen der unbehandelten CLP- Tiere der Koronarfluss deutlich zu mit einer prozentualen Steigerung um 34 ± 8 % gegenüber der Baseline. Im Vergleich dazu erhöhte sich der Koronarfluss bei den unbehandelten Sham- Tieren prozentual nur um 9 ± 3 %. Bei den isolierten Herzen der Simvastatin- behandelten CLP- Tiere stieg der Koronarfluss um 22 ± 6 % an und die Simvastatin- behandelten Sham- Tiere zeigten eine vergleichbare Steigerung des Koronarflusses um 20 ± 5 %. Die Applikation von Bradykinin führte also bei den unbehandelten CLP- Tieren im Vergleich zu den anderen drei Versuchstiergruppen zur stärksten Zunahme des Koronarflusses (clp vs. sham: $p < 0,001$; $n=8$), was durch eine hohe Aktivierung der eNOS im Rahmen der Sepsis mit Vasodilatation der Koronararterien zu erklären ist. Unter Bradykinin kommt es zu einer zusätzlichen Aktivierung der eNOS.

Im Vergleich zu den unbehandelten Sham- Tieren nahm der koronare Fluss bei den Simvastatin- therapierten Tieren stärker zu (clp-simva und sham- simva vs. sham $p < 0,01$; $n=8$). Die Simvastatintherapie führte bei den CLP- Tieren im Vergleich zu den unbehandelten CLP- Tieren zu einer verminderten Stimulation der eNOS, bei den behandelten im Vergleich zu den unbehandelten Sham- Tieren kam es unter Statintherapie zu einer verstärkten eNOS- Stimulation mit einer erhöhten NO- Freisetzung und folgender koronarer Vasodilatation. Die prozentualen Änderungen des koronaren Flusses sind in Abb. 3.9. dargestellt.

Nach Applikation des Vasodilatators Adenosin beobachteten wir im Vergleich zu Bradykinin insgesamt eine stärkere Vasodilatation mit konsekutiver Steigerung des Koronarflusses. Betrachtet man die einzelnen Versuchstiergruppen so verhielten sich die Tendenzen der prozentualen Steigerung gegensinnig im Vergleich zum ersten Versuchsabschnitt:

Im Gegensatz zu den Ergebnissen nach Bradykinin- Gabe zeigten die unbehandelten CLP- Tiere hier im Vergleich zu den anderen drei Versuchstiergruppen die geringste prozentuale Steigerung des koronaren Flusses mit 35 ± 7 % gegenüber der Baseline. Bei den Simvastatin- therapierten CLP-Tieren

lag die Zunahme des koronaren Flusses bei 69 ± 8 % und bei den behandelten Sham-Tieren leicht höher bei 71 ± 7 %. Die Steigerung des koronaren Flusses war bei den unbehandelten Sham-Tieren am deutlichsten mit 81 ± 10 %. Im ersten Versuchsabschnitt war die prozentuale Steigerung des Koronarflusses in dieser Versuchstiergruppe am geringsten ausgeprägt. Insgesamt stieg der koronare Fluss unter Adenosin im Vergleich zu Bradykinin gegenüber der Baseline deutlicher an, was besonders ausgeprägt war in letzteren drei Versuchstiergruppen (sham, sham-simva, clp-simva vs. Baseline: *** $p < 0,005$, $n = 8$). Im Vergleich war die Reaktion auf Adenosin in der unbehandelten CLP- Gruppe geringer (clp vs. Baseline: $P < 0,01$; clp vs. sham: $P < 0,001$; $n = 8$).

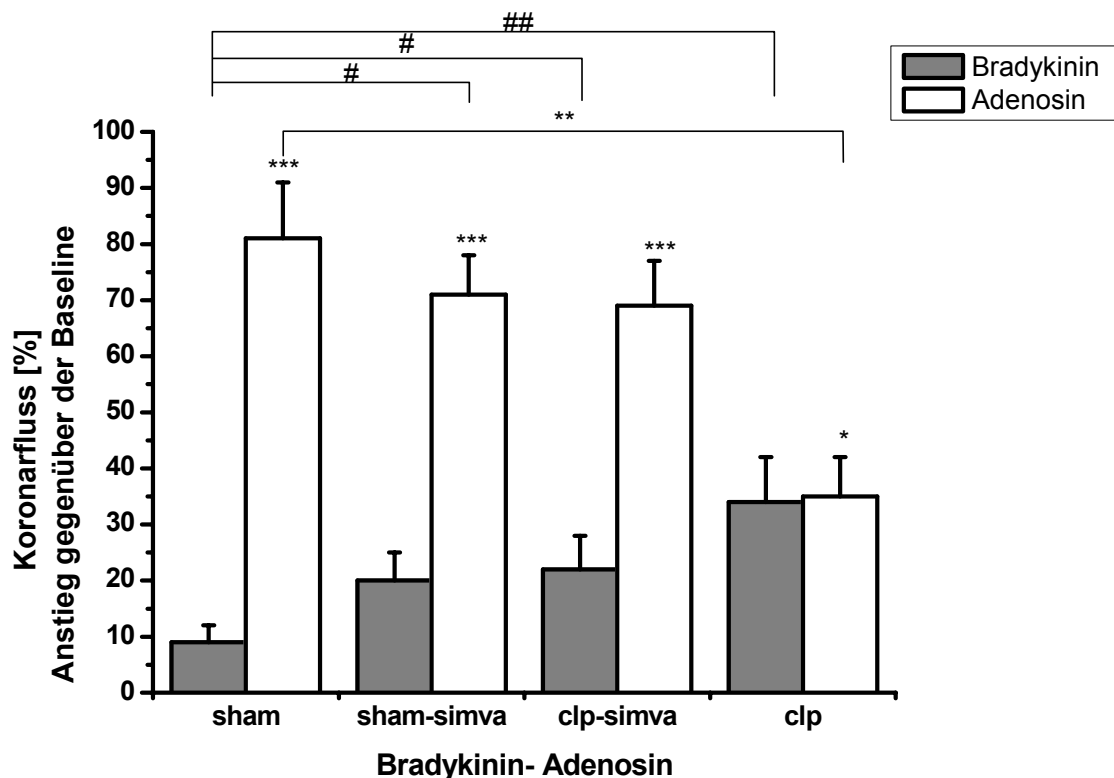


Abb. 3.9. prozentuale Steigerung des Koronarflusses nach Gabe von zunächst Bradykinin und anschließend Adenosin: Bradykinin erhöhte den koronaren Fluss am deutlichsten bei den unbehandelten CLP-Tieren (clp vs. sham ## $p < 0,001$; $n = 8$). Die Simvastatin-therapierten CLP- und Sham-Mäuse reagierten auf das Bradykinin mit einem Anstieg des koronaren Flusses im mittleren Bereich (clp-simva vs. sham: # $p < 0,01$; $n = 8$). Nach Adenosingabe stieg der koronare Fluss in allen vier Versuchstiergruppen, jedoch war die Zunahme des Flusses in der Gruppe der unbehandelten CLP-Tiere (clp vs. Baseline: * $p < 0,01$; clp vs. sham: ** $p < 0,001$; $n = 8$) geringer im Vergleich zu den anderen drei Versuchstiergruppen (clp-simva, sham-simva, sham vs. Baseline: *** $p < 0,005$; $n = 8$). Damit ist eine gegensinnige Tendenz der prozentualen Flussteigerung in den einzelnen Versuchstiergruppen nach Adenosingabe im Vergleich zur Bradykininapplikation zu beobachten.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt eine um das 4-fache verbesserte Überlebensrate einer CLP-induzierten Sepsis nach Gabe des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Simvastatin. Die mediane Überlebenszeit der behandelten CLP-Tiere betrug 108 Stunden im Vergleich zu 28 Stunden in der Gruppe der Placebo-behandelten septischen Tiere. Der dramatischen Überlebensverbesserung liegt eine Stabilisierung der Hämodynamik zugrunde.

4.1. Sepsisinduktion durch CLP: Ein klinisch relevantes Sepsismodell

Zur Sepsisinduktion wählten wir das CLP-Modell, da dieses Modell der Hämodynamik und den metabolischen Veränderungen der humanen Sepsis am ehesten ¹⁰⁹ ähnelt, um ausgehend vom Tiermodell klinisch relevante Aussagen machen zu können. Die Sepsisinduktion mittels CLP ahmt das Krankheitsbild einer perforierten Appendizitis oder Divertikulitis mit konsekutiver diffuser Peritonitis nach ¹¹⁰. Im Vergleich zu Modellen mit Endotoxikosis z.B. der Bolusinjektion von Lipopolysaccharid (LPS) weist das CLP-Modell folgende Vorteile auf: Es handelt sich um ein polymikrobielles Modell, welches grampositive und gramnegative, aerobe und anaerobe Erreger umfasst. Ausgehend von der Darmflora gelangen die mikrobiellen Erreger über die Punktionsstelle in die Peritonealhöhle und führen so eine systemische Infektion und Bakteriämie herbei. Entsprechend konnten wir 20 Stunden nach Sepsisinduktion verschiedene Erreger aus dem Blut septischer Mäuse kultivieren. Die septischen Tiere waren außerdem lethargisch und schwach, zu werten als klinische Zeichen einer systemischen Infektion.

CLP-Modell und LPS-Modell unterscheiden sich bezüglich des Zytokinprofils: Während die freigesetzten Zytokine im CLP-Modell über einen Zeitraum von 8 Stunden ansteigen, wie auch bei septischen Patienten nachgewiesen werden konnte, kommt es im LPS-Modell zu einem massiven Anstieg proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1, die bereits nach 1,5- 4 Stunden einen Peak erreichen ¹¹¹. Gleichzeitig ist nach LPS-Gabe die unmittelbare Entwicklung einer hypodynamen Hämodynamik zu beobachten, die der Pathophysiologie der humanen Sepsis nicht entspricht ^{109,110}. Das CLP-Modell bietet im Vergleich zur LPS-Injektion eine viel komplexere Grundlage mit Aktivierung vieler inflammatorischer Mediatoren, z.B. die

verstärkte Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin zur Leukozytenrekrutierung¹¹². Diese Beobachtungen könnten dazu beitragen, dass Therapieansätze zur Neutralisierung von Entzündungsmediatoren, die im LPS-Modell Erfolg versprochen, in klinischen Studien scheiterten^{11,109}. In der komplexen Pathogenese der Sepsis sind viele zelluläre Prozesse involviert und es werden viele humorale Kaskaden getriggert, so dass die Blockade einer einzelnen Komponente z.B. durch TNF- α -Antagonisten insuffizient erscheint, um diesen Entzündungsprozess signifikant beeinflussen zu können. HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren hingegen setzen durch ihre antiinflammatorischen, immunmodulatorischen, Endothel-protectiven, antithrombotischen, antioxidativen und antiapoptischen Effekte an verschiedenen Komponenten der Pathogenese der Sepsis an. Ein zunehmendes Verständnis dieser Effekte unterstützt die Hypothese, dass Statine zu einer Prognoseverbesserung der Sepsis führen und möglicherweise eine Rolle in der Therapie der Sepsis spielen könnten¹¹³.

4.2. Simvastatin und hämodynamische Stabilisierung durch NO-Modulation

4.2.1. Effekte der Simvastatintherapie auf peripheren Gefäßwiderstand und kardiale Funktion

Wir führten unsere Versuche 20 \pm 2 Stunden nach Sepsisinduktion mittels CLP durch. Als Anästhetikum verwendeten wir Urethan, ein vielfach bei Tierversuchen eingesetztes Anästhetikum, welches nur minimale Auswirkungen auf das autonome und kardiovaskuläre System hat. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung liegt eine hypodynamie Kreislaufsituation vor. So beobachtete Tao et al. 18 Stunden nach Sepsisinduktion mittels CLP eine Abnahme des Schlagvolumens und des Herzzeitvolumens¹¹⁴. Entsprechend zeigten wir in unseren echokardiographischen Untersuchungen bei den unbehandelten septischen Tieren eine Abnahme des Herzzeitvolumens von 1,24 \pm 0,09 ml/min/g auf 0,87 \pm 0,11 ml/min/g (***) p < 0,005; n=12). Zudem wiesen die isolierten Herzen der unbehandelten septischen Mäuse im Vergleich zu den Sham-Tieren eine Abnahme der kardialen Kontraktilität auf. Dies äußerte sich durch Messung der Kontraktilitätsparameter LVDP und dP/dTmax. Das echokardiographisch nachgewiesene reduzierte Herzzeitvolumen und die Abnahme der kardialen Kontraktilität der unbehandelten septischen Tiere im Vergleich zu den Sham-Tieren sprechen für das Vorliegen einer septischen Kardiomyopathie. In

Analogie zu unseren Versuchsergebnissen ist diese gekennzeichnet durch biventrikuläre Dilatation, Abnahme der linksventrikulären Pumpfunktion und der Ejektionsfraktion^{21,24}. Neben der kardialen Dysfunktion trägt eine Abnahme des peripheren Widerstands zur hypodynamen Kreislaufsituation bei. So war der mittlere arterielle Druck der Placebo-behandelten CLP-Tiere im Vergleich zu den Sham-Tieren um 25 ± 6 mmHg ($P < 0,001$; $n=12$) niedriger. Entsprechend unseren Resultaten belegen mittels Einsatz eines Millar-Katheters gewonnene Daten von Hollenberg et al. eine Abnahme des systemischen Gefäßwiderstands und des mittleren arteriellen Drucks 12- 18 Stunden nach CLP-Sepsisinduktion¹¹⁵. Zur Abnahme des peripheren Widerstands und des mittleren arteriellen Drucks im vasodilatatorischen Schock trägt auch eine verminderte Ansprechbarkeit auf endogene und exogene Katecholamine bei²⁴. Die Gabe des β_1 - Rezeptor-Agonisten Dobutamin führte bei den unbehandelten septischen Tieren nicht zu einer Erhöhung des Herzzeitvolumens in der Echokardiographie. Auch in der invasiven arteriellen Blutdruckmessung reagierte diese Versuchstiergruppe im Gegensatz zu den Sham-Tieren nicht auf die Gabe von Dobutamin mit einer signifikanten Zunahme des mittleren arteriellen Drucks. Diese Toleranzentwicklung gegenüber Katecholaminen ist auch in der humanen Sepsis zu beobachten und ein Charakteristikum der hämodynamischen Instabilität im septischen Schock^{24,27,116}.

