

Hämodynamische Charakterisierung eines murinen Sepsis Modells

**Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation**

**vorgelegt von
Jens Kellinghaus
aus
Mettingen**

**Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Peter Hanrath**

**Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Christian Weber**

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juni 2007

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek
online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Sepsis	5
1.1.1. Pathogenese	7
1.1.2. Hämodynamische Auswirkungen	9
1.1.3. Therapie	14
1.2. Ziel dieser Studie	15
 2. Material und Methoden	 17
2.1. Versuchstiere	17
2.2. Sepsisinduktion durch Coecum Ligatur und Punktion (CLP)	17
2.3. Überlebensdauer nach Sepsisinduktion	20
2.4. Invasive arterielle Blutdruckmessung	21
2.4.1. Versuchsaufbau	21
2.4.2. Versuchsdurchführung	24
2.4.2.1. Messwerte	24
2.4.2.2. Versuchsprotokoll	25
2.4.2.3. Pharmaka	27
2.4.2.3.1. Dobutamin	27
2.4.2.3.2. Ethylisothioharnstoff (Ethylisothiurea=ETU)	27
2.4.2.3.3. Narkosemittel	28
2.5. Hämodynamische Eigenschaften des isolierten Herzens im Langendorff Modell	29
2.5.1. Einführung	29
2.5.2. Versuchsaufbau	32
2.5.2.1. Präparation / Herzentnahme	32
2.5.2.2. Krebs-Henseleit-Lösung	36
2.5.2.3. Ballonkatheter	37
2.5.2.4. Koronarvenöse O ₂ Messung am isolierten Herzen	37

2.5.3. Versuchsdurchführung	38
2.5.3.1. Messwerte	38
2.5.3.2. Versuchsprotokoll	40
2.5.3.3. Pharmaka	44
2.5.3.3.1. Bradykinin	44
2.5.3.3.2. Adenosin	45
2.6. Datenerfassung	46
2.7. Datenverarbeitung	46
2.8. Statistische Auswertung	47
 3. Ergebnisse	 48
3.1. Überlebensdauer nach Sepsisinduktion	48
3.2. Invasive arterielle Blutdruckmessung	49
3.2.1. Mittlerer arterieller Blutdruck	49
3.2.2. Cardiac Power	51
3.2.3. Herzfrequenz	52
3.3. Hämodynamische Eigenschaften des isolierten Herzens im Langendorff Modell	53
3.3.1. LVDP	53
3.3.2. dP / dT	54
3.3.3. Cardiac Power	55
3.3.4. Koronarfluss	56
3.3.5. mVO ₂	58

4. Diskussion	59
4.1. Mortalität nach Sepsisinduktion	59
4.2. Auswirkungen der Sepsis auf den arteriellen Blutdruck	64
4.2.1. Sepsis bedingte Katecholaminresistenz	65
4.2.2. Blutdruckverhalten nach Blockade der NO Synthase	66
4.3. Auswirkungen der Sepsis auf das isolierte Herz im Langendorff Modell	69
4.3.1. Kardiodepression nach Sepsisinduktion	69
4.3.2. Ursachen der Kardiodepression im Zusammenhang mit der zellulären Energetik und dem myokardialen Sauerstoffverbrauch (mVO ₂)	72
4.3.3. Veränderungen des Koronarflusses und der Koronarreserve	74
 5. Zusammenfassung und Ausblick	 77
 6. Literaturverzeichnis	 79
 7. Materialienliste	 92
 8. Danksagung	 95
 9. Curriculum Vitae	 96

1. Einleitung

1.1. Sepsis

Prävalenz und Definition

Die Sepsis stellt weltweit eine der häufigsten Todesursachen bei kritisch kranken Patienten dar ¹⁻⁴. Die Mortalität ist seit Jahren, trotz weitreichender Fortschritte in der Intensivmedizin, unverändert hoch ⁵. 20-50 % der von einer schweren Sepsis betroffenen Patienten versterben an dieser Krankheit ⁶. Eine schwere Sepsis oder einen septischen Schock entwickeln 2-3 % der Patienten einer Normalstation und 10-15 % der Patienten einer Intensivstation ⁶.

