

EINFLUSS VON PHOSPHODIESTERASE 5-INHIBITOREN AUF DIE ESCHERICHIA COLI HÄMOLYSIN UND LIPOPOLYSACCHARID VERMITTELTE KARDIODEPRESSION AM ISOLIERTEN RATTENHERZEN

THOMAS CHRISTIAN FAßBENDER



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie
und -Embryologie der Justus-Liebig -Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Leiser

und

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II, Klinikum der Justus-Liebig
Universität Gießen
Betreuer: PD Dr. med. Ulf Sibelius

**Einfluss von Phosphodiesterase 5-Inhibitoren auf die
Escherichia coli Hämolyse und Lipopolysaccharid
vermittelte Kardiodepression am isolierten Rattenherzen**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Thomas Christian Faßbender
Tierarzt aus Bonn

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Leiser

PD Dr. med. Ulf Sibelius

Tag der Disputation: 04.05.2006

Meinen Eltern
Gerda und Peter Faßbender

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|---------------|
| 1 | Abkürzungsverzeichnis | VI |
| 2 | Abbildungsverzeichnis | VIII |
| 3 | Vorwort | - 1 - |
| 4 | Einleitung | - 2 - |
| 4.1 | Sepsis | - 2 - |
| 4.2 | Kardiovaskuläre Veränderungen in Sepsis und septischem Schock | - 4 - |
| 4.3 | Myokardiale Dysfunktion in Sepsis und septischem Schock | - 5 - |
| 4.3.1 | Myokardiale Perfusionsstörungen in der Sepsis | - 6 - |
| 4.4 | Arachidonsäuremetabolite | - 8 - |
| 4.4.1 | Leukotriene | - 10 - |
| 4.4.2 | Thromboxan | - 10 - |
| 4.5 | Kardiodepressive Substanzen | - 11 - |
| 4.5.1 | TNF- α | - 12 - |
| 4.6 | Bakterientoxine | - 14 - |
| 4.6.1 | Lipopolysaccharide | - 15 - |
| 4.6.2 | <i>Escherichia coli</i> Hämolysin | - 17 - |
| 4.7 | Phosphodiesterasen | - 19 - |
| 4.7.1 | Phosphodiesterase 5 | - 22 - |
| 4.8 | PDE5-Inhibitoren | - 24 - |
| 4.8.1 | Sildenafil | - 25 - |
| 4.8.2 | Zaprinast | - 26 - |
| 4.9 | Fragestellung | - 27 - |
| 5 | Material und Methoden | - 28 - |
| 5.1 | Material | - 28 - |
| 5.1.1 | Tiere | - 28 - |
| 5.1.2 | <i>Escherichia coli</i> Hämolysin und <i>Salmonella typhimurium</i> Lipopolysaccharid | - 28 - |
| 5.1.3 | Pharmaka | - 28 - |
| 5.1.4 | Geräte und Material für die Organperfusion | - 29 - |
| 5.1.5 | Analytische Test-Kits | - 29 - |
| 5.1.6 | Material zur mRNA Quantifizierung | - 30 - |
| 5.2 | Methoden | - 30 - |
| 5.2.1 | Grundlagen der Perfusion isolierter Rattenherzen nach O. LANGENDORFF | - 30 - |
| 5.2.2 | Versuchsordnung zur Perfusion isolierter Rattenherzen nach LANGENDORFF | - 31 - |
| 5.2.3 | Entnahme und Präparation des Herzens | - 32 - |
| 5.2.4 | Versuchsdurchführung | - 33 - |
| 5.2.5 | Protokollierung der physiologischen Parameter | - 35 - |
| 5.2.6 | Durchführung der analytischen Perfusatuntersuchungen | - 36 - |
| 5.2.6.1 | Cysteinyl-Leukotrien ELISA und Thromboxan B ₂ ELISA | - 36 - |
| 5.2.6.2 | Rat TNF- α Elisa | - 36 - |
| 5.2.6.3 | cGMP RIA | - 37 - |
| 5.2.7 | Quantitative mRNA Analyse | - 37 - |
| 5.2.8 | Statistische Datenauswertung | - 38 - |

| | | |
|------------|---|----------------|
| 6 | Ergebnisse | - 39 - |
| 6.1 | Übersicht | - 39 - |
| 6.2 | Toxinwirkung | - 39 - |
| 6.2.1 | Einfluss von LPS auf die physiologischen Parameter isolierter Herzen | - 39 - |
| 6.2.2 | Einfluss von ECH auf die Kontraktilität und die Koronarperfusion | - 41 - |
| 6.3 | Pharmakologische Intervention | - 42 - |
| 6.3.1 | Sildenafil und LPS | - 42 - |
| 6.3.2 | Sildenafil und ECH | - 43 - |
| 6.3.3 | Zaprinast und LPS | - 43 - |
| 6.3.4 | Zaprinast und ECH | - 46 - |
| 6.3.5 | MK-886 und ECH | - 46 - |
| 6.4 | Probenauswertung | - 48 - |
| 6.4.1 | Freisetzung von TNF- α | - 48 - |
| 6.4.2 | Freisetzung von Thromboxan | - 49 - |
| 6.4.3 | Freisetzung von Cysteinyl-Leukotrienen | - 50 - |
| 6.4.4 | Freisetzung von cGMP | - 51 - |
| 6.4.5 | mRNA-Expression | - 53 - |
| 6.4.5.1 | Genexpression von TNF- α | - 53 - |
| 6.4.5.2 | Genexpression von Thromboxansynthase | - 54 - |
| 6.4.5.3 | Genexpression von COX-2 | - 54 - |
| 7 | Diskussion | - 56 - |
| 7.1 | Septische Kardiomyopathie | - 56 - |
| 7.2 | Bezug zu vorherigen Arbeiten | - 57 - |
| 7.2.1 | LPS führt zur Kardiodepression | - 57 - |
| 7.2.2 | ECH bewirkt eine Vasokonstriktion im Koronargefäßsystem | - 59 - |
| 7.3 | Potential der PDE5-Inhibitoren | - 60 - |
| 7.4 | Effekte der PDE5-Inhibitoren | - 61 - |
| 7.4.1 | Wirkung auf LPS konfrontierte Herzen | - 61 - |
| 7.4.2 | Wirkung auf ECH konfrontierte Herzen | - 61 - |
| 7.5 | Ischämie und Kardiodepression | - 62 - |
| 7.6 | Regulation der Genexpression durch cGMP | - 65 - |
| 7.7 | Entwicklung des kardioprotektiven Effekts der PDE5-Inhibitoren | - 66 - |
| 7.8 | Klinische Relevanz | - 67 - |
| 8 | Zusammenfassung | - 69 - |
| 8.1 | Zusammenfassung | - 69 - |
| 8.2 | Summary | - 71 - |
| 9 | Literaturverzeichnis | - 73 - |
| 10 | Erklärung | - 103 - |
| 11 | Danksagung | - 104 - |

1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic Adenosinmonophosphate) |
| cGMP | zyklisches Guanosinmonophosphat (cyclic Guanosinmonophosphate) |
| cNOS | konstitutionelle NO-Synthase |
| COX-1 | konstitutionelle Cyclooxygenase |
| COX-2 | induzierbare Cyclooxygenase |
| CPF | koronarer Perfusatfluss (coronary perfusion flow) |
| CPP | koronarer Perfusionsdruck (coronary perfusate pressure) |
| Cys-LTs | Cysteinyl-Leukotriene |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (desoxy ribonucleic acid) |
| dp/dt_{max} | maximale linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit |
| ECH | <i>Escherichia coli</i> Hämolyysin |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EET | Epoxyeicosatriensäuren |
| Elisa | enzyme-linked immunosorbent assay |
| γ -IFN | Gamma-Interferon |
| GC | Guanylatzyklase |
| HPETE | Hydroperoxyeicosatetraenoiden |
| HR | Herzfrequenz (heart rate) |
| HU | hämolytische Einheiten (hemolytic units) |
| IK | Inhibitorkonzentration |
| IL-1 β | Interleukin-1 β |
| iNOS | induzierbare NO-Synthase |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LTB ₄ | Leukotrien B ₄ |
| LVDP | linksventrikulär entwickelter Druck (left ventricular developed pressure) |
| MDF | myokardial depressiver Faktor |
| mRNA | Botenribonucleinsäure (messenger ribonucleic acid) |
| NF- κ B | Kernfaktor- κ B (nuclear factor- κ B) |
| NO | Stickstoffmonoxid |

| | |
|------------------|--|
| PAF | Plättchen aktivierender Faktor |
| PC | Personalcomputer |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| PDE | Phosphodiesterase |
| PGI ₂ | Prostaglandin F ₂ |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKG | Proteinkinase G |
| RT | Reverse Transkriptase |
| RIA | Radioimmunoassay |
| TGF- β | „Transforming Growth Factor- β “ |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor- α |
| TxA ₂ | Thromboxan A ₂ |

2 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|--------|
| Abb. 1: Pathogenese von Sepsis und septischem Schock. | - 3 - |
| Abb. 2: Änderungen der Herzleistung während des septischen Schocks. | - 4 - |
| Abb. 3: Mechanismen zur Gewährleistung der notwendigen Sauerstoffverfügbarkeit | - 7 - |
| Abb. 4: Schematik des Arachidonsäuremetabolismus | - 9 - |
| Abb. 5: Schematische Darstellung des kardiodepressiven Effekts von TNF- α auf das Herz | - 13 - |
| Abb. 6: Schematischer Aufbau der chemischen Struktur von LPS | - 15 - |
| Abb. 7: Angenommener Signalweg von LPS in Endothelzellen | - 16 - |
| Abb. 8: Porenbildung durch ECH | - 18 - |
| Abb. 9: Durch G-Proteinaktivierung kann ECH sekundäre Zellreaktionen auslösen. | - 19 - |
| Abb. 10: Rolle der PDEs in der Signaltransduktion zyklischer Nukleotide. | - 20 - |
| Abb. 11: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus der einzelnen PDE-Familien- | 21 - |
| Abb. 12: PDE5 Aktivierung | - 23 - |
| Abb. 13: Strukturformeln von Sildenafil, Zaprinast und cGMP | - 24 - |
| Abb. 14: Prinzip der LANGENDORFF-Perfusion | - 31 - |
| Abb. 15: Versuchsanordnung nach O. LANGENDORFF | - 32 - |
| Abb. 16: Detailansicht zur Lage des Latexballons im isolierten Herzen | - 32 - |
| Abb. 17: Übersicht 60 Minuten Versuch | - 34 - |
| Abb. 18: Übersicht 180 Minuten Versuch | - 34 - |
| Abb. 19: LPS Wirkung am isolierten Herz | - 40 - |
| Abb. 20: ECH Wirkung am isolierten Herz | - 41 - |
| Abb. 21: LPS induzierte Kardiodepression in Anwesenheit 1 μ M PDE5-Inhibitoren | - 44 - |
| Abb. 22: LPS induzierte Kardiodepression in Anwesenheit 10 μ M PDE-Inhibitoren | - 45 - |
| Abb. 23: ECH induzierte Kardiodepression in Anwesenheit 1 μ M PDE5-Inhibitoren | - 47 - |
| Abb. 24: TNF- α Freisetzung ins Perfusat | - 49 - |
| Abb. 25: Thromboxan Freisetzung ins Perfusat | - 50 - |
| Abb. 26: Cysteinyl-Leukotrien Freisetzung ins Perfusat | - 51 - |
| Abb. 27: cGMP Freisetzung ins Perfusat | - 52 - |
| Abb. 28: relative TNF- α -mRNA-Expression im Ventrikelmyokard | - 53 - |
| Abb. 29: relative COX-2-mRNA-Expression im Ventrikelmyokard | - 54 - |
| Abb. 30: Signalwege von ECH und LPS im Überblick | - 56 - |
| Abb. 31: LPS vermittelte Effekte am Herzen | - 58 - |
| Abb. 32: ECH vermittelte Effekte am Herzen | - 59 - |
| Abb. 33: Beeinträchtigung des NO Signalwegs in der glatten Gefäßmuskelzelle. | - 60 - |

3 Vorwort

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation wurde im Zeitraum vom Oktober 2003 bis Januar 2005 im Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II (Leiter Prof. Dr. med. W. Seeger), Justus-Liebig-Universität Gießen Laborbereich von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. F. Grimminger, in Herrn PD Dr. med. U. Sibelius Arbeitsgruppe angefertigt. Betreut wurde sie durch Herrn Dr. med. U. Grandel und Herrn PD Dr. med. U. Sibelius.

Die vorliegende Arbeit ist dem Gebiet der septischen Kardiomyopathie zuzuordnen, einer Komplikation der Sepsis, welcher eine maßgebliche Rolle im septischen Schockgeschehen zukommt. Im Mittelpunkt der Dissertation steht die Bedeutung von Phosphodiesterasen in der toxinvermittelten Kardiodepression. Die Untersuchungen wurden am isoliert und zellfrei perfundierten Rattenherzen durchgeführt, die septischen Veränderungen am isolierten Organ wurden mit Hilfe zweier bakterieller Toxine induziert. Die Auswahl wurde hier auf Toxine gram-negativer Bakterien beschränkt. Zum Einsatz kamen *Escherichia coli* Hämolysin, ein Vertreter der Gruppe der porenbildenden Exotoxine, und Lipopolysaccharide, Zellwandbestandteile aller gram-negativer Keime, die zugleich bedeutende Pathogenitätsfaktoren darstellen. Um die Rolle der PDE in der toxinvermittelten Kardiodepression zu ermitteln, sollte untersucht werden, wie weit die toxininduzierten Veränderungen am Herzen durch präventive Gabe von PDE5 Inhibitoren aufgehoben werden können. Dabei kamen Sildenafil und Zaprinast zum Einsatz. Die Auswertung erfolgte zum einen auf Grund der physiologischen Daten, zum anderen auf Grund der analytischen Aufarbeitung gewonnener Perfusatproben und Ventrikelpräparate.

4 Einleitung

4.1 Sepsis

Die klinische Relevanz der Sepsis steigt besonders in der modernen Intensivmedizin weiter an. Dies liegt zum einen an einer durch neue, bessere Therapiemöglichkeiten immer größer werdenden Anzahl immunsupprimierter, schwerkranker sowie älterer und damit besonders infektionsgefährdeter Patienten, zum anderen aber auch an der ständigen Zunahme invasiver Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten (1). So kann die Anwendung intravasaler Katheter, Tubi und Blasen Katheter bei Patienten ohne Primärinfektion zu nosokomialen Infektionen führen. Zudem fördern vermehrt auftretende immunsupprimierende Erkrankungen wie beispielsweise eine HIV-Infektion oder ein Diabetes mellitus, beziehungsweise die Ausweitung immunsuppressiver Therapien das Auftreten einer Sepsis. Besonders prekär ist dies im Hinblick auf die Tatsache, dass der unkritische Einsatz hocheffizienter Antibiotika zahlreiche multiresistente, schwer therapierbare Keime hervorgebracht hat. So verwundert es auch nicht, dass die Inzidenz der Sepsis in den letzten Jahrzehnten zugenommen hat (2).

Als Sepsis wird die systemische Antwort auf eine Infektion bezeichnet, die hervorgerufen wird durch die Einschwemmung bakterieller Pathogenitätsfaktoren in die Zirkulation (s. Abb. 1). Durch diese Pathogenitätsfaktoren, vor allem Endo- und Exotoxine, kommt es zur systemischen Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, insbesondere Zytokinen wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β). Daneben kommt es über die Stimulierung von polymorphkernigen Leukozyten, Gewebsmakrophagen/monozyten und endothelialen Zellen zur Freisetzung einer Kaskade biologisch aktiver Mediatoren. Hierunter fallen als prominente Beispiele der Plättchen aktivierende Faktor (PAF) und Stickstoffmonoxid (NO). Dies alles führt zu einer Gegenregulation mit antiinflammatorischen Zytokinen wie dem Transforming Growth Factor β sowie löslichen Zytokininhibitoren beispielsweise dem IL-1 β Rezeptorantagonist. Aus dem Zusammenspiel von pro- und antiinflammatorischen Stimuli resultiert die pathophysiologische Ausprägung der Sepsis (3).

Nach einer Definition der *Society of Critical Care Medicine* und dem *American College of Chest Physicians* liegt eine Sepsis vor, wenn im Rahmen einer systemischen Antwort auf einen Entzündungsprozess zwei oder mehr der unten aufgeführten klinischen Befunde gegeben sind:

- Körpertemperatur >38°C oder <36°C
- Herzfrequenz >90 Schläge/min
- Atemfrequenz >20 Atemzüge/min oder PaCO₂ <32 mm Hg
- Leukozyten >12 000/mm³, <4 000/mm³ oder >10% unreife (4)

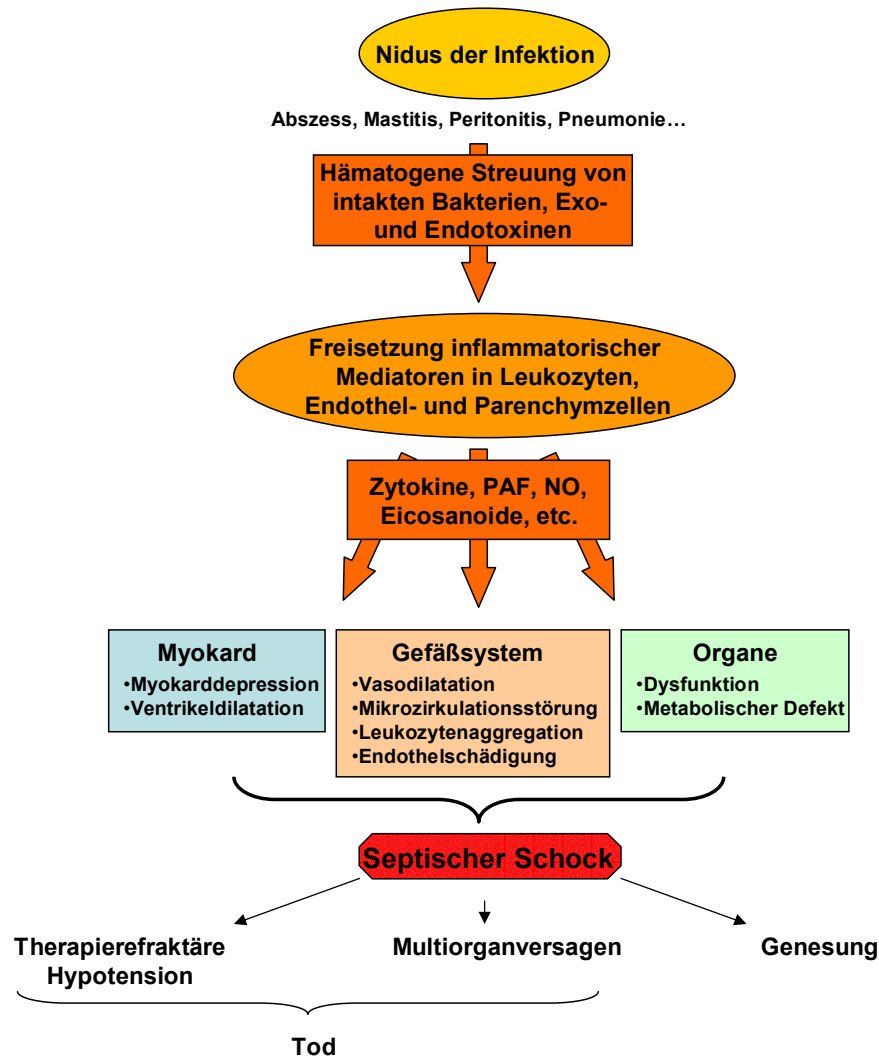


Abb. 1: Pathogenese von Sepsis und septischem Schock. Modifiziert nach Parrillo (6).

Gefürchtete Komplikationen der Sepsis sind letztlich das Multiorganversagen und der septische Schock. Ursächlich hierfür ist die Vielzahl der gebildeten Mediatoren beziehungsweise eine Imbalance der pro- und antiinflammatorischen Stimuli. Die Ausschüttung inflammatorischer und vasoaktiver Substanzen ruft lokale Gewebsschädigungen und Mikrozirkulationsstörungen hervor, die zu schweren Funktionsstörungen der betroffenen Organe führen (5).

4.2 Kardiovaskuläre Veränderungen in Sepsis und septischem Schock

Der Beginn einer Sepsis geht häufig mit einer Hypovolämie einher, die durch eine allgemeine Gefäßdilatation und den Verlust von Plasma in den Extravasalraum bedingt ist. Die Korrektur dieser Hypovolämie durch massive Infusionen führt bei 90% der Patienten zu einem erniedrigten systemischen Gefäßwiderstand, normalem oder gesteigerten Herzminutenvolumen, Tachykardie und erhöhten Sauerstoffkonzentrationen im pulmonalarteriellen Blut (7). Obwohl das Herzminutenvolumen normal oder sogar leicht gesteigert ist, liegt eine abnormale Ventrikelfunktion vor. Mit Hilfe der Radionuklidventrikulographie, kombiniert mit zeitgleichem Einsatz der Thermo-dilutionsmethode, konnte das charakteristische Muster der Herzarbeit während des septischen Schocks ermittelt werden.

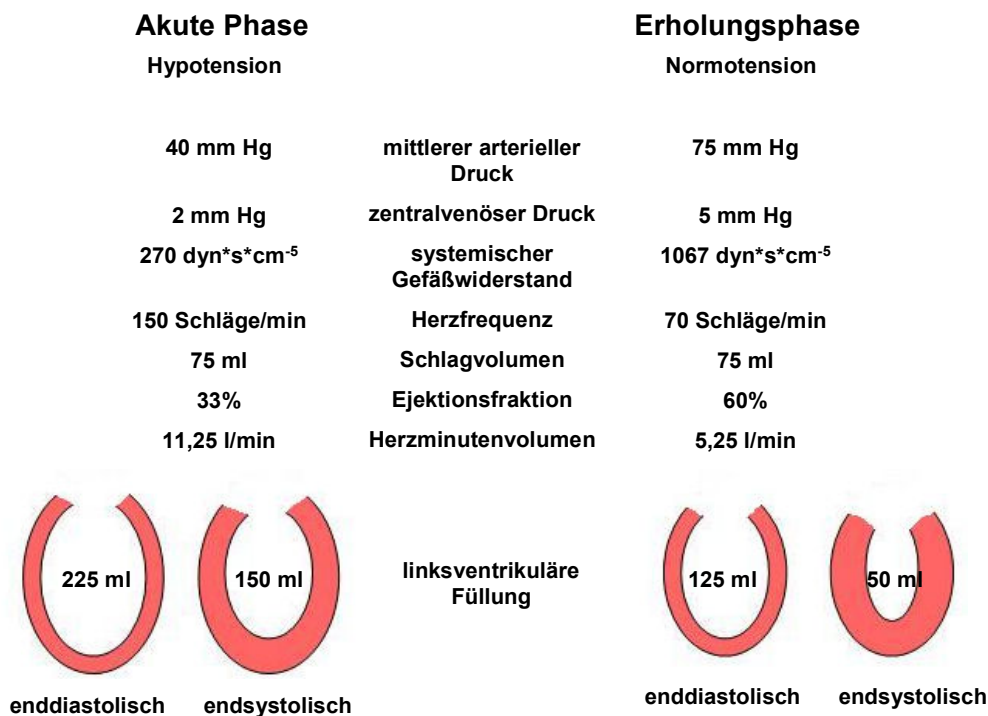


Abb. 2: Änderungen der Herzleistung während des septischen Schocks. Modifiziert nach (7).

So sind die Auswurffractionen beider Ventrikel vermindert, die enddiastolischen sowie endsystolischen Volumen hingegen in beiden Kammern erhöht, bei normalem Schlagvolumen (s. Abb. 2) (8, 9). Die Herzfrequenz und das Minutenvolumen sind angehoben, der systemische Gefäßwiderstand reduziert (s. Abb. 2). Zur Reduzierung der Auswurffractionen und der biventrikulären Dilatation kommt es 24 bis 48 Stunden nach Beginn der Sepsis. Diese Veränderungen sind reversibel und bilden sich in

überlebenden Patienten innerhalb von fünf bis zehn Tage zurück. Diese reversiblen Veränderungen konnten durch verschiedene Messmethoden bestätigt werden, u. a. linksventrikulärer Schlagarbeitsindex, Last unabhängige Druck-Volumenverhältnisbestimmungen und Herzultraschall (10, 11). Dabei ist interessant, dass bestimmte hämodynamische Muster prognostische Aussagen beinhalten. So ist eine niedrigere Herzfrequenz zu Beginn der Erkrankung prognostisch günstig und spricht für ein Überleben des Patienten und einen weniger schweren Krankheitsverlauf (7). Interessanterweise scheinen auch eine niedrige Auswurfraction sowie eine Ventrikeldilatation mit dem Überleben des Patienten positiv korreliert zu sein. Möglicherweise sind dies Zeichen für eine bessere ventrikuläre Kompensation der sepsisinduzierten Myokarddepression im Sinne des Frank-Starling-Mechanismus. Im Gegensatz dazu könnte ein Fehlen der Ventrikeldilatation Hinweise auf einen letalen Ausgang geben (12). Hämodynamische Reihenuntersuchungen an Patienten im septischen Schock zeigten, dass eine schnelle Normalisierung sowohl der Tachykardie als auch des Herzindex (Herzminutenvolumen bezogen auf die Körperoberfläche) innerhalb von 24 Stunden prognostisch günstig ist, hingegen das Bestehen eines hyperdynamen Zustandes die Wahrscheinlichkeit des Todes erhöht (6).

4.3 Myokardiale Dysfunktion in Sepsis und septischem Schock

Ein wichtiger Prognosefaktor septischer Erkrankungen ist die Organdysfunktion. Die myokardiale Dysfunktion ihrerseits ist wesentlich am Voranschreiten der allgemeinen Organdysfunktion beteiligt, insbesondere wenn man den mit der Sepsis einhergehenden erhöhten Sauerstoffbedarf der Organe betrachtet (1). Die reduzierte Kontraktilität des Herzens, die unabhängig von Änderungen der Vor- und Nachlast in der Sepsis beobachtet werden kann, scheint durch direkte Beeinträchtigung des kontraktiven Myokards hervorgerufen zu werden. So führt z.B. eine Endotoxämie im Tierversuch nachweislich zu einer Störung des Calciummetabolismus im kardialen Sarkolemm (13). Dazu kommen strukturelle Veränderungen des Herzgewebes in der Sepsis. Während im gesunden Myokard Kollagen die Ausrichtung der Myozyten unterstützt, ist in der Sepsis der myokardiale Kollagenanteil verringert und die Ausrichtung der Myozyten beeinträchtigt (14). Die Myokarddepression wird auf der einen Seite als Resultat der so genannten zirkulierenden, „myokardial depressiven Substanzen“ angesehen, bei denen es sich u. a. um kardiodepressive Zytokine handeln könnte (15). Auf der anderen Seite

werden myokardiale Ischämien verantwortlich gemacht. Während diese Theorien früher getrennt voneinander behandelt wurden, wird mittlerweile immer klarer, dass beide Faktoren eine Rolle spielen und teilweise einander bedingen.

4.3.1 Myokardiale Perfusionsstörungen in der Sepsis

Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur kann das Myokard keine Sauerstoffschuld dulden, da diese, selbst wenn keine Nekrose entsteht, unweigerlich zur kardialen Dysfunktion führt (16). Deshalb regeln zwei Mechanismen die Sauerstoffverfügbarkeit des Myokards, um auch unter kritischen Bedingungen eine ausreichende Versorgung zu gewährleisten: Die Autoregulation und die metabolische Regulation (s. Abb. 3).

Als Autoregulation wird die Fähigkeit der Koronargefäße bezeichnet, den Blutfluss unabhängig vom arteriellen Perfusionsdruck aufrecht zu erhalten. Im Ruhezustand kann so der koronare Perfusionsdruck (CPP) in einem Bereich von 70 bis 130 mmHg eingestellt werden (17, 18). Die Autoregulation findet hauptsächlich im Bereich der Arteriolen mit einem Durchmesser unter 100 µm statt (19). Steigt der Sauerstoffbedarf, wird der koronare Perfusionsfluss (CPF) durch Vasodilatation gesteigert. Aus diesem Grunde wird die Fähigkeit zur Autoregulation umso begrenzter je weiter die Vasodilatation vorangeschritten ist und geht bei maximal dilatierten Arteriolen verloren (18). Wie es zur Vasodilatation kommt ist ungeklärt, es wird über durch CPP-Änderungen beeinflusste Arteriolenwände (myogene Theorie) und Sauerstoffgewebskonzentration vermittelte (metabolische Theorie) Mechanismen diskutiert (20-22).

Die metabolische Regulation wird durch den Sauerstoffbedarf des Myokards gesteuert und besteht aus zwei Komponenten, zum einen aus einer Blutflussreserve, die bei gesteigerten Sauerstoffbedarf mediatorvermittelt durch Vasodilatation in Anspruch genommen wird, ähnlich der Autoregulation (metabolische Theorie); zum zweiten aus einer erhöhten Sauerstoffextraktion. Die Sauerstoffextraktion in der koronaren Strombahn liegt bereits im Ruhezustand bei circa 70%. Durch mikroskopische Beobachtungen am schlagenden Herzen konnte gezeigt werden, dass während einer Hypoxie weitere Kapillaren in Anspruch genommen werden, so dass eine weitere Steigerung der Sauerstoffgewinnung über den Ruhewert durchaus möglich ist (23). Die Sauerstoffaufnahmereserve ist also abhängig von einer intakten koronaren Mikrozirkulation.

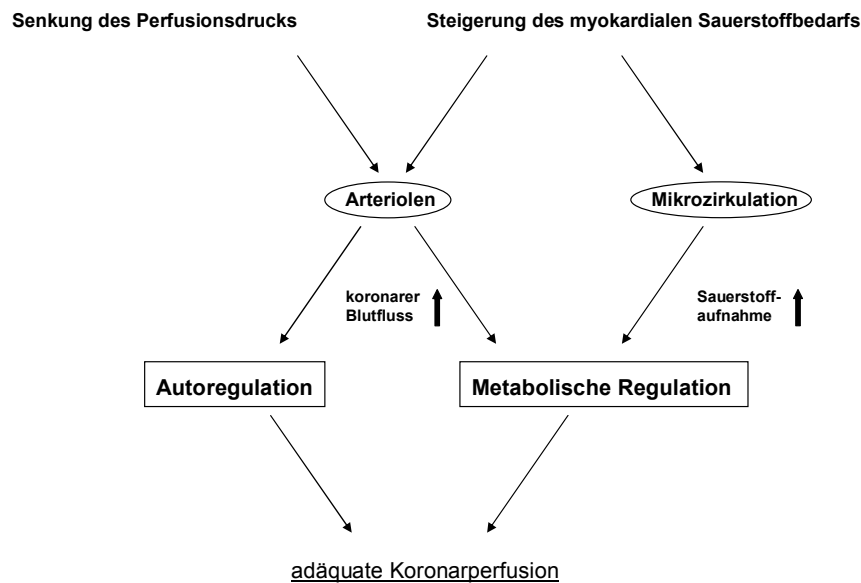


Abb. 3: Mechanismen zur Gewährleistung der notwendigen Sauerstoffverfügbarkeit

In der Sepsis sind diese Regelmechanismen stark beeinflusst. So kommt es in einer normotensiven Sepsis zur Vasodilatation und nachfolgend zu einem erhöhten CPF (24-26). Diese Vasodilatation schränkt die Fähigkeit zur Autoregulation ein. Auch geht dieser Anstieg des CPF nicht immer mit einem vergleichbaren Anstieg der Herzleistung einher (24, 25). Des Weiteren benötigt das Myokard in der Sepsis mehr Sauerstoff pro Arbeitseinheit als das gesunde Herz (24). Also könnte die Vasodilatation ein Produkt der metabolischen Regulation sein. Für das zumindest eingeschränkte Funktionieren der metabolischen Regulation während der Sepsis, spricht auch, dass jede Steigerung der Herzleistung an einen gesteigerten CPF gekoppelt ist (24, 26). Allerdings zeigten Versuche an Schafen, dass die metabolische Regulationsfähigkeit bei septischen Tieren gegenüber der Kontrollgruppe stark vermindert ist. So hatten die gesunden Schafe im Vergleich zu septischen Tieren eine dreifach höhere koronare Flussreserve und konnten ihren Sauerstoffbedarf noch bei einer verglichen mit den septischen Tieren 30% niedrigeren Blutsauerstoffkonzentration decken (26). Außerdem war es den septischen Schafen im Gegensatz zur Kontrollgruppe nicht möglich, ihre koronare Sauerstoffaufnahme zu steigern (26). Die Sauerstoffaufnahme ist eng assoziiert mit der Mikrozirkulation. Während der Sepsis konnten mikrozirkulatorische Dysfunktionen in verschiedenen Organen gezeigt werden. Die Pathogenese der mikrozirkulatorischen

Dysfunktion in der Sepsis ist multifaktoriell. So spielen Endothelzellschäden, Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen und die Okklusion von Kapillaren durch rigide Erythrozyten eine Rolle (27-29). In Herzbiopsien von septischen Schafen konnten fleckige Zellnekrosen nachgewiesen werden, eine Veränderung die auf eine Schädigung myokardialer Gefäße auf Kapillarebene hinweist (30, 31). Durch die herabgesetzte Zahl der während der Sepsis perfundierten Kapillaren, stehen weniger Kapillaren zum Sauerstofftransport zur Verfügung. Demzufolge kann es in nicht perfundierten Geweben zu Ischämien kommen. Fokale Ischämien können auch im septischen Schock auftreten, da hier die Blutflussverteilung nicht gleichmäßig ist (32). Während einige Areale im Herzen sehr gut durchblutet werden, werden andere kaum versorgt (33). So wurden histologische Schäden in den Herzen von endotoxämischen Hunden beobachtet (32). Die teilweise nicht mehr ausreichenden Regulationsmechanismen und die lokal auftretenden Ischämien können also neben den weiter unten erwähnten kardiodepressiven Substanzen für die kardiale Dysfunktion in der Sepsis verantwortlich gemacht werden. Experimente ergaben, dass an diesen Perfusionsstörungen in der Sepsis insbesondere Arachidonsäuremetabolite beteiligt sind.