Im Gegensatz zu den unbehandelten CLP- Mäusen waren die Simvastatintherapierten septischen Mäuse charakterisiert durch eine Stabilisierung der Hämodynamik und Erhaltung der kardialen Funktion. Die gemessenen Werte unterschieden sich nicht signifikant von denen der Sham-operierten Tiere. So hatte die Sepsisinduktion in der Simvastatin-behandelten Versuchstiergruppe keinen Einfluss auf das postoperativ echokardiographisch ermittelte Herzzeitvolumen im Vergleich zur präoperativen Untersuchung. Im isolierten Herzen nach Langendorff zeigte sich keine Abnahme der Kontraktilitätsparameter im Gegensatz zu den unbehandelten septischen Tieren. Auch die im Rahmen einer Sepsis zu erwartende Hypotension stellte sich bei den Simvastatin- behandelten CLP- Tieren nicht ein. Im Unterschied zu den unbehandelten septischen Tieren lag keine Katecholaminresistenz vor. Einer erhaltenen Rezeptorempfindlichkeit entsprechend führte die Gabe von Dobutamin zu einer Steigerung des mittleren arteriellen Drucks und des echokardiographisch ermittelten Herzzeitvolumens.

4.2.2. NO als Mediator vaskulärer Hyporeaktivität und septischer Kardiomyopathie

Die Ergebnisse der invasiven arteriellen Blutdruckmessung zeigten einen erniedrigten mittleren arteriellen Druck der Placebo-behandelten septischen Tiere. Simvastatin-behandelte septische Tiere erreichten hingegen Blutdruckwerte, welche im Bereich der Sham-operierten Tiere lagen. Vor dem Hintergrund, dass im septischen Schock, einhergehend mit kardialer Dysfunktion und Veränderungen des Gefäßtonus, die Balance zwischen vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen Einflüssen gestört ist¹⁷, kommt NO als Vasodilatator eine dominierende Rolle zu^{19,24,28}. Vasorelaxation durch NO wird erreicht über Aktivierung der Guanylatcyclase, cGMP-Generierung und anschließender Dephosphorylierung von Myosin in glatten Gefäßmuskelzellen. Systemische Vasodilatation führt im septischen Schock zur Abnahme des peripheren Widerstands und des mittleren arteriellen Drucks.

Zur näheren Untersuchung der NO-abhängigen Abnahme des peripheren Widerstands applizierten wir in einem weiteren Schritt ETU. ETU ist ein unspezifischer kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase. In allen vier Versuchstiergruppen nahm der mittlere arterielle Druck signifikant zu. Analog unseren Versuchsergebnissen beschrieben Landry et al einen Anstieg des arteriellen Drucks und des systemischen Widerstands nach Inhibition der NO-Synthase im septischen Schock¹¹⁶. Jedoch lag der absolute Wert des mittleren arteriellen Drucks nach NOS Inhibition mittels ETU bei unseren Placebo-behandelten septischen Tieren unter dem der anderen drei Versuchstiergruppen. Insofern spielt NO als Mediator der systemischen Vasodilatation zwar eine wesentliche Rolle. Jedoch kann die Reduktion des peripheren Widerstands nicht allein auf eine vermehrte NO-Produktion zurückgeführt werden. Neben NO sind auch Stoffwechselprodukte wie z.B. Laktat im Rahmen der zunehmenden Azidose von Bedeutung²⁴. Zusätzlich müssen die bei den unbehandelten septischen Tieren im Vergleich zu den anderen Versuchstiergruppen reduzierten Herzzeitvolumina im Rahmen der septischen Kardiomyopathie in Betracht gezogen werden.

Über die vasodilatatorische Funktion hinaus konnte NO als potentieller kardiodepressiver Faktor identifiziert werden^{24,27}. An isolierten Kardiomyozyten von Meerschweinchen³⁰ und bei isolierten Rattenherzen³¹ im Working-Heart- bzw.-Langendorff-Modell beeinträchtigte es die myokardiale Energiegewinnung und wirkte

negativ inotrop. Insofern könnte die von uns beobachtete Abnahme der Kontraktilitätsparameter dP/dT_{max} und LVDP, sowie das echokardiographisch ermittelte reduzierte Herzzeitvolumen der unbehandelten septischen Tiere auf eine vermehrte NO-Freisetzung zurückgeführt werden. Eine vermehrte Freisetzung von NO und nachfolgend des second messengers cGMP führt in Kardiomyozyten zu einer Hemmung des L-Typ- Calcium- Kanals. Darüber vermindert sich der Calcium-Einstrom in die Herzmuskelzellen. Zudem wird via Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase C eine Desensibilisierung der Myofilamente gegenüber Kalzium erreicht. Diese „NO-cGMP-Kaskade“ entspricht der derzeit am meisten favorisierten negativ- inotropen Mediatorokaskade^{24,27}. So war z.B. die NO- vermittelte Reduktion der Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten in Gegenwart des Guanylcyclase-Inhibitors Methylenblau vermindert³⁰. Auch in einer klinischen Studie verbesserte die Infusion von Methylenblau bei septischen Patienten den mittleren arteriellen Blutdruck, das Schlagvolumen und verminderte den Katecholaminbedarf¹¹⁷.

Die Stimulierung der cGMP- sensitiven Phosphodiesterase bewirkt eine verstärkte Degradierung von cAMP und folglich eine Inhibition der mitochondrialen Atmung sowie der ATP-Produktion^{28,32}. Da das Myokard abhängig ist von einer exklusiven, unmittelbaren Energiebereitstellung durch oxidativen mitochondrialen Metabolismus, ist eine Beeinträchtigung der Mitochondrien fatal für die Versorgung der Kardiomyozyten. In Analogie mit unseren Versuchsergebnissen zeigten Kelm et al., dass hohe NO- Konzentrationen signifikant mit einer Verminderung des LVDP und einer Erhöhung des koronaren Flusses einhergehen¹¹⁸. Direkt oder nach Interaktion mit freien Sauerstoffradikalen zu Peroxynitrit führt eine massive NO-Freisetzung zu zelltoxischen Effekten. Peroxynitrit reagiert mit verschiedenen Proteinen des kontraktiven Apparates unter Bildung von Nitrotyrosin¹¹⁹ und ist assoziiert mit Zellmembranschädigung¹²⁰. Insofern induziert NO zelluläre Dysfunktion und Apoptose in Kardiomyozyten^{21,24}.

Neben der kardialen Dysfunktion und der Abnahme des mittleren arteriellen Drucks war die hämodynamische Instabilität der unbehandelten im Gegensatz zu den Simvastatin- behandelten septischen Tieren auch charakterisiert durch eine fehlende Reaktion auf das positiv inotrop wirkende Katecholamin Dobutamin sowohl in den echokardiographischen Untersuchungen als auch bei der invasiven arteriellen

Blutdruckmessung. Im Gefäßbett trägt ein vermindertes Ansprechen auf endo- und exogene Katecholamine im vasodilatatorischen Schock zur Abnahme des peripheren Widerstands²⁴ bei. Insofern ist die fehlende Reaktion auf Dobutamin der unbehandelten CLP-Tiere bedeutsam für die Abnahme des peripheren Widerstands.

Der Katecholaminresistenz liegt wahrscheinlich eine „Downregulation“ der Adrenorezeptoren an den Zellmembranen glatter Muskelzellen zugrunde sowie eine Unterbrechung der Signaltransduktion auf Postrezeptorebene²⁴, wobei NO und saure Metaboliten wesentlich beteiligt sind^{24,26}. So zeigen iNOS –knockout- Mäuse nach LPS-Sepsisinduktion ein verbessertes Ansprechen auf Katecholamine¹²¹ und zudem eine niedrigere Mortalitätsrate. Ursächlich ist neben oben genannter NO-stimulierten Generierung von cGMP ein weiterer Mechanismus: Es konnte festgestellt werden, dass NO und saure Metaboliten wie Laktat Kalium-Kanäle (K_{Ca} und K_{ATP}) aktivieren¹¹⁶ mit nachfolgender Membranhyperpolarisation und Abnahme der Katecholaminwirkung^{122,123}. Im Gegensatz zu den unbehandelten septischen Tieren wiesen die Simvastatin-therapierten septischen Tiere eine erhaltene Empfindlichkeit gegenüber der Stimulation mit Dobutamin auf. Im Einklang mit unseren Versuchsergebnissen konnten Guisti-Paiva et al. zeigen, dass Simvastatin-vorbehandelte Ratten durch eine erhaltene Rezeptorempfindlichkeit für Phenylephrin charakterisiert waren⁸⁹.

Im letzten Versuchsabschnitt verglichen wir den koronaren Fluss am isolierten Herzen nach Langendorff innerhalb der vier Versuchstiergruppen unter konstanten Druckbedingungen (Perfusionsdruck 100 mmHg). Die Ausgangswerte der unbehandelten CLP-Tiere zeigten im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren einen signifikant höheren koronaren Fluss. Dieses ist am ehesten auf eine Steigerung der Koronardurchblutung infolge erhöhter NO-Konzentrationen zurückzuführen. Denn die Untersuchungen des isolierten Herzens nach Langendorff erlauben eine Betrachtung des koronaren Flusses unabhängig von systemischen Einflüssen wie z.B. die Freisetzung von Stoffwechselprodukten in der Peripherie wie Laktat. Im Vergleich zu den unbehandelten septischen Tieren waren die Ausgangswerte des koronaren Flusses der Simvastatin-behandelten septischen Tieren um 33% niedriger. Sie unterschieden sich sogar nicht signifikant von den Ausgangswerten der Sham-operierten Tiere. Zusammen mit den Beobachtungen aus

den anderen Versuchsteilen und der Kenntnis einer dominierenden Rolle von NO als Vasodilatator und Mediator kardialer Dysfunktion lässt sich aus dieser Beobachtung eine möglicherweise NO- modulierende Wirkung des Simvastatins ableiten. In diesem Zusammenhang wiesen Giusti-Paiva et al. eine durch Simvastatin-Behandlung dosisabhängige Reduktion der nach LPS-Gabe erhöhten Plasma-Nitratkonzentration nach ⁸⁹.

4.2.3. Simvastatin beeinflusst NO-Freisetzung durch Modulation der eNOS

Aus den bisherigen Versuchsergebnissen kann eine NO- modulierende Wirkung des Simvastatins vermutet werden, die eine Erklärung für die hämodynamische Stabilität der Simvastatin- behandelten septischen Tiere bietet und somit zur signifikant besseren medianen Überlebenszeit beiträgt. Der Anstieg des mittleren arteriellen Drucks nach Gabe des unspezifischen NOS- Inhibitor ETU lässt keine Differenzierung zu, auf welche NO- Synthase eine massive NO- Freisetzung mit nachfolgender systemischer Vasodilatation und kardialer Dysfunktion zurückzuführen ist. Der um 33% höhere koronare Fluss in der Gruppe der unbehandelten septischen Tiere im Vergleich zu den Simvastatin- vorbehandelten Tieren lässt vermuten, dass die endotheliale NO-Synthase (eNOS) an der NO-Freisetzung unter septischen Bedingungen entscheidend beteiligt sein könnte.

Zur Differenzierung der NO- abhängigen Vasodilatation verglichen wir die Entwicklung des koronaren Flusses in den vier Versuchstiergruppen nach Gabe des Vasodilatators Bradykinin. Bradykinin ist ein proinflammatorischer Mediator und Neuromediator, der über BK2-Rezeptoren die endotheliale NOS aktiviert und über Freisetzung von NO zu koronarer Vasodilatation mit Steigerung des koronaren Flusses führt. Im Vergleich zu den anderen Versuchstiergruppen sprachen die unbehandelten CLP- Tiere am stärksten auf die Stimulation der Vasodilatation durch Bradykinin an. Da der koronare Fluss in dieser Tiergruppe um 33% höher als der der Simvastatin- behandelten septischen Tiere war, lässt sich hieraus ableiten, dass eine ohnehin verstärkte eNOS- Aktivität durch die Gabe von Bradykinin potenziert wurde. Dieses wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die prozentuale Zunahme des koronaren Flusses bei den unbehandelten Sham- Tieren am geringsten ausgeprägt war.

Dass die NO-Freisetzung der endothelialen NO-Synthase an der Vasodilatation unter septischen Bedingungen entscheidend beteiligt zu sein scheint, konnte kürzlich von Connelly et al bestätigt werden. eNOS- knockout- Mäuse wiesen nach LPS- Gabe ein stabileres hämodynamisches Profil auf mit dem Resultat einer verbesserten Prognose der Versuchstiere ¹²⁴. In einer anderen Studie supprimierte eine Inhibition der eNOS-Aktivierung durch Geldanamycin und Redicicol die LPS-induzierte Vasorelaxation ¹²⁵. Insofern könnte die von uns beobachtete Hypotension der unbehandelten CLP- Mäuse in der arteriellen Blutdruckmessung auf eine verstärkte eNOS- Expression zurückzuführen sein.

Auch die kardiale Dysfunktion der unbehandelten septischen Tiere könnte in Zusammenhang mit einer eNOS- vermittelten verstärkten NO-Produktion stehen. So hatten myozytenspezifisch eNOS- überexprimierende transgene Mäuse mit hohen Werten an endogenem Myozyten- abstammenden NO eine reduzierte Calcium-Sensitivität der Myozyten mit Abnahme der myokardialen Kontraktilität ¹²⁶. In einer Studie von Kinugawa et al. verhinderte die Vorbehandlung mit einem Calcium-Chelator zunächst die IL-6- induzierte kardiale Depression. Dieses impliziert eine Beteiligung der Calcium-/ Calmodulin- abhängigen eNOS an kardialer Dysfunktion, da die iNOS Calcium- unabhängig ist. Kinugawa et al. zeigte des Weiteren, dass die IL-6 induzierte Kardiodepression in einem späteren Stadium nicht mehr durch einen Calcium- Chelator geblockt werden kann ¹²⁷. Die von uns beobachtete verstärkte Aktivität der eNOS in der Gruppe der unbehandelten Tiere könnte also auch an der kardialen Dysfunktion und Hypotension dieser Versuchstiergruppe beteiligt sein. Connelly et al. folgerte sogar eine potentielle proinflammatorische Rolle der eNOS, die die iNOS- Expression reguliert ¹²⁴.

Hiervon ausgehend und einer möglicherweise antiinflammatorischen Wirkung von Simvastatin ist bei der Betrachtung des koronaren Flusses der Simvastatin-therapierten Tiere nach Gabe von Bradykinin mit einem prozentual vermindertem Anstieg des koronaren Flusses zu rechnen. Dieses bestätigte sich auch in unseren Versuchsergebnissen, denn der prozentuale Anstieg des koronaren Flusses war nach Bradykingabe bei den Simvastatin- therapierten septischen Mäusen deutlich geringer ausgeprägt als bei den unbehandelten. Interessanterweise bestand zwischen den Simvastatin- therapierten CLP- und Sham-operierten Tieren kein

signifikanter Unterschied. Im Gegensatz hierzu stieg der koronare Fluss nach Bradykinin-Gabe bei den unbehandelten Sham- operierten Tiere am geringsten. Die Versuchsergebnisse lassen insofern darauf schließen, dass zum einen unter Sham-Bedingungen die Gabe von Simvastatin zu einer vermehrten eNOS- Aktivität führte. Zum anderen scheint diese Simvastatin- bedingte vermehrte eNOS-Aktivität unter septischen Bedingungen nicht vorzuliegen.

In Einklang mit der beobachteten vermehrten eNOS- Aktivität nach Simvastatin-Gabe bei den Sham- operierten Tiere steht eine tierexperimentelle Studie an Hunden: Eine kurzzeitige Therapie mit Simvastatin verstärkte dort die NO-abhängige koronare Vasodilatation mit gesteigerter NO-Produktion und verstärkter NO- vermittelter Regulation des myokardialen Sauerstoffverbrauchs in Assoziation mit einem Anstieg der eNOS in aortalen Endothelzellen ¹²⁸.

Laufs et al. demonstrierte für Statine eine vermehrte eNOS- Expression über verschiedene Mechanismen ⁷⁸⁻⁸⁰: Die vermehrte Expression der eNOS durch Statine ist zurückzuführen auf die Inhibition des Mevalonatwegs mit verminderter Geranylgeranylation der RhoA und Verlängerung der eNOS-Halbwertszeit ⁷⁹. Daneben konnte ein weiterer Mechanismus der verstärkten eNOS-Expression und – Aktivierung nachgewiesen werden: Statine aktivieren die Proteinkinase Akt als wichtigen Regulator zellulärer Prozesse einschließlich metabolischer und apoptotischer Prozesse über den Phosphoinositol-3-Kinase abhängigen Weg. Resultat ist eine verstärkte eNOS-Aktivität und Inhibition endothelialer Apoptose ^{82,129}. Aus den dargestellten Mechanismen lassen sich Endothel- protektive und antiapoptotische Wirkungen der Statine ableiten ¹¹³.

Ausgehend von der Erkenntnis einer verstärkten eNOS- Expression durch Statine und einer ohnehin erhöhten NO- Freisetzung unter septischen Bedingungen, hätte man also bei Messung des koronaren Flusses insbesondere nach Applikation von Bradykinin bei den Simvastatin- behandelten CLP- Tieren im Vergleich zu den unbehandelten eine Potenzierung der eNOS- Freisetzung erwarten können mit entsprechender prozentualer Zunahme des Flusses. Der prozentuale Anstieg des koronaren Flusses war nach Bradykiningabe bei den Simvastatin- therapierten septischen Mäusen jedoch deutlich geringer ausgeprägt als bei den unbehandelten.

Diese zunächst unerwarteten Ergebnisse spiegeln auch die kontroverse Diskussion der Rolle der eNOS während einer Sepsis in der Literatur wider: Trotz Hinweise einer potentiellen proinflammatorischen Rolle der eNOS ist dieses Isoenzym andererseits ein wichtiger Regulator des Gefäßtonus, des Blutflusses, der Gefäßpermeabilität, der Leukozyten- Endothel- Interaktionen und der Plättchenadhäsion, so dass protektive Funktionen im Hinblick auf die Endothelfunktion anzunehmen sind. Zudem zeigen verschiedene Studien, dass die konstitutive NOS unter physiologischen Bedingungen beteiligt ist an der funktionellen Regulation der kardialen Kontraktilität^{21,130}. Es wird vermutet, dass die eNOS- Expression unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine und zytotoxischer Effekte von NO und reaktiver Sauerstoffradikale mit Endothelzellschädigung im weiteren Verlauf abnimmt¹⁵. Gleichzeitig nimmt die endotheliale Dysfunktion zu und schließlich folgt der programmierte Zelltod mit fortschreitender Organschädigung als wichtiger pathogenetischer Bestandteil der Sepsis und des drohenden Multiorganversagens¹¹³.

Eine reduzierte endotheliale NO- Bioverfügbarkeit könnte insofern mit einer weiteren Verschlechterung der kardialen Dysfunktion einhergehen. So zeigten eNOS-knockout- Mäuse eine höhere Mortalität einer experimentell provozierten ischämischen Herzinsuffizienz mit Zunahme des enddiastolischen Durchmesser und enddiastolischen Volumens bei eingeschränkter Kontraktilität¹³¹. Eine Inhibition der NO-Synthese resultierte in einem erhöhten Sauerstoffverbrauch des Herzens bei vergleichbarer Herzarbeit¹³². Die Gabe des eNOS- Inhibitors L-NAME verursachte eine Abnahme des Herzzeitvolumens durch Reduktion des myokardialen Blutflusses²².

Ausgehend von einer verstärkten eNOS- Aktivität durch Simvastatin- Gabe könnte eine vermehrte NO- Bioverfügbarkeit insofern zu einer hämodynamischen Stabilisierung und Erhaltung der kardialen Funktion der Simvastatin-behandelten septischen Tiere beitragen. So hatten eNOS- überexprimierende transgene Mäuse eine verbesserte linksventrikuläre Funktion und eine bessere Überlebensprognose¹³³. NO- Bioverfügbarkeit freigesetzt durch die eNOS nimmt also eine Funktion bezüglich der Regulation des myokardialen Blutflusses und Erhöhung des Sauerstoffangebotes ein mit Auswirkungen auf die kardiale Funktion. Interessanterweise zeigten unsere Versuchsergebnisse jedoch bei den Simvastatin-

therapierten septischen Tieren im Gegensatz zu den Sham- operierten Tieren einen deutlich geringer ausgeprägten prozentualen Anstieg des koronaren Flusses nach Bradykiningabe. Zwischen den Simvastatin- therapierten CLP- und Sham- Tieren bestand sogar kein signifikanter Unterschied.

Eine Erklärung hierfür könnte folgende sein: Statine wirken über eine posttranslationale Regulierung der eNOS mit Stabilisierung der eNOS-mRNA⁷⁹. Eine Überexpression der eNOS im Rahmen der Sepsis, der Bradykininstimulation und der Vorbehandlung durch Simvastatin könnte ein negatives Feedback haben mit Abnahme der eNOS- mRNA. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine tierexperimentelle Studie, bei der Hunde CAS-936 erhielten, ein NO- freisetzendes Agens. Es konnte hier eine selektive Reduktion der eNOS- mRNA beobachtet werden konnte¹³⁴. Eine andere Erklärung ist, dass die Wirkung von Bradykinin via BK2-Rezeptoren durch Statine vermindert wird. Es konnte gezeigt werden, dass Bradykinin als proinflammatorischer Mediator über Aktivierung des Ras/Raf-1/ERK- Weges zu einer Aktivierung von NFκB und der COX-2 führt. Über den Mevalonatweg inhibieren Statine die Prenylation kleiner GTP- bindender Proteine und könnten so die Wirkung von Bradykinin abschwächen¹³⁵.

In diesem Zusammenhang übt die Gabe von Simvastatin bei den septischen Tieren möglicherweise über eine negative Feedbackregelung einen Schutzmechanismus vor übermäßiger eNOS- Aktivierung und NO- Freisetzung aus. Dieses wird unterstützt durch Beobachtungen des koronaren Flusses nach Applikation von Adenosin. Nach Gabe dieses NO- unabhängigen Vasodilatators zeigte sich im Vergleich zur Bradykininapplikation ein umgekehrter Effekt: Die größte prozentuale Steigerung des koronaren Flusses war hier in der Gruppe der unbehandelten Sham- operierten Tiere zu beobachten, während die prozentuale Steigerung in der Gruppe der unbehandelten CLP-Tiere am geringsten ausgeprägt war. Dies lässt darauf schließen, dass der koronare Fluss dieser Tiere NO-bedingt schon so erhöht ist, dass gegenüber den Ausgangsbedingungen eine Vasodilatation mittels des NO- unabhängigen Vasodilatators Adenosin im Unterschied zu den anderen Versuchstiergruppen nicht möglich war. Dies ist ein Hinweis auf eine voll ausgeschöpfte koronare Flussreserve, die unter physiologischen Bedingungen über Steigerung der myokardialen Perfusion einen erhöhten Sauerstoffbedarf des Herzens kompensiert. Im Gegensatz zu den unbehandelten septischen Tieren war

bei den unbehandelten Sham- Tieren die deutlichste prozentuale Zunahme des Flusses nach Adenosin-Gabe zu beobachten. In dieser Versuchstiergruppe bestand also vermutlich unter Ausgangsbedingungen eine niedrige NO- Freisetzung, so dass nach Gabe des NO-unabhängigen Vasodilatators ein deutlicher prozentualer Anstieg des koronaren Flusses möglich war. Vergleicht man die unbehandelten septischen Tiere mit den Simvastatin- behandelten septischen Tieren, so zeigte letztere Versuchstiergruppe eine deutlich stärkere prozentuale Steigerung des koronaren Flusses als Zeichen einer noch vorhandenen koronaren Flussreserve. Betrachtet man die beiden Sham- operierten Tiergruppen, so war der prozentuale Anstieg des koronaren Flusses nach Gabe von Adenosin bei den Simvastatin- therapierten Sham- operierten Tieren geringer ausgeprägt als bei den unbehandelten Sham- Tieren. Diese Beobachtung unterstützt die bereits diskutierte Hypothese einer eNOS- stimulierenden Wirkung des Simvastatins unter Sham- Bedingungen, die zu einem erhöhten Koronarfluss unter Ausgangsbedingungen führt hinweisend auf eine vermehrte eNOS Aktivität (s.o.), so dass diese Versuchstiergruppe nicht so ausgeprägt auf den NO- unabhängigen Vasodilatator Adenosin reagierte.

Zum anderen könnten Statine direkt die Adenosinwirkung modulieren: Adenosin wirkt an Endothelzellen und glatten Muskelzellen über A₂-Rezeptoren. Vom Endothel unabhängig wird via cAMP-Erhöhung die Aktivierung von K_{Ca} und K_{ATP}-Kanälen erreicht, die nachfolgende Hyperpolarisation der Zellmembran inhibiert intrazellulären Calcium-Einstrom mit konsekutiver Vasodilatation^{106,107}. Neben diesem klassischen Endothel- abhängigen Weg konnte auch ein vom Endothel- unabhängiger Weg der Adenosin- vermittelten Vasodilatation identifiziert werden. Akute Aktivierung der A_{2a}- Rezeptoren in Endothelzellen stimuliert L-Arginin-Transport und cGMP-Akkumulation unabhängig von zytosolischen Veränderungen bezüglich Ca²⁺, pH, cAMP, aber unter Einbezug von Proteinkinasen und der p42/p44MAPK- Phosphorylierung. Die resultierende NO-Freisetzung führt zu einer Membranhypolarisation¹³⁶. Für Statine konnte eine vom Mevalonatweg unabhängige Suppression der p42/44 MAPK (mitogen- activated protein kinase) nachgewiesen werden¹³⁷. In diesem Zusammenhang ist die in unseren Versuchen zu erkennende, etwas geringere prozentuale Steigerung des koronaren Flusses der Simvastatin-therapierten Tiere gegenüber den unbehandelten Sham-Tieren erklärbar.

4.2.4. NO-Freisetzung und Modulation der iNOS durch Simvastatin

In der Literatur finden sich Hinweise, dass die massive Freisetzung von NO unter septischen Bedingungen assoziiert ist mit Induktion der iNOS. So erbrachte Rees et al. den Nachweis der induzierbaren Ca^{2+} - unabhängigen NOS (iNOS) mit maximalen Plasmaspiegeln 12 Stunden nach Endotoxingabe, begleitet von erhöhten Nitrit-/Nitratplasmaspiegeln über denselben Zeitraum ¹³⁸. Die bei Wildtypen und eNOS- knockout- Mäusen zu beobachtende massive NO- Freisetzung nach LPS- Gabe blieb bei iNOS- knockout- Mäusen aus. Gleichzeitig war die NO- Freisetzung bei eNOS- knockout- Mäusen assoziiert mit einer Abnahme des mittleren arteriellen Drucks ¹³⁹, die bei iNOS-knockout-Mäusen nicht vorlag ^{138,140}. Im Gegenzug zur verstärkten iNOS-Expression und konsekutiver Freisetzung von NO mit Hypotension, resultiert aus einer Inhibition der NO-Synthase ein Anstieg des arteriellen Drucks und des systemischen Widerstands im septischen Schock ¹¹⁶. Insofern könnte der von uns beobachtete Anstieg des mittleren arteriellen Drucks nach Gabe des unspezifischen NOS- Inhibitors ETU insbesondere auf eine Inhibition der iNOS zurückzuführen sein.