4.4 Arachidonsäuremetabolite

Leukotriene gehören ebenso wie Thromboxan und Prostaglandine zu den Eicosanoiden, oxygenierten Derivaten der vierfach ungesättigten Eicosatetraensäure (Arachidonsäure, AA) (s. Abb. 4). Während der Sepsis kommt es, vermittelt durch Mediatoren der humoralen Kaskadensysteme, Sauerstoffradikale und Bakterientoxine zur Steigerung des Arachidonsäuremetabolismus. Die daraufhin gebildeten Metaboliten verfügen über vasoaktive Eigenschaften (34).

Leukotriene (LTs) werden über den 5-Lipoxygenaseweg gebildet. Die Lipoxygenase katalysiert die Dioxygenierung der AA zu instabilen Hydroperoxyeicosatetraenoiden (HPETE). HPETE wird mit Hilfe von Hydroperoxydassen in eine biologisch aktive Form das 5-HPETE umgewandelt. Durch Dehydrierung entsteht daraus Leukotrien A₄ (LTA₄) eine weitere Zwischenstufe, welche nun auf unterschiedlichen Wegen weiter verstoffwechselt wird. Die katalysierte Konjugation mit Glutathion führt zur Cysteinyl-Leukotrienbildung (LTC₄, LTD₄, LTE₄). Durch Hydrolyse hingegen kommt es zur intermediären 6-trans LTB₄ Form, die zu Leukotrien B₄ (LTB₄) dehydriert wird.

Thromboxan (TxA_2) wird über den Cyclooxygenaseweg gebildet. Dabei wird zuerst die Bildung von Prostaglandin H_2 (PGH_2) katalysiert, welches dann zu Thromboxan, Prostacyclin (PGI_2) und weiteren Prostaglandinen (PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$) metabolisiert wird. Es existieren zwei Isoformen der Cyclooxygenase. Die konstitutionelle Cyclooxygenase (COX-1) kommt in den meisten Geweben in einer konstanten Konzentration vor und reagiert direkt auf physiologische Reize. Die Produktion der induzierbaren Cyclooxygenase (COX-2) hingegen wird erst durch verschiedene Stimuli wie Ischämie, Inflammation oder Sepsis aktiviert. Ein Nachweis der COX-2 gelang in unterschiedlichen Geweben, unter anderem im Herzen (36-38).

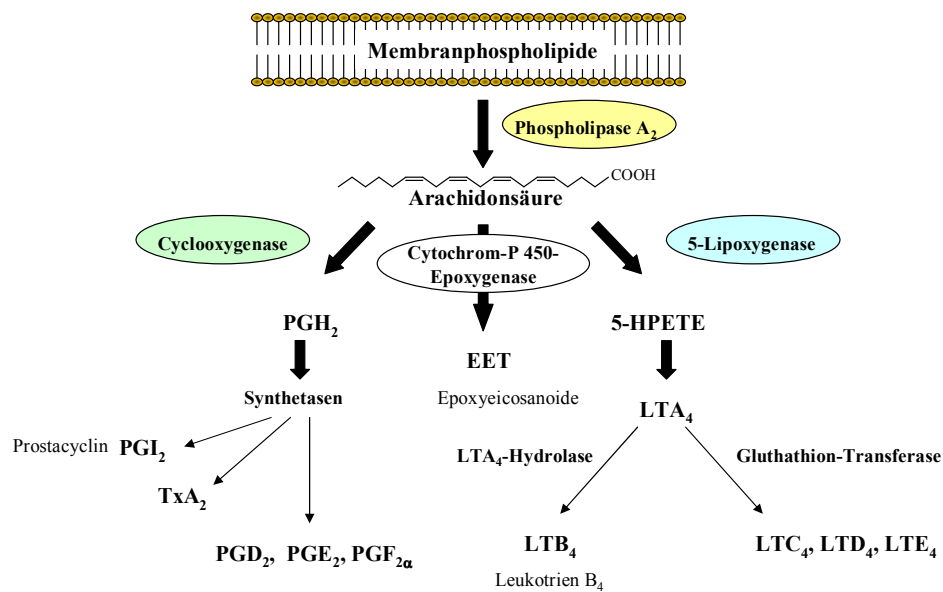


Abb. 4: Schematik des Arachidonsäuremetabolismus. Wird die Arachidonsäure durch Cyclooxygenase oxidiert entstehen Thromboxan (TxA_2) und Prostaglandine (PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$). Bei Oxidation durch Lipoxygenase kommt es zur Leukotrienbildung (LTC_4 , LTD_4 , LTE_4). Abbildung modifiziert nach (35).

Die Epoxyeicosatriensäuren (EETs) werden über den Cytochrom-P450-Epoxygenaseweg gebildet. Sie wurden das erste Mal vor 20 Jahren beschrieben. Es sind vier regioisomere, primäre Epoxidationsprodukte bekannt: 5,6-, 8,9-, 11,12-, and 14,15-EET (39). Die EETs nehmen neben ihrer Entgiftungsfunktion in der Leber unter anderem auch im kardiovaskulären System einige wichtige Funktionen wahr. So verfügen vor allem die häufig vorkommenden CYP 2J2 Isoformen, die im kardiovaskulären System im Endothel, in glatten Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten exprimiert werden, über gefäßprotektive Effekte. Diese umfassen unter anderem die Inhibition des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors $\text{NF-}\kappa\text{B}$, Schutz vor ischämischen Gewebsschädigungen und vor reaktivem Sauerstoff, Verminderung

der Gefäßmuskelmigration und Verstärkung der Fibrinolyse (39). Neben der CYP 2J wird auch die CYP 2C Familie im Endothel exprimiert, beide Familien verfügen über vasodilatierende Wirkung, die durch endotheliale Hyperpolarisation herbeigeführt wird. Außerdem bewirkt die CYP 2C9 Isoform Endothelzellproliferation und Angiogenese (40).

4.4.1 Leukotriene

Entgegen früherer Meinungen sind LTs nicht ausschließlich Produkte der weißen Blutzellen, sondern werden u. a. auch von Pulmonal- und Koronararterien synthetisiert. (41) Die Bildung von Cysteinyl-Leukotrienen (Cys-LTs) konnte im Herzen in endothelassozierten Leukozyten, Monozyten und Mastzellen nachgewiesen werden (42-44). Während Leukotrien B₄ als Aktivator der leukozytären Migration agiert und somit chemotaktisch zu einer Ansammlung von polymorphkernigen Granulozyten führt, handelt es sich bei den Cys-LTs um potente Vaso- und Bronchokonstriktoren (45-47). Durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität in Verbindung mit einer betont postkapillären Vasokonstriktion kann es zu Plasmaexsudation und Ödemformation kommen (48). LTC₄ und LTD₄ üben den stärksten vasokonstriktorischen Effekt auf die Koronararterien aus. Dies konnte sowohl in Versuchen an isolierten Herzen von Ratten, Katzen und Meerschweinen, als auch durch LTC₄ und LTD₄ Injektion in die Arteria circumflexa narkotisierter Hunde gezeigt werden (49, 50). Infolge dieser Injektion sank der koronare Blutfluss im Mittel um 42%, der systemische und pulmonale arterielle Druck wurden hingegen nicht messbar beeinflusst (50). Direkt negativ inotrope Eigenschaften der Cys-LTs, wie sie in früheren Arbeiten postuliert wurden ließen sich nicht eindeutig bestätigen, besonders da an isolierten Kardiomyozyten keine direkten Effekte nachgewiesen werden konnten (49). Heute geht man von einer negativen Beeinflussung der Kontraktilität in Folge der koronaren Vasokonstriktion aus (44, 49, 51).

4.4.2 Thromboxan

Die Synthese von TxA₂ konnte im Herzen in den koronaren Endothelzellen und in der glatten Gefäßmuskulatur gezeigt werden (52-54). TxA₂ wirkt neben seinem thrombozytenaggregationsfördernden Effekt hauptsächlich als hochpotenter Broncho- und Vasokonstriktor, zusätzlich steigert es die endotheliale Gefäßpermeabilität. Das hauptsächlich von Endothelzellen freigesetzte PGI₂ hingegen hat neben der Verminderung der endothelialen Permeabilität einen vasodilatativen Effekt (52, 53, 55-

58). Nachweislich bestehen während der Sepsis erhöhte Plasmaprostanoidspiegel. In diesem Zusammenhang lässt sich eine direkte Beziehung zwischen der nachgewiesenen TxA_2 Menge und der Schwere des Verlaufs sowie der Mortalität herstellen. PGI_2 kommt über den vasodilatativen Effekt wahrscheinlich eine protektive Rolle zu (34). Am isolierten septischen Rattenherzen werden sowohl TxA_2 als auch PGI_2 freigesetzt. Allerdings werden die vasodilatativen Effekte von PGI_2 auf die Koronargefäße durch die vasokonstriktive Wirkung von TxA_2 mehr als kompensiert. Man nimmt an, dass TxA_2 durch eine Verengung der Koronargefäße eine Abnahme der Kontraktilität am isolierten, septischen Rattenherz auslöst (52). Zusätzlich vermutet man eine parakrine Förderung der $\text{TNF-}\alpha$ -Produktion durch TxA_2 . Erwiesenermaßen resultiert eine bakterielle Stimulation des Herzens neben einem Anstieg der $\text{TNF-}\alpha$ -Produktion über eine COX-2 -Induktion in einer gesteigerten TxA_2 -Synthese. Durch Hemmung dieser TxA_2 -Synthese mit COX beziehungsweise COX-2 Inhibitoren respektive den Einsatz von TxA_2 -Rezeptorantagonisten kann die $\text{TNF-}\alpha$ -Produktion sowie die damit assoziierte Kardiodepression reduziert werden (59). Eine Minderung einer endotoxinämisch bedingten Funktionsstörung des Herzens konnte bei Schafen ebenfalls durch TxA_2 -Synthesehemmung bewirkt werden (60).

4.5 Kardiodepressive Substanzen

Das Konzept der malignen zirkulierenden „Humoren“, die herzscheidend wirken, existiert seit der griechischen Antike (61). Es hielt sich durch die Zeiten des Mittelalters bis ins 17. and 18. Jahrhundert. In der modernen Medizingeschichte wurde es von Wiggers 1947 wieder aufgegriffen und 1966 dokumentierten Brand und Lefer einen solchen myokardial depressiven Faktor (MDF) im Blut von Katzen, welche an einem hämorrhagischen Schock litten. (62, 63) Es wurden viele verschiedene Modelle genutzt, um MDF im Serum oder Plasma von Patienten, die an einem septischen Schock litten, zu identifizieren (15, 64-73).

Die Liste der endogen produzierten inflammatorischen Mediatoren, welche potentiell an der septischen myokardialen Depression beteiligt sein können, ist lang und umfasst u. a. Arachidonsäuremetabolite, sowohl Cyclooxygenaseprodukte worunter Thromboxan und die Prostaglandine (75) fallen, als auch Lipoxygenaseprodukte beispielsweise die Leukotriene (75-78). Daneben spielen auch der Plättchen aktivierende Faktor (PAF) (79-83), Histamin (84) und Endorphine (85) eine Rolle. Zytokine sind bei Patienten mit

Sepsis und septischem Schock erhöht. Zytokine welche kardiodepressiv wirken können, sind u. a. Gamma-Interferon (γ -IFN) (15, 86-90) und Interleukine (15, 91-94). Der „Transforming Growth Factor- β “ (TGF- β) (95-101) ist ein Zytokin, welches der Kardiodepression entgegenwirken kann, beziehungsweise bestimmte Effekte einiger oben aufgeführter Mediatoren antagonisieren. Die Mediatoren, denen die größte kardiodepressive Potenz zugemessen wird, gehören ebenfalls zur Gruppe der Zytokinen; es sind TNF- α und IL-1 β (15).

4.5.1 TNF- α

TNF- α wurde in erhöhten Konzentrationen in der humanen Sepsis und im septischen Schock nachgewiesen (86, 102-105). Analog dazu konnten nach Endotoxingabe, neben den für Sepsis und septischen Schock typischen kardiovaskulären und metabolischen Störungen, erhöhte TNF- α -Werte beobachtet werden (106-108). Die Applikation von rekombinantem TNF- α führt in Tiermodellen zu Fieber, Laktatazidose, disseminierter, intravaskulärer Gerinnung, Lungenödem und sogar Tod (109-112). Außerdem bewirkt eine TNF- α Gabe sowohl beim Tier als auch beim Menschen ein der septischen Kardiomyopathie ähnelndes klinisches Bild mit Blutdruckabfall, erhöhtem Herzminutenvolumen und allgemeinem systemischem Gefäßwiderstandsabfall (108, 113-117). Eichenholz et al. konnten dies über Radionuklid Ventrikulographie mit einem Pulmonalarterienkatheter bei Hunde nach TNF- α Gabe nachweisen. Dosisabhängig zeigten sich hier die gleichen kardiovaskulären Veränderungen wie bei Menschen im spontanen, beziehungsweise bei Hunden im experimentellen septischen Schock (109, 113, 116). Mäuse und Kaninchen, die vor einer entsprechenden Exposition mit TNF- α -Antikörpern behandelt wurden, waren somit vor einem endotoxischen Schock geschützt (117, 118).

Die Bildung von TNF- α erfolgt auch im Myokard selber, dies zeigte die Konfrontation von isolierten Katzen- beziehungsweise Rattenherzen und Katzen- sowie Rattenkardiomyozyten mit Endotoxin (59, 119-121). Dabei wird eine durch LPS verursachte verstärkte Bildung von TNF- α durch Kardiomyozyten zumindest partiell durch CD-14 Rezeptoren vermittelt (122, 123).

TNF- α wirkt innerhalb von zwei unterschiedlichen Zeitfenstern kardiodepressiv (s. Abb. 5). Ein besonders schnelles Ansprechen auf TNF- α zeigt sich *in vitro* an Kardiomyozyten innerhalb von Minuten, aber auch *in vivo* Studien mit Hunden bestätigen einen Wirkungseintritt innerhalb von Stunden (15, 113, 124, 125). Im Gegensatz dazu sind ebenfalls verzögerte und lang anhaltende depressive Effekte auf

myokardiales Gewebe beschrieben. Hier setzt die Wirkung erst nach Stunden ein und hält für Tage an (126-129). Analog dazu kann *in vivo* das Andauern des kardiodepressiven Effektes über mehrere Tage bis hin zu Wochen mit einem Wirkmaximum 48 Stunden nach Applikation beobachtet werden, dies besonders im Hinblick auf die relativ kurze Halbwertszeit von TNF- α (109, 113, 130). Der kardiodepressive Effekt von TNF- α geht auf eine reversible Schwächung der Kontraktilität der Kardiomyozyten über eine Beeinflussung sowohl der Calciumfreisetzung als auch Calciumsensitivität zurück (131).

Der frühe Wirkungseintritt scheint Sphingosin vermittelt zu sein, da es nur wenige Minuten nach TNF- α Stimulation in großen Mengen in den Kardiomyozyten produziert wird. Dies geschieht durch eine TNF- α bedingte Aktivitätssteigerung der Sphingomyelinase, die dann vermehrt Sphingomyelin in Ceramid umwandelt. Dieses wird zu Sphingosin metabolisiert, welches direkt die intrazelluläre Calciumfreisetzung hemmt. Gezeigt wurde dieser Mechanismus zum einen an Kardiomyozyten, zum anderen am isolierten Rattenherzen (132-134). Eine spezifische Hemmung der Ceramidase und damit der Umwandlung von Ceramid zu Sphingosin hebt die TNF- α ausgelösten negativ inotropen Effekte fast vollständig auf (133, 135).

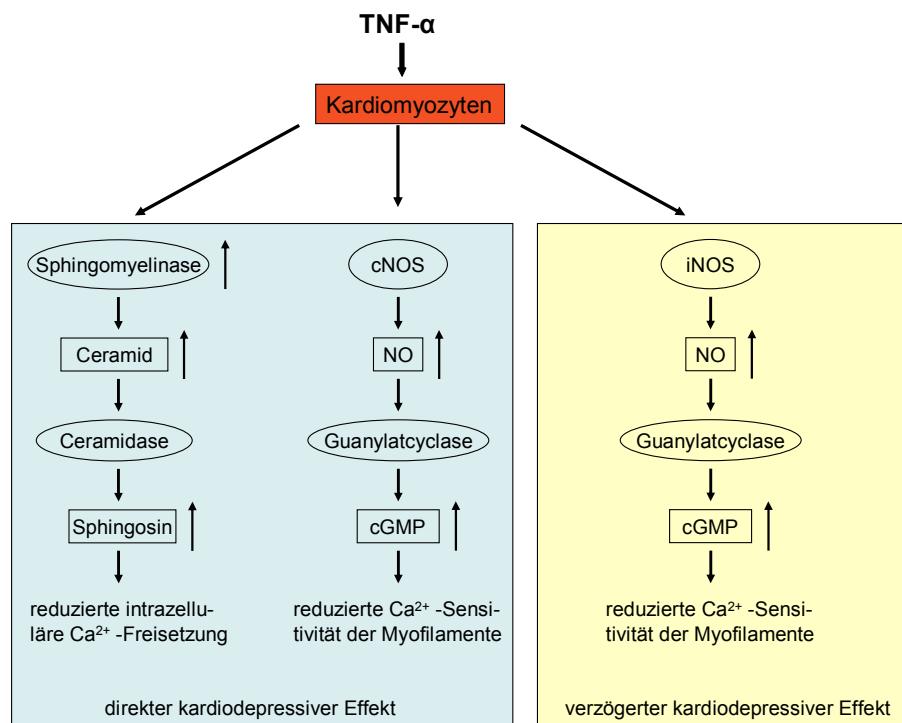


Abb. 5: Schematische Darstellung des kardiodepressiven Effekts von TNF- α auf das Herz. Beschreibung siehe Text.

Die protrahierten Calciumsensibilitätsstörungen durch TNF- α sind vor allem durch NO vermittelt. Über eine Stimulierung sowohl der konstitutionellen, als auch der induzierbaren NO-Synthase (cNOS / iNOS) bewirkt TNF- α eine gesteigerte NO-Produktion im Herzen (136-139). NO seinerseits stimuliert die Guanylatzyklase (GC) in den Kardiomyozyten und wirkt vasodilatativ in den Koronargefäßen. Die Aktivierung der GC resultiert in einem cGMP-Anstieg wodurch eine Desensibilisierung der Myofilamente gegenüber Calcium erfolgt. Die Expression der iNOS mit anschließender NO-Produktion nimmt mehrere Stunden in Anspruch und führt daher erst nach längerer TNF- α Exposition zur Störung der intrazellulären Calciumhomöostase und damit zu Kontraktilitätsstörungen (133). Die Tatsache, dass schon nach wenigen Minuten durch erhöhte NO-Produktion bedingte Kontraktilitätsstörungen beobachtet werden können, deutet zusätzlich auf eine Beteiligung einer frühen, cNOS vermittelten Kardio-depression bei der Genese der akuten, septischen Kardiomyopathie hin (136, 137).

4.6 Bakterientoxine

Bei vielen septischen Patienten sind nur geringe Bakterienmengen sowohl im Blut als auch im Gewebe nachweisbar. Daraus lässt sich schließen, dass eher die mikrobiellen Toxine sowie die durch sie induzierten Mediatoren als die intakten Bakterien selbst für klinische Veränderungen der Sepsis verantwortlich sind. Dies zeigt sich unter anderem durch systemische Beeinträchtigungen wie Organdysfunktionen, welche durch die Streuung von mikrobiellen Toxinen aus einem infektiösen Fokus hervorgerufen werden (140-142).

Bakterientoxine werden grundsätzlich in zwei Gruppen unterteilt: Endo- und Exotoxine. Bei den Endotoxinen und deren gram-positiven Verwandten handelt es sich um strukturelle Zellwandbestandteile, welche erstmals vor über hundert Jahren von Richard PEIFFER, einem Mitarbeiter Robert KOCHs, isoliert wurden. Diese Endotoxine werden nicht aktiv sezerniert, sondern erst beim Zelluntergang freigesetzt. Dies ist besonders bedeutsam im Hinblick auf die als Komplikation einer Antibiotikatherapie auftretende HERXHEIMER-Reaktion. Ihre Wirkung beruht hauptsächlich auf der Stimulierung überschießender Zellantworten mit exzessiver Zytokinfreisetzung (143, 144).

Im Gegensatz dazu werden Exotoxine üblicherweise aktiv von Bakterien sezerniert. Eine Unterteilung dieser proteinösen Toxine in drei Untergruppen ist möglich: In der ersten Gruppe sind die intrazellulär aktiven Toxine mit eigener Enzymaktivität wie zum Beispiel Botulinus- oder Tetanustoxin zusammengefasst. Die zweite Gruppe besteht aus

Superantigenen, welche hauptsächlich durch eine T-Zellrezeptor vermittelte, exzessive Zytokinausschüttung wirken. Zusätzlich sind auch direkte Effekte auf die Endothelbarriere beschrieben (145). Die dritte Gruppe schädigt die Zellmembran entweder durch enzymatische Aktivität oder Porenbildung, welche zur Lyse der Zelle führen kann. Zu dieser Gruppe zählt die Mehrheit der an der humanen Sepsis beteiligten Bakterien und eben diese Toxine stellen ein wesentliches pathogenes Prinzip dar (140).

4.6.1 Lipopolysaccharide

Das Endotoxin LPS ist ein Glykolipidkomplex, der zum einen aus einem biphosphoryliertem Lipid (Lipid A) und zum anderen aus einer Polysaccharidregion besteht. Der Polysaccharidanteil wird unterteilt in einen Oligosaccharidkern, bestehend aus einer äußeren und einer inneren Kernregion, und einer Polysaccharidkette, welche sich aus sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten zusammensetzt, der O-spezifischen Kette (s. Abb. 6). Die LPS-Moleküle bilden die äußere Schicht der gram-negativen Zellhülle, ihr Gewicht liegt zwischen 2 kDa und 20 kDa (144, 146).

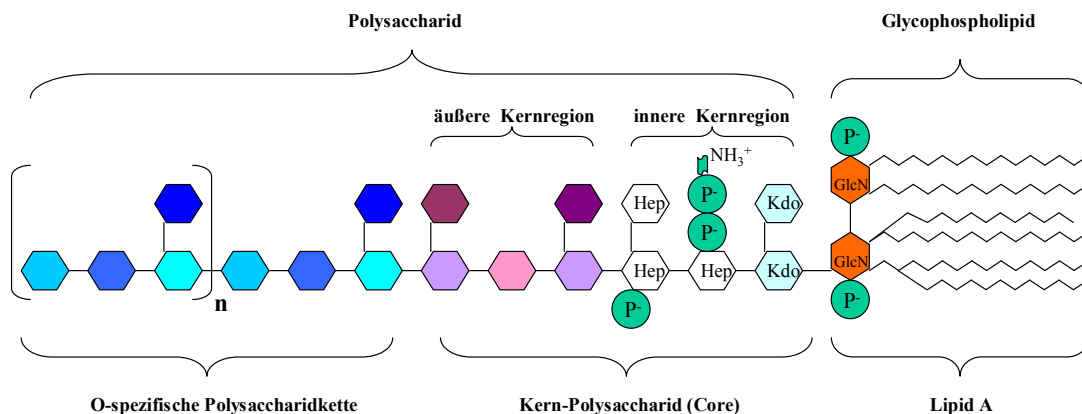


Abb. 6: Schematischer Aufbau der chemischen Struktur von enterobakteriellem LPS. Abkürzungen: GlcN: Glykosamin; Hep: L-glycero-D-manno-Heptose; Kdo: 2-Keto-3-desoxyoctonsäure; P: Phosphat; Zickzacklinie: Fettsäuren. Abbildung nach Caroff et al. (146).

Das Lipid A stellt den höchst konservierten Anteil des LPS-Moleküls dar. Es besteht aus zwei Glukosaminzuckern, wobei jeder eine Phosphatgruppe sowie Ester- und Amidgebundene Fettsäuren trägt. Trotz der hohen Konservierung gibt es Variationen der Fettsäuren und des Grads der Phosphorylierung. Der Nachweis von Endotoxin im Serum von Patienten mit gram-negativer Sepsis deutet auf eine Beteiligung von LPS am Krankheitsgeschehen hin (102, 147, 148). Die kardiodepressive Wirkung von LPS ähnelt dem Krankheitsbild der septischen Kardiomyopathie und lässt sich durch LPS-

Applikation sowohl im Tiermodell als auch am Menschen simulieren (109, 149). Endotoxin vermindert die Kontraktilität wie am isolierten Herzen und an Kardiomyozyten nachgewiesen wurde (59, 150-152). Da die Bioaktivität von isoliertem Lipid A der von intaktem LPS entspricht, ist das Lipid A als die biologisch aktive Komponente anzusehen (144).

Die Bindung von LPS an endotheliale Zellen erfolgt über CD14, ein wichtiges LPS-Rezeptormolekül (153). CD14 wird von Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen exprimiert, nicht aber von Endothelzellen. Zur Aktivierung von Endothelzellen durch LPS wird das von Monozyten freigesetzte lösliche CD14 (sCD14) benötigt, welches üblicherweise im Blut enthalten ist (154, 155). Die Bindung von LPS an CD14 wird durch das akute Phase Protein LPS-binding-protein (LBP) erleichtert, dessen Konzentration während einer Entzündung um das 20 fache ansteigen kann (156-159).

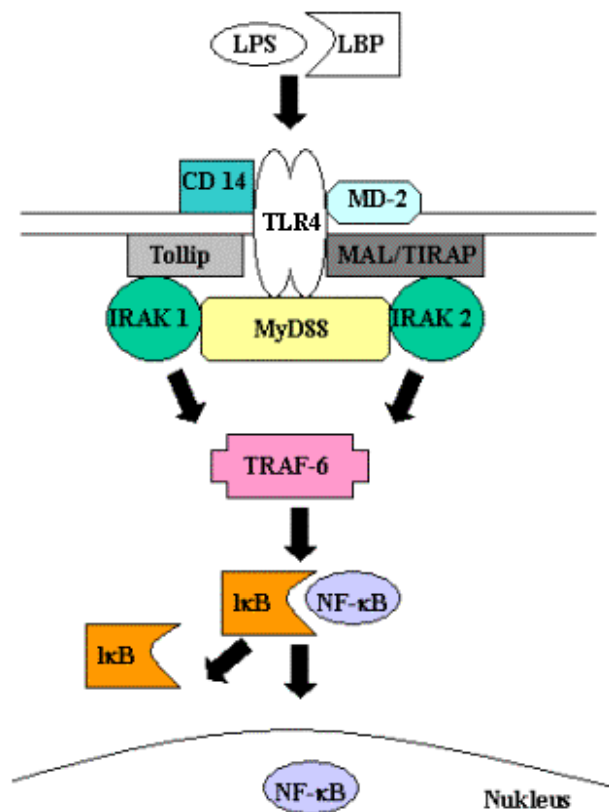


Abb. 7: Angenommener Signalweg von LPS in Endothelzellen. Abb. nach (144).

Man nimmt an, dass nach der Bindung an CD14 ein so genannter Toll-like Rezeptor (TLR) das Signal ins Zellinnere weiter leitet (144). Dadurch kommt es zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Proteine (Tollip, MAL/TIRAP, MyD88), die ihrerseits den Adapter für IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinasen (IRAK) bilden und diese zur

Autophosphorylisierung anregen, wodurch der Tumornekrosefaktorrezeptor-assoziierte Faktor 6 (TRAF6) aktiviert wird (160-163). Dieser führt schließlich durch seine Interaktion mit Elementen der I κ B/NF- κ B Familie zur Überführung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Kern, der dort an die DNA bindet (s. Abb. 7) (162, 164). Dadurch kommt es zur transkriptionalen Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL1, IL6 und IL8 sowie der Induktion von prokoagulatorischen Gerinnungsfaktoren und Adhäsionsmolekülen. Des Weiteren bewirkt LPS eine Ausschüttung vasoaktiver Moleküle und Störungen in der endothelialen Barriere (165, 166).

4.6.2 *Escherichia coli* Hämolyisin

In den achtziger Jahren des vorigen Jahrhunderts wurden erstmals porenbildende Bakterientoxine identifiziert, unter anderem auch das *Escherichia coli* Hämolyisin (ECH) (167). Heute weiß man, dass nahezu alle klinisch relevanten Sepsiserreger diese Art Toxin sezernieren.

ECH repräsentiert den Prototyp einer strukturell sowie funktional verwandten Gruppe von Kalzium abhängigen, mikrobiellen Toxinen, den RTX-Toxinen („repeats in toxins). Die strukturelle Verwandtschaft ist durch eine Region hoch konservierter sich wiederholender Aminosäuren bestimmt, welche ähnlich gebaut auch in den Toxinen von weiteren klinisch relevanten Bakterien wie *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii* und *Actinobacillus spp.* nachzuweisen sind (168). Bei circa 50% aller extraintestinalen, *E.coli* bedingten Infektionen beim Menschen, kann in daraus isolierten Bakterienkulturen ECH-Produktion nachgewiesen werden. ECH ist ein Einzelstrangpolypeptid mit einem Gewicht von 107 kDa.

Das Exotoxin wird als hydrophiles Monomer freigesetzt und bindet im Fall des ECHs vermutlich über nicht spezifische Absorption an die Lipiddoppelmembran der Zielzelle, wobei sämtliche Säugetierzellen für das Toxin empfänglich sind. An die Membran angedockt ändert sich der hydrophile in einen amphiphilen Zustand um in die Membran integriert zu werden. Viele Exotoxine, wie z.B. *Staphylococcus aureus* α -Toxin, bilden Poren durch Oligomerisierung, wobei die für Insertation und Aggregation benötigte Energie durch die Oligomerisierung selbst gewonnen wird. Für ECH ist der Mechanismus der Oligomerisierung unklar, möglicherweise werden hier Poren aus einzelnen Monomeren gebildet. Diese Poren weisen eine mittlere Größe von 2 nm auf,

welche die Passage von Calcium und Nucleotiden wie ATP und GTP, nicht aber Proteinen ermöglicht (144, 167, 169, 170).

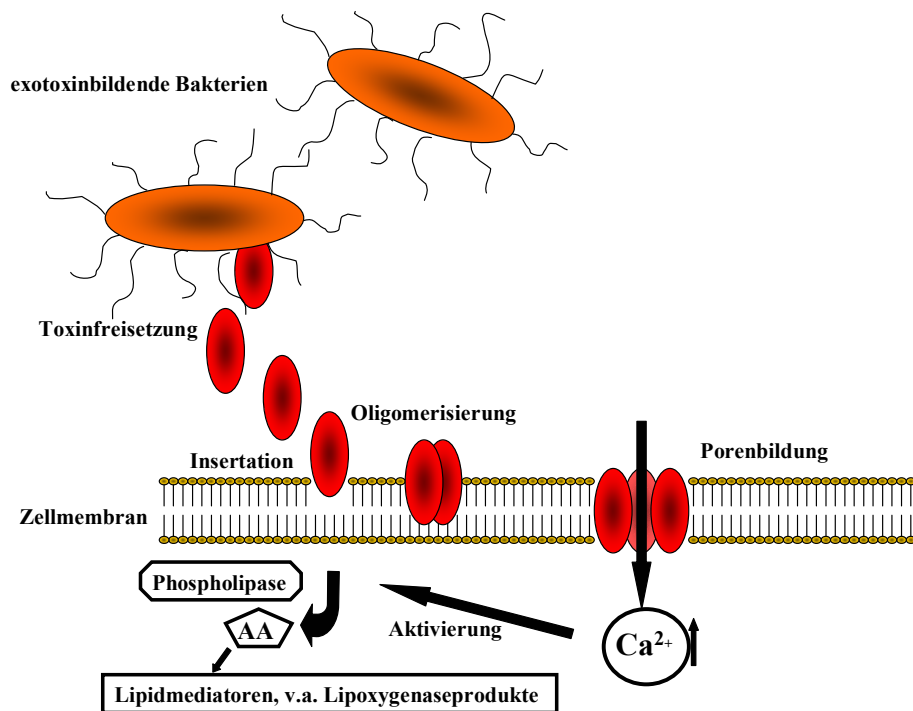


Abb. 8: Porenbildung durch ECH: Das Toxin wird als Monomer freigesetzt und bindet unspezifisch an der Doppellipidmembran. Erst kommt es zur Amphiphilierung, danach möglicherweise zur Oligomerisierung. Die Oligomerisierung ist für ECH nicht nachgewiesen, möglich ist auch die Porenbildung aus einem Monomer. Nach erfolgter Porenbildung führt der passive Ca^{2+} -Influx zur Lipidmediatorenfreisetzung. Abb. modifiziert nach Grandel et al. (144).