Versuche an iNOS-knockout-Mäusen zeigten nach Endotoxin- Gabe im Vergleich zu Wildtypen eine verminderte Ausprägung kardialer Dysfunktion ¹⁴¹. Die kardiale Dysfunktion der unbehandelten septischen Tiere könnte insofern durch eine verstärkte iNOS- Expression bedingt sein. Bestätigt wird diese Vermutung dadurch, dass eine frühzeitige nach drei Stunden stattfindende pharmakologische Inhibition der iNOS durch L-N6-(1-iminoethyl)lysine Hydrochlorid (L-NIL) die Endotoxin-induzierte Beeinträchtigung der systolischen und diastolischen Funktion des Herzens verhinderte ¹⁴¹. Auch zeigen iNOS –knockout- Mäuse nach LPS- oder CLP- Sepsisinduktion ein verbessertes Ansprechen auf Katecholamine mit entsprechender verbesserter systolischer Funktion ^{120,142}. Jedoch zeichnen sich iNOS- knockout- Mäuse wider Erwarten nicht durch eine Prognoseverbesserung bei Sepsis aus (s.u.).

Die Expression der iNOS in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Zellen des Endokards und Makrophagen wird stimuliert durch Entero- und Endotoxine, Arachidonsäurederivate und proinflammatorische Zytokine ^{17,23}. Die Aktivierung der iNOS umfasst die Transkription der iNOS-mRNA, die getriggert wird durch bindende Transkriptionsfaktoren einschließlich des Faktors NF κ B und des

Transkriptionsaktivators STAT-1 in der Promotorregion des iNOS-Gens¹⁵. Eine Inhibition von NFκB verhinderte im Tierversuch eine LPS- induzierte Vasodilatation und geht gleichzeitig mit einer reduzierten Expression der iNOS einher¹⁴³. Wagner et al. demonstrierten eine verminderte Translokation von NFκB und STAT-1 in Endothelzellen nach Gabe von Atorvastatin¹⁴⁴. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Statine über Inhibition des Mevalonatwegs zu einer Downregulation der iNOS-Expression führen als Konsequenz einer verminderten Translokation von NFκB⁸⁹. Umgekehrt war nach Gabe von Mevalonat und Farnesylpyrophosphat kein inhibitorischer Effekt von Statinen auf die LPS- und Zytokin-induzierte Expression der iNOS zu beobachten⁷⁷. Wagner et al. hingegen folgerten eine vom Mevalonatweg unabhängige Blockade der iNOS-Expression durch HMG-CoA-Reduktase- Hemmer vergleichbar der direkten Blockade von LFA-1¹⁴⁴. Der zugrunde liegende Mechanismus einer verminderten iNOS-Expression durch Statine ist noch nicht abschließend geklärt.

Demzufolge könnte die hämodynamische Stabilisierung der Simvastatin-behandelten septischen Tiere iNOS-modulierend bedingt sein. Jedoch wird die Rolle der iNOS in der Literatur kontrovers diskutiert. Geht man von einer dominierenden Rolle der massiven NO- Freisetzung durch die iNOS und der hieraus resultierenden hämodynamischen Beeinträchtigung aus, so müsste eine Inhibition der iNOS-Aktivierung zu einer Prognoseverbesserung beitragen. In einem LPS- Sepsismodell von Laubach et al. bot jedoch das Fehlen der iNOS bei iNOS- knockout- Mäusen keinen Schutz gegen Mortalität der Versuchstiere¹⁴⁵. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die zytotoxischen Effekte des NO eine Rolle bei der Immunabwehr spielen. Zum Beispiel konnten iNOS-knockout-Mäuse eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* nicht eindämmen¹⁴⁶. Takano et al¹⁴⁷ und Kanno et al¹⁴⁸ demonstrierten zudem kardioprotektive Effekte der iNOS. iNOS- überexprimierende transgene Mäuse wiesen keine Zeichen einer schweren Herzinsuffizienz auf¹⁴⁹. Da Mortalität einer Endotoxin- induzierten myokardialen Dysfunktion durch selektive iNOS-Inhibitoren oder von iNOS-knockout- Mäusen nicht signifikant gesenkt werden kann¹⁴¹ und Zytokine unabhängig von iNOS- Induktion zu kardialer Dysfunktion führen¹⁵⁰, ist die iNOS nur als ein Kofaktor eines komplexen Pathomechanismus mit resultierender kardialer Dysfunktion zu sehen. In diesem Zusammenhang ist die Stabilisierung der Hämodynamik der Simvastatin- behandelten CLP- Mäuse

insbesondere auf einer iNOS-Modulation beruhend in Frage zu stellen. Interessanterweise demonstrierten Ikeda et al., dass Statine zwar die iNOS- Aktivität am Gefäßsystem vermindern, es aber in Zytokin- stimulierten Kardiomyozyten sogar zu einer vermehrten Expression der iNOS durch lipophile Statine kommt ¹⁵¹.

Zusammenfassend zeigen unsere Versuchsergebnisse eine Simvastatin- abhängige Modulation von NO als wichtigen Mediator hämodynamischer Instabilität unter septischen Bedingungen. Unter Betrachtung der Isoenzyme der NO-Synthase könnte die eNOS im komplexen Pathomechanismus des septischen Schocks als proinflammatorischer Mediator die iNOS- Freisetzung regulieren, möglicherweise ist eine iNOS- de novo- Expression aber auch ein Kompensationsmechanismus einer verminderten eNOS- Funktion. Durch Gabe von Bradykinin verdeutlichten wir eine eNOS- modulierende Eigenschaft des Simvastatin. Daneben gibt es Hinweise für eine Modulation der iNOS. Insgesamt führte die Beeinflussung der NO-Freisetzung durch Simvastatin zu einer Stabilisierung der Hämodynamik einschließlich der kardialen Funktion und demzufolge zu einer verbesserten medianen Überlebenszeit der Simvastatin- therapierten CLP- Tiere.

4.3. Stabilisierung der Hämodynamik und Prognoseverbesserung durch NO-unabhängige pleiotrope Effekte des Simvastatins

4.3.1. Simvastatin beeinträchtigt Leukozyten-Endothel-Interaktionen

Neben einer Beeinflussung der endothelialen NO- Freisetzung durch Simvastatin konnte unsere Arbeitsgruppe einen weiteren interessanten Ansatzpunkt der Simvastatinwirkung erarbeiten. Leukozyten- Endothel- Interaktionen sind ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese der Sepsis. Durch diese Interaktion kommt es zur Abwanderung von Leukozyten in inflammatorisches Gewebe, wo sie über die Freisetzung granulärer Enzyme und reaktiver Sauerstoffspezies das Gewebe schädigen. Der Adhäsionsprozess wird beeinflusst durch eine Vielzahl von Molekülen wie Selektine, Chemokine z.B. MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), IL-8 und RANTES (Regulated upon Activation, Normally T-cell Expressed and Secreted), ICAM (intercellular adhesion molecule), VCAM (vascular cell adhesion molecule). Zudem ist die Expression von β 2-Integrinen (CD11/CD18) auf der Zelloberfläche von Monozyten beteiligt. Zu β 2-Integrinen gehören das Lymphozytenfunktions-assoziierte Antigen-1 (LFA-1; CD11a/CD18) und der Makrophagen-Rezeptor-1 (MAC-1; CD11b/CD18).

Zur Untersuchung von Leukozyten- Endothel- Interaktionen wurden Monozyten aus dem Blut der vier Versuchstiergruppen isoliert und die Adhäsion an Zytokin-stimulierte Endothelzellen der Maus unter physiologischen Flussbedingungen betrachtet. Im Vergleich zu Simvastatin- behandelten zeigten unbehandelte CLP-Tiere eine signifikant höhere Adhäsion der Monozyten an Endothelzellen. Um den zugrunde liegenden Mechanismus der Abnahme der Monozyten- Endothel- Adhäsion näher zu erörtern, wurden Monozyten, Endothelzellen und ein Gemisch aus Monozyten und Endothelzellen jeweils für 30 Minuten bzw. 24 Stunden mit Simvastatin inkubiert mit anschließender Überprüfung der Adhäsion. Nach 30-minütiger Vorbehandlung der Zellen ergab sich eine signifikante Abnahme der Adhäsion, welche durch Hinzufügen von Mevalonat nicht reversibel war. Dieses impliziert eine vom Mevalonatweg unabhängige Beeinflussung der Leukozyten-Endothel- Interaktion durch Simvastatin ¹⁵². So konnte eine direkte selektive Blockade des Moleküls LFA-1 (Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen-1) ^{70,86} nachgewiesen werden. Das Integrin LFA-1 ist außerdem involviert in effektive T-Zell-

Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen⁸⁶. Nach 24-stündiger Vorbehandlung der Zellgruppen mit Simvastatin war die beobachtete Abnahme der Adhäsion durch Mevalonatgabe im Vergleich zur kurzen Inkubationszeit nur partiell reversibel. Dieses weist auf eine teilweise vom Mevalonatweg abhängige Interaktion von Simvastatin hin. Über den Mevalonatweg inhibieren Statine kleine GTP-bindende Proteine, die an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sind und die Akkumulation von NFκB fördern. NFκB stimuliert im Zellkern die Transkription von Genen, deren Produkte für proinflammatorische Mechanismen verantwortlich sind. Im Zusammenhang mit Leukozyten- Endothel- Interaktionen bewirkte z. B. Lovastatin über Inhibition des Mevalonatweges eine verminderte Expression von CD11b und CD-11b abhängiger Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen⁸⁷. Weitere Beispiele sind die Inhibition der Produktion und Expression von Chemokinen wie MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), IL-8 und RANTES (Regulated upon Activation, Normally T-cell Expressed and Secreted)^{84,85,153} oder eine verminderte Expression des ICAM-1 durch ein Einfluss von Statinen¹⁵⁴.

In diesem Zusammenhang soll noch einmal auf die in unseren Versuchsergebnissen gezeigte eNOS- Modulation der Simvastatin- behandelten Versuchstiergruppen hingewiesen werden. Vermehrte eNOS- Expression durch Statine erfolgt unter anderem via post-translationaler Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase/ Proteinkinase unabhängig vom Mevalonatweg (siehe oben). Durch vermehrte eNOS- Expression erhöht sich die endotheliale NO- Bioverfügbarkeit mit Verbesserung der Endothelfunktion. Zudem wies Stalker nach, dass eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit zu einer 50%igen Reduktion der P-Selektin-Expression führt. Dieses Phänomen fehlte bei eNOS- Knockout-Mäusen, was die Bedeutung der eNOS bezüglich Leukozyten- Endothel- Interaktionen verdeutlicht¹⁵⁵.

Im septischen Schock ist die Verschlechterung der kapillaren Perfusion u.a. ein Resultat von Leukozyten- Endothel- Interaktionen und endothelialer Dysfunktion. Perfusionsheterogenität auf der Ebene der Mikrostrombahn mit Gebieten der Hyperperfusion und No-Flow- Regionen tragen zu lokalen Organperfusionsstörungen und Schock- bedingter Organdysfunktion z.B. septischer Kardiomyopathie bei. Reaburn et al zeigten, dass im Rahmen der proinflammatorischen Antwort auf eine Sepsisinduktion über TNF-α die Expression von Adhäsionsmolekülen auf kardialen

Endothelzellen und Kardiomyozyten mit zunehmender kardialer Dysfunktion gefördert wurde ¹⁵⁶. Die von unserer Arbeitsgruppe nachgewiesene Abnahme der Leukozyten- Endothel- Interaktionen durch Vorbehandlung mit Simvastatin trägt insofern zur Stabilisierung der Hämodynamik einschließlich der kardialen Funktion der Simvastatin- behandelten CLP- Tiere bei.

4.3.2. Antioxidative, antithrombotische und immunmodulatorische Effekte von HMG-CoA-Reduktase- Inhibitoren

In der Literatur finden sich weitere Hinweise für pleiotrope Effekte der Statine, die zur verbesserten Hämodynamik der Simvastatin- therapierten septischen Mäuse und demzufolge auch der signifikant besseren Überlebensrate beitragen könnten. Ein Beispiel ist die verminderte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF α unter Simvastatintherapie. Statine inhibieren die Aktivierung und Translokation von NF- κ B in den Zellkern vermutlich via verstärkter Expression von I- κ B ⁵⁵. NF- κ B fördert die Expression von Genen, deren Produkte proinflammatorische Mediatoren sind wie TNF α . Die lokale TNF- α - Konzentration scheint ein wichtiger Faktor der Progression myokardialer Dysfunktion zu sein, es induziert sowohl die Suppression der myokardialen Kontraktilität als auch die Induktion myokardialer Apoptose ¹⁵⁷. Eine Inhibition der NF κ B-Aktivierung verhinderte die myokardiale TNF- α - Produktion und verbesserte die kardiale Funktion von Ratten ¹⁵⁸. I κ B α - überexprimierende transgene Mäusen wiesen keine Endotoxin- induzierte myokardiale Dysfunktion auf ¹⁵⁹.

Des Weiteren sind anti- oxidative Effekte der Statine zu nennen. Die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist unter septischen Bedingungen von pathophysiologischer Bedeutung, da freie Sauerstoffradikale mit verschiedenen biologischen Substraten reagieren und konsekutiv zu Gewebe- und Organschädigung führen. Durch Inhibition der Rac-Isoprenylation reduzieren Statine die NAD(P)H-Oxidase und demzufolge die ROS-Produktion ⁵⁵ in Monozyten, neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen und Zellen des Myokards ^{82,160}. Zum Beispiel reduzierte in einer klinischen Studie eine orale Statintherapie die Rac1 Funktion im Herzen ¹⁶¹. Gleichzeitig verbesserte eine kurzzeitige Simvastatintherapie bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie die linksventrikuläre Ejektionsfraktion. Plasmakonzentrationen von TNF- α , IL-6 und BNP waren signifikant vermindert ¹⁶².

Da nachgewiesen werden konnte, dass sich das Ausmaß des oxidativen Stresses auf die Morbidität und Mortalität einer Sepsis auswirkt ¹⁶⁰, könnte der antioxidative Effekt von Statinen entscheidend zur Prognoseverbesserung der Simvastatintherapierten septischen Mäuse beitragen.

Antithrombotische Effekte der Statine vermindern Sepsis-induzierte Koagulopathie, die durch Mikrothrombenbildung und Mikrozirkulationsstörungen zu Gewebehypoxie und Organschäden führt. Statine setzen an verschiedenen Stellen der Gerinnungskaskade an und reduzieren so die prokoagulatorische Aktivität unter septischen Bedingungen: In diesem Zusammenhang ist die Statin-vermittelte verstärkte Expression der eNOS von Bedeutung mit Inhibition der Plättchenaggregation ^{57,58} und zusätzlich eine reduzierte Produktion von Thromboxan A2 ⁵⁸. Statine erhöhen die Expression und Aktivität des Thrombomodulins ¹⁶³ und stimulieren die Fibrinolyse durch Regulation von t-PA und PAI-1 ¹⁶⁴.

Darüber hinaus wurden immunmodulatorische Eigenschaften der Statine nachgewiesen, die sich sowohl auf Antigen-präsentierende Zellen als auch auf T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung beziehen ⁵⁸. Beispiele sind Unterdrückung von Proliferation und Aktivierung natürlicher Killerzellen ¹⁶⁵, Inhibition der Makrophagenaktivierung ⁶⁷ und Induktion von Apoptose in LPS-aktivierten Makrophagen ¹⁶⁶. Statine reduzieren die MHC-II-Expression auf Endothelzellen und Monozyten ^{75,76}. Zudem beeinflussen sie die Differenzierung von Th0-Zellen zu Th1-Zellen und konsekutiv die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine ^{58,167,168}. Im Gegenzug wird die Differenzierung zu Th-2-Zellen mit Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine gefördert. Antiinflammatorische Effekte der Statine werden auch vermittelt durch die Unterdrückung der Ausschüttung von Akut-Phase-Proteinen wie CRP ^{68,69}, welche an weiterer Aktivierung proinflammatorischer Mechanismen wie Aktivierung des Komplementsystems, vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, Suppression der eNOS und Induktion des Plasminogenaktivator-Inhibitors-1 (PAI-1) beteiligt sind ⁵⁸.

4.4. Prävention und Prognoseverbesserung einer Sepsis durch HMG-CoA-Reduktase- Inhibitoren

Zusammenfassend beeinflussen Statine durch anti-inflammatorische, immunmodulierende, antioxidative, antithrombotische, Endothel- protektive Effekte und Erhöhung der NO- Bioverfügbarkeit entscheidende Schritte der Pathogenese der Sepsis. Im Rahmen der Vielzahl der pleiotropen Effekte zeigte unsere Arbeitsgruppe die Modulation der NO- Freisetzung als wichtigen Mediator der pathologischen Hämodynamik und die Beeinflussung von Leukozyten- Endothel- Interaktionen, eine bedeutende antiinflammatorische Eigenschaft von Statinen im Rahmen der schweren Sepsis und des septischen Schocks. Insgesamt führte die Vorbehandlung mit Simvastatin zu einer signifikanten Verbesserung der Hämodynamik, was sich in der deutlichen Prognoseverbesserung der therapierten septischen Versuchstiere niederschlug mit einer um das 4-fache verbesserten medianen Überlebenszeit. Die von uns beobachtete signifikant verbesserte Mortalitätsrate Simvastatin-behandelter Tiere gegenüber unbehandelten konnte kürzlich bestätigt werden durch eine tierexperimentelle Studie an Mäusen mit Gabe von Simvastatin an drei aufeinander folgenden Tagen vor Sepsisinduktion mittels CLP. Gleichzeitig zeigte sich bei den Simvastatin- therapierten Tieren dieser Studie eine Verbesserung der Nierenfunktion mit positiver Auswirkung auf das sepsis- induzierte akute Nierenversagen. Akutes Nierenversagen kommt bei etwa 50% Patienten im septischen Schock vor und ist mit einer hohen Mortalität verbunden. Die Resultate dieser Studie wurden auf die systemischen antiinflammatorischen Effekte der Statine zurückgeführt, aber auch auf direkte vaskuläre Effekte der Statine im Bereich der Nierengefäße unter anderem über vermehrte Expression der eNOS ⁸⁸.

In einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe beobachteten wir eine signifikant verbesserte Mortalitätsrate Statin- behandelter septischer Mäuse durch intraperitoneale Applikation verschiedener Statine wie Atorvastatin, Pravastatin und Simvastatin 6 Stunden nach Sepsisinduktion mittels CLP ¹⁵². Die Steigerung der medianen Überlebensrate um > 60% der behandelten versus unbehandelten Tiere war jedoch nicht so ausgeprägt im Vergleich zu der Zunahme der Überlebensrate um das 4-fache in der vorliegenden Arbeit. Diese Resultate bestätigen zum einen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und lassen einen Gruppeneffekt der HMG-CoA-Reduktase- Hemmer erkennen. Gleichzeitig lassen sie auch vermuten, dass

pleiotrope Effekte der Statine zeitabhängig entfaltet werden. Für das Hitzeschockprotein HO-1 konnte z.B. nachgewiesen werden, dass Simvastatin und Lovastatin HO-1 mRNA-Spiegel zeit- und konzentrationsabhängig erhöhen¹⁶⁹. Das Hitzeschockprotein HO-1 ist an der Vermittlung antiinflammatorischer, zytoprotektiver und antioxidativer Effekte der Statine beteiligt.

Neben tierexperimentellen Studien brachten auch klinische Studien Hinweise für eine Prognoseverbesserung schwerer Infektionen. Mortensen et al demonstrierte, dass die Einnahme von Statinen vor Krankenhausaufenthalt mit einer Verbesserung der 30-Tage-Mortalität von Patienten mit einer Pneumonie einhergeht¹⁷⁰. Thomsen et al. stellte unter Statintherapie eine Reduktion der 180-Tage-Mortalität einer Bakteriämie fest (8,4% vs. 17,5%)¹⁷¹. Auch retrospektive Studien von Liappis et al¹⁷² und Kruger et al¹⁷³ beobachteten eine verminderte Mortalität von Patienten mit Bakteriämie. Almog et al konnte in einer prospektiven Kohortenstudie nachweisen, dass eine vorherige Statintherapie assoziiert ist mit einer verminderten Inzidenz der Entwicklung einer schweren Sepsis und einer konsekutiv notwendig werdenden intensivmedizinischen Versorgung¹⁷⁴. Letztere Erkenntnisse konnten durch eine kürzlich veröffentlichte klinische Kohortenstudie, welche 69168 Patienten einschloss, bestätigt werden. Der Einsatz von Statinen bei atherosklerotischen Patienten war verbunden mit einer signifikanten Risikoreduktion der Entwicklung einer Sepsis, einschließlich einer schweren Sepsis¹⁷⁵.

Insofern ist festzustellen, dass die in der Therapie von Hyperlipidämien und der koronaren Herzkrankheit etablierten HMG-CoA-Reduktase-Hemmer wie Simvastatin zur Prävention und Therapie einer humanen Sepsis beitragen könnten. Die bisherige Studienlage bringt jedoch keinen präzisen Aufschluss. Um die Bedeutung einer präventiven Rolle von Statinen näher zu erläutern, sind große, Placebo-kontrollierte randomisierte Patientenstudien notwendig. Gleiches gilt für die Bedeutung eines therapeutischen Potentials von Statinen. Hierfür sind Studien in Bezug auf die Dosierung und den zeitlichen Zusammenhang erforderlich. Bei Applikation von Statinen sollte zudem das Auftreten von Statin-assoziierten Nebenwirkungen wie z.B. Myo- und Neuropathie sorgfältig beobachtet werden. Um Patienten mit einem höheren Infektionsrisiko zukünftig besser identifizieren zu

können, sollten außerdem sensitive Variablen wie Biomarker oder genetische Marker entwickelt werden¹⁷⁶.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Sepsis stellt eine der häufigsten Todesursachen von Patienten auf Intensivstationen dar. Trotz des inzwischen fortgeschrittenen Verständnisses der komplexen Pathogenese mit Aktivierung multipler zellulärer und humoraler Prozesse ist die Therapie dieses Krankheitsbildes schwierig. Jüngere Ansätze in der medikamentösen Therapie, wie niedrig dosierte Kortikosteroide und aktiviertes Protein C, haben zwar zu einer Reduktion der Mortalität geführt, letztere verbleibt aber mit 30 bis 50 % für die schwere Sepsis auf einem sehr hohen Niveau. Klinische und experimentelle Studien zeigen für HMG-CoA-Reduktase- Inhibitoren neben ihrer lipidsenkenden Wirkung pleiotrope Eigenschaften, die antiinflammatorische, immunmodulatorischen, Endothel-protectiven, antithrombotischen, antioxidativen, antiapoptotischen Effekte umfassen und so die komplexe Pathogenese der Sepsis beeinflussen könnten.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Simvastatin auf das Überleben und hämodynamische Parameter im murinen Sepsismodell. Dazu wurde nach intraperitonealer Simvastatingabe eine Sepsis durch Coecumligatur und Punktion (CLP) induziert. Dieses polymikrobielle Modell der Sepsisinduktion zeigt eine sehr weit gehende Übereinstimmung mit der humanen Sepsis hinsichtlich Hämodynamik und metabolischen Veränderungen. Mit dem Nachweis einer Bakteriämie belegen unsere Daten typische Kriterien einer Sepsis, wie sie auch bei septischen Patienten beobachtet werden. Zur Untersuchung hämodynamischer Parameter erfolgten *in vivo* mittels Echokardiographie und intraarterieller Blutdruckmessung. Ergänzend führten wir Untersuchungen am isolierten Herzen nach Langendorff durch.

Die Induktion einer Sepsis mittels CLP führte bei den Placebo- behandelten septischen Tieren zu einer Letalität von 100% mit einer medianen Überlebenszeit von 28 Stunden versus 108 Stunden in der Gruppe der Simvastatin- behandelten Tiere. Echokardiographisch zeigten die Placebo- behandelten septischen Tiere eine hypodynamie Kreislaufsituation, welche sich analog der humanen Sepsis im Anschluss an eine hyperdynamie Phase entwickelte. Im Gegensatz zu den Simvastatin- behandelten wiesen die Placebo- behandelten septischen Tiere in der

arteriellen Blutdruckmessung eine signifikante Abnahme des peripheren Widerstands auf. Nach Applikation des unspezifischen NOS- Inhibitors ETU stieg der mittlere arterielle Druck in allen Versuchstiergruppen als Hinweis auf eine massive Freisetzung des Vasodilatators NO als Ursache der septischen Hypotension. Im Sinne einer Sepsis bedingten Katecholaminresistenz hatte die Gabe von Dobutamin weder einen Anstieg des mittleren arteriellen Drucks noch eine Steigerung des echokardiographisch gemessenen Herzzeitvolumens zur Folge. Im Rahmen dieser akuten septischen Kardiomyopathie zeigte sich eine ausgeprägte kardiale Dysfunktion einhergehend mit einer Reduktion der linksventrikulären Kontraktilität des isolierten Herzens nach Langendorff. Bei den Simvastatin- therapierten septischen Tieren trat keine Katecholaminresistenz auf. Diese Tiergruppe wies im Vergleich zu den Sham-Tieren weder eine Kardiodepression noch eine signifikante Hypotension auf. Als zugrunde liegenden Mechanismus hämodynamischer Stabilisierung könnte eine NO- Modulation durch Simvastatin eine entscheidende Rolle spielen. Bei den Placebo- behandelten septischen Tieren potenzierte die Applikation von Bradykinin die ohnehin erhöhte NO-Freisetzung durch übersteigerte Aktivität der eNOS mit Ausschöpfung der koronaren Flussreserve. Die Simvastatin- Behandlung trug zumindest teilweise zu einer Erhaltung der koronaren Flussreserve bei als Hinweis auf eine eNOS- Modulation. Neben einer eNOS-Modulation durch Statine ergeben sich auch Hinweise auf eine iNOS- Modulation. Darüber hinaus beeinflussen Statine Leukozyten-Endothel- Interaktionen. Neben immunmodulatorischen und antiinflammatorischen Eigenschaften der Statine setzen antithrombotische, antioxidative und antiapoptotische Effekten an verschiedenen Komponenten der komplexen Pathogenese der Sepsis an.

Die vorliegende Arbeit zeigt nach Applikation von Simvastatin eine hämodynamische Stabilisierung und erhaltene kardiale Funktion, die zu einer signifikant verbesserten Überlebenszeit im murinen Sepsismodell führen. Zunehmende Erkenntnisse über die pleiotropen Effekte der Statine und erste retrospektive klinische Studien sowie prospektive Observationsstudien legen nahe, dass Statinen möglicherweise eine Rolle in der Prävention und Therapie der Sepsis zukommen könnte. Zur weiteren Beurteilung dieses potentiell neuen Therapienansatzes für Statine bedarf es Placebo- kontrollierter, randomisierter Patientenstudien.