Der passive Kalziuminflux kann zu sekundären Zellaktionen, beispielsweise einer gesteigerten Lipidmediatorproduktion führen, wobei insbesondere Lipoxygenasemetabolite vermehrt anfallen (s. Abb. 8) (170-173).

In einigen Fällen bewirkt die Bindung von ECH an seine Zielzelle die Auslösung G-Protein-abhängiger, sekundärer Zellreaktionen unabhängig von seiner porenbildenden Eigenschaft (s. Abb. 9) (174, 175). Außerdem konnte eine ECH induzierte, endotheliale Schrankenstörung mit interzellulärer Spaltbildung nachgewiesen werden (173). Die pathogene Relevanz von ECH wurde *in vitro* sowie im Tierversuch nachgewiesen. So zeigten Mäuse, denen lebende *E.coli* injiziert wurden, eine signifikant höhere Mortalität bei hämolysinbildenden Stämmen im Vergleich zu nicht hämolysierenden *E.coli* (176). Am isolierten Rattenherzen konnten Sibelius et al. eine drastische Erhöhung des koronaren Perfusionsdrucks (CPP) sowie eine Beeinträchtigung der Pumpfunktion nach ECH-Applikation zeigen. Beide Effekte sind durch eine gesteigerte

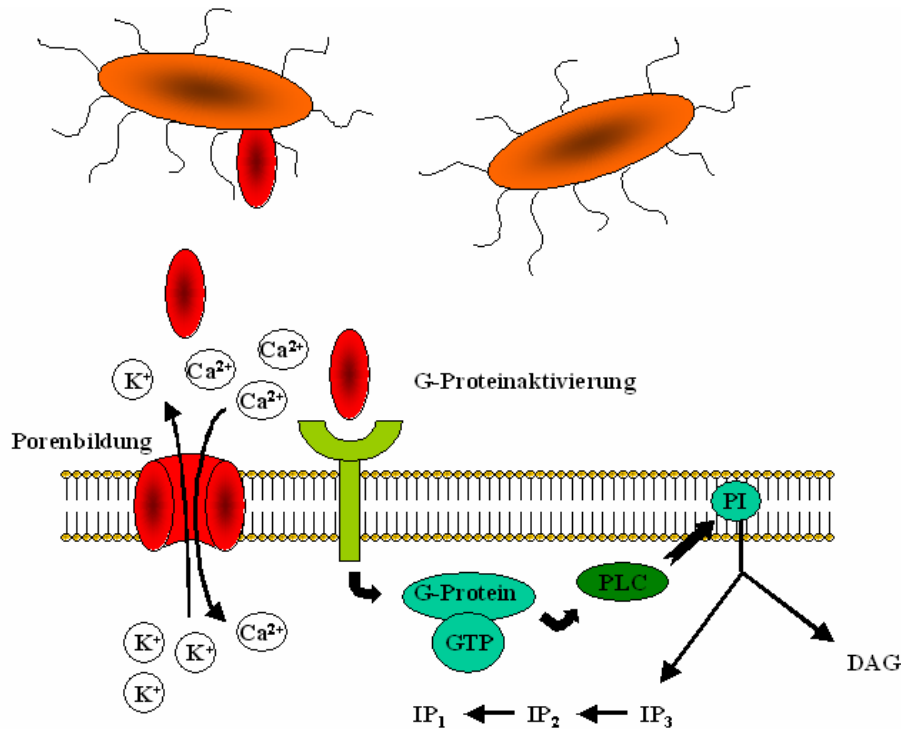


Abb. 9: Durch G-Proteinaktivierung kann ECH sekundäre Zellreaktionen auslösen. So kommt es über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zu Hydrolyse von Phosphatidylinositol, daraus resultiert eine Akkumulation von Inositolphosphaten (IP₁₋₃) und Diacylglycerol (DAG). Abb. modifiziert nach Grandel et al. (144).

Lipoxygenasefunktion mit nachfolgend erhöhter Leukotriensynthese bedingt (51). Auf Grund der hohen Assoziation von ECH-Produktion und Erkrankung kann beim Menschen eine analoge Rolle postuliert werden (166, 177).

4.7 Phosphodiesterasen

Phosphodiesterasen (PDEs) sind wichtige Enzyme im Signalweg der zyklischen Nukleotide. Durch so genannte „first messengers“ wie NO, Peptide, Neurotransmitter und Bakterientoxine (z.B. von *E.coli*) werden zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) vermittelte „second messenger“ Mechanismen ausgelöst (s. Abb. 10) (178, 179). Dabei regulieren cAMP und cGMP höchst unterschiedliche Prozesse in den verschiedensten Geweben. So ist cAMP beispielsweise sowohl in den Cholesterinstoffwechsel in der Leber, als auch in die Entspannung der glatten Muskulatur in den Atemwegen involviert (180, 181). cGMP hingegen nimmt unter anderem eine Schlüsselstellung in der Signalverarbeitung der retinalen Photorezeptorzellen ein (182). Für die vorliegende Arbeit von besonderer

Bedeutung ist die Tatsache, dass cGMP die Kontraktilität von glatten Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten reguliert (183).

Es stellt sich die Frage, wie zwei so kleine und einfach strukturierte Moleküle eine so große Aktionsspezifität und Funktionsdiversität bereitstellen können. Interessant ist auch wie sowohl sehr langsame als auch sehr schnelle Prozesse durch die gleichen Mechanismen ausgelöst werden können.

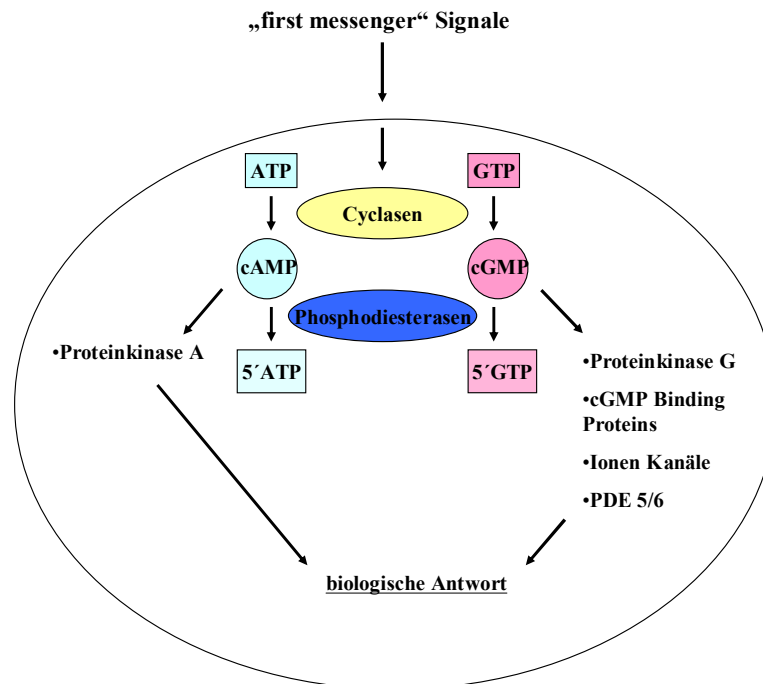


Abb. 10: Rolle der PDEs in der Signaltransduktion durch zyklische Nucleotide: Intrazelluläre cAMP/cGMP Konzentrationen werden über Adenylat- und Guanylatzyklasen, welche die cAMP-beziehungsweise cGMP-Bildung katalysieren sowie über die PDEs, die die Hydrolyse der zyklischen Nucleotide katalysieren reguliert. Abb. nach Manganiello et al. (189).

Der Schlüssel liegt in der Vielzahl der verschiedenen Isozyme für die Nucleotidsynthese (2-3 Zyklasten/Zelltyp) und den Nucleotidabbau (3-4 PDEs/Zelltyp) sowie deren möglichen Kombinationen. Dabei regeln die PDEs durch Hydrolyse die intrazelluläre cAMP und cGMP Konzentration und damit die biologische Antwort auf diese Signalmoleküle (178, 179, 184, 185).

PDEs werden in 11 Familien (PDE1-11) unterteilt, von denen einige mehrere Proteine (z.B. PDE 4A, B, C, D) enthalten (s. Abb. 11). Wobei jede PDE durch alternatives „splicing“ und variable Transkriptionsstartpunkte zahlreiche alternierende Botenribonucleinsäuren (mRNAs) kodieren kann (184).

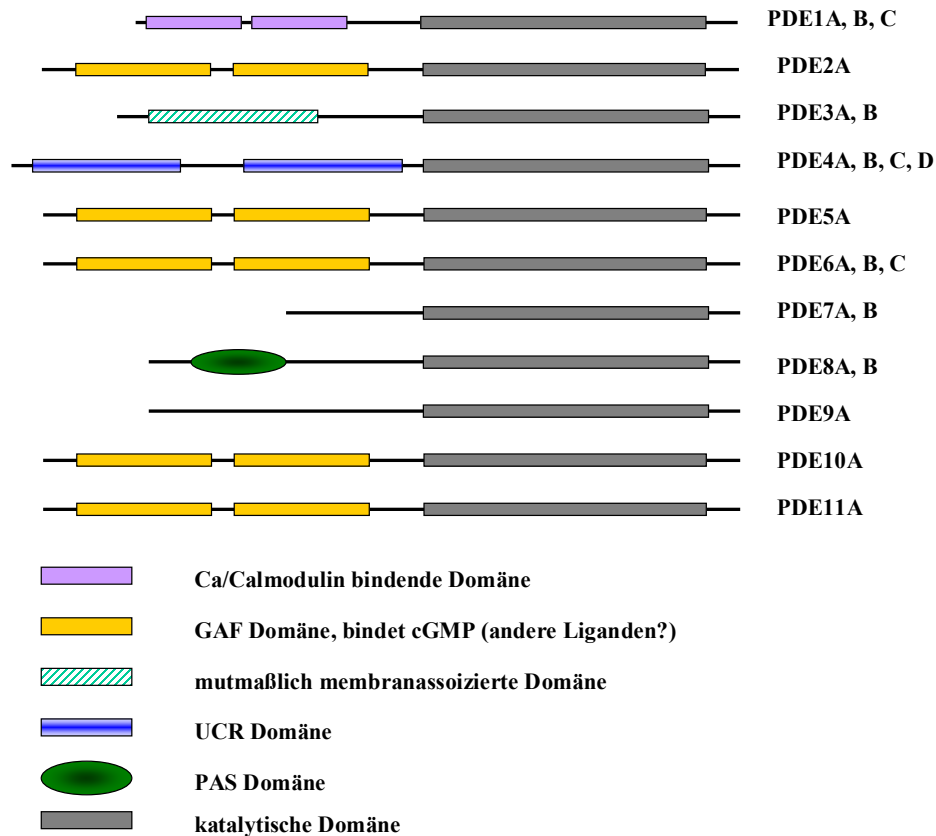


Abb. 11: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus der einzelnen PDE-Familien. Die Abkürzungen ergeben sich aus den Initialen der Mitglieder der korrespondierenden Gruppen: GAF: cGMP-regulierte PDEs, zahlreiche Adenylzyklasen, und FhlA; PAS: Per, ARNT, und Sim Proteine. UCR steht für upstream conserved region. Abbildung nach Rybalkin et al. (184).

Der Aufbau der einzelnen PDEs ist modular, wobei die katalytische Domäne nahe dem Carboxyl-Terminus, die regulatorische hingegen nahe dem Amino-Terminus lokalisiert ist (186, 187). Sämtliche PDEs haben signifikante Übereinstimmungen in der katalytischen Domäne, variieren jedoch stark in der regulatorischen (184). Dabei werden die katalytischen Eigenschaften durch Bindung diverser Stoffe an der regulatorische Domäne aktiviert respektive inhibiert. So wird PDE5 beispielsweise durch cGMP Bindung aktiviert, PDE3 jedoch inhibiert; PDE1 hingegen wird durch Ca^{2+} /Calmodulin Bindung stimuliert (184, 188). Auch die Substrataffinität variiert, während einige nicht selektiv sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysieren (PDE1, 2, 3, 10, 11) sind andere nur am cAMP- (PDE4, 7, 8) beziehungsweise cGMP-Abbau (PDE5, 6, 9) beteiligt (181-183). Ein weiterer Spezifikationsfaktor ist die Verbreitung im Körper. PDEs kommen in unterschiedlichen Konzentrationen im gesamten Körper vor, wobei die einzelnen Familien verschiedene Zelltypspezifitäten besitzen, darüber hinaus unterscheiden sich auch die verschiedenen Proteine einer Familie in ihren

Prädilektionszellen. Zudem gibt die reine Präsenz einer PDE in einem bestimmten Zelltyp keine Auskunft darüber, ob sie am Zellmetabolismus beteiligt ist (188, 190).

Interessant für die Signaltransduktion im kardiovaskulären System sind :

| | | |
|---|---|---|
| in den Kardiomyozyten: | in der glatten Gefäßmuskulatur: | in den Gefäßendothelzellen: |
| <ul style="list-style-type: none"> • PDE1A,C • PDE2A, A2 • PDE3 • PDE4A,B1-3,D1-3 | <ul style="list-style-type: none"> • PDE1A, B • PDE3A, B • PDE5A • (PDE4) | <ul style="list-style-type: none"> • PDE1(C) |

(188)

4.7.1 Phosphodiesterase 5

Die PDE5 Familie besteht aus einem einzigen Protein (PDE5A), das drei unterschiedliche Isoformen (PDE5A1-3) kodiert. Die Isoformen unterscheiden sich nur in ihrer Amino-Terminussequenz. PDE5A1 und PDE5A2 kommen in zahlreichen Geweben vor, unter anderem Gehirn, Lunge, Thrombozyten, glatter Gefäß- und Viszeralmuskulatur sowie den Nieren. PDE5A3 ist spezifisch in der glatten Muskulatur lokalisiert (191, 192). PDE5 metabolisiert cGMP, einen second messenger des NO sowie ein Mediator der glatten Muskelrelaxation und der Vasodilatation (193). Die cGMP-spezifische PDE5 ist ein Homodimer, jede Untereinheit besteht aus 875 Aminosäuren. Allerdings hat eine monomere, nur aus einer 375 Aminosäuren enthaltenden katalytischen Domäne bestehende PDE5-Mutante gezeigt, dass weder Dimerisation noch die Interaktion von regulatorischer und katalytischer Domäne für die katalytische Aktivität notwendig sind (194). Die aminoterminalständige, regulatorische Domäne beinhaltet eine Phosphorylierungsstelle (Ser⁹²), die entweder durch Proteinkinase A (PKA) oder Proteinkinase G (PKG) phosphoryliert werden kann. Die Phosphorylierung resultiert in einer 50-70% Enzymaktivitätssteigerung (195). Jede der PDE5 Untereinheiten enthält zwei allosterische (nicht katalytische) Bindungsstellen für cGMP deren Besetzung für die Phosphorylierung von Ser⁹² notwendig ist; außerdem steigert die cGMP-Bindung an den katalytischen Domänen die nachfolgende Besetzung der allosterischen Domänen (196). Die katalytische Domäne ist am Carboxylterminus lokalisiert und besteht aus einer cGMP-Bindungsstelle und einem „Zn binding Motif“, das über die katalytische Seite ragt. Zn²⁺ könnte an der Produktion von Hydroxylionen

(OH⁻) beteiligt sein, welche die Phosphodiesterbindung des Substrats an der 3'-Position attackieren (196, 197).

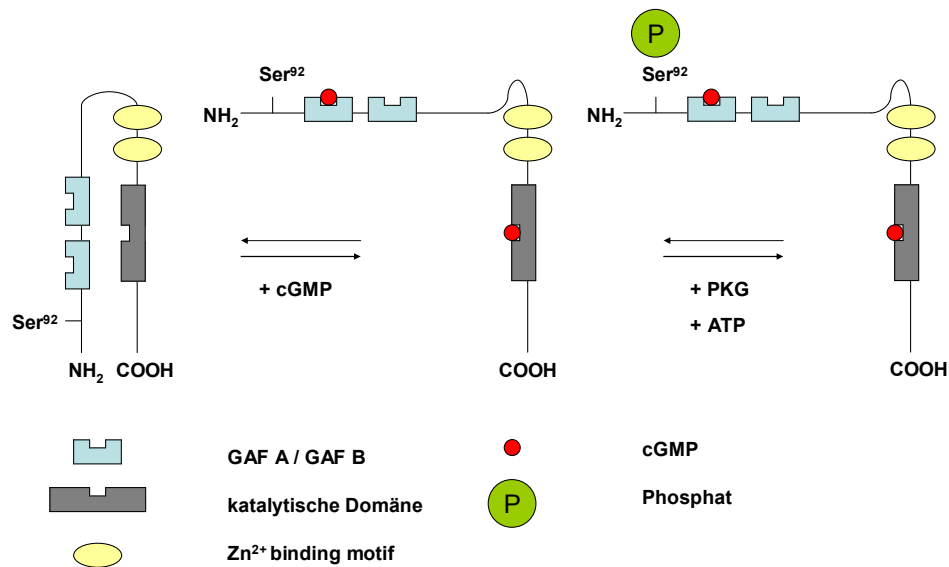


Abb. 12: PDE5 wird direkt durch die Bindung von cGMP an die GAF A (GAF: cGMP-regulierte PDEs, zahlreiche Adenylzyklasen, und FhlA) Domäne aktiviert. Nur der aktivierte Zustand wird PKA vermittelt phosphoryliert. Abb. modifiziert nach (184, 197).

Der angenommene Enzymaktivierungsablauf besteht aus einer erhöhten cGMP-Konzentration im Zytoplasma, wodurch verstärkt cGMP an die katalytische und daraus resultierend an die allosterische Bindungsstelle bindet. Dies ermöglicht die Phosphorylierung von Ser⁹² und damit eine erhöhte Enzymaktivität (s. Abb. 12) (196). Rybalkin et al. demonstrierten, dass auch eine Enzymaktivierung durch alleinige cGMP-Bindung ohne PKG vermittelte Phosphorylierung möglich sein könnte (198). Zusätzlich zeigte sich in Studien mit menschlichen Corpus cavernosum Zellkulturen, dass ein erhöhter cGMP-Gehalt über 48 Stunden zu einer gesteigerten Aktivität des PDE5-Promotergens und damit zur verstärkten PDE5-Expression führt (199). Neben der gesteigerten der PDE5- Expression und Enzymaktivität konnte an Hand von Zellkulturexperimenten eine durch hohe cGMP-Level herabgesetzte cGMP-Produktion gezeigt werden. So kommt es zu einer Reduktion der löslichen Guanylatzyklasensynthese (sGC) über PKG vermittelte Phosphorylierung der sGC (200). Die Reduzierung gesteigerter cGMP-Konzentrationen funktioniert also über mehrere Mechanismen.

4.8 PDE5-Inhibitoren

PDE5-Inhibitoren wie beispielsweise Sildenafil oder Zaprinast binden kompetitiv zu cGMP an die katalytische, jedoch nicht an die allosterische Domäne (190). Analog zu cGMP wird dadurch die Bindung von cGMP an die allosterische Bindungsstelle stimuliert, jedoch resultiert die Phosphorylierung von Ser⁹² nicht in einer Veränderung der PDE-Inhibitor-Bindung an der katalytischen Domäne (195).

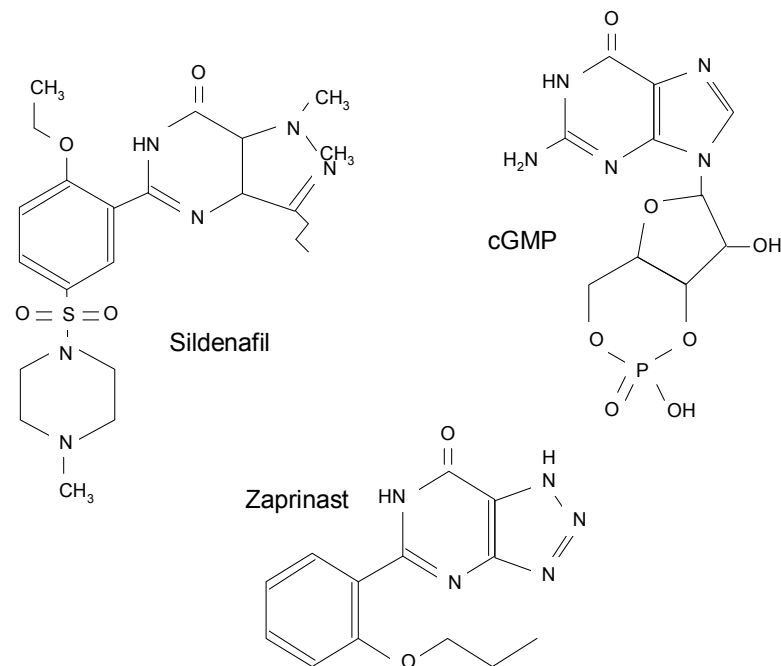


Abb. 13: Strukturformeln von Sildenafil, Zaprinast und cGMP

Es wird vermutet, dass die Aminosäuren, welche für die Bindung der Inhibitoren an die katalytische Domäne entscheiden sind, nicht vollkommen mit denen übereinstimmen, welche bei den Nukleotiden für diese Aufgabe verantwortlich sind. Es liegen gesicherte Erkenntnisse vor, dass Sildenafil und Zaprinast unterschiedliche Bindungsmuster innerhalb der katalytischen Domäne haben (201). Die Bindung von Sildenafil ähnelt stärker der des cGMP, daher könnte die höhere inhibitorische Potenz von Sildenafil gegenüber Zaprinast resultieren. (Sildenafil IC_{50} 1 nM; Zaprinast IC_{50} 130 nM; IC_{50} =Konzentration bei der die Enzymaktivität um 50% reduziert ist) Die Aminosäuren, welche für die Bindung von Sildenafil wichtig sind, finden sich allerdings auch in allen anderen Säugerphosphodiesterasen, so dass die Selektivität für PDE5 auf einen anderen individuellen Aspekt des Proteins zurückgehen muss (201).

4.8.1 Sildenafil

Sildenafil wurde 1989 im Rahmen der Entwicklung von PDE5-Inhibitoren zur Behandlung von koronaren Herzerkrankungen entdeckt. Nachdem zufällig das große Potential des Inhibitors auf dem Gebiet der erektilen Dysfunktion bemerkt wurde, erhielt Sildenafil 1998 die Zulassung für eben diese Indikation unter dem Produktnamen Viagra[™]. Neuere Erkenntnisse demonstrieren Anwendungsmöglichkeiten auf dem Gebiet der pulmonalen Hypertension. So bewirkt Sildenafil eine pulmonale Vasodilatation und führt zu einer verbesserten arteriellen Oxygenierung (202-204). Die chemische Beschreibung von Sildenafil ist 1-[[3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl]sulfonyl]-4-methylpiperazine. Es wird als Citrat vertrieben und stellt sich als kristallines weißes Pulver dar, mit einem Molekulargewicht von 666,7. Die Löslichkeit in Wasser beträgt 3,5 mg/ml (205). Sildenafil ist hochselektiv in der Inhibition der cGMP-spezifischen PDE5. Durch die Inhibition der cGMP-Hydrolyse verlängert Sildenafil die cGMP-Wirkung, daraus resultiert eine Steigerung der glatten Muskelrelaxation (187). Sildenafil galt lange als potentester Inhibitor der PDE5, mittlerweile steht mit Vardenafil ein noch stärkerer Inhibitor zur Verfügung.

Sildenafil hat keinen direkten inotropen Effekt auf Herzsegmente von Hunden oder Menschen (206). Dies bestätigte sich auch an anästhesierten Hunden, die nach Gabe therapeutisch relevanter Sildenafil Dosen keine Änderung der Herzleistung zeigten (207). Der blutdrucksenkende Effekt von Sildenafil allein ist, wenn überhaupt äußerst gering und reicht nicht zur reflektorischen Erhöhung der Herzfrequenz aus (208). Allerdings kann es in Kombination mit NO-Donoren zu einer solchen Steigerung zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks kommen (209). Besonderes Interesse kommt den Effekten von Sildenafil am Koronargefäßsystem zu. An isolierten Koronararterien von Hunden steigert Sildenafil selektiv die cGMP-Konzentration in der glatten Gefäßmuskulatur. Sildenafilkonzentrationen von 10 bis 100 nmol/l führen zu einem solchen cGMP-Anstieg. Konzentrationen über 100 nmol/l können die cGMP-Konzentration nicht weiter erhöhen. Eine Beeinflussung des cAMP-Spiegels durch Sildenafil findet nicht statt (206). In Untersuchungen am Hundemodell wurde gezeigt, dass Sildenafil zu einer Erhöhung des koronaren Blutflusses sowohl im Ruhezustand, als auch während Belastung führt (210-212).

4.8.2 Zaprinast

Zaprinast wurde während einer Studie über Xanthine als mögliche antiallergische Verbindung synthetisiert (213). Tatsächlich verfügt Zaprinast über Eigenschaften, wie Inhibition der Histaminausschüttung, des asthmainduzierten Bronchospasmus und der spasmogenen Wirkung von Histamin sowie anderen Mediatoren auf die glatte Muskulatur, die es als Therapeutikum gegen allergisches Asthma qualifizieren. Weiterführende Studien zeigten, dass Zaprinast eine selektive Inhibitorwirkung der cGMP spezifischen PDE5 in humaner Lunge, Rattenmastzellen und boviner Koronararterie besitzt. Diese ist gegenüber cGMP circa 200fach stärker ausgeprägt, als gegenüber cAMP. Außerdem verstärkt Zaprinast den relaxierenden Effekt von Nitrovasodilatoren in der Koronararterie (214-216).

Die chemische Beschreibung für Zaprinast lautet: 1,4-Dihydro-5-(2-propoxyphenyl)-7*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*d*]pyrimidine-7-one. Es ist als weißer, pulverförmiger Feststoff zu beziehen, das Molekulargewicht beträgt 271,3. Die Löslichkeit in DMSO wird mit 25 mg/ml, in Ethanol mit 5mg/ml angegeben. Zaprinast inhibiert selektiv PDE5, der Hersteller Calbiochem[®] gibt die IC₅₀ mit 450 nM an, und verstärkt darüber den vasodilatativen Effekt von NO (217).

4.9 Fragestellung

Die kardiodepressiven Effekte des gram-negativen Exotoxins ECH und des gram-negativen Zellhüllbestandteils LPS sind bekannt und schon in zahlreichen Studien reproduziert worden. Ihre Beteiligung an der Genese der Sepsis und der septischen Kardiomyopathie gilt als gesichert. Da gerade die septische Kardiomyopathie entscheidenden Einfluss auf den Ausgang der Sepsis hat, sollen in der vorliegenden Arbeit neue Erkenntnisse über eine mögliche positive Beeinflussung der toxinvermittelten Kardiodepression gewonnen werden. Die Fragestellungen waren im Einzelnen:

1. Kann die negativ inotrope Wirkung bestimmter Bakterientoxine durch den Einsatz von PDE5-Inhibitoren beeinflusst werden?
2. Haben PDE5-Inhibitoren Einfluss auf die Liberation von Zytokinen und/oder vasoaktiven Mediatoren, die an der toxinvermittelten Kardiodepression beteiligt sind?
3. Findet eine mögliche Intervention der PDE5-Inhibitoren bereits auf transkriptionaler oder posttranskriptionaler Ebene statt?

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Tiere

Alle Experimente wurden mit Wistar Ratten der Firma Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland durchgeführt. Die Ratten waren männlich und hatten ein Gewicht von 180 bis 350 g, bei einem Alter von sechs bis 12 Wochen.

5.1.2 *Escherichia coli* Hämolyisin und *Salmonella typhimurium* Lipopolysaccharid

Das gereinigte ECH wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. S. Bhakdi, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz, zur Verfügung gestellt. Prüfungen auf Endotoxinkontamination verliefen negativ. Die Konzentration des ECH wird auf Grund der Diskrepanz zwischen Proteinkonzentration und tatsächlich biologisch aktivem Toxin in hämolytischen Einheiten (HU) angegeben. Eine HU bewirkt per definitionem eine 60%ige Hämolyse einer 10%igen Erythrozytensuspension (175). Eine 60%ige Hämolyse lag bei dem Großteil der getesteten Toxinchargen bei einer Verdünnung von 1:3000 vor. Das bedeutet, dass die biologische Aktivität des ECH definitionsgemäß 3000 HU/ml beträgt.

Das LPS isoliert aus *Salmonella typhimurium* Stämmen wurde von Sigma-Alldrich mit Firmensitz in Steinheim, Deutschland, bezogen.

5.1.3 Pharmaka

Folgende Pharmaka kamen zur Anwendung:

- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma, Deisendorf, Deutschland
- Isofluran (Forene[®]), Abbott, Wiesbaden, Deutschland
- Isotone Natriumchloridlösung 0,9%, Braun, Melsungen, Deutschland
- Heparin - Natrium (Liquemin[®]), Hoffmann-La-Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
- MK-886, Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
- Pentobarbital-Natrium (Narcoren[®]), Merial, Hallbergmoos, Deutschland
- Sildenafil, Pfizer, Freiburg, Deutschland
- Zaprinast, Calbiochem, Bad Soden, Deutschland

5.1.4 Geräte und Material für die Organperfusion

Die nachfolgend aufgeführten Geräte und Materialien wurden bei der Organperfusion eingesetzt:

- AD/DA-Messkarte PCL-818Lbip, Spectra Computersysteme, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland
- Aortenkanüle (Durchmesser. innen 1,5 mm, außen 2,0 mm) und Latexballon Größe 5, Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
- Brückenverstärker, Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
- Carbogen (5% CO₂, 95% O₂), Messer Griesheim, Siegen, Deutschland
- Doppelwandiges Perfusatresevoir / Oxygenator und Organkammer aus Glas, angefertigt bei Amo-Glas, Wertheim-Dertingen, Deutschland
- Druckaufnehmer, Combi-Transducer, B. Braun, Melsungen, Deutschland
- Krebs-Henseleit-Pufferlösung, Elektrolytlösung I/3, Serag-Wiessner, Naila, Deutschland mit folgender Zusammensetzung (in mM): NaCl (125,00), Glucose (13,32), KCl (4,30), CaCl₂·2H₂O (2,40), MgCl₂·6 H₂O (1,30), KH₂PO₄ (1,10)
- Labtech Notebook[®]-Software, Pro Version 9,02, Spectra Computersysteme, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland
- Natriumhydrogencarbonat 8,4%, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland in Krebs-Henseleit-Pufferlösung (in mM): NaHCO₃ (25,00)
- Pentium Personal Computer (PC), Siemens Nixdorf, Deutschland
- Schlauchpumpe, MS-4 Reglo 8-100, Ismatec, Glattbrugg, Schweiz
- Stimulationsgerät, Stimulator P Typ 201, Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
- Teflon 3-Wege-Kupplung, Novodirect, Kehl, Deutschland
- Tygon[®]-Pumpenschläuche, Ismatec, Glattbrugg, Schweiz
- Umwälzthermostat Thermomix ME, B. Braun, Melsungen, Deutschland

5.1.5 Analytische Test-Kits

Zur Probenauswertung wurden folgende kommerziell erhältliche Test-Kits genutzt:

- cGMP RIA, Immunotech, Marseilles, Frankreich
- Cysteinyl-Leukotrien Elisa, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
- Rat TNF α Elisa, BioSource International Inc., Camarillo, CA, USA
- Thromboxane B₂ Elisa, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA

5.1.6 Material zur mRNA Quantifizierung

- ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
- Aqua dest., DECP-behandelt
- dNTP, Eurobio, Raunheim, Deutschland
- Dynabeads[®] mRNA DIRECT[™] Kit, Dynal[®] Biotech, Oslo, Norwegen
- MgCl₂, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland
- MULV Reverse Transkriptase, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland
- 10^xPCR-Puffer II, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland
- RNase-Inhibitor, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland
- Stichproben-Hexamere, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland
- TaqMan PCR Reagent Kit, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland

5.2 Methoden

5.2.1 Grundlagen der Perfusion isolierter Rattenherzen nach O. LANGENDORFF

Die 1895 von dem Physiologen Oskar LANGENDORFF (1853-1908) entwickelte Methode zur Untersuchung am überlebenden Säugetierherzen sieht eine retrograde Perfusion des Myokards vor (218). Dabei wird das isolierte Organ über den Aortenstumpf perfundiert, wobei das eingeleitete Perfusat in die über den Aortenklappen gelegenen Koronararterien fließt. Voraussetzung dafür ist die intakte Ventilfunktion der Valva aortae (Aortenklappe), welche ein Abfließen des Perfusats in den linken Ventrikel verhindert. So sind eine Versorgung des Myokards und damit ein Überleben des Herzens für eine gewisse Zeit gewährleistet (s. Abb. 14). Die Versorgung des Myokards in Verbindung mit dem intakten Reizleitungssystem resultiert in einer spontan schlagenden Herzpräparation bei leeren Ventrikeln. Die Isolation ermöglicht die

Beobachtung von spezifischen Reaktionen auf definierte Stimuli ohne zentralnervöse, humorale und metabolische Einflüsse des Gesamtorganismus.

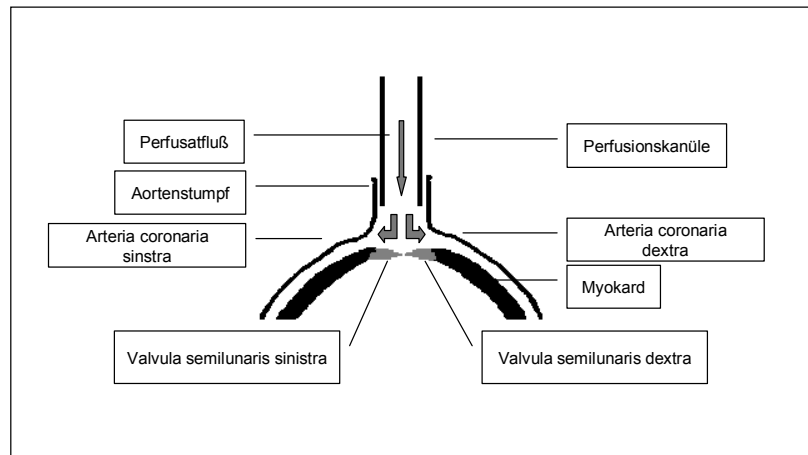


Abb. 14: Prinzip der LANGENDORFF-Perfusion

5.2.2 Versuchsanordnung zur Perfusion isolierter Rattenherzen nach LANGENDORFF

Das im Oxygenator mit 25 mM NaHCO₃ versetzte, auf 37°C erwärmte und Sauerstoff sowie Kohlendioxid gesättigte Perfusat wurde über eine Rollerpumpe mit 10 ml/min /g Herzgewicht über die Aortenkanüle durch die Koronaren gepumpt, in der temperierten Organkammer aufgefangen und nach Filtrierung (Porengröße 15 µm) in den Oxygenator zurückgepumpt (s. Abb. 15). Ein flüssigkeitsgefüllter, im linken Ventrikel platzierter Latexballon (s. Abb. 16) gibt den durch die Herzaktion ausgeübten Druck über einen Schlauch an einen Druckabnehmer weiter, welcher an einen Brückenverstärker angeschlossen ist. Der Brückenverstärker ist über eine entsprechende Messkarte mit einem PC verbunden, der die amplifizierten Messergebnisse mit Hilfe einer speziellen Software protokolliert. Auf dem gleichen Weg wird der in der Perfusionskanüle entwickelte Perfusionsdrucks aufgezeichnet; hier entfällt der Ballon, da direkt auf das in der Kanüle befindliche Perfusat zugegriffen werden kann. Die Toxine und Pharmaka werden mittels Eppendorfpipette direkt in den Oxygenator appliziert.

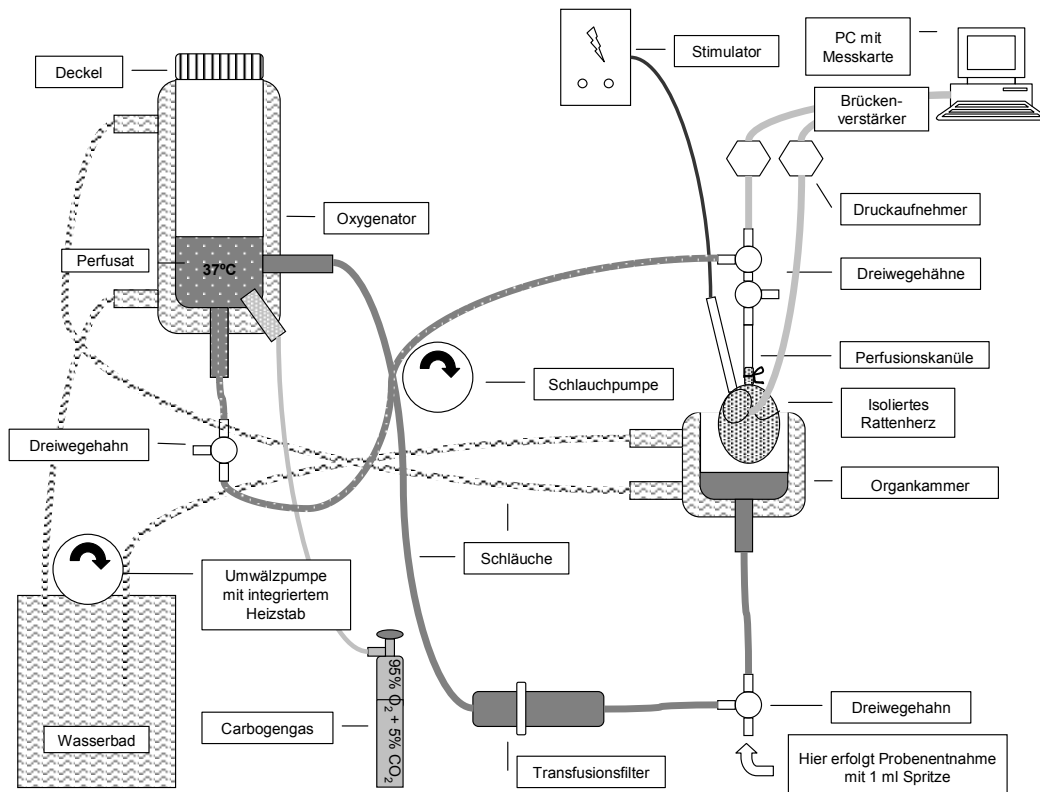


Abb. 15: Versuchsapparatur nach O. LANGENDORFF

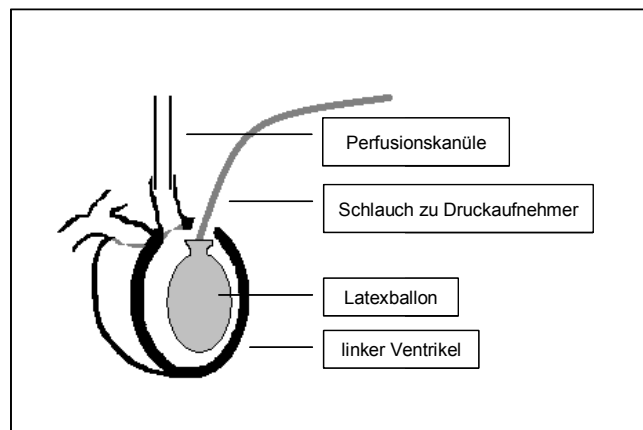


Abb. 16: Detailansicht zur Lage des Latexballons im isolierten Herzen

5.2.3 Entnahme und Präparation des Herzens

Die Ratte wurde initial mit einem Milliliter (1 ml) verdampften Isofluran (Forene[®]) in einem abgedichteten Behälter narkotisiert. Zur Narkoseerhaltung werden Pentobarbital (Narcoren[®], 0,375 g/kg Körpergewicht) mit isotonischer Kochsalzlösung gemischt und nach Wirkung intraperitoneal (i.p.) injiziert. Das Natrium – Heparin (Liquemin[®], 3000

IU/kg Körpergewicht) wurde ebenfalls i.p. injiziert und diente zur Prävention von Thromben, welche die Präparation beeinträchtigen könnten.

Über den Cornealreflex wurde die Tiefe der Narkose beurteilt. Erst wenn dieser Reflex und die Tiefensensibilität nicht mehr erhalten waren, wurde eine Hautinzision vom Nabel bis zum Sternum vorgenommen. Danach wurde die Peritonealhöhle vom Nabel bis zum proximalen Drittel des Rippenbogens V-förmig eröffnet. Der dabei entstehende V-förmige Muskellappen wurde über den Rippenbogen nach kranial geklappt und der Brustkorb am Xyphoid fixiert. Die Leber und das Zwerchfell verbindenden Bänder wurden durchtrennt, danach wurden bilateral mit einem Schenkel einer Schere das Zwerchfell perforiert und per Scherenschlag sämtliche Rippen durchtrennt; beim Wechsel von der einen auf die andere Brustkorbseite wurde das Diaphragma abpräpariert. Das Sternum mit den anhängenden Rippenenden wurde nach kranial geklappt und das Herz mit einem Scherenschlag oberhalb der Herzbasis von den großen Gefäßen getrennt.

Das isolierte Herz wurde sofort in eine Schale mit eisgekühlter Krebs-Henseleit-Pufferlösung überführt, welche vor der Kühlung durch den Oxygenator zirkuliert, dabei auf 37°C erwärmt und mit Carbogen angereichert worden war. Die unmittelbar auftretende Kältekardioplegie wurde genutzt, um nicht benötigte Strukturen wie Perikard, Thymus, verzweigter Anteil des Aortenbogens sowie Gefäßstümpfe der Lungenvenen abzuräparieren.

Der Aortenstumpf wurde über die Perfusionskanüle gezogen und mittels einer Ligatur fixiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde bereits auf 37°C erwärmtes, Carbogen gesättigtes Perfusat über eine Rollerpumpe mit 10 ml/ min/g Herzgewicht durch die Apparatur gepumpt.

5.2.4 Versuchsdurchführung

Die Herzen wurden mit 150 ml Perfusat von Blutresten freigespült, wobei das Perfusat verworfen wurde. Anschließend wurde das an der Kanüle frei schlagende Herz in die auf 37°C erwärmte Organkammer verbracht und mit 50 ml Krebs-Henseleit-Pufferlösung rezirkulierend perfundiert. Im rezirkulierenden Perfusionsmodus wurde das Perfusat durch einen Filter mit 15 µm Porengröße geleitet und zurück in den Oxygenator gepumpt. Sobald sich ein *steady state*, ein stabiler Zustand, in welchem sich die zu messenden Drücke (CPP, LVDP) auf ein stabiles Niveau einpendeln, etabliert hatte, startete der 25 minütige Vorlauf. Die Herzfrequenz (HR) wurde zuvor unter Zuhilfenahme einer bipolaren Elektrode des Stimulationsgerätes auf 300-350 Schläge

pro Minute eingestellt. Während dieses Vorlaufs wurden zwei Perfusatproben genommen sowie gegebenenfalls zehn Minuten vor dem eigentlichen Versuchsbeginn das Pharmakon in den Oxygenator appliziert.

Nach Beendigung des Vorlaufs wurde das entsprechende Bakterientoxin ebenfalls in den Oxygenator pipettiert. Je nach Toxinart betrug die Versuchsdauer eine Stunde (ECH) beziehungsweise drei Stunden (LPS). Bei einstündiger Versuchsdauer werden in der 5., 10., 20., 40. und 60. Minute Proben genommen, bei dreistündiger Versuchsdauer alle halbe Stunde ab der 30. Minute (s. Abb. 17 u. 18).

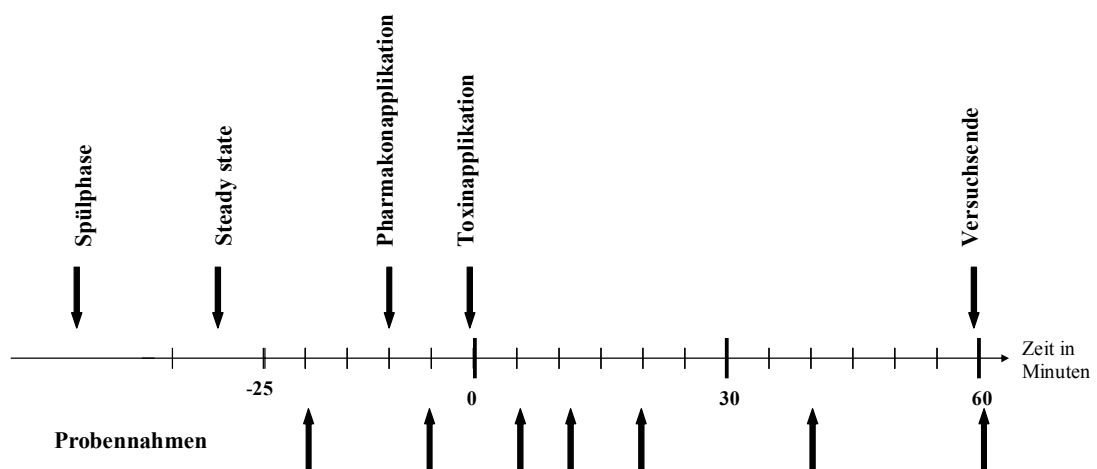


Abb. 17: Übersicht 60 Minuten Versuch

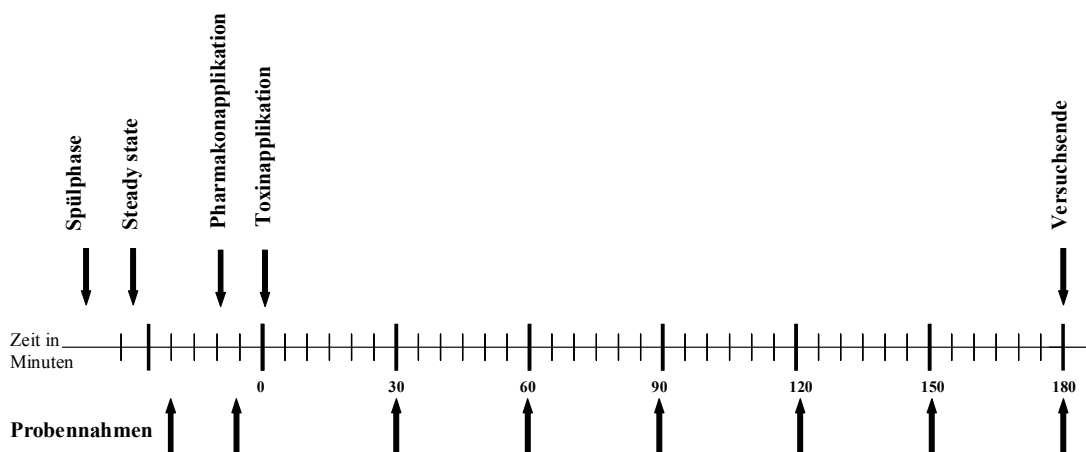


Abb. 18: Übersicht 180 Minuten Versuch

Nach Versuchsende wurde das Herz mit einem Scherenschlag auf Höhe der Ventilebene von der Perfusionskanüle abgesetzt. Der linke Ventrikel wurde abpräpariert in flüssigem Stickstoff gefroren und bei - 80°C aufbewahrt.

5.2.5 Protokollierung der physiologischen Parameter

Es wurden drei unterschiedliche physiologische Druckparameter erhoben und protokolliert. Die dazu verwendeten Druckaufnehmer (Combitrans Transducer) leiten das Signal zur Amplifizierung an einen Brückenverstärker weiter, die Verarbeitung und Aufzeichnung erfolgt in einem PC mit integrierter AD/DA-Messkarte.

Der koronare Perfusionsdruck (CPP) ergibt sich aus dem Flusswiderstand der Koronargefäße und erhöht sich mit zunehmender Vasokonstriktion. Dieses Verhältnis lässt sich durch folgende Formel beschreiben: $CPP \approx \text{Gefäßwiderstand} / \text{Perfusatfluss}$ (konstant). Der CPP wurde über ein Aqua destillata (Aqua dest.) gefülltes Schlauchsystem an einer Abzweigung kurz oberhalb der Perfusionskanüle aufgenommen und an den Druckaufnehmer weitergeleitet. Die Protokollierung mittels der Labtech Notebook[®]-Software erfolgte ebenso wie die des LVDP und der HR permanent über die gesamte Versuchsdauer.

Der linksventrikuläre Druck (LVP) wurde mittels eines, über das linke Atrium durch die Mitralklappe im linken Ventrikel positionierten, Aqua dest. gefüllten Latexballons ermittelt. Dabei war die Ballonfüllung an das Ventrikelvolumen angepasst, so dass der enddiastolische Druck auf 0 mmHg kalibriert wurde. Durch die isovolumetrische Kontraktion des Ventrikelmyokards ließen sich so linksventrikulärer systolischer und diastolischer Druck bestimmen. Der Ballon war mit einem, mit Aqua dest. gefüllten, Schlauchsystem verbunden, welches den Druck an einen Druckaufnehmer weitergab. Die Differenz aus maximal systolischen abzüglich enddiastolischen Drucks stellt den effektiven, linksventrikulären Druckanstieg (left ventricular developed pressure, LVDP) dar, der als Maß der Kontraktilität zu sehen ist. Zusätzlich lassen sich aus dem LVP die HR und die links ventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{\max}) ermitteln. Letztere ist ein differenzierter Kontraktilitätsparameter und wird in 5 Minuten Abständen während des gesamten Versuches protokolliert.

Die bereits erwähnte Stimulierung des Herzens mit einer bipolaren Elektrode auf eine konstante Frequenz oberhalb der Eigenfrequenz wurde durchgeführt, um frequenzabhängige Kontraktilitätsveränderungen zu vermeiden.

5.2.6 Durchführung der analytischen Perfusatuntersuchungen

5.2.6.1 Cysteinyl-Leukotrien ELISA und Thromboxan B₂ ELISA

Das Prostanoid Thromboxan A₂ ist ein nicht zirkulierender Lipidmediator, der als Antwort auf lokale Stimuli gebildet wird und nur in direkter Umgebung wirksam ist, bevor er zu Thromboxan B₂ abgebaut wird. Auf Grund der kurzen Halbwertszeit von TxA₂ ist eine Quantifizierung nur über das sich im Perfusat anreichernde nicht enzymatische Hydrolyseprodukt TxB₂ möglich.

Die Cysteinyl-Leukotriene C₄, D₄ und E₄ entstehen durch Kopplung des instabilen Epoxids Leukotrien A₄ mit Glutathion und gehen auseinander hervor.

Der Nachweis läuft über eine kompetitive Bindung des TxB₂ beziehungsweise der Cys-LTs gegenüber einer konstanten Menge Tracers um eine limitierte Anzahl an Bindungsstellen eines spezifischen Kaninchen-Antiserums. Dabei ist die Menge des gebundenen Tracers, TxB₂ - respektive Cys-LTs-Acetylcholinesterase-Konjugate, umgekehrt proportional zur Menge des gebundenen Analyts. Die entstandenen Immunkomplexe binden an den auf der Mikrotiterplatte angebrachten monoklonalen Anti-Kaninchen-Antikörpern, nicht gebundene Immunkomplexe werden ausgewaschen. Die enzymatische Umsetzung eines zugegebenen chromogenen Substrates (Acetylthiocholin und 5,5-dithio-bis-(2 Nitrobenzoesäure)) durch die im Tracer enthaltene Acetylcholinesterase zu 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure resultiert in einer Gelbfärbung der Proben. Die photometrische Quantifizierung der 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure bei 412 nm (Resorptionsmaximum) steht in direkter Beziehung zur Menge des Tracers, die umgekehrt proportional zur Menge des Analyts ist. Die zur Analytik herangezogenen Perfusatsproben wurden bis zur Durchführung des ELISAs bei -20°C gelagert.

5.2.6.2 Rat TNF- α Elisa

Zur Quantifizierung von TNF- α im Perfusat wurde ebenfalls ein kommerzieller ELISA (BioSource) verwendet. Dazu wurden die zu untersuchenden Proben auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Dabei erfolgte während der ersten Inkubation eine Bindung des TNF- α sowohl mit dem auf der Mikrotiterplatte fixiertem TNF- α -Antikörper als auch mit dem später zugegebenen biotinylierten zweiten Antikörper. Der überschüssige biotinylierte Antikörper wurde entfernt, dann wurde das Enzym Streptavidin-Peroxidase dazugegeben, welches sich an den TNF- α gebundenen zweiten Antikörper band. Als chromogenes Substrat wurde Tetramethylbenzidin hinzugesetzt. Das entstandene

enzymatische Endprodukt ist direkt proportional zur TNF- α Menge der Probe und wurde bei 450 nm photometrisch quantifiziert.

Die so gemessenen Perfusatproben wurden wegen der Thermolabilität des Zytokins TNF- α unmittelbar nach ihrer Gewinnung bis zum Versuchsende in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -80°C gelagert.

5.2.6.3 cGMP RIA

Das Prinzip dieses analytischen Tests (Immunotech) basiert auf einer konkurrierenden Bindung von succinyliertem cGMP und dem radioaktiven ^{125}I -ScGMPTME Tracer an polyklonale Antikörper, die an der Innenseite von speziellen Röhren fixiert sind. Um auf der einen Seite jegliche enzymatische Aktivität zu unterbinden und auf der anderen Seite cGMP aus Proteinbindungen zu lösen, wurden die Proben zuerst mit Perchlorsäure versetzt. Die so vorbehandelten Proben wurden succinyliert und anschließend in einem Gamma-Zähler gemessen. Zur Auswertung wurde auf logarithmischem Papier ein Graph basierend auf Leerwerten mit festgelegter Tracer Konzentration gezeichnet und der entsprechenden Strahlung auf der Ordinate zugeordnet. Dabei verhält sich die cGMP Menge umgekehrt proportional zur Menge des Tracers. Sämtliche Proben für die cGMP Messung wurden bei -20°C gelagert.

5.2.7 Quantitative mRNA Analyse

Die mRNA Quantifizierung von COX-2, Thromboxansynthase und TNF- α im Myokard wurde an Hand einer real-time-Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Dazu kalibrierte man die zu messende mRNA mit der des ubiquitär vorkommenden Porphobilinogen-Deaminase-Gens (PBGD-Gen, housekeeping gene). Zur mRNA-Extraktion wurden 10 μm starke Kryoschnitte des linken Ventrikels in 300 μl Lösungspuffer des *Dynabeads[®] mRNA DIRECT[™] Kits* aufgelöst. Die mRNA bindet an Oligo-dT Fragmente, welche kovalent an supermagnetische Glaspartikel gebunden sind. Es wurden 100 μg dieser Partikel pro Probe verwendet. Nach mehreren Waschvorgängen wurde die isolierte mRNA in 20 μl Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser gelöst. DEPC wurde zur Gewährleistung der DNA Freiheit eingesetzt. Zur cDNA Synthese wurden die Proben erst über 10 Minuten auf 70°C erhitzt und im Anschluss für 5 Minuten auf Eis gelegt. Je 10 μl der Proben wurden mit 4 μl MgCl_2 (25 mM), 2 μl 10^{\times} PCR-Puffer II, 1 μl randomisierte Hexamere (50 μM), 0,5 μl RNase-Inhibitor (10 U), 1 μl MULV reverse Transkriptase (10 mM) und 1 μl Desoxyribonukleotid (dNTP) (10 mM) auf ein Gesamtvolumen von 19,5 μl aufgefüllt.

Die Proben wurden dann für 10 Minuten bei 20°C und danach eine Stunde lang bei 43°C inkubiert. Durch 5 minütiges Erhitzen auf 99°C wurde die reverse Transkriptase inaktiviert. Die gewonnene DNA wurde zur quantitativen PCR mit dem *Sequence Detection System 7700* genutzt. Hierbei fand das *TaqMan PCR Reagent Kit* Verwendung. 2 µl der erhaltenen cDNA wurden mit Oligonukleotidprimer (300 nM) und Hybridisierungs sonden (200 nM) auf 50 µl aufgefüllt. Danach wurde die DNA bei 95°C 10 Minuten lang denaturiert und die Doppelstrangstruktur aufgetrennt. Es folgen 40 Zyklen von 15 Sekunden bei 95°C (Auftrennung) und 60 Sekunden bei 61°C („Annealing“, Elongation). Die so erstellten mRNA Kopien konnten nun intern mit dem PBGD-Gen kalibriert und quantifiziert werden. Zur relativen Quantifizierung wurde die Ziel-Gen-mRNA (COX-2/ Thromboxansynthase/ TNF-α) mit der internen Standard-Gen-mRNA (PBGD) nach folgender Formel berechnet:

$$T_0/R_0=K \cdot (1+E)^{(CT,R-CT,T)}$$

T_0 bezeichnet die initiale Anzahl an Ziel-Gen-mRNA-Kopien, R_0 die initiale Anzahl an Standard-Gen-mRNA-Kopien, E die Effizienz der Amplifikation, CT,R den Schwellenzyklus des Standardgens, CT,T den Schwellenzyklus des Zielgens und K eine Konstante (219).

5.2.8 Statistische Datenauswertung

Die Kontraktilitätsparameter LVDP und dP/dt_{max} wurden als prozentuale Abweichung vom Ausgangswert zum Zeitpunkt 0' angegeben, die Änderungen des koronaren Gefäßwiderstandes, CPP, als Differenz (Δ) zum Ausgangswert (0'). Die im ELISA oder RIA gemessenen Mediatorkonzentrationen wurden ebenfalls alle als Differenz zur bestehenden Initialkonzentration angegeben. Alle aufgeführten Daten sind arithmetische Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM) berechnet aus mindestens vier Experimenten. Die erhobenen Daten wurden mit einer Varianzanalyse und anschließend *Tukey's Honestly Significant Difference Test* als post-hoc-Test oder mit einem T-Test auf statistische Signifikanz untersucht. Werte von mindestens $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant beurteilt.

6 Ergebnisse

6.1 Übersicht

Ziel der Experimente war Aufschluss darüber zu erlangen, ob dem System der zyklischen Nukleotide pathophysiologische Relevanz in der Entstehung der septischen Kardiomyopathie zukommen könnte. Die septischen Veränderungen wurden mit Hilfe zweier unterschiedlicher Bakterientoxine, ECH und LPS, simuliert. Die Versuchsdauer variierte je nach Toxin von einer bis zu drei Stunden. Ein Hauptaugenmerk lag dabei auf der Protokollierung der physiologischen Parameter des Herzens, auf der einen Seite die Kontraktilität (LVDP, dP/dt_{max}), auf der anderen die koronare Durchblutung (CPP). Zusätzlich wurden Perfusat- und Ventrikelpfen zur weiteren Analytik aufgearbeitet. Folgende Versuchsreihen mit je mindestens vier unabhängigen Experimenten ($n \geq 4$) wurden durchgeführt:

| |
|--|
| 3 Stunden Kontrolle |
| 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS |
| 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 1 μM Sildenafil |
| 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10 μM Sildenafil |
| 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 1 μM Zaprinast |
| 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10 μM Zaprinast |

| |
|--|
| 1 Stunden Kontrolle |
| 0,3 HU/ml ECH |
| 0,3 HU/ml ECH + 1 μM Sildenafil |
| 0,3 HU/ml ECH + 1 μM Zaprinast |
| 0,3 HU/ml ECH + 7,5 μM MK-886 |

6.2 Toxinwirkung

6.2.1 Einfluss von LPS auf die physiologischen Parameter isolierter Herzen

LPS wurde in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ ins Perfusat appliziert und die physiologischen Parameter über drei Stunden hinweg aufgezeichnet. Im Vergleich zur

Kontrollgruppe zeigt LPS deutliche kardiodepressive Qualitäten (s. Abb. 19). So kam es zum deutlichen Abfall des LVDP und des dp/dt_{max} , wohingegen der CPP höchstens minimal beeinträchtigt wurde. Während in der Kontrollgruppe der LVDP über die Zeit hinweg stabil blieb beziehungsweise bis zur 150. Minute sogar leicht anstieg und mit $103 \pm 3\%$ vom Ausgangswert abschloss, sank der LVDP in der LPS-Gruppe auf $69 \pm 4,5\%$ vom Ausgangswert ab. Die Kontraktilitätsminderung setzte dabei in der 30. Minute ein und verlief dann relativ linear.

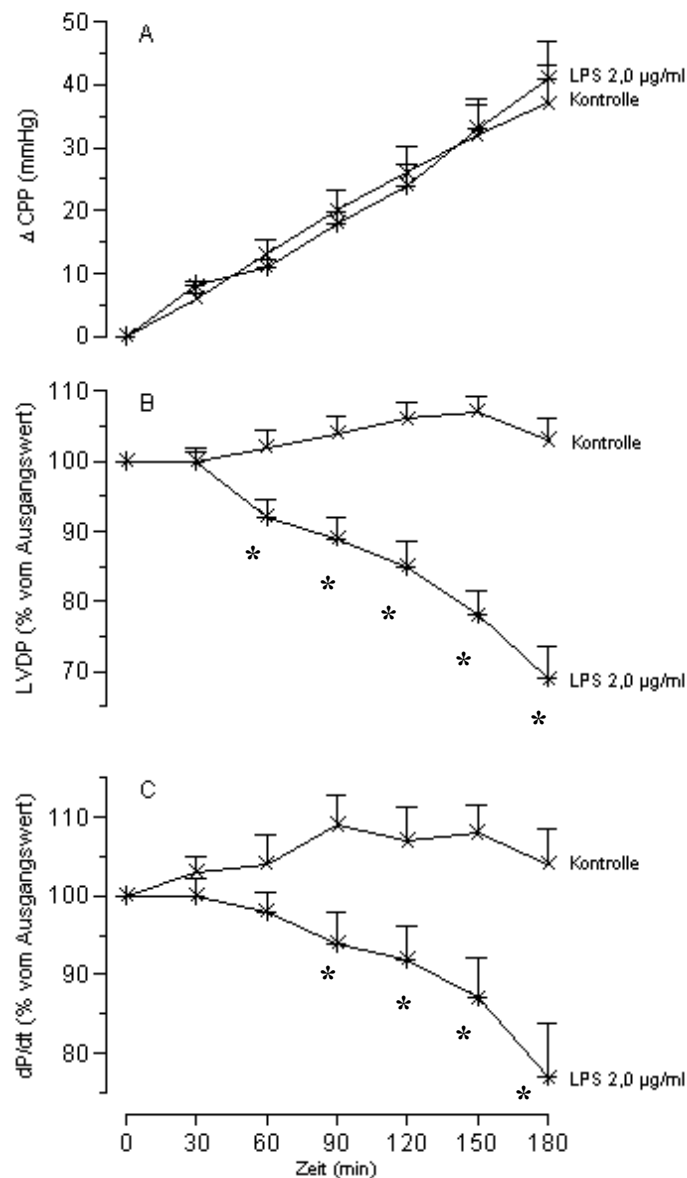


Abb. 19: Diagramm A beschreibt die Entwicklung des Perfusionsdrucks vom Ausgangswert, Diagramm B stellt die prozentualen Veränderungen der linksventrikulären Kontraktilität, Diagramm C die der linksventrikulären maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit dar. Die markierten (*)Werte unterscheiden sich signifikant (mindestens $p < 0,05$) von der Kontrollgruppe.

Analog dazu verlief die Entwicklung der dP/dt_{\max} : Die Kontrollgruppe hatte einen fast identischen Kurvenverlauf wie beim LVDP und lag nach 180 Minuten mit $104 \pm 4,4\%$ leicht über dem Initialwert. Der Graph der LPS-Gruppe war bis zur 60. Minute nahezu stabil und fiel dann auf $77 \pm 6,4\%$ ab.

Der koronare Gesamtgefäßwiderstand wurde von LPS so gut wie nicht tangiert, so stieg der CPP in beiden Gruppen über die gesamte Versuchsdauer stetig an. Nach Versuchsende lag der Δ CPP der Kontrollgruppe bei $37 \pm 6,2$ mmHg und der der LPS-Gruppe bei $41 \pm 5,7$ mm Hg.

6.2.2 Einfluss von ECH auf die Kontraktilität und die Koronarperfusion

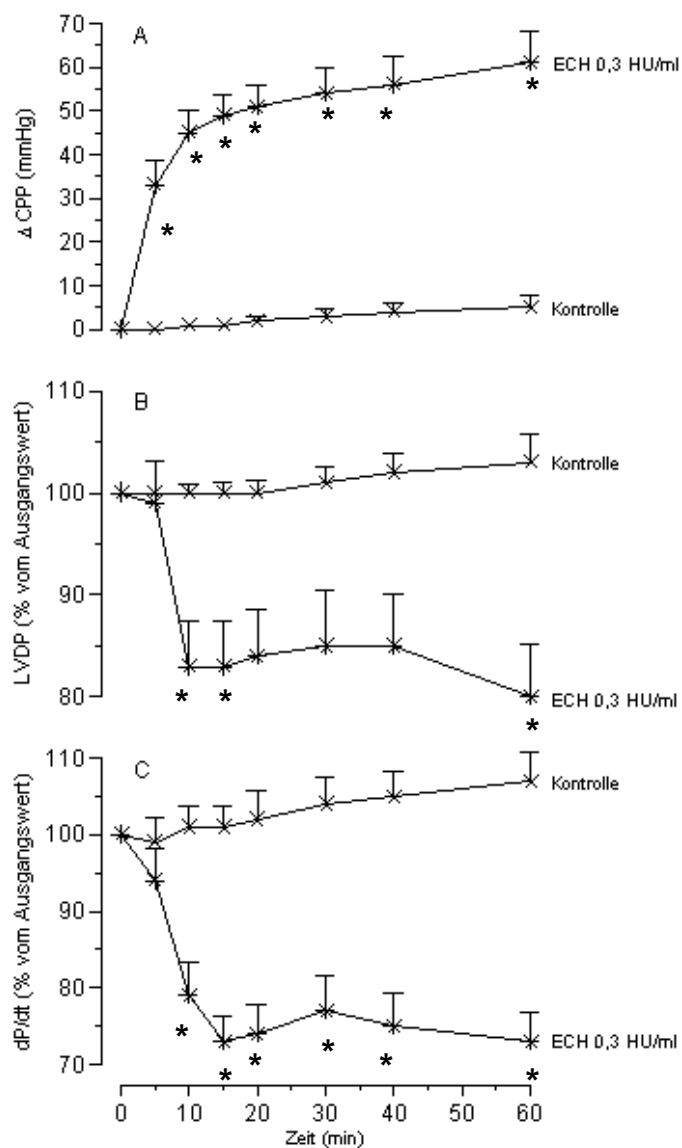


Abb. 20: Diagramm A zeigt die Entwicklung des Perfusionsdrucks als Abweichung vom Ausgangswert, Diagramm B stellt den prozentualen Verlauf der linksventrikulären Kontraktilität, Diagramm C den der linksventrikulären maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit dar. Die markierten (*)Werte unterscheiden sich signifikant (mindestens $p < 0,05$) von der Kontrollgruppe.