6. Literaturverzeichnis

1. Parrillo J.E., Parker M.M., Natanson C., Suffredini A.F., Danner R.L., Cunnion R.E., Ognibene F.P. Septic shock in Humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med.* 1990;113:227-242.
2. Danai P., Martin G.S. Epidemiology of sepsis: recent advances. *Curr Infect Dis Rep.* 2005;7:329-334.
3. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *The Lancet.* 2005;365:63-78.
4. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003;348:1546.
5. Angus D.C., Wax R.S. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med.* 2001;29:S109-S116.
6. Bone R.C., Fisher C.J., Clemmer T.P., Slotman G.I., Metz C.A., Balk R.A. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. *Crit Care Med.* 1989;17:389-393.
7. Tsiotou A.G., Sakorafas G.H., Anagnostopoulos G., Bramis J. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci. Monit.* 2005;11(3):RA76-85.
8. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RMH, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest.* 1992;101:1644-1655.
9. Thomas L. Germs. *N Engl J Med.* 1972;287:553-555.
10. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002;420:885-891.
11. Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *N Engl J Med.* 2003;348:138-150.
12. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 1996;383:787-793.
13. Heidecke CD, Hensler T, Weighardt H, Zantl N, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B. Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection. *The American Journal of Surgery.* 1999;178:288-292.
14. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. The enigma of sepsis. *J Clin Invest.* 2003;112:460-467.
15. Chandra A., Enkhbaatar P., Nakano Y., Traber L.D., Traber D.L. Sepsis: emerging role of nitric oxide and selectins. *Clinics.* 2006;61:71-76.
16. Riedemann NC, Guo R, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med.* 2003;9:517-524.

17. Feihl F, Waeber B, Liaudet L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? *Pharmacology & Therapeutics*. 2001;91:179-213.
18. Strand O.A., Leone A., Giercksky K.E., Kirkeboen K.A. Nitric oxide indices in human septic shock. *Crit Care Med*. 2000;28:2779-2785.
19. Clancy R.M., Leszczynska - Piziak J., Abramson S.B. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest*. 1992;90:1116-1121.
20. Crane BR, Arvai AS, Gachhui R, Wu C, Ghosh DK, Getzoff ED, Stuehr DJ, Tainer JA. The Structure of Nitric Oxide Synthase Oxygenase Domain and Inhibitor Complexes. *Science*. 1997;278:425-431.
21. Belcher E, Mitchell J, Evans T. Myocardial dysfunction in sepsis: no role for NO? *Heart*. 2002;87:507-509.
22. Thiemermann C. Nitric oxide and septic shock. *General Pharmacology: The Vascular System*. 1997;29:159-166.
23. Price S, Anning PB, Mitchell JA, Evans TW. Myocardial dysfunction in sepsis: mechanisms and therapeutic implications. *European Heart Journal*. 1999;20:715-724.
24. Janssens U. Septic cardiovascular diseases. *Dtsch Med Wochenschr*. 2003;128:803-809.
25. Macarthur H, Mattammal MB, Westfall TC. A New Perspective on the Inhibitory Role of Nitric Oxide in Sympathetic Neurotransmission. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995;216:686-692.
26. Tsuneyoshi I., Kanmura Y., Yoshimura N. Nitric oxide as a mediator of reduced arterial responsiveness in septic patients. *Crit Care Med*. 1996;24:1083-1086.
27. Müller-Werdan U. Akute septische Kardiomyopathie. *Der Internist*. 1998;V39:467-478.
28. Vincent JL, Zhang H., Szabo C., Preiser J.C. Effects of Nitric Oxide in Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1781-1785.β
29. Carreras MC, Franco MC, Peralta JG, Poderoso JJ. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 2004;25:125-139.
30. Brady AJ, Warren JB, Poole-Wilson PA, Williams TJ, Harding SE. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1993;265:H176-H182.

31. Sun X, Wei S, Szabo C, Dusting GJ. Depression of the inotropic action of isoprenaline by nitric oxide synthase induction in rat isolated hearts. *European Journal of Pharmacology*. 1997;320:29-35.
32. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *The Lancet*. 2002;360:219-223.
33. Zappellini A., Moreno Jr.H., Antunes E., de Nucci G. Dissociation between the increase in systemic vascular resistance induced by acute nitric oxide synthesis inhibition and the decrease in cardiac output in anesthetized dogs. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997;29:45-48.
34. Kojda G, Kottenberg K, Noack E. Inhibition of nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase induces cardiodepressive effects in normal rat hearts. *Eur J Pharmacol*. 1997;334:181-190.
35. Muller-Strahl G, Kottenberg K, Zimmer HG, Noack E, Kojda G. Inhibition of nitric oxide synthase augments the positive inotropic effect of nitric oxide donors in the rat heart. *J Physiol (Lond)*. 2000;522:311-320.
36. Dellinger R.P., Carlet J.M., Masur H., Gerlach H., Calandra T., Cohen J., Gea-Banacloche J., Keh D., Marshall J.C., Parker M.M., Ramsay G., Zimmerman J.L., Vincent J.-L., Levy M.M. Surviving sepsis campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 2004;32:858-873.
37. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M, the Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group. Early Goal-Directed Therapy in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med*. 2001;345:1368-1377.
38. Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R. Intensive Insulin Therapy in Critically Ill Patients. *N Engl J Med*. 2001;345:1359-1367.
39. Bennett IL. The effectiveness of hydrocortisone in the management of severe infection. *JAMA* 1963;183, 462-465.
40. Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *New England Journal of Medicine*. 1987;317:653-658.
41. Cronin L, Cook DJ, Carlet J, Heyland DK, King D, Lansang MA, Fisher CJ Jr. Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med*. 1995;23[8], 1430-1439.
42. Fisher CJ, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, Abraham E, Schein RMH, Benjamin E, The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group.

- Treatment of Septic Shock with the Tumor Necrosis Factor Receptor:Fc Fusion Protein. *N Engl J Med.* 1996;334:1697-1702.
43. Reinhart K, Karzai W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Crit Care Med* 2001;29: S121-S125.
 44. Zeni F, Freeman B.F., Natanson C. Antiinflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. *Crit Care Med*;1997;25[8], 1095-1100.
 45. Annane D. Corticosteroids for septic shock. *Crit Care Med.* 2001;29:S117-S120.
 46. Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, Capellier G, Cohen Y, Azoulay E, Troche G, Chaumet-Riffaut P, Bellissant E. Effect of Treatment With Low Doses of Hydrocortisone and Fludrocortisone on Mortality in Patients With Septic Shock. *JAMA* 2002;288:862-871.
 47. Shenker Y., Skatrud JB. Adrenal Insufficiency in Critically Ill Patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1520-1523.
 48. Matthay MA. Severe sepsis - a new treatment with both anticoagulant and antiinflammatory properties. *N. Engl. J. Med.* 2001;344: 759-762. 2001.
 49. Warren HS, Suffredini AF, Eichacker PQ, Munford RS. Risks and benefits of activated protein C treatment for severe sepsis. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347, 1027-1030.
 50. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene Expression Profile of Antithrombotic Protein C Defines New Mechanisms Modulating Inflammation and Apoptosis. *J Biol Chem.* 2001;276:11199-11203.
 51. Siegel JP. Assessing the use of activated protein C in the treatment of severe sepsis. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347: 1030-1034.
 52. Czermak BJ, Sarma V, Pierson CL, Warner RL, Huber-Lang M, Bless NM, Schmal H, Friedl HP, Ward PA. Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nat.Med.*1999; 5: 788-792.
 53. Riedemann NC, Guo RF, Laudes IJ, Keller K, Sarma VJ, Padgaonkar V, Zetoune FS, Ward PA. C5a receptor and thymocyte apoptosis in sepsis. *FASEB J.* 2002;02-0033fje.
 54. Bouchon A., Facchetti F., Weigand M.A., Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature.* 2001;410:1103-1107.
 55. Jain M.K., Ridker P.M. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:977-987.

56. Vaughan CJ, Gotto AM. Update on statins: 2003. *Circulation*. 2004;110:886-892.
57. Werner N NGLU. Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Res Cardiol*. 2002;97:105-116.
58. Liao J.K., Laufs U. Pleiotropic Effects of Statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:89-118.
59. Maron D.J., Fazio S., Linton M.F. Current perspectives on statins. *Circulation*. 2000;101:207-213.
60. Vaughan CJ, Antonio M, Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;35:1-10.
61. Heart Protection Study Collaborative G. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20[punctuation space]536 high-risk individuals: a randomised placebocontrolled trial. *The Lancet*. 2002;360:7-22.
62. Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *The Lancet*. 2003;361:1149-1158.
63. Bonetti PO, Wilson SH, Rodriguez-Porcel M, Holmes J, Lerman LO, Lerman A. Simvastatin preserves myocardial perfusion and coronary microvascular permeability in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;40:546-554.
64. Williams DVM JK, Sukhova PhD GK, Herrington MD MHS, Libby MD P. Pravastatin Has Cholesterol-Lowering Independent Effects on the Artery Wall of Atherosclerotic Monkeys. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998;31:684-691.
65. Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M, Spiekermann S, Kirchhoff N, Schulz S, Manes C, Fischer D, de Groot K, Fliser D, Fauler G, Marz W, Drexler H. Simvastatin Versus Ezetimibe: Pleiotropic and Lipid-Lowering Effects on Endothelial Function in Humans. *Circulation*. 2005;111:2356-2363.
66. Wenke K, Meiser B, Thiery J, Nagel D, von Scheidt W, Steinbeck G, Seidel D, Reichart B. Simvastatin Reduces Graft Vessel Disease and Mortality After Heart Transplantation : A Four-Year Randomized Trial. *Circulation*. 1997;96:1398-1402.
67. Paumelle R., Blanquart C., Briand O., Barbier O., Duhem C., Woerly G., Percevault F., Fruchart J.-C., Dombrowicz D., Glineur C., Staels B. Acute Antiinflammatory Properties of Statins Involve Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha via Inhibition of the Protein Kinase C Signaling Pathway. *Circ Res*. 2006;98:361-369.

68. Ansell B.J., Watson K.E., Weiss R.E., Fonarow G.C. hsCRP and HDL effects of statins trial (CHEST): rapid effect of statin therapy on C-reactive protein and high-density lipoprotein levels A clinical investigation. *Heart Dis.* 2003;5:2-7.
69. Kleemann R, Verschuren L, de Rooij BJ, Lindeman J, de Maat MM, Szalai AJ, Princen HM, Kooistra T. Evidence for anti-inflammatory activity of statins and PPAR{alpha}-activators in human C-reactive protein transgenic mice in vivo and in cultured human hepatocytes in vitro. *Blood.* 2004;2003-2011.
70. Weitz-Schmidt G. Statins as anti-inflammatory agents. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2002;23:482-487.
71. Kwak B., Mach F. Statins inhibit leucocyte recruitment. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21:1256-58.
72. Pruefer D., Scalia R., Lefer A.M. Simvastatin Inhibits Leukocyte-Endothelial Cell Interactions and Protects Against Inflammatory Processes in Normocholesterolemic Rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2894-2900.
73. Pruefer D, Makowski J, Schnell M, Buerke U, Dahm M, Oelert H, Sibelius U, Grandel U, Grimminger F, Seeger W, Meyer J, Darius H, Buerke M. Simvastatin inhibits inflammatory properties of Staphylococcus aureus alpha toxin. *Circulation.* 2002;15:2104-2110.
74. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin Treatment Increases Collagen Content and Decreases Lipid Content, Inflammation, Metalloproteinases, and Cell Death in Human Carotid Plaques : Implications for Plaque Stabilization. *Circulation.* 2001;103:926-933.
75. Kwak B., Mulhaupt F., Veillard N., Pelli G., Mach F. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits IFN-gamma induced MHC class II expression in human vascular endothelial cells. *Swiss Med Wkly.* 2001;131:41-46.
76. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat med.* 2000;6:1399-1402.
77. Pahan K., Sheikh F.G., Namboodiri A.M., Singh I. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest.* 1997;100:2671-2679.
78. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation.* 1998;97:1129-1135.
79. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase mRNA Stability by Rho GTPase. *J Biol Chem.* 1998;273:24266-24271.
80. Laufs U, Fata VL, Liao JK. Inhibition of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA Reductase Blocks Hypoxia-mediated Down-regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *J Biol Chem.* 1997;272:31725-31729.

81. Undas A, Brummel KE, Musial J, Mann KG, Szczeklik A. Simvastatin Depresses Blood Clotting by Inhibiting Activation of Prothrombin, Factor V, and Factor XIII and by Enhancing Factor Va Inactivation. *Circulation*. 2001;103:2248-2253.
82. Endres M., Laufs U. Effects of Statins on Endothelium and Signaling Mechanisms. *Stroke*. 2004;35:2708-2711.
83. Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M, Mundt S, Hassing H, Patel S, Rosa R, Hermanowski-Vosatka A, Wang PR, Zhang D, Peterson L, Detmers PA, Chao YS, Wright SD. Simvastatin Has Anti-Inflammatory and Antiatherosclerotic Activities Independent of Plasma Cholesterol Lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:115.
84. Romano M, Diomede L, Sironi M, Massimiliano L, Sottocorno M, Polentarutti N, Guglielmotti A, Albani D, Bruno A, Fruscella P, Salmona M, Vecchi A, Pinza M, Mantovani A. Inhibition of Monocyte Chemotactic Protein-1 Synthesis by Statins. *Lab Invest*. 2000;80:1095-1100.
85. Rezaie-Majd A, Prager GW, Bucek RA, Schernthaner GH, Maca T, Kress HG, Valent P, Binder BR, Minar E, Baghestanian M. Simvastatin reduces the expression of adhesion molecules in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 1[23(3)]: 397-403.
86. Weitz- Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, Cottens S, Takada Y, Hommel U. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med*. 2001;7:687-692.
87. Weber C, Erl W, Weber KSC, Weber PC. HMG-CoA Reductase Inhibitors Decrease CD11b Expression and CD11b-Dependent Adhesion of Monocytes to Endothelium and Reduce Increased Adhesiveness of Monocytes Isolated From Patients With Hypercholesterolemia. *Journal of the American College of Cardiology*. 1997;30:1212-1217.
88. Yasuda H, Yuen PST, Hu X, Zhou H, Star RA. Simvastatin improves sepsis-induced mortality and acute kidney injury via renal vascular effects. *Kidney Int*. 2006;69:1535-1542.
89. Giusti-Paiva A., Martinez M.R., Felix J.V.C., da Rocha M.J.A., Carnio E.C., Elias L.L.K., Antunes-Rodrigues J. Simvastatin decreases nitric oxide overproduction and reverts the impaired vascular responsiveness induced by endotoxic shock in rats. *Shock*. 2004;21:271-275.
90. Karow, Lang. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 2001: 53.
91. Ruffolo R.R.Jr. The pharmacology of dobutamine. *Am J Med Sci*. 1987;294:244-248.
92. Emanuelli C, Maestri R, Corradi D, Marchione R, Minasi A, Tozzi MG, Salis MB, Straino S, Capogrossi MC, Olivetti G, Madeddu P. Dilated and Failing

- Cardiomyopathy in Bradykinin B2 Receptor Knockout Mice. *Circulation*. 1999;100:2359-2365.
93. Garvey EP, Oplinger JA, Tanoury GJ, Sherman PA, Fowler M, Marshall S, Harmon MF, Paith JE, Furfine ES. Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Inhibition by non-amino acid isothioureas. *J Biol Chem*. 1994;269:26669-26676.
94. Janssen BJA, De Celle T, Debets JJM, Brouns AE, Callahan MF, Smith TL. Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H1618-H1624.
95. Hara K., Harris R.A. The Anesthetic Mechanism of Urethane: The Effect on Neurotransmitter-Gated Ion Channels. *Anesth Analg*. 2000;94:313-318.
96. Erhardt W., Hebestedt A., Aschenbrenner G., Pichotka B., Blumel G. A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate). *Res Rep Health Eff Inst*. 1984;184:159-169.
97. Yang XP, Liu YH, Rhaleb NE, Kurihara N, Kim HE, Carretero OA. Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1999;277:H1967-H1974.
98. Zimmer HG. The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. *News Physiol Sci*. 1998;13:203-210.
99. Linz W., Wiemer G., Scholkens B.A. Beneficial effects of bradykinin on myocardial energy metabolism and infarct size. *Am J Cardiol*. 1997;80:118A-123A.
100. Cheng C.P., Onishi K., Ohte N., Suzuki M., Little W.C. Functional effects of endogenous bradykinin in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:1679-1686.
101. Shryock J.C., Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol*. 1997;79:2-10.
102. Mubagwa K, Flameng W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: An updated overview. *Cardiovascular Research*. 2001;52:25-39.
103. Belardinelli L, Shryock JC, Song Y, Wang D, Srinivas M. Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes. *FASEB J*. 1995;9:359-365.
104. Henry P, Demolombe S, Puceat M, Escande D. Adenosine A1 Stimulation Activates δ -Protein Kinase C in Rat Ventricular Myocytes. *CIRCULATION RESEARCH*. 1996;78:161-165.
105. Hutchinson S.A., Scammells P.J. A1 Adenosine Receptor Agonists: Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential. *Curr Pharm Des*. 2004;10:2021-2039.

106. Cabell F, Weiss DS, Price JM. Inhibition of adenosine-induced coronary vasodilation by block of large-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1994;267:H1455-H1460.
107. Kleppisch T, Nelson MT. Adenosine Activates ATP-Sensitive Potassium Channels in Arterial Myocytes via A2 Receptors and cAMP-Dependent Protein Kinase. *PNAS*. 1995;92:12441-12445.
108. Abebe W, Hussain T, Olanrewaju H, Mustafa SJ. Role of nitric oxide in adenosine receptor-mediated relaxation of porcine coronary artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1995;269:H1672-H1678.
109. Buras J.A., Holzmann B., Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discovery*. 2005;4:854-865.
110. Wichterman K.A., Baue A.E, Chaudry I.H. Sepsis and septic shock - a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*. 1980;29:189-201.
111. Remick D.G., Newcomb D.E., Bolgos G.L., Call D.R. Comparison of the Mortality and Inflammatory response of two Models of Sepsis: Lipopolysaccharide vs. Cecal Ligation and Puncture. *Shock*. 2000;13:110-116.
112. Bauer P, Lush CW, Kvietys PR, Russell JM, Granger DN. Role of endotoxin in the expression of endothelial selectins after cecal ligation and perforation. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 2000;278:R1140-R1147.
113. Almog Y. Statins, Inflammation, and Sepsis: Hypothesis. *Chest*. 2003;124:740-743.
114. Tao W., Deyo D.J., Traber D.L., Johnston W.E., Sherwood E.R. Hemodynamic and cardiac contractile function during sepsis caused by cecal ligation and puncture in mice. *Shock* 2004; 21(1):31-37
115. Hollenberg S.M., Dumasius A., Easington C., Collila S.A., Neumann A., Parillo J.E. Characterization of a hyperdynamic murine model of resuscitated sepsis using echocardiography. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:891-895
116. Landry DW, Oliver JA. The Pathogenesis of Vasodilatory Shock. *N Engl J Med*. 2001;345:588-595.
117. Kirov M.Y., Evgenov O.V., Evgenov N.V., Egorina E.M., Sovershaev M.A., Sveinbjornsson B., Nedashkovsky E.V., Bjertanaes L.J. Infusion of methylene blue in human septic shock: a pilot, randomized, controlled study. *Crit Care Med*. 2001;29:1860-1867.
118. Kelm M, Schafer S, Dahmann R, Dolu B, Perings S, Decking UK, Schrader J, Strauer BE. Nitric oxide induced contractile dysfunction is related to a reduction in myocardial energy generation. *Cardiovasc Res*. 1997;36:185-194.
119. Xia Y, Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *PNAS*. 1997;94:6954-6958.

120. Di Napoli P, Antonio Taccardi A, Grilli A, Spina R, Felaco M, Barsotti A, De Caterina R. Simvastatin reduces reperfusion injury by modulating nitric oxide synthase expression: an ex vivo study in isolated working rat hearts. *Cardiovascular Research*. 2001;51:283-293.
121. Boyle WA, III, Parvathaneni LS, Bourlier V, Sauter C, Laubach VE, Cobb JP. iNOS Gene Expression Modulates Microvascular Responsiveness in Endotoxin-Challenged Mice. *Circ. Res.* 2000;87:18e-24.
122. Chen S.-J., Wu C, Yen M.-H. Role of nitric oxide and K⁺-channels in vascular hyporeactivity induced by endotoxin. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1999;V359:493-499.
123. Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C, Bolotina VM. Mechanism of Nitric Oxide-Induced Vasodilatation : Refilling of Intracellular Stores by Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase and Inhibition of Store-Operated Ca²⁺ Influx. *Circ. Res.* 1999;84:210-219.
124. Connelly L, Madhani M, Hobbs AJ. Resistance to Endotoxic Shock in Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS) Knock-out Mice: A pro-inflammatory role for eNOS-derived NO in vivo. *J Biol Chem*. 2005;280:10040-10046.
125. Vo PA, Lad B, Tomlinson JAP, Francis S, Ahluwalia A. Autoregulatory Role of Endothelium-derived Nitric Oxide (NO) on Lipopolysaccharide-induced Vascular Inducible NO Synthase Expression and Function. *J Biol Chem*. 2005;280:7236-7243.
126. Brunner F, Andrew P, Wolkart G, Zechner R, Mayer B. Myocardial Contractile Function and Heart Rate in Mice With Myocyte-Specific Overexpression of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation*. 2001;104:3097-3102.
127. Kinugawa K., Takahashi T., Kohmoto O., Yao A., Aoyagi T., Momomura S., Hirata Y., Serizawa T. Nitric oxide-mediated effects of interleukin-6 on [Ca²⁺]_i and cell contraction in cultured chick ventricular myocytes. *Circ Res*. 1994;75:285-295.
128. Mital S, Zhang X, Zhao G, Bernstein RD, Smith CJ, Fulton DL, Sessa WC, Liao JK, Hintze TH. Simvastatin upregulates coronary vascular endothelial nitric oxide production in conscious dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H2649-H2657.
129. Lefer DJ. Statins as Potent Antiinflammatory Drugs. *Circulation* 2002; 106[16]: 2041-2042.
130. Court O., Parrillo J.E., Kumar A. Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit Care* 2002; 6[6]: 500-508. 2
131. Scherrer-Crosbie M, Ullrich R, Bloch KD, Nakajima H, Nasser B, Aretz HT, Lindsey ML, Vancon AC, Huang PL, Lee RT, Zapol WM, Picard MH. Endothelial Nitric Oxide Synthase Limits Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction in Mice. *Circulation*. 2001;104:1286-1291.

132. Bernstein RD, Ochoa FY, Xu X, Forfia P, Shen W, Thompson CI, Hintze TH. Function and production of nitric oxide in the coronary circulation of the conscious dog during exercise. *Circ Res*. 1996;79:840-848.
133. Jones SP, Greer JJM, van Haperen R, Duncker DJ, de Crom R, Lefer DJ. Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:4891-4896.
134. Zhao G, Shen W, Xu X, Ochoa M, Bernstein R, Hintze TH. Selective Impairment of Vagally Mediated, Nitric Oxide-Dependent Coronary Vasodilation in Conscious Dogs After Pacing-Induced Heart Failure. *Circulation*. 1995;91:2655-2663.
135. Chen BC, Yu CC, Lei HC, Chang MS, Hsu MJ, Huang CL, Chen MC, Sheu JR, Chen TF, Chen TL, Inoue H, Lin CH. Bradykinin B2 Receptor Mediates NF- κ B Activation and Cyclooxygenase-2 Expression via the Ras/Raf-1/ERK Pathway in Human Airway Epithelial Cells. *J Immunol*. 2004;173:5219-5228.
136. Wyatt AW, Steinert JR, Wheeler-Jones CPD, Morgan AJ, Sugden D., Pearson JD, Sobrevia L., Mann GE. Early activation of the p42/p44MAPK pathway mediates adenosine-induced nitric oxide production in human endothelial cells: a novel calcium-insensitive mechanism. *FASEB J*. 2002;16:1584-1594.
137. Sindermann JR, Schmidt A, Breithardt G, Buddecke E. Lovastatin controls signal transduction in vascular smooth muscle cells by modulating phosphorylation levels of mevalonate-independent pathway. *Basic Res Cardiol*. 2001;96:283-289.
138. Rees DD, Monkhouse JE, Cambridge D, Moncada S. Nitric oxide and the haemodynamic profile of endotoxin shock in the conscious mouse. *Br J Pharmacol*. 1998;124:540-546.
139. Hallemeesch MM, Janssen BJA, de Jonge WJ, Soeters PB, Lamers WH, Deutz NEP. NO production by cNOS and iNOS reflects blood pressure changes in LPS-challenged mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285:E871-E875.
140. Gunnnett CA, Chu Y, Heistad DD, Loihl A, Faraci FM. Vascular effects of LPS in mice deficient in expression of the gene for inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1998;275:H416-H421.
141. Ullrich R, Scherrer-Crosbie M, Bloch KD, Ichinose F, Nakajima H, Picard MH, Zapol WM, Quezado ZMN. Congenital Deficiency of Nitric Oxide Synthase 2 Protects Against Endotoxin-Induced Myocardial Dysfunction in Mice. *Circulation*. 2000;102:1440-1446.
142. Barth E., Radermacher P., Thiemermann C., Weber S., Georgieff M., Albuszies G. Role of inducible nitric oxide synthase in the reduced responsiveness of the myocardium to catecholamines in a hyperdynamic, murine model of septic shock. *Crit Care Med*. 2006;34:307-313.

143. D'Acquisto F., Ialenti A., Iuvone T., Di Rosa M., Carnuccio R. Inhibition of nuclear factor -kappa B prevents the loss of vascular tone in lipopolysaccharide-treated rats. *Eur J Pharmacol.* 1999;365:253-257.
144. Wagner AH, Schwabe O, Hecker M. Atorvastatin inhibition of cytokine-inducible nitric oxide synthase expression in native endothelial cells in situ. *Nature.* 2002;136:143-149.
145. Laubach VE, Shesely EG, Smithies O, Sherman PA. Mice Lacking Inducible Nitric Oxide Synthase are Not Resistant to Lipopolysaccharide-Induced Death. *PNAS.* 1995;92:10688-10692.
146. Macmicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, Hutchinson N, Chen H, Mudgett JS. Altered Responses to Bacterial-Infection and Endotoxic-Shock in Mice Lacking Inducible Nitric-Oxide Synthase. *Cell.* 1995;81:641-650.
147. Takano H, Manchikalapudi S, Tang XL, Qiu Y, Rizvi A, Jadoon AK, Zhang Q, Bolli R. Nitric Oxide Synthase Is the Mediator of Late Preconditioning Against Myocardial Infarction in Conscious Rabbits. *Circulation.* 1998;98:441-449.
148. Kanno S, Lee PC, Zhang Y, Ho C, Griffith BP, Shears LL, II, Billiar TR. Attenuation of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Superinduction of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Circulation.* 2000;101:2742-2748.
149. Heger J, Godecke A, Flogel U, Merx MW, Molojavvi A, Kuhn-Velten WN, Schrader J. Cardiac-specific overexpression of inducible nitric oxide synthase does not result in severe cardiac dysfunction. *Circ Res.* 2002;90:93-99.
150. Muller-Werdan U, Schumann H, Fuchs R, Reithmann C, Loppnow H, Koch S, Zimny-Arndt U, He C, Darmer D, Jungblut P. Tumor Necrosis Factor[alpha](TNF[alpha]) is Cardiodepressant in Pathophysiologically Relevant Concentrations Without Inducing Inducible Nitric Oxide-(NO)-Synthase (iNOS) or Triggering Serious Cytotoxicity. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997;29:2915-2923.
151. Ikeda U., Shimpo M., Ikeda S., Shimada K. Lipophilic statins augment inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;38:69-77.
152. Merx MW, Liehn EA, Graf J, van de Sandt A, Schaltenbrand M, Schrader J, Hanrath P, Weber C. Statin Treatment After Onset of Sepsis in a Murine Model Improves Survival. *Circulation.* 2005;112:117-124.
153. Kothe H, Dalhoff K, Rupp J, Muller A, Kreuzer J, Maass M, Katus HA. Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors Modify the Inflammatory Response of Human Macrophages and Endothelial Cells Infected With Chlamydia pneumoniae. *Circulation.* 2000;101:1760-1763.
154. Takeuchi S, Kawashima S, Rikitake Y, Ueyama T, Inoue N, Hirata Ki, Yokoyama M. Cerivastatin Suppresses Lipopolysaccharide-Induced ICAM-1 Expression through Inhibition of Rho GTPase in BAEC. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2000;269:97-102.