Im Gegensatz zu LPS nahm ECH sowohl Einfluss auf die Kontraktilität als auch auf den koronaren Gefäßwiderstand (s. Abb. 20). ECH wurde mit einer Dosierung von 0,3 HU/ml eingesetzt, die Versuchsdauer war auf eine Stunde begrenzt.

ECH führte zu einer starken Erhöhung des koronaren Gefäßwiderstandes. So war der Δ CPP in der Kontrollgruppe annähernd konstant und stieg lediglich um $5 \pm 3,0$ mmHg an. Im Gegensatz dazu schnellte er in der ECH-Gruppe in den ersten 10 Minuten rapide um $45 \pm 5,7$ mmHg empor, um danach nur noch geringfügig weiter anzusteigen.

Parallel zur Erhöhung des koronaren Gefäßwiderstands kam es zu einer Abnahme der Kontraktilität. So sank der LVDP in der ECH-Gruppe besonders in den ersten 10 Minuten der Toxinperfusion ab und blieb dann auf diesem Niveau. Der Endwert lag bei $80 \pm 5,2\%$ des Ausgangswerts. Die Kontrollgruppe wies einen nahezu konstanten LVDP-Wert auf der bei Versuchsende $103 \pm 2,8\%$ des Ausgangswerts betrug.

Ähnlich entwickelte sich auch die linksventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit. Die Kontrollgruppe stieg nach 60 Minuten leicht auf $107 \pm 3,7\%$ des Ausgangswerts und die ECH-Gruppe fiel auf $73 \pm 3,9\%$ des Ausgangswerts.

6.3 Pharmakologische Intervention

Um die Effekte von Sildenafil und Zaprinast auf toxinperfundierte Herzen zu ermitteln, wurden einige Herzen 10 Minuten vor der Toxinapplikation mit je einem der Inhibitoren vorbehandelt. Dabei kamen Konzentrationen von $1 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ zum Einsatz. Des Weiteren wurde der spezifische Lipoxigenaseinhibitor MK-886 eingesetzt, da eine ECH induzierte, leukotrienvermittelte Vasokonstriktion vermutet wurde (50). Die Konzentration der Toxine war in sämtlichen Versuchen gleich (LPS $2 \mu\text{g/ml}$, ECH $0,3 \text{ HU/ml}$).

6.3.1 Sildenafil und LPS

Sildenafil wurde in Verbindung mit LPS in zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, zum einen $1 \mu\text{M}$ und zum anderen $10 \mu\text{M}$ (s. Abb. 21 u. 22).

Durch die Gabe von Sildenafil konnte der kardiodepressive Effekt von LPS teilweise abgeschwächt werden. So sank der LVDP LPS-perfundierter Herzen bei $1 \mu\text{M}$ Sildenafil auf $82 \pm 3,3\%$ und bei $10 \mu\text{M}$ Sildenafil nur auf $88 \pm 2,5\%$. Dies stellt eine circa 19%ige beziehungsweise 28%ige Verbesserung gegenüber der LPS-Gruppe dar.

Die $\text{dP/dt}_{\text{max}}$ LPS-perfundierter Herzen fiel entsprechend auf $84 \pm 1,7\%$ ($1 \mu\text{M}$ Sildenafil) respektive $86 \pm 4,8\%$ ($10 \mu\text{M}$ Sildenafil) ab, was eine Besserung gegenüber

der LPS-Gruppe von etwa 9% beziehungsweise 12% bedeutet. Interessant ist auch, dass sich die linksventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit bei 10 μM Sildenafil bis zur 90. Minute verhältnismäßig konstant hielt.

Der ΔCPP änderte sich nicht signifikant. So betrug er bei Versuchsende für 1 μM Sildenafil $28 \pm 4,1$ mmHg und für 10 μM Sildenafil $56 \pm 9,4$ mmHg.

6.3.2 Sildenafil und ECH

In Kombination mit ECH wurde Sildenafil nur in der Konzentration 1 μM angewandt (s. Abb. 23), da durch eine höhere PDE-Inhibitorkonzentration keine Verbesserung des Ergebnisses gegenüber der niedrigeren Konzentration erzielt wurde (nicht dargestellt). Es zeigten sich deutliche, protektive Effekte auf den koronaren Gefäßwiderstand und auf die Kontraktilität.

So stieg der ΔCPP unter Sildenafil nur um $39 \pm 9,2$ mmHg, wobei der Verlauf des Graphen dem der ECH-Gruppe entsprach. Der Druckanstieg verringerte sich verglichen mit der ECH-Gruppe um etwa 30%.

Der LVDP stieg nach initialem Abfall wieder an und befand sich ab der 20. Minute im Bereich des Ausgangswertes und leicht darüber. Nach 60 Minuten betrug er $100 \pm 3,8\%$ des Ausgangswerts.

Auch die dP/dt_{max} fiel unter Sildenafil nicht so stark ab. Zwar kam es parallel zum LVDP auch hier eingangs zu einer Verringerung, jedoch ab der 30. Minute hielt sich die dP/dt_{max} konstant knapp unter dem anfänglichen Niveau und schloss mit $98 \pm 4,4\%$ des Ausgangswerts ab.

6.3.3 Zaprinast und LPS

Analog zu Sildenafil wurde auch Zaprinast in zwei Konzentration (1 μM / 10 μM) in Verbindung mit LPS eingesetzt (s. Abb. 21 u. 22). Auch Zaprinast war in der Lage, die negativ inotrope Wirkung des Toxins teilweise aufzuheben. Dies zeigte sich besonderes in Bezug auf den LVDP.

Zwar sank bei der niedrigeren Konzentration Zaprinast der LVDP auf $79 \pm 2,1\%$ des Ausgangswertes, mit der höheren Konzentration von 10 μM blieb er dagegen bis zur 120. Minute stabil und fiel dann nur auf $91 \pm 3,3\%$ des Ausgangswerts. Damit waren die Werte im Vergleich zur LPS-Gruppe um ungefähr 14% beziehungsweise 32% erhöht.

Ähnlich, wenn auch nicht ganz so deutlich, war die Verbesserung in Bezug auf die linksventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit.

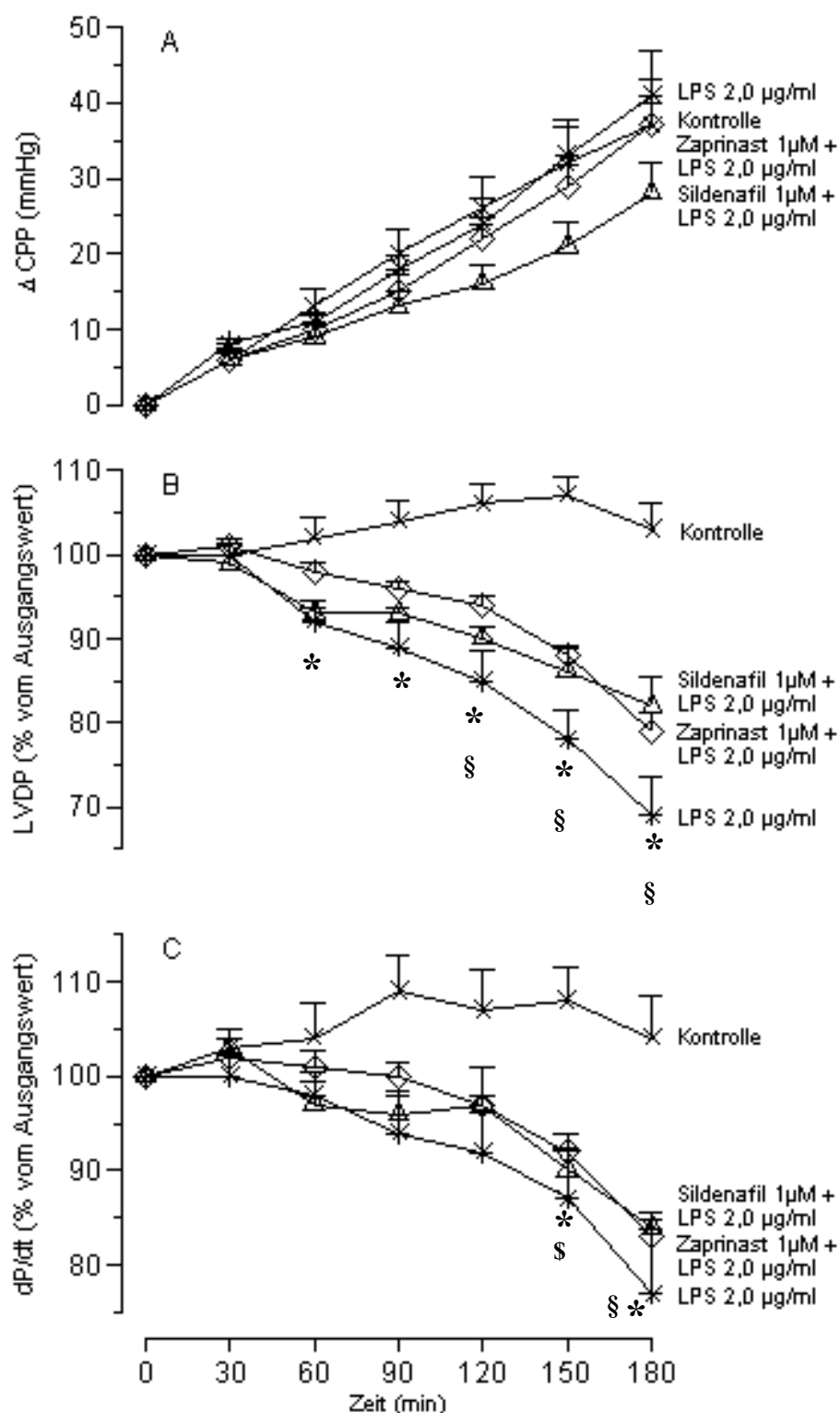


Abb. 21: LPS induzierte Kardiodepression in Anwesenheit der PDE-Inhibitoren 1 µM Sildenafil und 1 µM Zaprinast. Diagramm A zeigt die Abweichung des Perfusionsdrucks vom Ausgangswert, Diagramm B stellt den prozentualen Verlauf der linksventrikulären Kontraktilität dar, die markierten LPS-Werte unterscheiden sich signifikant (mindestens $p < 0,05$) von der Kontrollgruppe (*), den Sildenafil- (*) und Zaprinastwerten (§). Diagramm C zeigt den prozentualen Verlauf der linksventrikulären maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit, die markierten LPS-Werte unterscheiden sich signifikant (mindestens $p < 0,05$) von der Kontrollgruppe (*), den Sildenafil- (§) und den Zaprinastwerten (§).

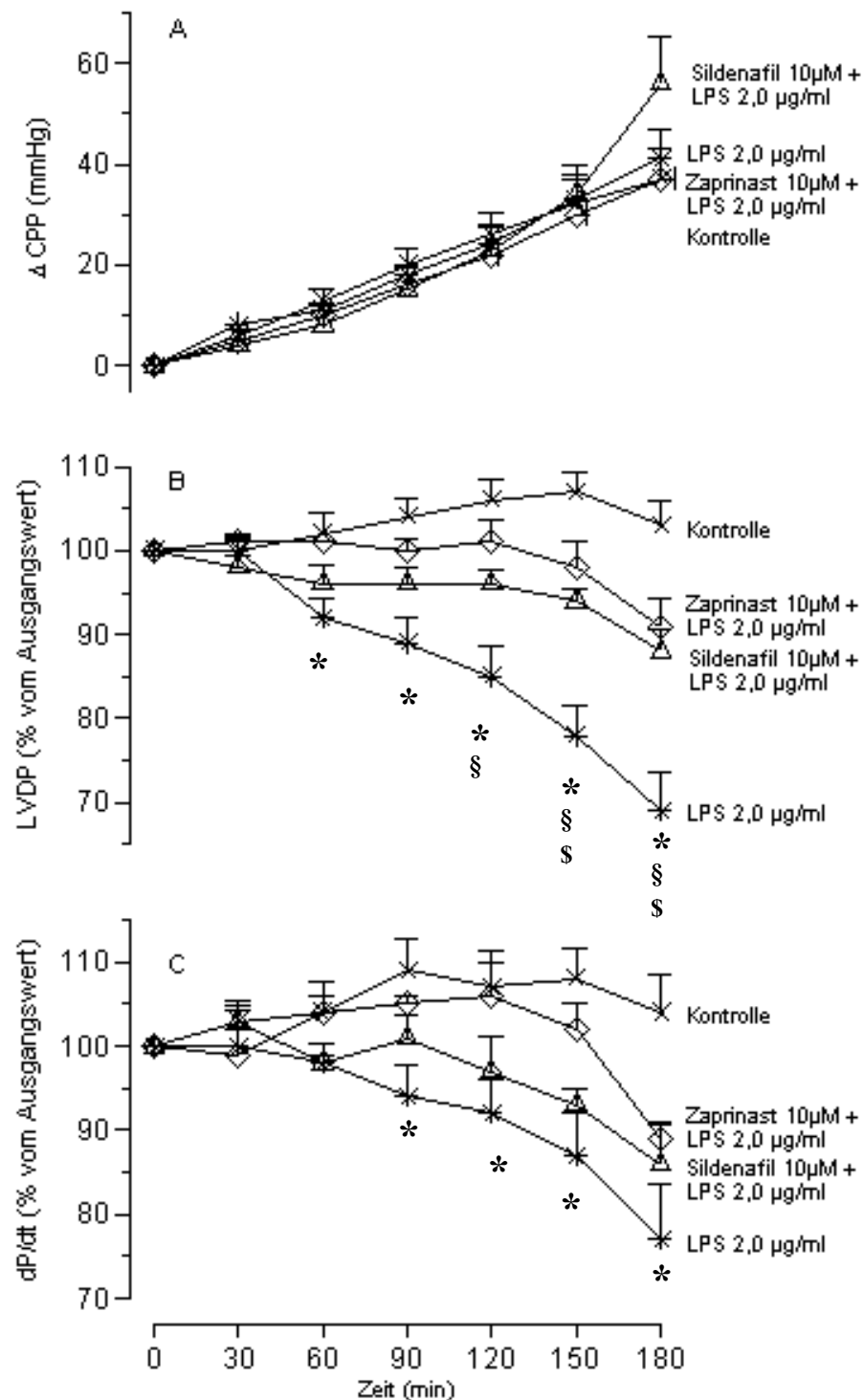


Abb. 22: LPS induzierte Kardiodepression in Anwesenheit der PDE-Inhibitoren 10 μ M Sildenafil und 10 μ M Zaprinast. Diagramm A beschreibt die Entwicklung des Perfusionsdrucks vom Ausgangswert. Diagramm B stellt den prozentualen Verlauf der linksventrikulären Kontraktilität dar, die markierten LPS-Werte unterscheiden sich signifikant (mindestens $p < 0,05$) von der Kontrollgruppe (*), den Sildenafil- (§) und den Zaprinastwerten (§). Diagramm C zeigt den prozentualen Verlauf der linksventrikulären maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit, die markierten LPS-Werte unterscheiden sich signifikant (mindestens $p < 0,05$) von der Kontrollgruppe.

Sie verringerte sich mit der niedrigeren Zaprinastkonzentration auf $81 \pm 1,8\%$ und mit der höheren Zaprinastkonzentration auf $89 \pm 2,0\%$ des Ausgangswertes. Verglichen mit der Endotoxingruppe liegen die Werte ca. 8% respektive 16% höher.

Eine signifikante Beeinflussung des koronaren Gefäßwiderstandes konnte man auch hier nicht eindeutig nachweisen. Sowohl in der $1 \mu\text{M}$ IK-Gruppe liegt der ΔCPP mit $37 \pm 3,0 \text{ mmHg}$ als auch in der $10 \mu\text{M}$ IK-Gruppe mit $37 \pm 4,8 \text{ mmHg}$ auf dem Niveau der Kontrollgruppe ($37 \pm 6,3 \text{ mmHg}$) und nur geringfügig unter dem der LPS-Gruppe ($41 \pm 5,7 \text{ mmHg}$).

6.3.4 Zaprinast und ECH

Parallel zu Sildenafil wurde Zaprinast in Versuchen mit ECH nur in $1 \mu\text{M}$ Konzentration verwandt (s. Abb. 23). Auch Zaprinast verhinderte einen übermäßigen Anstieg des CPP, wie er durch alleinige ECH-Gabe provoziert wird.

So stieg der ΔCPP nach 60 Minuten auf $41 \pm 8,2 \text{ mmHg}$, wobei der Verlauf des Zaprinastgraphen nahezu dem von Sildenafil entspricht. Auch hier ist der Druckanstieg um circa 30% geringer als in der ECH-Gruppe.

Entsprechend kommt es auch zu Auswirkungen auf die Kontraktilitätsparameter: So stieg der LVDP in den ersten Minuten über den Ausgangswert an, glich sich dann schnell dem Verlauf des Sildenafilgraphen an und schloss nach 60 Minuten geringfügig niedriger mit $97 \pm 4,7\%$ des Ausgangswerts ab.

Der $\text{dP/dt}_{\text{max}}$ Graph verlief annähernd parallel zum Sildenafilgraph, fiel ab der 20. Minute allerdings etwas stärker auf $90 \pm 2,8\%$ des Ausgangswerts ab.

6.3.5 MK-886 und ECH

Der spezifische Lipoxygenaseinhibitor MK-886 (Molekulargewicht: 494.0) wirkt über seine Bindung an das Lipoxygenaseaktivierungsprotein. Dadurch kommt es zur spezifischen Inhibition der 5-Lipoxygenase, während der übrige Arachidonsäuremetabolismus unbeeinträchtigt bleibt. Er kam hier in einer Konzentration von $7,5 \mu\text{M}$ zum Einsatz (s. Abb. 23).

Durch die Inhibition der 5-Lipoxygenase war eine nahezu vollständige Aufhebung des vasokonstriktorisches Effekts von ECH möglich. So stieg der ΔCPP ECH-perfundierter Herzen in Anwesenheit von MK-886 bis zum Versuchsende nur auf $15 \pm 6,3 \text{ mmHg}$, während der ΔCPP in der ECH-Gruppe um $61 \pm 7,2 \text{ mmHg}$ und in der Kontrollgruppe um $5 \pm 3,0 \text{ mmHg}$ anstieg.

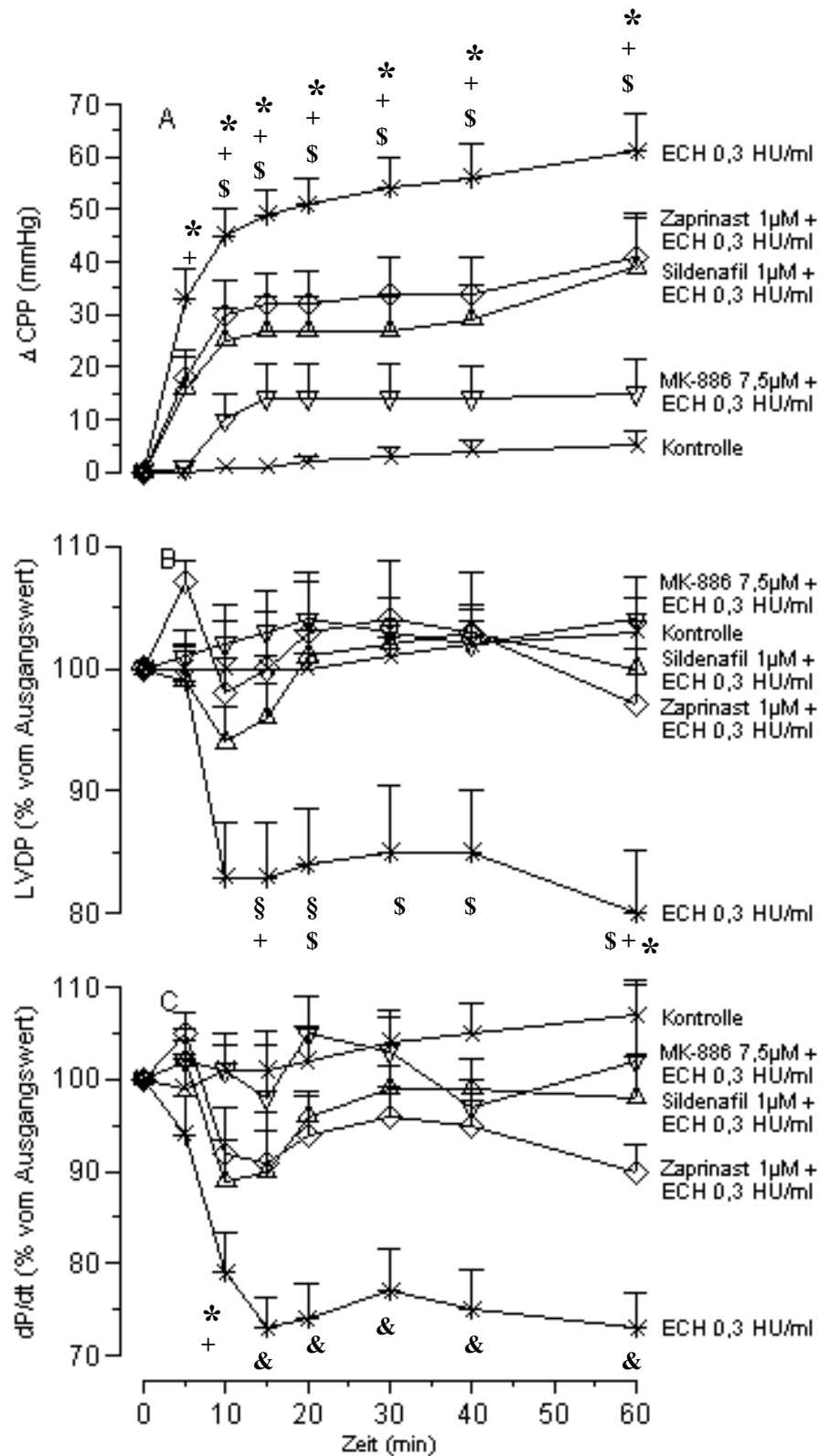


Abb. 23: Diagramm A beschreibt die Entwicklung des Perfusionsdrucks vom Ausgangswert, die markierten ECH-Werte unterscheiden sich signifikant (mindestens $p < 0,05$) von der Kontroll- (*), MK886- (+) und Sildenafilgruppe (\$). Diagramm B stellt den prozentualen Verlauf der linksventrikulären Kontraktilität, Diagramm C den prozentualen Verlauf der linksventrikulären maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit dar, die markierten ECH-Werte unterscheiden sich signifikant (mindestens $p < 0,05$) von der Kontrollgruppe (*), der Zaprinast- (\$), der MK886- (+) und der Sildenafilgruppe (\$). In Diagramm C unterscheiden sich die ECH-Werte ab der 15. Minute signifikant (mindestens $p < 0,05$) von allen übrigen Gruppen (&).

Zudem konnte der ECH-induzierte Kontraktilitätsverlust verhindert werden, so war der LVDP über die gesamte Versuchsdauer relativ konstant und lag nach 60 Minuten $104 \pm 3,4\%$ über seinem Ausgangswert.

Die linksventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ECH-perfundierter Herzen in Anwesenheit von MK-886 entwickelte sich nicht ganz so gleichmäßig, lag am Ende jedoch auch $102 \pm 8,2\%$ über ihrem Ausgangswert.

6.4 Probenauswertung

Während der Versuche wurden in regelmäßigen Abständen Perfusatsproben entnommen sowie nach Versuchsende Präparate vom linken Ventrikel gesichert. Die Perfusatsproben wurden mittels ELISA oder RIA aufgearbeitet und auf TNF- α , TxB₂ und cGMP untersucht. Die Ventrikelpräparate wurden einer RT-PCR unterzogen, um die Genexpression für TNF- α , COX-2 und Thromboxansynthase zu evaluieren.

6.4.1 Freisetzung von TNF- α

Zur Bestimmung des freigesetzten TNF- α wurde ein ELISA verwendet (s. Abb. 24). Es wurden Perfusatsproben untersucht, welche zu Versuchsbeginn und dann stündlich genommen worden waren.

| |
|--|
| 3 Stundenkontrolle |
| 2 μ g/ml LPS |
| 2 μ g/ml LPS + 10 μ M Sildenafil |
| 2 μ g/ml LPS + 10 μ M Zaprinast |

Während der TNF- α -Spiegel in der Kontrollgruppe annähernd konstant blieb und erst ab der 120. Minute leicht um $48,5 \pm 7,5$ pg/ml anstieg, erhöhte sich in der LPS-Gruppe die TNF- α -Konzentration ab der 60. Minute sprunghaft bis zum Versuchsende um $737,5 \pm 115,7$ pg/ml.

Es wurden auch Sildenafil respektive Zaprinast vorbehandelte Endotoxinversuche gemessen, dabei zeigte sich, dass die PDE5-Inhibitoren zumindest in 10 μ M Konzentration Auswirkungen auf die TNF- α -Freisetzung haben. Zwar kam es ab der 60. Minute zum Anstieg der TNF- α -Konzentration, jedoch betrug die Steigerung unter Sildenafil nur $239,6 \pm 39,2$ pg/ml und unter Zaprinast $395,2 \pm 68,5$ pg/ml.

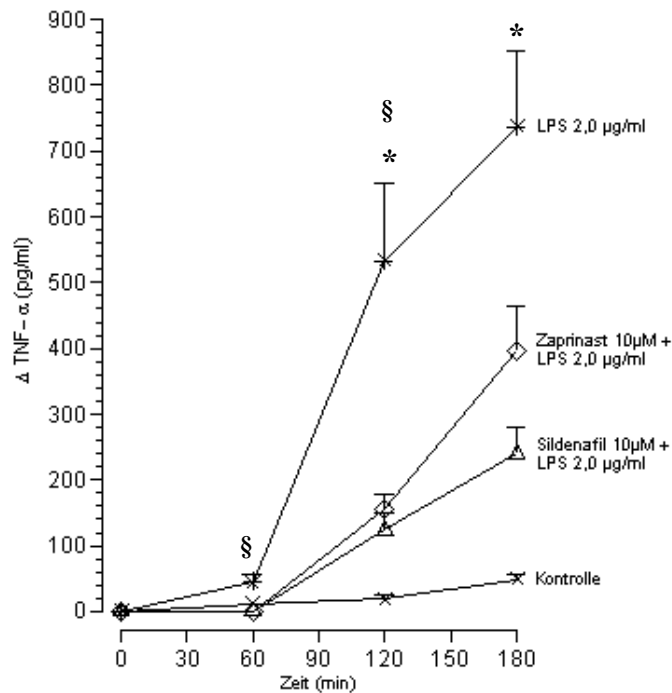


Abb. 24: TNF- α Freisetzung ins Perfusat: Die markierten LPS-Werte unterscheiden sich signifikant (mindestens $p < 0,05$) von der Zaprinast- (§), Sildenafil- (*) und Kontrollgruppe (*).

6.4.2 Freisetzung von Thromboxan

Thromboxan wurde ebenfalls per ELISA bestimmt (s. Abb. 25). Zur Bestimmung wurden Proben derselben Versuche herangezogen bei denen auch TNF- α gemessen wurde. Die Probennahme erfolgte zu den gleichen Zeitpunkten (0', 60', 120', 180').

| |
|--------------------------------|
| 3 Stundenkontrolle |
| 2 µg/ml LPS |
| 2 µg/ml LPS + 10 µM Sildenafil |
| 2 µg/ml LPS + 10 µM Zaprinast |

Im Vergleich zu TNF- α fällt auf, dass sich die Thromboxankonzentration in allen Gruppen von der ersten Minute an steigerte und dieser Anstieg in der letzten Stunde verstärkt war, ausgenommen bei Zaprinast.

So wies die Kontrollgruppe bei Versuchsende eine Thromboxankonzentrationserhöhung von $30,9 \pm 7,9$ pg/ml auf. Die Toxingruppe lag dagegen mit einem Anstieg von $137,0 \pm 45,1$ pg/ml vierfach höher.

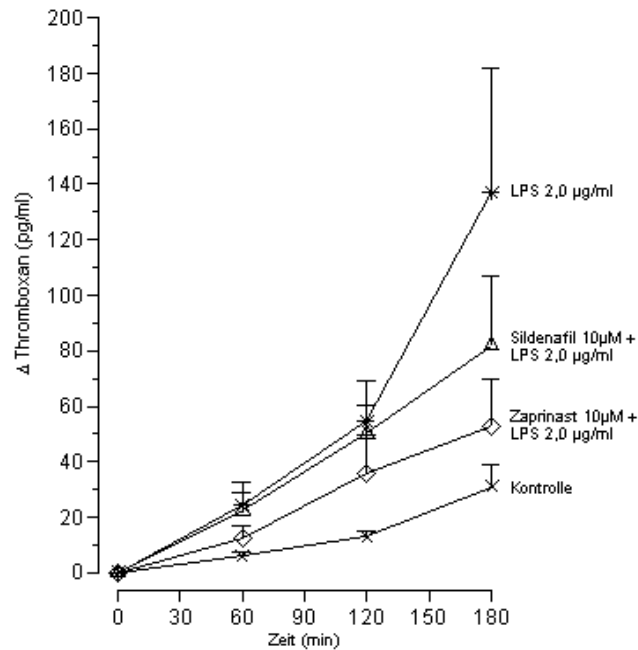


Abb. 25: Thromboxan Freisetzung ins Perfusat

Unter Zaprinast war die Thromboxanfreisetzung im Vergleich zur Toxingruppe deutlich eingeschränkt, nach 180 Minuten hatte sich die Konzentration nur um $53,0 \pm 16,5$ pg/ml erhöht. Sildenafil zeigte sich nicht so effektiv; hier fand immerhin noch ein Anstieg von $103,4 \pm 28,0$ pg/ml über die gesamte Versuchsdauer statt.

6.4.3 Freisetzung von Cysteinyl-Leukotrienen

Der Nachweis von Cys-LTs erfolgte mittels ELISA (s. Abb. 26). Untersucht wurden Versuche mit ECH für sich oder in Kombination mit einem Pharmakon sowie eine Kontrollgruppe. Die Probennahme erfolgte zu Versuchsbeginn ferner in der 5., 20., 40. und 60. Minute. Folgende Proben wurden gemessen:

| |
|---------------------------------|
| 1 Stunden Kontrolle |
| 0,3 HU/ml ECH |
| 0,3 HU/ml ECH + 1 µM Sildenafil |
| 0,3 HU/ml ECH + 1 µM Zaprinast |
| 0,3 HU/ml ECH + 7,5 µM MK-886 |

In der Kontrollgruppe war über die gesamte Versuchsdauer keine gesteigerte Freisetzung von Cys-LTs nachweisbar. Im Gegensatz dazu steigerte sich die Cys-LT-

Konzentration in der Exotoxingruppe um $409,4 \pm 111,8$ pg/ml, bei linearem Graphenverlauf.

Annähernd keine Cys-LT-Freisetzung fand in der MK-886-Gruppe statt. Erwartungsgemäß verhinderte der spezifische Lipoxigenaseinhibitor die ECH-aktivierte Cys-LT-Produktion, so dass nach einem absolut basalen Verlauf eine minimale Erhöhung der Cys-LT-Konzentration von $0,083 \pm 0,046$ pg/ml stand.

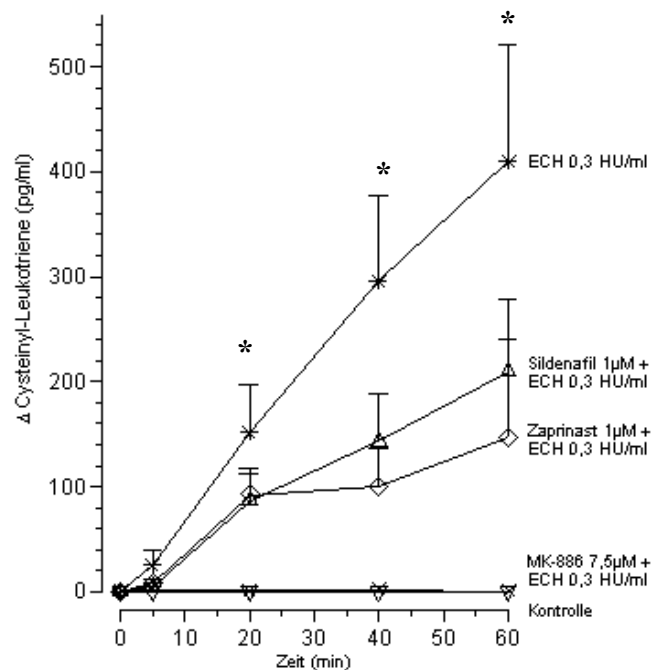


Abb. 26: Cysteinyl-Leukotrien Freisetzung ins Perfusat: Die markierten ECH-Werte unterscheiden sich signifikant (mindestens $p < 0,05$) von der Kontroll- (*) und der MK-886 Gruppe (*).