155. Stalker TJ, Lefer AM, Scalia R. A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid. *N.Engl.J.Med.* 2001;133:406-412.
156. Raeburn CD, Calkins CM, Zimmerman MA, Song Y, Ao L, Banerjee A, Harken AH, Meng X. ICAM-1 and VCAM-1 mediate endotoxemic myocardial dysfunction independent of neutrophil accumulation. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 2002;283:R477-R486.
157. Meldrum D.L. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J. Physiol. Regulatory Inetgrative Comp. Physiol.* 1997;274:R577-95
158. Maass D.L., Hybki D.P., White J., Horton J.W. The time course of cardiac NF-kappaB activation and TNF-alpha secretion by cardiac myocytes after burn injury: contribution to burn-related cardiac contractile dysfunction. *Shock.* 2002;17:293-299.
159. Haudek SB, Spencer E, Bryant DD, White DJ, Maass D, Horton JW, Chen ZJ, Giroir BP. Overexpression of cardiac I- κ B α prevents endotoxin-induced myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H962-H968.
160. Durant R, Klouche D., Delbosc S., Morena M., Amigues L., Beraud J.J., Canaud B., Cristol J.P. Superoxide anion overproduction in sepsis: effects of vitamin e and simvastatin. *Shock.* 2004;22:34-39.
161. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schafers HJ, Nickenig G, Bohm M, Laufs U. Oxygen Free Radical Release in Human Failing Myocardium Is Associated With Increased Activity of Rac1-GTPase and Represents a Target for Statin Treatment. *Circulation.* 2003;108:1567-1574.
162. Laufs U, Kilter H, Konkol C, Wassmann S, Bohm M, Nickenig G. Impact of HMG CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart. *Cardiovascular Research.* 2002;53:911-920.
163. Shi J, Wang J., Zheng H., Ling W., Joseph J., Li D., Metha J.L., Ponnappan U., Lin P., Fink L.M., Hauer-Jensen M. Statins increase thrombomodulin expression and function in human endothelial cells by a nitric oxide-dependent mechanism and counteract tumor necrosis factor alpha-induced thrombomodulin downregulation. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2003;14:575-585.
164. Bourcier T, Libby P. HMG CoA Reductase Inhibitors Reduce Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression by Human Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:556-562.
165. Kurakata S, Kada M, Shimada Y, Komai T, Nomoto K. Effects of different inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, pravastatin sodium and simvastatin, on sterol synthesis and immunological functions in human lymphocytes in vitro. *Immunopharmacology.* 1996;34:51-61.
166. Kim YC, Song SB, Lee MH, Kang KI, Lee H, Paik SG, Kim KE, Kim YS. Simvastatin induces caspase-independent apoptosis in LPS-activated

- RAW264.7 macrophage cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;339:1007-1014.
167. Ferro D., Parrotto S., Basili S., Alessandri C., Violi F. Simvastatin inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:427-431.
168. Rosenson RS, Tangney CC, Casey LC. Inhibition of proinflammatory cytokine production by pravastatin. *The Lancet*. 1999;353:983-984.
169. Grosser N, Hemmerle A, Berndt G, Erdmann K, Hinkelmann U, Schurger S, Wijayanti N, Immenschuh S, Schroder H. The antioxidant defense protein heme oxygenase 1 is a novel target for statins in endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004;37:2064-2071.
170. Mortensen E, Restrepo M, Anzueto A, Pugh J. The effect of prior statin use on 30-day mortality for patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Respiratory Research*. 2005;6:82.
171. Thomsen R.W., Hundborg H.H., Johnsen S.P., Pedersen L., Sorensen H.T., Schonheyder H.C., Lervang H.H. Statin use and mortality within 180 days after bacteremia: a population-based cohort study. *Crit Care Med*. 2006;34(4):1080-86
172. Liappis AP, Kan VL, Rochester CG, Simon GL. The effect of statins on mortality in patients with bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*. 2001;33:1352-1357.
173. Kruger P, Fitzsimmons K, Cook D, Jones M, Nimmo G. Statin therapy is associated with fewer deaths in patients with bacteraemia. *Intensive Care Medicine*. 2006;32:75-79.
174. Almog Y, Shefer A, Novack V, Maimon N, Barski L, Eizinger M, Friger M, Zeller L, Danon A. Prior statin therapy is associated with a decreased rate of severe sepsis. *Circulation*. 2004;110:880-885.
175. Hackam DG, Mamdani M, Li P, Redelmeier DA. Statins and sepsis in patients with cardiovascular disease: a population-based cohort analysis. *The Lancet*. 367:413-418.
176. Merx MW, Weber C. Statins: a preventive strike against sepsis in patients with cardiovascular disease? *The Lancet*. 2006;367:372-373.

A. Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-Isoxazol-propionsäure
AP-1	Activator-protein 1
aPC	rekombinantes aktiviertes Protein C
ATP	Adenosin-Triphosphat
BK	Bradykinin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CLP	Coecum Ligatur and Punktion
cNOS	konstitutive NO-Synthase
COX2	Cyclooxygenase 2
CRP	C-reaktives Protein
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ETU	S-Ethylisothiurea
FPP	Farsenylpyrophosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GTP	Guanosin-Triphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDL	high density lipoprotein
HMGB1	high mobility group box protein 1
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
HO-1	Hitzeschockprotein 1
ICAM	intercellular adhesion molecule
IL-1	Interleukin-1
IL-18	Interleukin 18
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KLF2	Kruppel-like factor 2
LDL	low density lipoprotein
LFA1	lymphocyte function associated antigen-1
LFA-1	Lymphozytenfunktions-assoziertes Antigen-1
L-NIL	L-N ⁶ -(1-iminoethyl)lysine Hydrochlorid
LPS	Lipopolysaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
MAC-1	Makrophagen-Rezeptor-1
MAP	mittlerer arterieller Druck
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1

MDS	myocardial depressant substance
MHC	major histocompatibility complex
MIF	macrophage migration-inhibitor factor
NaCl	Natriumchlorid
NF κ B	Nuklear Faktor- kappa B
NMDA	N-methyl-D-aspartat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitors-1
PGRP	Peptidoglykan Recognition-Rezeptoren
PKC	Proteinkinase C
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
RANTES	Regulated upon Activation, Normally T-cell Expressed and Secreted
ROS	reactive Sauerstoffspezies
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VCAM	vascular cell adhesion molecule
ZNS	Zentrales Nervensystem

B. Materialienliste

Medikamente

Ketanest, 10ml, 250mg/ml,	Parke-Davis
Xylazin (Rompun), 2%, 25ml,	Bayer
Urethane, M.W. 89,09	ICN Biomedicals Inc.
Tramal, 12ml	Grünenthal
2-Ethyl-2Thiopsenudourea hydrobromid 98%	Aldrich Chemical Company
Dobutamin Solvay, 250mg/ml, 50ml	Solvay Arzneimittel
Heparin-Natrium 25.000 I.E	Braun
Glucose 40, 10ml	Braun
Isotonische Natrium Chlorid Lösung	Boehr., Ingelheim, Delta Pharma
Betaisodona Lösung	Mundipharma GmbH
Adenosine, 98%, F.W. 316,3	Sigma
Bradykinin 5mg, 98%, F.W. 1060,2	Sigma
S4150 pO ₂ Zero Solution	Radiometer Copenhagen

Chemikalien

NaCL M=58.44g/mol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat; M=136,09g/mol	
Calciumchlorid Dihydrat; M= 147.02 g/mol	
Kaliumchlorid; M=74,56 g/mol	
Natriumhydrogencarbonat; M= 84.01g/mol	
Magnesium Sulfat FW 246.5	Sigma Chemical Company
Pyruvat FW 110,0	
D+Glucose MW 198.2	Calbiochem:-Novabiochem Corp

Instrumente

Aesculap Mikro Pinzette, Uhrmacher Modell, gerade, 110mm, BD 331 R
Aesculap Mikro Pinzette, Uhrmacher Modell, gebogen, 115mm, BD 333 R
Aesculap Feine anatomische Pinzette, gebogen, OC021 R, 100mm
FST Gefäßclip Micro Serredines
FST Forceps 14,5cm, 11022-14,
FST gebogene chirurgische Schere 11,5cm, 14075-11
FST feine Schere, gerade, 10,5cm, 14088-10
FST Gefäßklemme, Clip Applicator 14cm Vascular Clamp, 18057-14
FST Sprungschere, gebogen 8,5 cm, 15004-8
FST Sprungschere, gerade, 8,5 cm, 15003-8
S&T 00608 Katheterhalter

Infusionspumpe

Precidor Infors Ag Basel

Katheter

Portex Non sterile Polythene Tubing, 0,4 mm ID , 0,8mmOD, SIMS Portex LTD., UK

Nahtmaterial

5-0 Seide, schwarz, geflochten	Serag Wiessner, Germany
2-0 Seide, schwarz, geflochten	Johnson&Johnson
3-0 Seide, schwarz, geflochten	Johnson & Johnson

Kanülen

20G x 1 ½“, 0,9x40, gelb	Tenumo
26G x 23, 0,45x23	Tenumo

Mikroskop

Leica MZ 9-5

Waagen

Sartorius Feinwaage

Sartorius Mikrowaage

Rasiergerät

Aesculap Favorita II Typ GT109

Verstärkermodule

ECGA Modul Typ 689 (Erfassung und Verstärkung von EKG Signalen)

OPPM Typ 697 (Messung des Sauerstoffpartialdruck unter Verwendung einer Clark Meßelektrode)

Transit Time Flowmeter TTFM Typ 700 (Ultraschall Flußmeßgerät, Einkanal Transonic Ultraschall Transit Time Flußmeßgerät)

Transducer Amplifier Modul TAM A (Analoge, universelle Gleichspannungsmeßbrücke + ohmscher Meßwertaufnehmer)

C. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Peter Hanrath, ehemaliger Direktor der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Aachen, für die freundliche Überlassung des Themas. Dem jetzigen Direktor der Medizinischen Klinik I, Herrn Professor Dr. Malte Kelm, gebührt mein Dank für die weitere wohlwollende Unterstützung meiner Promotionsarbeit sowie seine gutachterliche Tätigkeit.

Ebenso danke ich dem Leiter des Institutes für Kardiovaskuläre Molekularbiologie des Universitätsklinikums Aachen, Herrn Professor Dr. Christian Weber, für seine gutachterliche Tätigkeit. Bei ihm und seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und optimale Nutzung methodischer Synergien bedanken. So waren die Ergebnisse zur Simvastatinwirkung im Zusammenhang mit Fragen der Zelladhäsion und Rekrutierung eine weitreichende und wertvolle Erweiterung in Bezug auf die Auswertung der vorliegenden Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Privatdozent Dr. Marc Merx für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Dank seiner Erfahrung und kreativen Anregungen war es möglich die Versuchsabläufe optimal zu gestalten. Jederzeit stand er mir mit seinem wertvollen Rat und seiner hilfreichen Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit zur Seite.

Frau Dr. Maren Schaltenbrand danke ich insbesondere für die sehr gute Zusammenarbeit, ebenso wie den weiteren Mitarbeiterinnen des Laborteams, Irina Moshkova und ganz besonders Stefanie Becher für die praktische Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Arbeit.

Für die Bereitstellung und Pflege der Tiere möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Institutes für Versuchstierkunde sowie Zentrallaboratorium für Versuchstiere des Universitätsklinikums Aachen bedanken.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir das Studium der Medizin ermöglicht haben und denen ich meine Dissertation widmen möchte. Ihnen, Benedikt Kunz, meinen Freunden und Verwandten gilt mein besonderer Dank für ihr Verständnis, ihre Liebe und Geduld und die aufbauenden Worte.

D. CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name	Annette Maria van de Sandt
Anschrift	Jakobstrasse 61-63 52064 Aachen
Geburtsdatum/-ort	04. November 1979 in Emmerich
Familienstand	ledig

Schulbildung

08/1986 - 06/1990	Gemeinschaftsgrundschule St. Martinus, Kleve
08/1990 - 05/1999	Konrad-Adenauer-Gymnasium, Kleve
06/1999	Abitur

Studium

10/1999	Immatrikulation im Fach Medizin an der RWTH Aachen
08/2001	Ärztliche Vorprüfung
08/2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2006	Approbation als Ärztin

Beruflicher Werdegang

Seit 08/ 2006	Assistenzärztin in der Med. Klinik I, Prof. M. Kelm, Universitätsklinikum Aachen; Pauwelsstrasse 30, 52074 Aachen
---------------	---

Veröffentlichung

MW. Merx, EA. Liehn, J. Graf, A. van de Sandt, M. Schaltenbrand, J. Schrader, P. Hanrath, Ch. Weber; „Statin Treatment After Onset of Sepsis in a Murine Model Improves Survival”, Circulation 2005; 112:117-124,