Auch die Vorbehandlung mit PDE5-Inhibitoren führte zu einer erniedrigten Cys-LT-Freisetzung, so kam es unter Sildenafil zu einer Zunahme von $209,9 \pm 68,0$ pg/ml und unter Zaprinast von nur $147,6 \pm 93,4$ pg/ml. Dies ist verglichen mit der ECH-Gruppe nur die Hälfte beziehungsweise ein gutes Drittel.

6.4.4 Freisetzung von cGMP

cGMP wurde über einen kommerziell erhältlichen RIA bestimmt (s. Abb. 27). Die Messungen wurden in den gleichen Versuchsgruppen vorgenommen, in denen auch Cys-LTs analysiert wurden. Gemessen wurden Proben die zu den Zeitpunkten 0., 20., und 60. Minute genommen worden waren.

| |
|--------------------------------------|
| 1 Stunden Kontrolle |
| 0,3 HU/ml ECH |
| 0,3 HU/ml ECH + 1 μ M Sildenafil |
| 0,3 HU/ml ECH + 1 μ M Zaprinast |
| 0,3 HU/ml ECH + 7,5 μ M MK-886 |

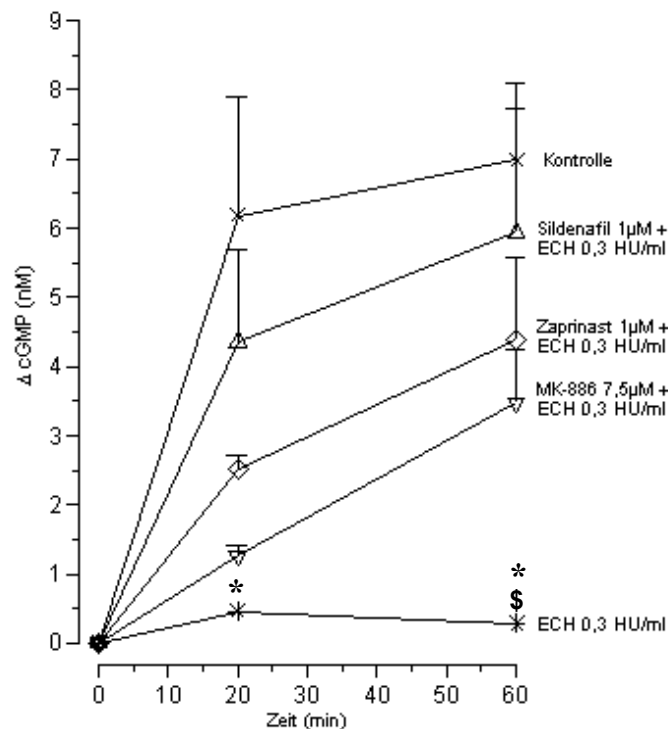


Abb. 27: cGMP Freisetzung ins Perfusat: Die markierten ECH-Werte unterscheiden sich signifikant (mindestens $p < 0,05$) von der Sildenafil- (\$) und Kontrollgruppe (*).

In der Kontrollgruppe war ein Anstieg an cGMP um $6,9 \pm 1,1$ nM nachweisbar. Dieser war besonders im ersten Drittel recht steil.

In der Exotoxingruppe hingegen sistierte die cGMP-Konzentration nahezu auf dem Initialwert und erhöhte sich nur um $0,3 \pm 0,3$ nM.

Da die PDE5-Inhibitoren den cGMP-Abbau in der Zelle verzögern ist es nicht verwunderlich, dass entsprechend vorbehandelte Herzen trotz ECH-Applikation höhere cGMP Werte aufweisen. Die mit Sildenafil vorbehandelte Gruppe steigerte die cGMP-Konzentration um $5,9 \pm 1,7$ nM, befand sich also relativ nahe an der Kontrollgruppe; unter Zaprinast fand noch eine Erhöhung um $4,4 \pm 1,2$ nM statt.

Die Vorbehandlung mit MK-886 resultierte nach 60 Minuten in einer Anhebung der cGMP-Konzentration um $3,5 \pm 0,8$ nM.

6.4.5 mRNA-Expression

Die mRNA Quantifizierung der unten genannten Gene wurde durchgeführt um aufzuklären, ob die Toxinperfusion mit LPS Auswirkungen auf die regulatorische Ebene haben und wenn ja, ob diese durch Pharmakaapplikation manipuliert werden können. Als Untersuchungsmaterial dienten linke Ventrikelpräparate.

| |
|--------------------------------|
| 3 Stundenkontrolle |
| 2 µg/ml LPS |
| 2 µg/ml LPS + 10 µM Sildenafil |
| 2 µg/ml LPS + 10 µM Zaprinast |

Untersucht wurde auf Genexpression von TNF- α (s. Abb. 28), Thombroxansynthase und COX-2 (s. Abb. 29). Die mRNA Konzentration wurde relativ in Bezug auf das Standardgen angegeben.

6.4.5.1 Genexpression von TNF- α

Nach 180 Minuten war in den Kontrollherzen eine relative Konzentration von 0,383 \pm 1,286 TNF- α mRNA Kopien pro 1 Kopie PBGD mRNA nachzuweisen.

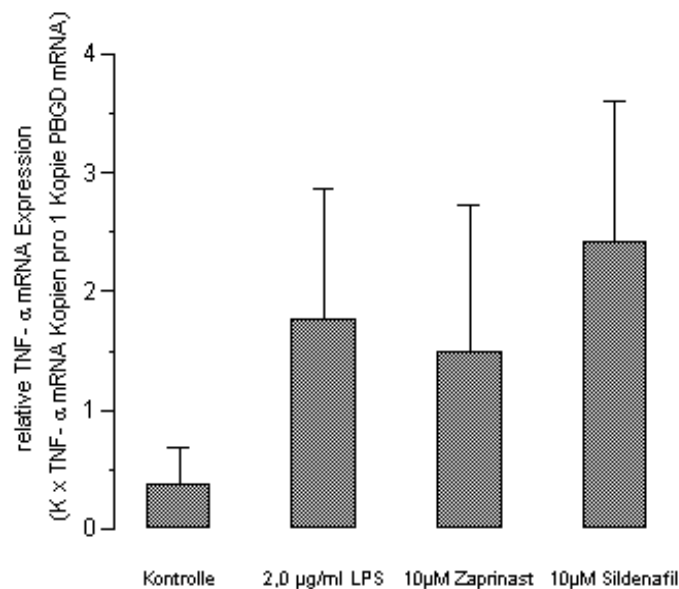


Abb. 28: Relative TNF- α -mRNA-Expression im Ventrikelmyokard

In den Herzen, die mit 2 µg/ml LPS perfundiert wurden, fand sich dagegen mit einer relativen Konzentration von 1,767 \pm 1,102 TNF- α mRNA Kopien pro 1 Kopie PBGD

mRNA eine um das etwa Viereinhalbfache erhöhte Expression von TNF- α mRNA im Ventrikelmyokard.

Bei den mit Sildenafil vorbehandelten Herzen war die Konzentration mit $2,419 \pm 1,176$ TNF- α - mRNA Kopien pro 1 Kopie PBGD mRNA sogar noch höher. Die mit Zaprinast vorinkubierten Herzen wiesen im Vergleich zur Toxingruppe eine erniedrigte mRNA Konzentration von $1,485 \pm 1,246$ TNF- α mRNA Kopien pro 1 Kopie PBGD mRNA auf.

6.4.5.2 Genexpression von Thromboxansynthase

Eine Hochregulierung der Thromboxansynthase durch die Perfusion konnte nicht beobachtet werden. Am höchsten war die Konzentration paradoxerweise in der Kontrollgruppe. In den mit $2 \mu\text{g/ml}$ LPS perfundierten Herzen lag die relative Thromboxansynthasekonzentration nach Versuchsende 35% niedriger. Im gleichen Bereich lagen die Herzen der Sildenafilgruppe. Mit Zaprinast behandelte Ventrikel wiesen nach 180 Minuten etwa die Hälfte der Konzentration der Kontrollgruppe auf.

6.4.5.3 Genexpression von COX-2

In der Kontrollgruppe ließ sich nach Versuchsende eine relative COX-2 mRNA-Konzentration von $0,133 \pm 1,244$ COX-2 mRNA Kopien pro 1 Kopie PBGD mRNA nachweisen. Im Vergleich war der mRNA-Spiegel in der Toxingruppe mit $3,496 \pm 1,196$ COX-2 mRNA Kopien pro 1 Kopie PBGD mRNA erhöht.

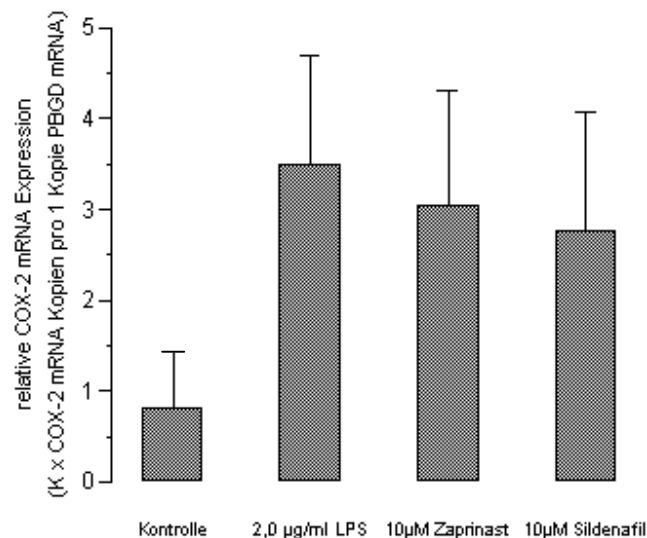


Abb. 29: Relative COX-2-mRNA-Expression im Ventrikelmyokard

Eine Vorbehandlung mit PDE5-Inhibitoren scheint die Expression nicht zu beeinträchtigen. Unter Zaprinast beträgt die relative mRNA-Konzentration noch 3,052 \pm 1,254 COX-2 mRNA Kopien pro 1 Kopie PBGD mRNA und unter Sildenafil nur 2,761 \pm 1,324 COX-2 mRNA Kopien pro 1 Kopie PBGD mRNA.

7 Diskussion

7.1 Septische Kardiomyopathie

Die in den letzten Jahren durch zahlreiche Faktoren gesteigerte Inzidenz der Sepsis geht zwangsweise mit einem Anstieg der sepsisinduzierten Kardiomyopathien einher, so dass diesen eine zunehmend größere Bedeutung zukommt (1, 2). Da im Rahmen einer akuten septischen Kardiomyopathie ein gesteigertes Herzzeitvolumen vorliegen kann, das anscheinend dem Schockgeschehen entgegenwirkt, wurde die Pumpschwäche des Herzens lange Zeit nicht erkannt oder nicht ausreichend beachtet. Faktisch ist es dem septischen Herzen häufig nicht möglich, seine Pumpleistung soweit zu erhöhen, wie es zur Aufrechterhaltung eines adäquaten Blutdrucks bei stark erniedrigtem systemischem Widerstand nötig wäre (6-9).

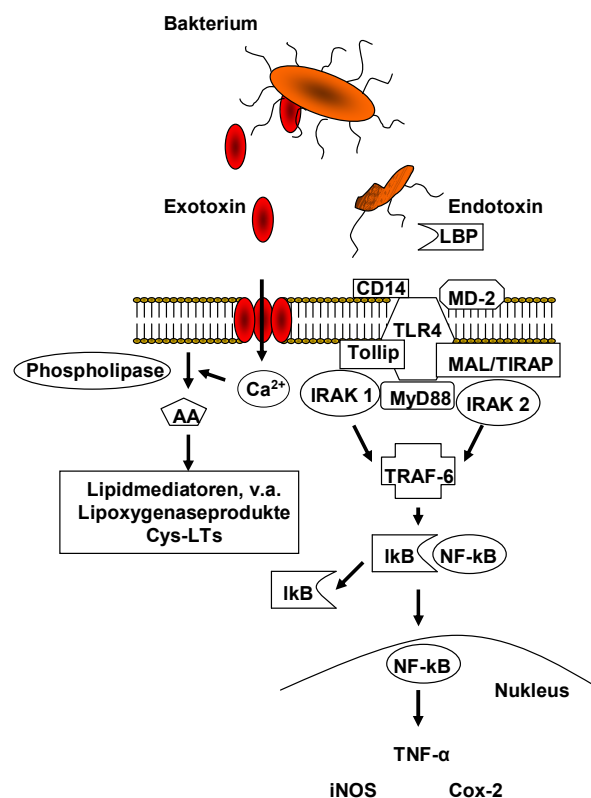


Abb. 30: Signalwege von ECH und LPS im Überblick

Zum einen kann die septische Kardiomyopathie durch Wirkung kardiodepressiver Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{Il-1}\beta$ hervorgerufen werden, deren Spiegel in der Sepsis erhöht sein können (72, 73). Zum anderen kann sie durch Mikrozirkulationsstörungen

innerhalb des Myokards ausgelöst werden, die auch ohne globale Minderperfusion zu einer hypoxisch bedingten Pumpinsuffizienz führen können (26-33).

Ursächlich für das Entstehen einer Sepsis ist eine Primärinfektion mit Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren oder Pilzen. Als häufigste Sepsisverursacher wurden Bakterien identifiziert. Bedeutend ist, dass das Krankheitsbild der Sepsis nicht an die Anwesenheit intakter Bakterien in der Zirkulation gebunden ist. Die hämatogene Streuung sezernierter Exotoxine und endotoxinhaltiger Zellfragmente reichen zur Induktion einer Sepsis aus (s. Abb. 30) (140-142). Die kardiovaskulären Veränderungen tragen wesentlich zur Induktion des septischen Multiorganversagens und des septischen Schocks bei. Die septische Kardiomyopathie, die sich im Falle einer Genesung innerhalb weniger Tage vollständig zurückbilden kann (10, 11), ist ein wichtiger Bestandteil der Veränderungen.

Zyklische Nukleotide stellen dabei einen wichtigen Bestandteil in der Regulation von koronarer Vasomotorik und kardialer Kontraktilität dar und spielen auch eine Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis (183).

Die vorliegende Arbeit soll klären, ob PDE5-Inhibitoren den kardiodepressiven Effekt von gramnegativen Bakterien beziehungsweise deren Endo- und Exotoxinen zumindest teilweise aufheben und so zu einem günstigeren Verlauf der Sepsis beitragen können.

7.2 Bezug zu vorherigen Arbeiten

In vorangegangenen Studien und Arbeiten konnten bereits die kardiodepressiven Einflüsse von LPS und ECH auf das Herz nachgewiesen werden. So wurde die Wirkung von LPS am Ganztiermodell, am isolierten Herzen sowie in Kardiomyozyten nachgewiesen (59, 109, 149, 150-152). Gleiches gilt für ECH (51, 140, 168-170, 176). Herauszuheben ist in diesem Zusammenhang, dass diese kardiodepressiven Effekte nur durch Toxinkonfrontation hervorgerufen wurden und die Präsenz intakter Bakterien zur Ausbildung einer septischen Kardiomyopathie nicht erforderlich war.

7.2.1 LPS führt zur Kardiodepression

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Ergebnisse der Endotoxinversuche an zellfrei perfundierten Rattenherzen (59). So konnte eine eindeutige Depression der Kontraktilität unter LPS im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden. Die Kontraktilität des linken Ventrikels nahm in LPS-perfundierten Herzen im Mittel um circa 30% des Ausgangswertes ab.

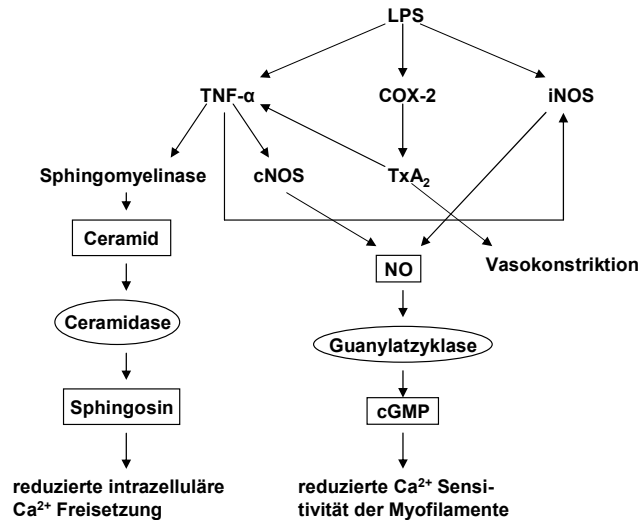


Abb. 31: LPS vermittelte Effekte am Herzen

Die koronare Perfusion protokolliert über den CPP blieb durch LPS unbeeinträchtigt, was die Entstehung von fokalen Mikrozirkulationsstörungen allerdings nicht ausschließt.

Das seit langem bekannte kardiodepressive Potential von LPS wird auf die Freisetzung von TNF- α zurückgeführt, einem Zytokin mit negativ inotroper Wirkung, die über Eingriffe in die Calciumhomöostase vermittelt wird (s. Abb. 31) (59, 130-132, 134).

Entsprechend wurde die Zunahme von TNF- α in den über die Versuchsdauer akquirierten Perfusatproben mittels ELISA bestimmt. Erwartungsgemäß kam es in der Kontrollgruppe über die gesamte Versuchsdauer nur zu einer geringen Anhebung der TNF- α -Konzentration. In der mit Endotoxin konfrontierten Gruppe kumulierte TNF- α im rezirkulierenden System um eine 15fach höhere Konzentration. Bemerkenswerterweise bleibt der TNF- α -Spiegel bis zur sechzigsten Minute relativ konstant, um dann sprunghaft anzusteigen, hier lässt sich ein zeitlicher Zusammenhang zwischen steigender TNF- α -Konzentration und abnehmender Kontraktilität herstellen.

Da eine parakrine Förderung der TNF- α -Produktion durch TxA₂ vermutet wird, wurden ebenfalls die TxA₂-Konzentrationszunahmen per ELISA gemessen (59). Die Thromboxankonzentration steigerte sich von der ersten Minute an, verstärkt vor allem in der letzten Stunde. Die Toxingruppe wies bei Versuchsende eine vierfach höhere Thromboxankonzentrationserhöhung auf als die Kontrollgruppe. Demnach kann eine denkbare Beeinflussung der TNF- α -Produktion durch TxA₂ bestätigt werden. Überdies verfügt TxA₂ über ein großes vasokonstriktives Potential (52, 60).

7.2.2 ECH bewirkt eine Vasokonstriktion im Koronargefäßsystem

Wie bereits in vorherigen Studien beschrieben, bewirkt ECH eine drastische Erhöhung des koronaren Gefäßwiderstandes und eine Abnahme der Kontraktilität (s. Abb. 32) (51). Diese Erkenntnisse konnten im Zuge dieser Arbeit bestätigt werden. Während die physiologischen Parameter der Kontrollgruppe durchweg stabil im Bereich des Ausgangsniveaus verliefen, führte die Exotoxingabe zu drastischen Veränderungen. Eine Applikation von 0,3 HU/ml ECH in den Perfusatkreislauf führte innerhalb kürzester Zeit zu einem deutlichen Anstieg des CPP.

Einen ähnlich rasanten Verlauf beobachtet man in der Entwicklung der Kontraktilitätsparameter.

Diese Kardiodepression ergibt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit aus kardialen Mikrozirkulationstörungen, welche durch die Leukotrienfreisetzung hervorgerufen werden (44, 49, 51, 170-173).

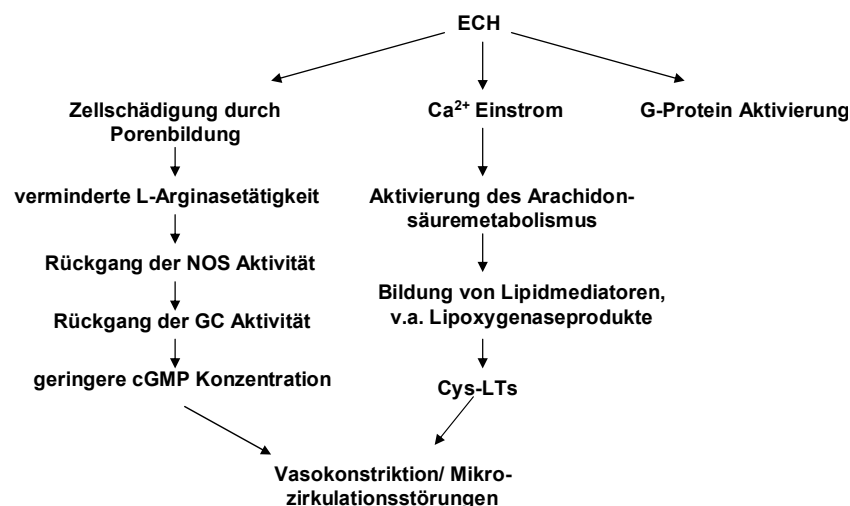


Abb. 32: ECH vermittelte Effekte am Herzen

Dies bestätigen Toxinversuche mit dem selektiven Lipoxygenaseinhibitor MK-886. Durch die mittels ELISA nachgewiesene vollständige Inhibition der Cys-LT-Produktion können die vasokonstriktorischen und damit auch kardiodepressiven Effekte von ECH nahezu komplett gehemmt werden. Direkt negativ inotrope Effekte wie sie für Leukotriene in früheren Studien postuliert wurden sind zu vernachlässigen, da sie sich in späteren Arbeiten nicht eindeutig nachweisen ließen (49). MK-886 nimmt vermutlich keinen Einfluss auf die porenformenden und G-Protein aktivierenden Eigenschaften des ECHs (144, 167, 167, 174, 175).

7.3 Potential der PDE5-Inhibitoren

Der Ansatz, den gerade beschriebenen toxininduzierten Kardiodepressionen mit Hilfe von PDE5-Inhibitoren entgegenzuwirken, ergibt sich aus folgenden Überlegungen:

Die Toxine erzeugen unter anderem über Mediatoren wie TxA_2 und Cys-LTs Vasokonstriktionen und fokale Ischämien, daraus resultieren Hypoxien, welche schlussendlich zur Kontraktilitätsschwächung des Herzens führen (27-33, 46-48, 50, 51, 53). Durch das Eingreifen der PDE5-Inhibitoren in den cGMP-Abbau mittels kompetitiver Hemmung der PDEs kommt es zu einer verlängerten cGMP-Wirkung.

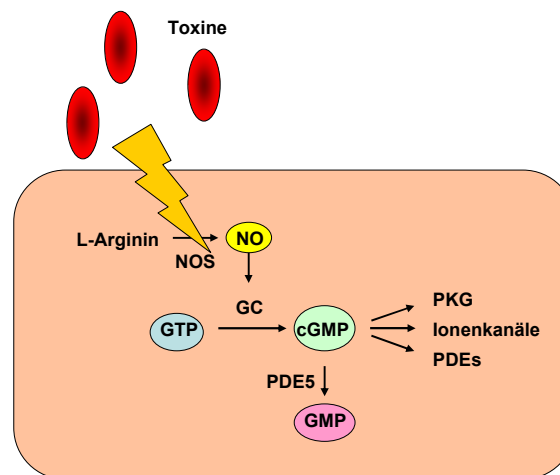


Abb. 33: Beeinträchtigung des NO Signalwegs in der glatten Gefäßmuskelzelle. Abkürzungen: GC: Guanylatzyklase, NOS: NO-Synthase, PKG: Proteinkinase G

cGMP seinerseits führt zu einer Verminderung der Kalziumfreisetzung, beziehungsweise der Rho-A abhängigen Calciumsensitivität in den glatten Gefäßmuskelzellen und bewirkt dadurch eine Vasodilatation (220, 221). Diese Änderungen in der Kalziumhomöostase scheinen PKG spezifisch vermittelt zu sein. So nimmt die cGMP aktivierte PKG Einfluss auf die regulatorische myosinbindende Untereinheit der Myosinphosphatase, die kalziumaktivierten maxi K^+ Kanäle (BK_{Ca}) und das Inositoltriphosphatrezeptor assoziierte cGMP Kinasesubstrat (IRAG) (222-226). Auch die toxinbedingte Schädigung der Gefäßendothelzellen führt zu einer verminderten NO-Synthese aus L-Arginin und damit einem erniedrigten cGMP-Spiegel (s. Abb. 33).

Gelänge es mit Hilfe der PDE5-Inhibitoren die Vasokonstriktion und die fokalen Ischämien über eine Erhöhung des cGMP-Spiegels zu minimieren, könnte dies zu einer Abweichung der Mikrozirkulationsstörungen führen.

Bedenken bezüglich der kardialen Funktion, schließlich bewirkt $\text{TNF-}\alpha$ über Aktivierung der cNOS/iNOS mit nachfolgender cGMP Erhöhung eine Depression der

Kardiomyozytenkontraktilität, sind unbegründet, da PDE5 in Herzmuskelzellen keine zentrale Rolle spielt (136-139, 188).

7.4 Effekte der PDE5-Inhibitoren

Die Applikation der PDE5-Inhibitoren Sildenafil und Zaprinast erfolgte vor der Toxingabe. Es kamen Inhibitorkonzentrationen von 1 μM und 10 μM zum Einsatz. Entsprechende Pharmakonkontrollversuche zeigten, dass die Inhibitoren alleine keine Auswirkungen auf die Kontraktilität oder den koronaren Gefäßwiderstand haben.

Zwar gelang es nicht, die kardiodepressiven Effekte der Toxine mit Hilfe der Inhibitoren vollständig aufzuheben, jedoch zeigten die vorbehandelten Herzen gegenüber den Toxinkontrollgruppen deutlich verbesserte Funktionsparameter.

7.4.1 Wirkung auf LPS konfrontierte Herzen

Es kommt sowohl unter Sildenafil als auch unter Zaprinast zu einer deutlichen Steigerung der linksventrikulären Schlagkraft gegenüber der Endotoxingruppe, welche inhibitorkonzentrationsabhängig zu sein scheint. Die maximale linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit fällt ebenfalls nicht ganz so stark ab, wie in den nicht inhibierten Versuchen. Auch kann hier ein konzentrationsabhängiger Inhibitoreffekt postuliert werden. Der koronare Perfusionsdruck bleibt sowohl von LPS allein als auch in Kombination mit den PDE5-Inhibitoren weitgehend unbeeinträchtigt.

Interessanterweise verbessern sich nicht nur die physiologischen Parameter sondern auch die Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$ und TxA_2 ist verringert. Dabei zeigte sich, dass die LPS vermittelte $\text{TNF-}\alpha$ -Freisetzung unter Sildenafil um zwei Drittel und unter Zaprinast um knapp die Hälfte vermindert wird. Die endotoxininduzierte Freisetzung von TxA_2 hingegen wird stärker durch Zaprinast gehemmt. So ist die Erhöhung der TxA_2 Konzentration unter Zaprinast um knapp zwei Drittel und unter Sildenafil nur um ein Drittel niedriger als in der LPS-Gruppe.

Scheinbar wirken die Inhibitoren auch auf die Freisetzung von Eicosanoiden und kardiodepressiven Zytokinen (52, 60, 113, 125-129).

7.4.2 Wirkung auf ECH konfrontierte Herzen

Bei den mit Inhibitoren vorbehandelten, toxinperfundierten Herzen steigt der koronare Perfusionsdruck um etwa ein Drittel weniger an als in der nur mit Exotoxin

konfrontierten Gruppe. Damit geht sekundär auch ein geringerer Abfall der Kontraktilitätsparameter einher. Der LVDP hält sich im Bereich des Ausgangswertes, dabei liegen die Ergebnisse für Sildenafil und Zaprinast auf ähnlichem Niveau. Die dP/dt_{\max} hält sich unter Sildenafil relativ konstant, fällt aber unter Zaprinast 10% unter den Initialwert.

Auffällig ist die verminderte Freisetzung von Cys-LTs, die unter Sildenafil nur die Hälfte und unter Zaprinast sogar nur ein gutes Drittel beträgt.

Es scheint also ein Einfluss auf die Freisetzung kardiodepressiver beziehungsweise vasokonstriktiver Eicosanoiden stattzufinden (44, 49, 51).

Im RIA konnte nachgewiesen werden, dass die cGMP Akkumulation im Perfusat nach alleiniger ECH-Konfrontation gegen null geht. Dies kann auf die Zerstörung der Endothelzellen und die dadurch verringerte cGMP-Produktion zurückzuführen sein (s. Abb. 33) (140). Die Verwendung der PDE5-Inhibitoren führt erwartungsgemäß zu einer höheren cGMP Akkumulation, die unter Sildenafil fast an den Kontrollwert herankommt und unter Zaprinast deutlich über der Hälfte des Kontrollwerts liegt.

7.5 Ischämie und Kardiodepression

Der Hauptmediator der endotoxinbedingten Kardiodepression ist das TNF- α . Neben den primär zu kontraktilen Dysfunktion führenden Mechanismen, die über Eingriffe in die Calciumhomöostase vermittelt sind (59, 130-132, 134), spielen sekundär die apoptotischen Veränderungen von Myokardzellen, die Liberation von freien Radikalen und die koronare Vasokonstriktion eine Rolle (227-233). Der apoptotische Signalweg wird über die TNF- α Rezeptoren TNFR-1 und -2 durch Caspaseaktivierung induziert und trägt zur kardialen Dysfunktion unter anderem durch myokardialen Zelluntergang bei (227). Der Liberation freier Radikale und der koronaren Vasokonstriktion kommen besondere Bedeutung zu, da es sich hier um selbstunterhaltende Prozesse handelt. Die durch TNF- α Beteiligung stimulierte Produktion freier Radikale führt ihrerseits zu einem weiteren Anstieg von TNF- α (228, 229). Auch die koronare Vasokonstriktion mündet in einem *circulus vitiosus*, da neben der endotoxininduzierten TNF- α Synthese in den Kardiomyozyten (59, 119-121) auch ischämische Bedingungen zur TNF- α Produktion in den Herzmuskelzellen führen (230-232). Diese Erkenntnis gewannen unter anderem Edmunds und Woodward durch Ischämie/Reperfuersionsversuche am isolierten Rattenherzen (233). Gleichzeitig wiesen sie auch die TNF- α bedingte

koronare Vasokonstriktion nach, der durch Inhibition der Sphingomyelinase, der Cyclooxygenase und durch TxA₂ Antagonisten entgegengewirkt werden konnte. Ein Versuch die koronare Konstriktion mit Bosentan, einem ET_{A/B} Rezeptorantagonist, zu inhibieren scheiterte, weshalb eine Beteiligung von Endothelin ausgeschlossen werden kann (233). Diese koronare Vasokonstriktion bewirkt fokale Ischämien, welche wiederum zur Bildung von TNF- α führen (230-233).

Ein Nachweis dieser koronaren Vasokonstriktion über einen CPP-Anstieg bei konstantem Fluss konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erbracht werden, möglicherweise sind die Veränderungen fokal mikrozirkulatorischer Natur und deshalb als Anstieg des Gesamtgefäßwiderstands nicht messbar.

Die genaue Ätiologie der TNF- α bedingten koronaren Vasokonstriktion ist noch nicht erforscht, Edmunds und Woodward stellen dazu mehrere Hypothesen auf (233). Die von Ihnen durchgeführten Untersuchungen sprechen für eine Sphingomyelinase induzierte, Sphingosin vermittelte TxA₂ Freisetzung, die ihrerseits zur koronaren Vasokonstriktion führt. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass eine Sphingosin induzierte koronare Konstriktion beim Schwein komplett durch Indomethacin, einem Cyclooxygenaseinhibitor, aufgehoben werden konnte (234). Außerdem konnte in Fibroblasten durch exogenes Sphingosin eine zytokininduzierte Prostaglandinproduktion über Aktivierung sowohl der Phospholipase A₂ als auch der Cyclooxygenase gesteigert werden (235, 236). Es scheint also, dass TxA₂ der finale Mediator der TNF- α bedingten koronaren Vasokonstriktion ist.

Interessanterweise konnte eine Stimulierung der Sphingomyelinase durch AA nachgewiesen werden (237), und einige Autoren sind der Meinung, dass die TNF- α induzierte Phospholipase A₂ essentiell ist für die Aktivierung der Sphingomyelinase (237). Das führt zu der Möglichkeit eines sich selbstverstärkenden Mechanismus in der TNF- α Signaltransduktion: TNF- α induzierte Phospholipase A₂ setzt AA frei, welche über Sphingomyelinaseaktivierung zur Sphingosinfreisetzung führt, Sphingosin seinerseits verstärkt den AA Abbau und bewirkt eine weitere Aktivierung der Phospholipase A₂.

Es zeigt sich also, dass TNF- α für eine Vielzahl von Mechanismen verantwortlich ist, welche zur kardialen Dysfunktion beitragen. Des Weiteren wird deutlich, dass ein großer Anteil davon selbstunterhaltend, beziehungsweise sogar selbstverstärkend ist. Das bedeutet, dass das Vorhandensein von TNF- α die Produktion von weiterem TNF- α begünstigt und damit das Voranschreiten des kardiodepressiven Effektes. Ein

wesentlicher Mechanismus ist die Induktion einer koronaren Vasokonstriktion mit daraus resultierenden fokalen ischämischen Veränderungen (30, 33). Hier ist ein Ansatzpunkt für den Einsatz von PDE5-Inhibitoren gegeben, die über eine verlängerte cGMP Wirkung eine Vasodilatation bewirken und so der Ischämie induzierten TNF- α Produktion entgegenwirken.

Im Gegensatz zur offensichtlich in letzter Instanz TxA₂ vermittelten Vasokonstriktion nach Endotoxinkonfrontation, scheint die exzessive koronare Konstriktion nach ECH-Gabe Cys-LT induziert zu sein. Es sind zwar erhöhte Konzentrationen von TxA₂ und PGI₂ nachweisbar, doch hat der Einsatz von Indomethacin, im Gegensatz zur Intervention mit MK-886, keinerlei Einfluss auf die CPP Steigerung (51). Ein weiterer wichtiger Punkt ist die fehlende Anreicherung des Perfusats mit TNF- α (51). Die Kardiodepression resultiert daher höchstwahrscheinlich ausschließlich aus kardialen Mikrozirkulationsstörungen. Diese zeichnen sich durch das gleichzeitige Auftreten über- und unterperfundierter Bereiche in direkter Nachbarschaft aus (30, 33, 51, 52). Vergleichbar ist der durch Staphylococcus α -Toxin hervorgerufene kardiodepressive Effekt. Hier kommt es ebenfalls nach Konfrontation mit einem porenformenden Exotoxin zur Freisetzung eines Eicosanoids, TxA₂, mit nachfolgender Perfusionsstörung, die in kardialer Dysfunktion resultiert (52). Diese Kardiodepression lässt sich durch pharmakologische Intervention mit Indomethacin, beziehungsweise Daltroban, einem TxA₂ Rezeptorantagonisten, vollständig aufheben, ebenso wie die durch ECH über Cys-LTs induzierte Kontraktilitätsminderung durch Beseitigung des vasokonstriktiven Effektes mittels MK-886.

Das kardiodepressive Potential von Cys-LTs und die gesteigerte Produktion von Cys-LTs unter ischämischen Bedingungen lässt sich auch an folgenden Studien belegen: Lee et al. gelang es am isolierten Rattenherzen eine erhöhte endogene Cys-LT Produktion unter ischämischen Bedingungen nachzuweisen (238). Diese scheint in direkter Verbindung zum gesteigerten Koronargefäßwiderstand zu stehen. So führte eine Vorbehandlung der Herzen mit dem LTD₄, LTE₄ Rezeptorantagonist LY171883 zu einem deutlich verminderten Anstieg des koronaren Gefäßwiderstandes und einer insgesamt besseren funktionalen Erholung des Herzens in der Reperfusionphase (238). Ähnliches zeigten Rossoni et al. am isolierten Kaninchenherzen (239). Auch hier korrelierte der Anstieg des koronaren Gefäßwiderstandes mit einer gesteigerten Cys-LT Produktion. Der Einsatz von BAY X1005 einem Leukotriensyntheseinhibitor resultierte in einer nahezu vollständigen Inhibition der LT-Synthese und einer deutlich geringeren

CPP-Steigerung (239). In vivo Experimente mit Kaninchen demonstrierten außerdem eine deutlich reduzierte Mortalitätsrate bei Tieren, die vor der Induzierung eines akuten myokardialen Infarkts mit Bay X1005 vorbehandelt waren.

Die Induzierung der Cys-LT Produktion durch ischämische Bedingungen und der Anstieg des koronaren Gefäßwiderstandes durch Cys-LTs verstärken sich demnach gegenseitig und können durch eine verbesserte Perfusion abgeschwächt werden (239).

Es liegt also nahe, dass die durch Anwendung eines PDE5-Inhibitors potenzierten, cGMP vermittelten, vasodilatativen Effekte ebenfalls zu einer Minderung der Kardiodepression führen.

7.6 Regulation der Genexpression durch cGMP

Es stellt sich die Frage wie die Cys-LT, TNF- α sowie TxA₂ Liberation von PDE5-Inhibitoren direkt oder indirekt beeinflusst werden kann. In diesem Zusammenhang muss auf die genregulierenden Effekte von cGMP hingewiesen werden.

Obwohl die transkriptionale Regulation von cAMP in den letzten Jahrzehnten intensiv erforscht worden ist, finden die regulativen Eigenschaften von cGMP bezüglich der Genexpression erst seit kurzem Beachtung. Mittlerweile ist eine positive und/oder negative cGMP vermittelte Beeinflussung der mRNA Expression für mehr als 50 Gene bekannt, jedoch sind in den meisten Fällen die genauen Mechanismen noch nicht verstanden (240).

So wird unter anderem die Expression des inflammatorischen Zytokins TNF- α und der an inflammatorischen Prozessen beteiligten Zytokin induzierenden iNOS und COX-2 Gene durch cGMP reguliert (241-244). Ein Einfluss von cGMP auf die Cys-LT-Produktion, beziehungsweise Lipoxygenasen mRNA ist nicht beschrieben, kann aber analog zur Beeinträchtigung der COX-2 mRNA vermutet werden, COX-2 ist unter anderem für die LPS induzierte TxA₂ Produktion verantwortlich (59). Sowohl positive als auch negative Effekte des cGMP auf die Expression der oben genannten Gene sind beschrieben, welche in einigen Fällen zu einer biphasischen Regulation führen. Diese ist gekennzeichnet durch eine frühe transkriptionale Upregulation, gefolgt von einer posttranskriptionalen Downregulation verursacht durch mRNA Destabilisierung (245-247).

Im vorliegenden Fall sind besonders die mRNA destabilisierenden Effekte interessant, wie sie in glatten Gefäßmuskelzellen, Kardiofibroblasten, aber auch LPS stimulierten Makrophagen und Mesangialzellen beschrieben sind (245, 248, 249). Man nimmt an,

dass die cGMP bedingte Downregulierung des ubiquitären mRNA bindenden Proteins HuR möglicherweise für die Destabilisierung der mRNA oben genannter Gene verantwortlich ist, da HuR neben cGMP die Stabilität der mRNA von TNF- α , iNOS und COX-2 reguliert (247). Folglich wäre eine posttranskriptionale Modulation der Genexpression möglich, welche in einer Verminderung der mRNA Konzentration resultieren würde.

Ferner kann es zu einer indirekten Regulierung von Transkriptionsfaktoren durch die Beeinträchtigung des Transkriptionsaktivators NF- κ B kommen. Dieser ist für die Expression inflammationsassoziiierter Gene, einschließlich derer von Zytokinen wie zum Beispiel TNF- α und Adhäsionsmolekülen, zuständig (144, 162, 164, 250). NF- κ B wird durch die Bindung an zytosolische I κ B Proteine inaktiviert. In humanen Endothelzellen kommt es durch cGMP zur Hemmung einer zytokininduzierten NF- κ B Aktivierung und einer Stabilisierung der I κ B Proteine (251, 252). Demzufolge ist auch eine mRNA reduzierende Intervention durch cGMP auf transkriptionaler Ebene denkbar.

Der Versuch, diese genregulierenden Eigenschaften cGMPs mittels mRNA Quantifizierung nachzuweisen, gelang nicht. So konnten keine eindeutigen Beziehungen zwischen Mediatorkonzentration und entsprechender mRNA-Expression abgeleitet werden. Allerdings könnte das vollständige Fehlen signifikanter mRNA Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen darauf hindeuten, dass ein relativ hohes Grundrauschen besteht, in dem geringfügige, jedoch für die Mediatortranslation relevante mRNA Expressionsänderungen nicht auffallen

Eine weitere Möglichkeit wäre eine cGMP vermittelte Beeinflussung der Translation. Durch eine Modulation der Translation könnte es trotz erhöhter Genexpression zu einer reduzierten Proteinsynthese und damit verminderten Mediatorkonzentrationen kommen. Die Möglichkeit der Translationsregulation durch cGMP wurde beispielsweise von Stockert in seinen Arbeiten über Asialoglycoproteinrezeptoren beschrieben (253, 254). Daneben ist eine mögliche Kreuzaktivierung cAMP abhängiger Mechanismen denkbar.

7.7 Entwicklung des kardioprotektiven Effekts der PDE5-Inhibitoren

Zusammenfassend ergibt sich ein Geflecht gegenseitiger Wechselwirkungen. Für die LPS-Versuche lässt sich folgender Wirkmechanismus annehmen: Der erhöhte cGMP-Spiegel führt zu einer koronaren Vasodilatation, die Mikrozirkulationsstörungen

vorbeugt und damit die Myokardversorgung verbessert sowie die weitere Freisetzung von TNF- α vermindert (216, 217, 230-233). Auf diese Weise wird frühzeitig in die sich teilweise selbstunterhaltenden Mechanismen eingegriffen, und den TNF- α abhängigen kardiodepressiven Effekten, wie der Aktivierung der cNOS/iNOS, des Sphingomyelinasesignalwegs, der freien Radikalliberation und der Apoptose, entgegengewirkt (59, 130-132, 134, 227-233).

Im Falle der ECH-Versuche steht ebenfalls die vasodilatative Wirkung am Koronargefäßsystem im Vordergrund. Diese beruht einerseits auf einer verlängerten cGMP Wirkung, andererseits auf einer verringerten Cys-LT Freisetzung. Die verbesserte Perfusion durchbricht nämlich die sich selbstunterhaltende, ischämisch bedingte Cys-LT Liberation und vermindert so den weiteren Anstieg des koronaren Gefäßwiderstandes (238, 239). Sekundär zur Senkung des koronaren Gefäßwiderstandes kommt es nahezu zur vollständigen Aufhebung der Kardiodepression (44, 49, 51, 220, 221, 238, 239).

7.8 Klinische Relevanz

Die Bedeutung der Sepsis nimmt in der heutigen Zeit mit steigender Inzidenz stetig zu, insbesondere weil die Letalität verhältnismäßig hoch ist. Diese ist hauptsächlich in den gefürchteten Komplikationen wie dem Multiorganversagen und dem septischen Schock begründet (2, 5). Zu diesen Komplikationen kommt es, wenn es dem durch Toxine und Mediatoren vorgeschädigten Herzen nicht mehr möglich ist, die durch das Versacken des Blutes in der Peripherie geforderte Pumpleistung zu erbringen. Besondere Beachtung kommt dabei dem Umstand zu, dass die alleinige Streuung von endotoxinergen Zellfragmenten und sezernierten Exotoxinen zur Induktion einer septischen Kardiomyopathie ausreicht (140-142). So kann eine auf Grund der Sepsis induzierte Antibiotikapplikation zur Anreicherung von Endotoxinen führen und die Gesamtsituation bedrohlich verschlechtern, als Stichwort sei die Herxheimer Reaktion genannt. Umso entscheidender ist es, dass diese Phase der akuten Hypotension gut überstanden wird, da dies entscheidend zur Verbesserung der Prognose beiträgt und die pathologischen Alterationen am Herzen sich nach einigen Tagen vollständig zurückbilden. (10, 11) Gerade auf diesem Gebiet bescheinigt die vorliegende Arbeit den PDE5-Inhibitoren ein enormes Potential. So kommt es unter Einwirkung der PDE5-Inhibitoren zu einer deutlichen Verbesserung der Kontraktilität. Ein besonders

interessanter Aspekt ist, dass die protektiven Mechanismen an diversen Stellen gleichzeitig ansetzen und sich bestimmte Effekte synergistisch verstärken. So ist eine protektive Wirkung primär durch eine Verbesserung der koronaren Blutversorgung und sekundär über die Beeinflussung verschiedener Mediatoren nachweisbar.

Diese Erkenntnisse wurden allerdings am isolierten Organ gewonnen und sind nicht eins zu eins auf den Gesamtorganismus übertragbar. Insbesondere die vasodilatativen Eigenschaften der PDE5-Inhibitoren könnten im Status der Hypotension für den Gesamtorganismus zum Problem werden.

Es sind also weiterführende Untersuchungen am Gesamtorganismus nötig, um beurteilen zu können, in wie weit man sich das große Potential der PDE5-Inhibitoren in der Sepsis zu Nutze machen kann und um den genauen Wirkmechanismen auf den Grund zu gehen. Grundsätzlich zeigt die vorliegende Arbeit, dass neben den β -adrenerg, positiv inotrop wirkenden PDE3-Inhibitoren wie Amrinone und Milrinone auch den PDE5-Inhibitoren wie Sildenafil und Zaprinast im Kontext der septischen Kardiomyopathie Beachtung zu schenken ist.

8 Zusammenfassung

8.1 Zusammenfassung

Durch Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren oder Pilze kommt es zu Primärinfektionen, in deren Folge sich eine Sepsis entwickeln kann. Die häufigsten Sepsisverursacher sind Bakterien, wobei der Tatsache, dass das Krankheitsbild der Sepsis nicht an die Anwesenheit intakter Bakterien in der Zirkulation gebunden ist sondern die hämatogene Streuung sezernierter Exotoxine und endotoxinhaltiger Zellfragmente zur Induktion einer Sepsis ausreichen, besondere Bedeutung beigemessen werden muss.

Die während einer Sepsis auftretenden kardiovaskulären Veränderungen tragen entscheidend zur Induktion des septischen Multiorganversagens sowie des septischen Schocks bei. Es ist dem Herzen im Zuge einer akuten septischen Kardiomyopathie häufig nicht möglich, seine Pumpleistung so zu erhöhen, wie es zur Aufrechterhaltung eines adäquaten Blutdrucks bei stark erniedrigtem systemischem Widerstand nötig wäre. Die septische Kardiomyopathie kann durch die Wirkung kardiodepressiver Zytokine wie TNF- α und Il-1 β hervorgerufen werden; daneben sind Mikrozirkulationsstörungen innerhalb des Myokards, welche auch ohne globale Minderperfusion zu einer hypoxisch bedingten Pumpinsuffizienz führen können, als mögliche Ursache anzusehen.

Zyklische Nukleotide stellen dabei einen wichtigen Bestandteil in der Regulation von koronarer Vasomotorik und kardialer Kontraktilität dar, überdies spielen sie auch eine Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis.

Die vorliegende Arbeit behandelt die Frage, ob Phosphodiesterase (PDE5) -Inhibitoren den kardiodepressiven Effekt gram-negativer Bakterien respektive deren Endo- und Exotoxinen zumindest teilweise aufheben und so zu einem günstigeren Verlauf der Sepsis beitragen können. Dazu wurden isolierte Rattenherzen mit *Escherichia coli* Hämolysin (ECH) und Lipopolysaccharid (LPS) perfundiert. Die dadurch generierte Kardiodepression sowie Vasokonstriktion im Koronargefäßsystem sollten mit Hilfe von Sildenafil und Zaprinast inhibiert werden, was partiell gelang. Desweiteren wurde durch die Aufarbeitung von Ventrikelpräparaten eine verminderte Freisetzung kardiodepressiver Mediatoren, insbesondere von TNF- α und Cysteinyl-Leukotrienen (Cys-

LT), nachgewiesen. Eine Beeinflussung der Genexpression hingegen konnte nicht gezeigt werden.

Für die LPS-Versuche stellt sich der protektive Effekt folgendermaßen dar: Der durch die PDE5-Inhibitoren erhöhte cGMP-Spiegel führt zu einer koronaren Vasodilatation, welche Mikrozirkulationsstörungen vorbeugt, was zur Verbesserung der Myokardversorgung und einer verminderten Freisetzung von TNF- α führt. Durch diese zeitige Intervention in die teilweise selbstunterhaltenden Mechanismen können der TNF- α abhängige kardiodepressive Effekt, aber auch die Aktivierung der cNOS/iNOS, des Sphingomyelinasesignalwegs, der freien Radikalliberation und der Apoptose antagonisiert werden.

Im Falle der ECH-Versuche steht ebenfalls die vasodilatative Wirkung der PDE5-Inhibitoren im Koronargefäßsystem im Vordergrund. Diese beruht sowohl auf einer prolongierten cGMP Wirkung als auch auf einer herabgesetzten Cys-LT Liberation. Die verbesserte Perfusion verhindert die sich selbstunterhaltende, ischämisch bedingte Cys-LT Freisetzung und verringert so eine weitere Erhöhung des koronaren Gefäßwiderstandes. Infolge der Senkung des koronaren Gefäßwiderstandes wird die Kardiodepression nahezu vollständig aufgehoben.

Die gewonnenen Ergebnisse deuten auf ein protektives Potential der PDE5-Inhibitoren bezüglich der septischen Kardiomyopathie hin.

8.2 Summary

Microorganisms like bacteria, viruses and fungi cause primary infections, which can lead to sepsis. In fact, sepsis is primarily caused by bacteria. Induction of septicemia is not dependent on the presence of intact bacterial organisms in the blood circulation. Hematogenic spreading of secreted bacterial exotoxins as well as cellular fragments containing endotoxins can also lead to sepsis.

Cardiovascular alterations due to sepsis crucially contribute to multiple organ dysfunction syndrome and to septic shock. The heart of septic patients is frequently unable to increase cardiac output adequately to compensate the systemic fall in blood pressure. On the one hand septic cardiomyopathy can be induced by cardiodepressive cytokines like TNF- α or Il-1 β and on the other hand by microcirculatory dysfunctions within the myocardium, which even without global ischemia may lead to a decreased cardiac output due to hypoxia.

Cyclic nucleotides play an important role in coronary vasoconstriction and cardiac depression and also in pathophysiology of sepsis.

The present study investigates in how far the phosphodiesterase (PDE5) inhibitors Sildenafil and Zaprinast could be able to inhibit the cardiodepressive effect of gram-negative bacteria and their endo- and exotoxins respectively, which then could lead to an improvement of the prognosis. Isolated rat hearts were perfused with *Escherichia coli* hemolysin (ECH) and lipopolysaccharides (LPS) respectively which lead to cardiodepression and coronary vasoconstriction. After treatment with Sildenafil and Zaprinast respectively this effect could be partially decreased. Analysis of samples gained from ventricular tissue revealed a decreased liberation of cardiodepressive mediators, such as TNF- α and cysteinyl-leukotrienes (Cys-LT). Alterations in gene expression could not be shown.

The protective effect of the PDE5-inhibitors in the LPS perfused rat hearts can be explained in the following way: PDE5-inhibitor elevate the cGMP levels which lead to coronary vasodilatation inhibiting microcirculatory dysfunction. This improves myocardial supply and decreases TNF- α liberation. The early intervention in the partially self engaging mechanisms inhibit the TNF- α dependent cardiodepressive effect, activation of the cNOS/iNOS in the sphingomyelinase signaling pathway, free radical liberation and apoptosis.

The main effect of PDE5-inhibitor treatment on ECH perfused hearts is a coronary vasodilatation due to a prolonged cGMP impact and a decreased Cys-LT liberation. PDE5-inhibitors decrease self engaging, ischemic induced Cys-LT liberation, which in the end leads to a minimized increase in coronary vascular resistance. Due to the decrease of the coronary resistance cardiodepression can be abolished nearly completely.

All results gained in this study recommend a beneficial potential of PDE5-inhibitors in septic cardiomyopathy.

9 Literaturverzeichnis

- (1) Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991; 115:457-469
- (2) Centers for Disease Control. Increase in hospital discharge survey rates for septicaemia – United States, 1979-1987. *Morb Mortal Wkly Rep* 1990; 39:31-34
- (3) Kumar A, Haery C, Parrillo JE. Myocardial dysfunction in septic shock: part I. Clinical manifestation of cardiovascular dysfunction. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2001; 15:364-376
- (4) Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101:1644-1655
- (5) Parrillo JE, moderator. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113:227-242
- (6) Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 1993; 328:1471-1478
- (7) Parker MM, Shelhamer JH, Natanson C, Alling DW, Parrillo JE. Serial cardiovascular variables in survivors and nonsurvivors in human septic shock: heart rate as an early predictor of prognosis. *Crit Care Med* 1987; 15:923-929
- (8) Parker MM, Shelhamer JH, Bacharach SL, Green MV, Natanson C, Frederick TM, Damske BA, Parrillo JE. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med* 1984; 100:483-490

- (9) Parker MM, McCarthy KE, Ognibene FP, Parrillo JE. Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans. *Chest* 1990; 97:126-131
- (10) Ognibene FP, Parker MM, Natanson C, Shelhamer JH, Parrillo JE. Depressed left ventricular performance: response to volume infusion in patients with sepsis and septic shock. *Chest* 1988; 93:903-910
- (11) Parker MM, Ognibene FP, Parrillo JE. Reversible depression of myocardial function in septic shock (SS) confirmed by a load-independent measure of ventricular performance. *Clin Res* 1990; 38:340A. abstract
- (12) Parker MM, Suffredini AF, Natanson C, Ognibene FP, Shelhamer JH, Parrillo JE. Responses of left ventricular function in survivors and nonsurvivors of septic shock. *J Crit Care* 1989; 4:19-25
- (13) Liu MW. Mechanisms of membrane alterations in endotoxin shock: roles of phospholipase and phosphorylation. *Circ Shock* 1990; 30:43-49
- (14) Yu P, Bopughner D, Martin C, Keys J, Sibbald W. Myocardial collagen damage in rats with hyperdynamic sepsis at 24 and 48 hrs. *Crit Care Med* 1993; 21(4)[Suppl]:S277
- (15) Wangensteen SL, Geissenger WT, Lovett WL, Glenn TM, Lefer AM. Relationship between splanchnic blood flow and a myocardial depressant factor in endotoxin shock. *Surgery* 1971; 69:410-418
- (16) Laxson DD, Homans DC, Dai X-Z, Sublett E, Bache RJ. Oxygen consumption and coronary reactivity in postischemic myocardium *Circ Res* 1989; 64:9-20
- (17) Mosher P, Ross J Jr, McFate PA, Shaw RF. Control of coronary blood flow by an autoregulatory mechanism. *Circ Res* 1964; 14:250-259

- (18) Hoffman JIE. Maximal coronary flow and the concept of coronary vasculature reserve. *Circulation* 1984; 70(2):153-159
- (19) Kanatsuka H, Lamping KJ, Eastham CL, Marcus ML. Heterogeneous changes in epimyocardial microvascular size during graded coronary stenosis: evidence of the microvascular site for autoregulation. *Circ Res* 1990; 66:389-396
- (20) Folkow B. Description of the myogenic hypothesis. *Circ Res* 1964; 15[Suppl 1]:1279-1287
- (21) Broten TP, Feigl EO. Role of myocardial oxygen and carbon dioxide in cardiac autoregulation. *Am J Physiol* 1992; 262:H1231-H1237
- (22) Drake-Holland AJ, Laird JD, Noble MIM, Spaan JAE, Vergroesen I. Oxygen and coronary vascular resistance during autoregulation and metabolic vasodilatation in the dog. *J Physiol (Lond)* 1984; 348:285-299
- (23) Martini J, Honig CR. Direct measurement of intercapillary distance in beating rat heart in situ under various conditions of O₂ supply. *Microvasc Res* 1969; 1:244-256
- (24) Fish RE, Burns AH, Lang CH, Spitzer JA. Myocardial dysfunction in a nonlethal, nonshock model of chronic endotoxemia. *Circ Shock* 1985; 16:241-252
- (25) Fish RE, Lang CH, Spitzer JA. Regional blood flow during continuous low-dose endotoxin infusion. *Circ Shock* 1986; 18:267-275
- (26) Bloos F, Morisaki H, Neal A, Pitt M, Martin C, Ellis C, Sibbald WJ. Is the circulatory "reserve" supporting tissue O₂ availability depressed in normotensive hyperdynamic sepsis? *Crit Care Med* 1992; 20(4):S55
- (27) Baker CH, Sutton, ET, Zhou Z, Dietz JR. Microvascular vasopressin effects during endotoxin shock in the rat. *Circ Shock* 1990; 30:81-95

- (28) Thomas JR, Harlan JM, Rice CL, Winn RK. Role of leukocyte CD11/CD18 complex in endotoxin and septic shock in rabbits. *J Appl Physiol* 1992; 73:1510-1516
- (29) Powell RJ, Machiedo GW, Rush BF Jr. Decreased red blood cell deformability and impaired oxygen utilization during human sepsis. *Am Surg* 1993; 59:65-68
- (30) Hersch M, Gnidec AA, Bersten AD, Troster M, Rutledge FS, Sibbald WJ. Histologic and ultrastructural changes in nonpulmonary organs during early hyperdynamic sepsis. *Surgery* 1990; 107:397-410
- (31) Ince C, Ashurf JF, Avontuur JAM, Wieringa PA, Spaan JAE, Bruining HA. Heterogeneity of the hypoxic state in rat heart is determined at capillary level. *Am J Physiol* 1993; 264:H294-H301
- (32) Kleinmann WM, Krause SM, Hess ML. Differential subendocardial perfusion and injury during the course of gram-negative endotoxemia. *Adv Shock Res* 1980; 4:139-152
- (33) Groeneveld ABJ, van Lambalgen AA, van den Bos GC, Bronsveld W, Nauta JJP, Thijs LG. Maldistribution of heterogeneous coronary blood flow during canine endotoxin shock. *Cardiovasc. Res* 1991, 25:80-88
- (34) Bernard GR, Reines HD, Halushka PV, Higgins SB, Metz CA, Swindell BB, Wright PE, Watts FL, Varbanac JL. Prostacyclin and thromboxane A₂ formation is increased in human sepsis syndrome. Effects of cyclooxygenase inhibition. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:1095-1101
- (35) Tolman KG. Eicosanoids and liver. *Prostagl Other Lip Med* 2000; 61:164-174
- (36) Swith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996; 271:33157-33160

- (37) Liu SF, Newton R, Evans TW, Barnes PJ. Differential regulation of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 gene expression by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat. *Clin Sci (Lond)* 1996; 90:301-306
- (38) Wong SC, Fukuchi M, Melnyk P, Rodger I, Giaid A. Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor-kappa B in myocardium of patients with congestive heart failure. *Circulation* 1998; 98:100-103
- (39) Spiecker M, Liao JK. Vascular protective effects of cytochrome p450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Arch Biochem Biophys* 2005; 433(2):413-420
- (40) Michaelis R. Die Cytochrom P450 Epoxygenase 2C) induziert über die Aktivierung des EGF-Rezeptors Angiogenese. Presstext DGK 04/2003
- (41) Piper PJ, Letts LG, Galton SA. Generation of a leukotriene substance from porcine vascular and other tissues. *Prostaglandines* 1983; 25:591-599
- (42) Keller AM, Clancy RM, Barr ML, Marboe CC, Canon PJ. Acute reoxygenation injury in the isolated rat heart: role of resident cardiac mast cells. *Circ Res* 1988; 63:1044-1052
- (43) Grimminger F, Scholz C, Bhakdi S, Seeger W. Subhemolytic doses of *Escherichia coli* hemolysin evoke large quantities of lipoxygenase products in human neutrophils. *J Biol Chem* 1991; 266:14262
- (44) Lee CC, Appleyard RF, Byrne JG, Cohn LH. Leukotriene D₄ and E₄ produced in myocardium impair coronary flow and ventricular function after two hours of global ischemia in rat heart. *Cardiovasc Res* 1993; 27:770-773
- (45) Sala A, Rossoni G, Buccellati C, Berti F, Folco G, Maclouf J. Formation of sulphidopeptide-leukotriene by cell-cell interaction causes coronary vasoconstriction in isolated, cell-perfused heart of rabbit. *Br J Pharmacol* 1993, 110:1206-1212

- (46) Holroyde MC, Altounyan PEC, Cole M, Dixon M, Elliot EV. Leukotriene C and D induce bronchoconstriction in man. *Agents Actions* 1981; 11:573-574
- (47) Yokochi K, Olley PM, Siferis E, Hamilton F, Hutanen D, Coceani F. Leukotriene D₄: a potent vasoconstrictor of the pulmonary and systemic circulation in the new born lamb. *Leukotriene and other Lipoxygenase products*, edited by B. Samuelsson and R. Paoletti. New York: Raven, 1982; 211-214
- (48) Joris I, Majno G, Corey EJ, Lewis RA. The mechanism of vascular leakage induced by leukotriene E₄. *Am J Pathol* 1987; 26:19-24
- (49) Roth DM, Lefer DJ, Hock CE, Lefer AM. Effects of peptide leukotrienes on cardiac dynamics in rat, cat und guinea pig hearts. *Am J Physiol* 1985; 249:H477-H484
- (50) Woodman OL, Dusting GJ. Coronary vasoconstriction induced by leukotriene in the aenesthetized dog. *Eur J Pharmacol* 1983; 86:125-128
- (51) Sibelius U, Grandel U, Buerke M, Kiss L, Klingenberger P, Heep M, Bournelis E, Seeger W, Grimminger F. Leukotriene mediated coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility evoked by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in perfused rat hearts. *Crit Care Med* 2003; 31:683-688
- (52) Sibelius U, Grandel U, Buerke M, Mueller L, Kiss L, Kraemer HJ, Braun-Dullaeus R, Haberbosch W, Seeger W, Grimminger F. Staphylococcal alpha-toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation. *Circulation* 2000; 101:78-85
- (53) Matsumo Y, Noguchi Y, Inui J. Effect of Y-20811, a thromboxane A₂ synthetase inhibitor, on the arachidonic acid-induced response in the blood-

- superperfused canine coronary artery. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1994; 103:59-66
- (54) Takayasu-Okishio M, Terashita Z, Kondo K. Endothelin-1 and platelet activating factor stimulate thromboxane A₂ biosynthesis in rat vascular smooth muscle cell. *Biochem Pharmacol* 1990; 40:2713-2717
- (55) Seeger W, Walter H, Suttrop N, Muhly M, Bhakdi S. Thromboxane-mediated hypertension and vascular leakage evoked by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in rabbit lungs. *J Clin Invest* 1989; 84:220-227
- (56) Seeger W, Wolf H, Stahler G, Neuhof H, Roka L. Increased pulmonary vascular resistance and permeability due to arachidonate metabolism in isolated rabbit lungs. *Prostaglandins* 1982; 23:157-173
- (57) Petrak RA, Balk RA, Bone RC. Prostaglandines, cyclo-oxygenase inhibitors, and thromboxane synthetase inhibitors in the pathogenesis of multiple systems organ failure. *Crit Care Clin* 1989; 5:303-314
- (58) van Hinsbergh VW. Regulatory functions of the coronary endothelium. *Mol Cell Biochem* 1992; 116:163-169
- (59) Grandel U, Fink L, Blum A, Heep M, Buerke M, Kraemer HJ, Mayer K, Bohle RM, Seeger W, Grimminger F, Sibelius U. Endotoxin-induced myocardial necrosis factor-alpha synthesis depresses contractility of isolated rat hearts: evidence for a role of sphingosin and cyclooxygenase-2-derived thromboxane production. *Circulation* 2000; 102:2758-2764
- (60) Fujioka K, Sugi K, Isago T, Flynn JT, Traber LD, Herndon DN, Traber DL. Thromboxane synthase inhibition and cardiopulmonary function during endotoxemia in sheep. *J Appl Phys* 1991; 71:1376-1381
- (61) Anonymus. The hippocratic corpus. In Phillips ED: Greek Medicine. London, Thames & Hudson; 1973 48-52

- (62) Wiggers CJ. Myocardial depression in shock: a survey of cardiodynamic studies. *Am Heart J* 1947; 33:633-650
- (63) Brand ED, Lefer AM. Myocardial depressant factor in plasma from cats in irreversible post-oligemic shock. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966; 122:200-203
- (64) Lovett WL, Wangenstein SL, Glenn TM, Lefer AM. Presence of a myocardial depressant factor in patients with circulatory shock. *Surgery* 1971; 70:223-231
- (65) McConn R, Greineder JK, Wasserman F, Clowes GH Jr. Is there a humoral factor that depresses ventricular function in sepsis? *Circ Shock* 1979; 1:9-22
- (66) Carli A, Auclair MC, Vernimmen C, Jourdon P. Reversal by calcium of rat heart cell dysfunction induced by human sera in septic shock. *Circ Shock* 1979; 6:147-157
- (67) Benassayag C, Christeff MC, Auclair MC, Vernimmen C, Carli-Vielle C, Nunez E, Carli A. Early released lipid-soluble cardiodepressant factor and elevated oestrogenic substances in human septic shock. *Eur J Clin Invest* 1984; 14:288-294
- (68) Parrillo JE, Burch C, Roach P, Parker MM, Natanson C, Schuette W. A circulating myocardial depressing substance in humans with septic shock: septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance. *J Clin Invest* 1985; 76:1539-1553
- (69) Reilly JM, Cunnion RE, Burch-Whitman C, Parker MM, Shelhamer JH, Parrillo JE. A circulating myocardial depressant substance is associated with cardiac dysfunction and peripheral hypoperfusion (lactic acidemia) in patients with septic shock. *Chest* 1989; 95:1072-1080

- (70) Gomez A, Wang R, Unruh H, Light RB, Bose D, Chau T, Correa E, Mink S. Hemofiltration reverses left ventricular dysfunction during sepsis in dogs. *Anesthesiology* 1990; 73:671-685
- (71) Jha P, Jacobs H, Bose D, Wang R, Yang J, Light RB, Mink S. Effects of *E. coli* sepsis and myocardial depressant factor on interval-force relations in dog ventricle. *Am J Physiol* 1993; 264:H1402-H1410
- (72) Gu M, Bose R, Bose D, Yang J, Li X, Light RB, Jacobs H, Mink SN. Tumor necrosis factor- α but, not septic plasma depresses cardiac myofilament contraction. *Can J Anaesth* 1998; 45:352-359
- (73) Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta are responsible for depression of *in vitro* myocardial cell contractility induced by serum from humans with septic shock. *J Exp Med* 1996; 183:949-958
- (74) Metz CA, Sheargen JN. Ibuprofen in animal models of septic shock. *J Crit Care* 1990; 5:206-211
- (75) Goldberg RN, Suguihara C, Martinez O, Bancalari A, Clark MR, Bancalari E. The role of leukotrienes in the late hemodynamic manifestations of group B streptococcal sepsis in piglets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1988; 33:191-198
- (76) Schutzer KM, Haglund U, Falk A. Cardiopulmonary dysfunction in a feline septic model: possible role of leukotrienes. *Circ Shock* 1989; 29:13-25
- (77) Letts LG, Piper PJ. The actions of leukotrienes C₄ and B₄ on guinea-pig isolated hearts. *Br J Pharmacol* 1982; 76:169-176
- (78) Burke JA, Levi R, Guo ZG, Corey EJ. Leukotrienes C₄, D₄ and E₄: effect on human and guinea-pig cardiac preparations *in vitro*. *J Pharm Exp Ther* 1982; 221:235-241

- (79) Kenzoa JL, Perez JE, Bergmann SR, Lange LG. Effects of acetyl glyceryl ether of phosphylcholine (platelet activating factor) on ventricular preload, afterload and contractility in dogs. *J Clin Int* 1984; 74:1193-1203
- (80) Alloati G, Penna C, De Martino A, Montrucchio G, Camussi G. Role of nitric oxide and platelet-activating factor in cardiac alterations induced by tumor necrosis factor alpha in the guinea-pig papillary muscle. *Cardiovasc Res* 1999; 41:611-619
- (81) Stahl GL, Lefer AM. Mechanism of platelet activating factor-induced cardiac depression in the isolated perfused rat heart. *Circ Shock* 1987; 23:165-167
- (82) Salari H, Walker MJA. Cardiac dysfunction caused by factors released from endotoxin-activated macrophages. *Circ Shock* 1989; 27:263-272
- (83) Massey CV, Kohout TR, Gaa ST, Lederer WJ, Rogers TB. Molecular and cellular actions of platelet-activating factor in rat heart cells. *J Clin Invest* 1991; 88:2106-2116
- (84) Li X, Jacobs H, Yang JJ, Eschun G, Bose D, Jacobs H, Yang JJ, Light RB, Mink SN. Histamine H3 activation depresses cardiac function in experimental sepsis. *J Appl Physiol* 1998; 85:1693-1701
- (85) Reynolds DG, Gurll NJ, Vargish T, Lechner RB, Faden AI, Holaday JW. Blockade of opiate receptors with naloxone improves survival and cardiac performance in canine endotoxic shock. *Circ Shock* 1980; 7:39-48
- (86) Girardin E, Grau GE, Dayer JM, Roux-Lombard P, Lambert PH. Plasma tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N Engl J Med* 1980; 319:397-400

- (87) Billiau A, Vanderkerckhove F. Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur J Clin Invest* 1991; 21:559-573
- (88) Silva AT, Cohen J. Role of interferon- γ in experimental gram-negative sepsis. *J Infect Dis* 1992; 166:331-335
- (89) Deyton LR, Walker RE, Kovacs JA, Herpin B, Parker M, Masur H, Fauci AS, Lane HC. Reversible cardiac dysfunction associated with inteferon- α therapy in AIDS patients with Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 1989; 321:1246-1248
- (90) Sonnenblick M, Rosin A. Cardiotoxicity of interferon: a review of 44 cases. *Chest* 1991; 99:557-561
- (91) Kammula US, Withe DE, Rosenberg SA. Trends in the safety of high-dose bolus interleukin-2 administration in patients with metastatic cancer. *Cancer* 1998; 83:797-805
- (92) Gaynor ER, Vitek L, Sticklin L, Creekmore SP, Ferraro ME, Thomas JX Jr, Fisher SG, Fisher RI. The hemodynamic effects of treatment with interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. *Ann Intern Med* 1988; 109:953-958
- (93) Ognibene FP, Rosenberg Fa, Lotze M, Skibber J, Parker MM, Shelhamer JH, Parrillo JE. Interleukin-2 administration causes reversible hemodynamic changes and left ventricular dysfunction similar to those seen in septic shock. *Chest* 1988; 94:750-754
- (94) Walvatne CS, Johnson A, Stahl T, et al. IL-2 and LPS stimulate the cardiac contractile dysfunction of bacterial peritonitis. *Crit Care Med* 1991; 19:S9 (abstract)
- (95) Marie C, Cavillon J, Losser M. Elevated levels of circulating transforming growth factor-beta1 in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 1996; 125:520-521

- (96) Wahl SM. Transforming growth factor beta (TGF- β) in inflammation: a cause and a cure. *J Clin Immunol* 1992; 12:61-74
- (97) Karres I, Kremer JP, Steckholzer U, Kenney JS, Ertel W. Transforming growth factor- β_1 inhibits synthesis of cytokines in endotoxin-stimulated whole blood. *Arch Surg* 1996; 131:1310-1317
- (98) Pinsky DJ, Cai B, Yang X, Rodriguez C, Sciacca RR, Cannon PJ. The lethal effects of cytokine-induced nitric oxide on cardiac myocytes are blocked by nitric oxide synthase antagonism or transforming growth factor- β . *J Clin Invest* 1995; 95:677-685
- (99) Roberts AB, Vodovotz Y, Roche NS, Sporn MB, Nathan CF. Role of nitric oxide in antagonistic effects of transforming growth factor- β and interleukin- 1β on the beating rate of cultured cardiac myocytes. *Mol Endocrinol* 1992; 6:1921-1930
- (100) Roberts AB, Roche NS, Winokur TS, Burmester JK, Sporn MB. Role of transforming growth factor- β in maintenance of function of cultured neonatal cardiac myocytes: autocrine action and reversal of damaging effects of interleukin-1. *J Clin Invest* 1992; 90:2056-2062
- (101) Perella MA, Hsieh C, Lee W, Shieh S, Tsai JC, Patterson C, Lowenstein CJ, Long NC, Haber E, Shore S, Lee ME. Arrest of endotoxin-induced hypotension by transforming growth factor β -1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:2054-2059
- (102) Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokin and endotoxin levels correlate with survival in patients with septic syndrome. *Ann Intern Med* 1993; 119:771-778

- (103) Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. *J Exp Med* 1989; 169:333-338
- (104) Calandra T, Baumgartner J, Grau GE, Wu MM, Lambert PH, Schellekens J, Verhoef J, Glauser MP. Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1 and interferon- γ in the serum of patients with septic shock. *J Infect Dis* 1990; 161:982-987
- (105) Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, Michie HR, Stanford GG, van der Meer JW, Endres S, Lonnemann G, Corsetti J, Chernow B, et al. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis* 1990; 161:79-84
- (106) Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM, Wilmore DW. Detection of tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 1988; 318:1481-1486
- (107) Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, Manogue KR, Palladino MA Jr, Cerami A, Shires GT, Lowry SF. Cytokine appearance in human endotoxaemia and primate bacteremia. *Surg Gynecol Obstet* 1988; 166:147-153
- (108) Michie HR, Spriggs DR, Manogue KR, Sherman ML, Revhaug A, O'Dwyer ST, Arthur K, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM, et al. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. *Surgery* 1988; 104:280-286
- (109) Natanson C, Eichenholz PW, Danner RL, Eichacker PQ, Hoffman WD, Kuo GC, Banks SM, MacVittie TJ, Parrillo JE. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J Exp Med* 1989; 169:823-832
- (110) Beutler B, Cerami A. Catechin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986; 320:584-586

- (111) Ferrari-Baliviera E, Mealy K, Smith RJ, Wilmore DW. Tumor necrosis factor induces adult respiratory distress syndrome in rats. *Arch Surg* 1989; 124:1400-1405
- (112) Eichacker, PQ, Hoffmann WD, Farese A, Banks SM, Kuo GC, MacVittie TJ, Natanson C. TNF but not IL-1 in dogs causes lethal lung injury und multiple organ dysfunction similar to human sepsis. *J Appl Physiol* 1991; 71:1979-1989
- (113) Eichenholz W, Eichacker PQ, Hoffman WD, Banks SM, Parrillo JE, Danner RL, Natanson C. Tumor necrosis factor challenges in canines: patterns of cardiovascular dysfunction. *Am J Physiol* 1992; 263:H668-H675
- (114) Sorkin P, Abu-Abdid S, Lev D, Gutman M, Aderka D, Halpern P, Setton A, Kudlik N, Bar-On J, Rudich V, et al. Systemic leakage and side effects of tumor necrosis factor- α administered via isolated limb perfusion can be manipulated by flow rate adjustment. *Arch Surg* 1996; 130:1078-1084
- (115) van der Poll T, Romjin JA, Endert E, Borm JJ, Buller HR, Sauerwein HP. Tumor necrosis factor mimics the metabolic response to acute infection in healthy humans. *Am J Physiol* 1991; 261:E457-E465
- (116) Natanson C, Danner RI, Fink MP, MacVittie TJ, Walker RI, Conklin JJ, Parrillo JE. Cardiovascular performance with *E.coli* challenges in a canine model of human sepsis. *Am J Physiol* 1998; 274:H193-H201
- (117) Beutler B, Milsark IW, Cerami A. Passive immunisation against catechin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 1985; 229:869-871
- (118) Mathison JC, Wolfson E, Ulevitch RJ. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram-negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J Clin invest* 1988; 81:1925-1937

- (119) Kapadia S, Lee J, Torre-Amino G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. Tumor necrosis factor- α gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest* 1995; 96:1042-1052
- (120) Comstock KL, Brown KA, Page MT, Martin D, Ho P, Pedraza M, Castro EN, Nakajima N, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA. LPS-induced TNF- α release from and apoptosis in rat cardiomyocytes: Obligatory role for CD14 in mediating the LPS response. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30:2761-2775
- (121) Giroir BP, Johnson JH, Brown T, Allen GL, Beutler B. The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia. *J Clin Invest* 1992; 90:693-698
- (122) Knuefermann P, Nemoto S, Misra A, Nozaki N, Defreitas G, Goyert SM, Carabello BA, Mann DL, Vallejo JG. CD-14 deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2002; 106:2608-2615
- (123) Comstock KL, Krown KA, Page MT, Martin D, Ho P, Pedraza M, Castro EN, Nakajima N, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA. LPS-induced TNF- α release from and apoptosis in rat cardiomyocytes: obligatory role for CD14 in mediating the LPS response. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 30:2761-2775
- (124) Kumar A, Kosuri R, Ginsburg B, et al. Myocardial cell contractility is depressed by supernatants of endotoxin stimulated THP-1 cells. *Crit Care Med* 1994; 22:A118 (abstract)
- (125) Walley KR, Herbert PC, Wakai Y, Wilcox PG, Road JD, Cooper DJ. Decrease in left ventricular contractility after tumor necrosis factor- α infusion in dogs. *J Appl Physiol* 1994; 76:1060-1067
- (126) Gulick T, Chung MK, Pieper SJ, Lange LG, Schreiner GF. Interleukin-1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte adrenergic responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 91:6753-6757

- (127) Evans HG, Lewis MJ, Shah, AM. Interleukin-1 β modulates myocardial contraction via dexamethasone sensitive production of nitric oxide. *Cardiovasc Res* 1993; 8:460-464
- (128) Hosenpud JD, Campbell SM, Mendelson DJ. Interleukin-1 induced myocardial depression in an isolated beating heart preparation. *J Heart Transplant* 1989; 8:460-464
- (129) DeMeules JE, Pigula FA, Mueller M, Raymond SJ, Gamelli RL. Tumor necrosis factor and cardiac function. *J Trauma* 1992; 32:686-692
- (130) Murray DR, Freeman GL. Tumor necrosis factor- α induces a biphasic effect on myocardial contractility in conscious dogs. *Circ Res* 1996; 78:154-160
- (131) Tavernier B, Garrigue D, Boule C, Vallet B, Adnet P. Myofilament calcium sensitivity is decreased in skinned cardiac fibres of endotoxin-treated rabbits. *Cardiovasc Res* 1998; 38:472-479
- (132) Müller-Werdan U, Reithmann C, Werdan K. Cytokines and the heart: molecular mechanisms of septic cardiomyopathy. RG Landes Company, Georgetown, USA/ Chapman&Hall, New York, USA, Springer Berlin Heidelberg New York 1996
- (133) Oral H, Dorn GW, Mann DL. Spingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian cardiac myocyte. *J Biol Chem* 1997; 272:4836-4842
- (134) Edmunds NJ, Lal H, Woodward B. Effects of tumor necrosis factor-alpha on left ventricular function in the rat isolated perfused heart: possible mechanisms for a decline in cardiac function. *Br J Pharmacol* 1999; 126:189-196

- (135) Sugita M, Williams M, Dulaney JT, Moser HW. Ceramidase and ceramid synthesis in human kidney and cerebellum. *Biochem Biophys Acta* 1975; 398:125-131
- (136) Kumar A, Brar R, Wang P, Dee L, Skorupa G, Khadour F, Schulz R, Parrillo JE. Role of nitric oxide and cGMP in humans septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am J Physiol* 1999; 276:R265-276
- (137) Finkel MS, Oddis CV, Jacob TC, Watkins SC, Hattler BG, Simmons, RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992; 257:387-389
- (138) Stein B, Frank P, Schmitz W, Scholz H, Thoenes M. Endotoxin and cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. *J Mol Cardiol* 1996; 28:1631-1639
- (139) Schulz R, Nava E, Moncada S. Induction and potential biological relevance of a Ca (2+)-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol* 1992; 105:575-580
- (140) Bhakdi S, Grimminger F, Suttrop N, Walmrath D, Seeger W. Proteinaceous bacterial toxins and pathogenesis of sepsis syndrome and septic shock: the unknown connection. *Med Microbiol Immunol* 1994; 183:119-144
- (141) Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420:885-891
- (142) Hotchkiss RM, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348:138-150
- (143) Haeffner-Cavallion N, Carreno MP, Aussel, L, Caroff M. Molecular aspects of endotoxins relevant to their biological function. *Nephrol Dia Transplant* 14998; 14:853-860
- (144) Grandel U, Grimminger F. Endothelial responses to bacterial toxins in sepsis. *Critical ReviewsTM in Immunology* 2003; 23:267-299

- (145) Campbell WN, Fitzpatrick M, Ding X, Jett M, Gemski P, Goldblum SE. SEB ist cytotoxic and alters EC barrier function through protein tyrosine phosphorylation in vitro. *Am J Physiol* 1997; 273:L31-L39
- (146) Caroff M, Karibian D, Cavaillon JM, Haeffner-Cavaillon N. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 2002; 4:915-929
- (147) Endo S, Inada K, Inoue Y, Kuwata Y, Suzuki M, Yamashita H, Hoshi S, Yoshida M. Two types of septic shock classified by the plasma levels of cytokines and endotoxin. *Circ Shock* 1992; 38:264-274
- (148) Hurley JC. Endotoxaemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:268-292
- (149) Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Parrillo JE. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *Engl J Med* 1989; 321:280-287
- (150) McDonough KH, Brumfield Ba, Lang CH. In vitro performance after lethal and non-lethal doses of endotoxin *Am J Physiol* 1986; 250:H240-H246
- (151) Rubin LJ, Keller RS, Parker JL, Adams HR. Contractile dysfunction of ventricular myocytes isolated from endotoxemic guinea pigs. *Shock* 1994; 2:113-120
- (152) Thompson M, Kliewer A, Maass D, Becker L, White DJ, Bryant D, Arteaga G, Horton J, Giroir BP. Increased cardiomyocyte intracellular calcium during endotoxin-induced cardiac dysfunction in guinea pigs. *Pediatr Res* 2000; 47:669-676

- (153) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison CD. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharides (LPS) and LPS binding Protein. *Science* 1990; 149:1431-1433
- (154) Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, Finlay BB, Wright SD. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharid. *J Exp Med* 1992; 176:1665-1671
- (155) Pugin J, Ulevitch RJ, Tobias PS. A critical role for monocytes and CD14 in endotoxin-induced endothelial cell activation. *J Exp Med* 1993; 178:2193-2200
- (156) Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* 1986; 164:777-793
- (157) Tobias PS, Mathison JC, Ulevitch RJ. A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses of gram-negative sepsis. *J Biol Chem* 1988; 263:13479-13481
- (158) Schumann RR, Leong SR, Flagg GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 149:1429-1431
- (159) Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Ann Rev Immunol* 1995; 18:10482-10488
- (160) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Gosh S, Janeway CA Jr. MyD88 is an adapter protein in the hToll/IL-1 receptor family signalling pathway. *Mol Cell Biol* 1998; 2:253-258
- (161) Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2:675-680

- (162) Muzio M, Ni j, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MYD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 1997; 278:1612-1615.
- (163) Wesche H, Gao X, Li X, Kirschning CJ, Stark GR, Cao Z. IRAM-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem* 1999; 27:19403-19410
- (164) De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF- κ B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:E83-E88
- (165) Meyrick B, Hoover R, Jones MR, Berry LC Jr, Brighman KL. In vitro effects of endotoxin on bovine and sheep lung microvascular endothelial cells and pulmonary artery endothelial cells. *J Cell Physiol* 1989; 138:165-174
- (166) Goldblum SE, Ding X, Brann TW, Campell-Washington J. Bacterial lipopolysaccharides induces actin reorganization, intercellular gap formation and endothelial barrier dysfunction in pulmonary vascular endothelial cells: concurrent F-actin depolymerization and new actin synthesis. *J Cell Physiol* 1993; 157:13-23
- (167) Bhakdi S, Mackman N, Nicaud JM, Holland IB. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembran pores. *Infect Immun* 1986; 52:63-69
- (168) Welch RA. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 1991; 5:521-529
- (169) Bhakdi S, Bayley H, Valeva A, Walev I, Walker B, Kehoe M, Palmer M. *Staphylococcal* alpha-toxin, streptolysin-O and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol* 1996; 165:73-79

- (170) Bhakdi S, Mackman N, Menestrina G, Gray L, Hugo F, Seeger W, Holland IB. The hemolysin of *Escherichia coli*. *Eur J Epidemiol* 1988; 4:135-143
- (171) Grimminger F, Walmrath R, Birkemeyer RG, Bhakdi S, Seeger W. Leukotriene and hydroxyeicosatetraenoic acid generation elicited by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in rabbit lungs. *Infect Immun* 1990; 58:2659-2663
- (172) Grimminger F, Thomas M, Obernitz R, Walmrath D, Bakdi S, Seeger W. Inflammatory lipid mediator generation elicited by viable hemolysin-forming *Escherichia coli* in lung vasculature. *J Exp Med* 1990; 172:1115-1125
- (173) Suttrop N, Floerr B, Schnittler H, Seeger W, Bhakdi S. Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function. *Infect Immun* 1990; 58:3796-3801
- (174) Grimminger F, Sibelius U, Bhakdi S, Suttrop N, Seeger W. *Escherichia coli* hemolysin is a potent inducer of phosphoinositide hydrolysis and related metabolic responses in human neutrophils. *J Clin Invest* 1991; 88:1531-1539
- (175) Bhakdi S, Martin E. Superoxide generation by human neutrophils induced by low doses of *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun* 1991; 107:147-223
- (176) May AK, Sawyer RG, Gleason T, Whitworth A, Pruett TL. In vivo cytokine response to *Escherichia coli* alpha-hemolysin determined with genetically engineered hemolytic and nonhemolytic *E.coli* variants. *Infect Immun* 1996; 64:2167-2171
- (177) Welch RA, Dellinger EP, Minshew B, Falkow S. Hemolysin contributes to virulence of extraintestinal *E. coli* infections. *Nature* 1981; 296:665-667
- (178) Beavo JA, Conti M, Heaslip RJ. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Mol Pharmacol* 1994; 46:399-405

- (179) Conti M, Jin SC, Monaco L, Repaske DR, Swinnen JV. Hormonal regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterases *Endocrine Rev* 1991; 12:218-234
- (180) Botham KM. Cyclic AMP and the regulation of cholesterol metabolism. *Biochem Soc Trans* 1992; 20:454-459
- (181) Hakonarson H, Grunstein MM. Regulation of second messengers associated with airway smooth muscle contraction and relaxation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(5 Pt3):S115-122
- (182) Zhang X, Cote RH. c GMP signalling in vertebrate retinal photoreceptor cells. *Front Biosci* 2005; 10:1191-1204
- (183) Llorens S, Jordan J, Nava E. The nitric oxide pathway in the cardiovascular system. *J Physiol Biochem* 2002; 58:179-188
- (184) Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res* 2003 22; 93:280-91
- (185) Beavo JA, Brunton LL. Cyclic nucleotide research: still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:710-718
- (186) Degermann E, Leroy MJ, Taira M, Belfrage P, Manganiello VC. in Le Roith D, Olefsky J, Taylor S. *Diabetes mellitus, a clinical and fundamental textbook* Lippincott, Philadelphia, PA
- (187) Gibson A. Phosphodiesterase 5 inhibitors and nitrgic transmission-from zaprinast to sildenafil. *Eur J Pharmacol* 2001; 411:1-10
- (188) Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, Elbatarny HS, Jimmo SL. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol* 2003; 64:533-46

- (189) Manganiello VC, Murata Taka, Taira Masato, Belfrage Per†, Degerman E†. Diversity in cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme families. *Arch Biochem Biophys* 1995; 322:1-13
- (190) Soderling SH, Beavo JA. Regulation of cGMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12:174-9
- (191) Lin CS. Tissue expression, distribution and regulation of PDE5. *Int J Impot Res* 2004; 16 [Suppl 1]:S8-S10
- (192) McAllister-Lucas DH, Haik TL, Colbran JL, Sonnenburg WK, Seger D, Turko IV, Beavo JA, Francis SH, Corbin JD. An essential aspartic acid at each of two allosteric cGMP-binding sites of cGMP-specific phosphodiesterase. *J Biol Chem* 1995; 270:30671-30679
- (193) Reffelmann T, Kloner RA. Therapeutic potential of phosphodiesterase 5 inhibition for cardiovascular disease. *Circulation* 2003; 108:239-244
- (194) Fink TL, Francis TH, Beasley A, Grimes KA, Corbin JD. Expression of an active, monomeric catalytic domain of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *J Biol Chem* 1999; 274:34613-34620
- (195) Corbin JD, Turko IV, Beasley A, Francis SH. Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotid-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur J Biochem* 2000; 267:2760-2767
- (196) Corbin JD, Francis SH. Cyclic GMP phosphodiesterase-5 target of sildenafil. *J Biol Chem* 1999; 274:13729-13732
- (197) Francis SH, Colbran JL, McAllister-Lucas LM, Corbin JD. Zinc interactions and conserved motifs of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase suggest that it is a zinc hydrolase. *J Biol Chem* 1994; 269:22477-22480

- (198) Rybalkin SD, Rybalkina IG, Shimizu-Albergine M, Tang XB, Beavo JA. PDE5 is converted in an activated state upon cGMP binding on the GAF A domain. *Eur Mol Bio Organ* 2003; 22:469-478
- (199) Lin CS, Chow S, Lau A, Tu R, Lue TF. Human PDE5A gene encodes three PDE5 isoforms from two alternate promoters. *Int J Impot Res* 2002; 14:15-24
- (200) Murthy KS. Activation of phosphodiesterase 5 and inhibition of guanylate cyclase by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle. *Biochem J* 2001, 360:199-208
- (201) Turko IV, Ballard SA, Francis SH, Corbin JD. Inhibition of cyclic cGMP-binding cyclic cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *J Biol Chem* 1999; 273:6460-6466
- (202) Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Olschewski H, Schermuly RT, Weismann N, Gunther A, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360(9337):895-900
- (203) Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Schermuly RT, Weismann N, Seeger W, Grimminger F. Combination therapy with oral Sildenafil and inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *Ann Intern Med* 2002; 136:515-522
- (204) Ghofrani HA, Voswinckel ER, Reichenberger F, Olschewski H, Haredza P, Karadas B, Schermuly RT, Weismann N, Seeger W, Grimminger F. Difference in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:1488-1496
- (205) Pfizer Labs, Division of Pfizer Inc, NY, NY 10017. VIAGRA[®] (sildenafil citrate) tablets. Produktbeschreibung 2000

- (206) Corbin J, Rannels S, Neal D, Chang P, Grimes K, Beasley A, Francis S. Sildenafil citrate does not affect cardiac contractility in human or dog heart. *Curr Med Res Opin* 2003; 19:747-752
- (207) Sugiyama A, Satho Y, Shiina H, Takahara A, Yoneyama M, Hashimoto K. Cardiac electrophysiologic and hemodynamic effects of sildenafil, a PDE5 inhibitor, in anesthetized dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38:940-946
- (208) Zusman RM, Morales A, Glasser DB, Osterloh IH. Overall cardiovascular profile of sildenafil citrate. *Am J Cardiol* 1999; 83:35C-44C
- (209) Gillies HC, Roblin D, Jackson G. Coronary and systemic hemodynamic effects of sildenafil citrate: from basic science to clinical studies in patients with cardiovascular disease. *Int J Cardiol* 2002; 86:131-141
- (210) Traverse JH, Chen YJ, Du R, Bache RJ. Cyclic nucleotide phosphodiesterase type 5 activity limits blood flow to hypoperfused myocardium during exercise. *Circulation* 2000; 102:2997-3002
- (211) Chen Y, Du R, Traverse JH, Bache RJ, Effect of sildenafil on coronary active and reactive hyperemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279:H2319-2325
- (212) Ishikura F, Beppu S, Hamada T, Khandheria BK, Sweard JB, Nehra A. Effects of sildenafil citrate (Viagra) combined with nitrate on the heart. *Circulation* 2000; 102:2516-2521
- (213) Broughton BJ, Chaplen P, Knowles P, Lunt E, Pain DL, Wooldridge KRK, Ford R, Marshall S, Walker JL, Maxwell DR. New inhibitor of regan-mediated anaphylaxis *Nature* 1974; 251:650-652
- (214) Bergstrand H, Kristoffersson J, Lundquist B, Schurmann A. Effects of antiallergic agents, compound 48/80 and some reference inhibitors on the

- activity of partially purified human lung tissue adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate diesterases. *Mol Pharmacol* 1977; 13:38-43
- (215) Bergstrand H, Lundquist B, Schurmann A. Rat mast cell high affinity cyclic nucleotide phosphodiesterases: separation and inhibitory effects of two antiallergic agents. *Mol Pharmacol* 1978; 14:848-855
- (216) Kukovetz WR, Holzmann S, Wurm A, Poch G. Evidence for cyclic GMP-mediated relaxant effects of nitro-compounds in coronary smooth muscle. *NS Arch Pharmacol* 1979; 310:129-138
- (217) Calbiochem®. Zaprinast Datenblatt, Cat.No. 684500 2001
- (218) Langendorff, O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Archiv der gesamten Physiologie* 1895; 61:291-332
- (219) Fink L, Seeger W, Ermert L, Hänze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM. Real-time quantitative RT-PCR after laser assisted cell picking. *Nat Med* 1998; 4:1329-1333
- (220) Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, DeJonge HR. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 1997; 22:307-312
- (221) Sauzeau V, Jeune HL, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, Loirand G. Cyclic GMP-dependent protein kinase signalling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 2000; 275:21722-21729
- (222) Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* 2000; 113:1671-1676

- (223) Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, Mendelsohn ME. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase Ia. *Science* 1999; 286:1583-1587
- (224) Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B, Keef KD. Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serinr 1072. *J Biol Chem* 1999; 274:10927-10935
- (225) Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP₃ receptor and cGMP kinase Iβ. *Nature* 2000; 404:197-201
- (226) Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med* 2003; 35:21-27
- (227) Carlson DL, Willis MW, White DJ, Horton JW, Giroir BP. Tumor necrosis factor-α-induced caspase activation mediates Endotoxin-related cardiac dysfunction. *Crit Care Med* 2005; 33:1021-1028
- (228) Murphy HS, Shayman JA, Till GO, Mahrougui M, Owens CB, RyanUS, Ward PA. Superoxide responses of endothelial cells to C5a and TNF: divergent signal transduction pathways. *Am J Physiol* 1992; 263:L51-59
- (229) Pogrebniak HW, Matthews WA, Pass HI. Reactive oxygen species can amplify macrophage tumor necrosis factor production. *Surg Forum* 1990; 16:101-103
- (230) Gurevitch J, Froklis I, Yuhas Y, Paz Y, Matsa M, Mohr R, Yakirevich V. Tumor necrosis factor-alpha is released from the isolated heart undergoing ischeia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28:247-252

- (231) Gurevitch J, Froklys I, Yuhas Y, Lifschitz-Mercer b, Berger E, Paz Y, Matsa M, Kramer A, Mohr R. Tumor necrosis factor-alpha improves myocardial recovery after ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:1554-1561
- (232) Medrum DR, Cleveland JC, Cain BS, Meng X, Harken AH. Increased myocardial tumor necrosis factor- α in a crystalloid-perfused model of cardiac ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1998; 65:439-443
- (233) Edmunds NJ, Woodward B. Effects of tumour necrosis factor- α on the coronary circulation of the rat isolated perfused heart: a potential role for Thromboxane A₂ and sphingosine. *Br J Pharmacol* 1998; 124:493-498
- (234) Murohara T, Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Ohta Y, Yasue H. Effects of Sphingomyelinase and shingosine on arterial vasomotor regulation. *J Lipid Res* 1996; 37:1601-1608
- (235) Candela M, Barker SC, Ballou, LR. Sphingosine synergistically stimulates tumor necrosis factor α -induced prostaglandin E₂ production in human fibroblasts. *J Exp Med* 1991; 174:1363-1369
- (236) Ballou LR, Chao CP, Holness MA, Barker SC, Raghov R. Interleukin-1-mediated PGE₂ production and sphingomyelin metabolism. *J Biol Chem* 1992; 267:20044-20050
- (237) Jayadev S, Lindardic CM, Hannun YA. Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor α . *J Biol Chem* 1994; 269:5757-5763
- (238) Lee CC, Appleyard RF, Byrne JG, Cohn LH. Leukotrienes D₄ and E₄ produced in myocardium impair coronary flow and ventricular function after two hours of global ischemia in rat heart. *Cardiovasc Res* 1993; 27:770-773

- (239) Rossoni G, Sala FB, Berti F, Testa T, Buccellati C, Molta C, Muller-Peddinghaus R, Maclouf J, Folco GC. Myocardial protection by the leukotriene synthesis inhibitor BAY X1005: Importance of transcellular biosynthesis of cysteinyl-leukotrienes. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 276:335-341
- (240) Pilz RB, Casteel DE. Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res* 2003; 93:1034-1046
- (241) Kalra D, Baumgarten G, Dibbs Z, Seta Y, Sivasubramanian N, Mann DL. Nitric oxide provokes tumor necrosis factor- α expression in adult feline myocardium through a cGMP-dependent pathway. *Circulation* 2000; 102:1302-1307
- (242) Muhl H, Pfeilschifter J. Amplification of nitric oxide synthase expression by nitric oxide in interleukin 1 β -stimulated rat mesangial cells. *J Clin Invest* 1995; 95:1941-1946
- (243) Yamamoto K, Ikeda U, Shimada K. Natriuretic peptides modulate nitric oxide synthesis in cytokine-stimulated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:2375-2382
- (244) Perez-Sala D, Lamas S. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by nitric oxide in cells. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3:231-248
- (245) Perez-Sala D, Cernuda-Morollon E, Diaz-Cazorla M, Rodriguez-Pascual F, Lamas S. Posttranscriptional regulation of human iNOS by the NO/cGMP pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280:F466-F473
- (246) Diaz-Cazorla M, Perez-Sala D, Lamas S. Dual effect of nitric oxide donors on cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:943-952

- (247) Brennan CM, Steitz JA. HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58:266-277
- (248) Sinha B, Eigler A, Baumann KH, Greten TF, Moeller J, Endres S. Nitric oxide downregulates tumour necrosis factor in mRNA in RAW 264,7 cells. *Res Immunol* 1998; 149:139-150
- (249) Kiemer AK, Vollmar AM. Autocrine regulation of inducible nitric-oxide synthase in macrophages by atrial natriuretic peptide. *J Biol Chem* 1998; 273:13444-13451
- (250) Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107:7-11
- (251) Kiemer AK, Weber NC, Vollmar AM. Induction of I κ B atrial natriuretic peptide as a regulator of the NF- κ B pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 295:1068-1076
- (252) Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke JP. Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness: nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation* 1996; 94:1682-1689
- (253) De la Vega LA, Stockert RJ. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Cell Physiol* 2000; 279:2037-2042
- (254) Stockert RJ, Paietta E, Racevskis J, Morell AG. Postranscriptional regulation of the asialoglycoprotein receptor by cGMP. *J Biol Chem* 1992; 267:56-59

10 Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Kirchheim, den 05.10.2005

Thomas Faßbender

11 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. med. Ulf Sibelius für die Überlassung des interessanten Themas, der Bereitstellung der umfangreichen Laboreinrichtung und die kompetente fachliche Beratung.

Herrn Prof. Dr. vet. med. Dr. h. c. Rudolf Leiser danke ich für seine Unterstützung und Vertretung der Dissertation auf veterinärmedizinischer Seite.

Bei Herrn Dr. med. Ulrich Grandel bedanke ich mich für seine kompetente, engagierte Betreuung.

Herrn Dr. med. Ludger Fink danke ich für die Durchführung der real-time-PCR.

Für praktische Hilfestellung im Labor danke ich Frau Tina Heep.

MUTIG'99 danke ich aus Prinzip.

Bei Simin Dexler bedanke ich mich für Unterstützung in allen Lebens- und Leidenslagen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, deren Unterstützung mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglichte.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5036-3



9 783835 950368

®