Allein in Deutschland erkranken jedes Jahr zwischen 44000 und 95000 Menschen an schwerer Sepsis, und 30-50 % dieser Patienten versterben während ihres Krankenhausaufenthaltes ⁷. Legt man für einen Patienten mit schwerer Sepsis Behandlungskosten von etwa 23 200 Euro zugrunde, so ergibt sich für das deutsche Gesundheitssystem eine jährliche Belastung von 1 bis 2 Milliarden Euro ⁸. Diese Kosten machen damit 21 bis 46 Prozent der Gesamtkosten der Intensivmedizin in Deutschland aus ⁹.

Aber auch im Falle des Überlebens bleibt das Mortalitätsrisiko noch über Jahre hinweg erhöht. Dieses Risiko ist abhängig von der Ursache des Krankenhausaufenthaltes, Krankheitsschwere, Alter, Nebenerkrankungen und der Lokalisation der zugrunde liegenden Infektion. Für Deutschland gibt es bislang keine validen epidemiologischen Daten zu Inzidenz, Prävalenz und Letalität der Sepsis ⁸.

In den USA nahm die Inzidenz zwischen 1979 und 2000 durchschnittlich um 13,7 Prozent pro Jahr zu. Dieses führte in dem entsprechenden Zeitraum fast zu einer Verdreifachung der intrahospitalen Sterbefälle im Bezug auf die Sepsis ⁴. Die Sepsis stellt in den USA die zehnthäufigste Todesursache insgesamt dar ¹⁰.

1992 erstellte das "US Expert Panel for the American College of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine" eine Übereinkunft zur Definition der Sepsis ¹¹. Es wurden die Begriffe Infektion, Bakteriämie, Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock und sepsis-induzierte Hypotension definiert.

Das SIRS wird dabei bei Vorhandensein von zwei oder mehr der folgenden Parameter diagnostiziert:

- Körpertemperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz >90 Schläge/min
- Atemfrequenz > 20 Atemzüge/min,
- $\text{pCO}_2 < 32$ mmHg,
- Leukozyten >12.000 / μl bzw. <4000 / μl oder Linksverschiebung $>10\%$

Nach den Kriterien des „US Expert Panel for the American College of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine“ besteht eine Sepsis bei Vorhandensein eines SIRS und einer Infektion (inflammatorische Antwort auf die Anwesenheit von Mikroorganismen oder Besiedelung von normalerweise sterilen Geweben durch Mikroorganismen) als systemische Antwort auf eine Infektion.

Eine schwere Sepsis kennzeichnet eine Sepsis verbunden mit einer Organdysfunktion, Hypoperfusion (dabei u.a. Auftreten von Laktatazidose, Oligurie, akute Wesensveränderungen) oder Hypotension.

Der septische Schock zeigt die Kriterien einer schweren Sepsis mit zusätzlicher sepsis-induzierter Hypotonie trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution.

Von einer sepsis-induzierten Hypotension spricht man bei einer Abnahme des systolischen Blutdrucks auf Werte <90 mmHg oder um mehr als 40 mmHg vom Ausgangswert, bei Abwesenheit von anderen Gründen der Hypotension.

Die vier häufigsten Eintrittspforten für Keime, die eine Sepsis oder eine schwere Sepsis auslösen, sind der Urogenital Trakt, das Abdomen, die Atemwege sowie intravaskuläre Katheter ¹¹. Dabei stellen Gram positive Keime (v.a. Staphylococcus Aureus, Koagulase negative Staphylokokken, Streptococcus Pneumoniae) und Gram negative Keime (v.a. Escherichia Coli, Klebsiella sp. und Pseudomonas Aeruginosa) den Großteil der Erreger. Zusätzlich gewinnen Pilzinfektionen an Bedeutung, so stieg die Zahl der durch Pilzinfektionen bedingten septischen Fälle in den USA zwischen 1979 und 2000 um 207 Prozent ⁴.

1.1.1. Pathogenese

Bei Bakterieninvasion werden Makrophagen, dendritische Zellen und Neutrophile Zellen aktiviert. Diese können über eine Freisetzung von Interleukin-12 CD4-T-Zellen aktivieren. Aktivierte CD4-T-Zellen sind darauf programmiert, Zytokine zu sezernieren, die entweder pro-inflammatorische Eigenschaften [Typ-1-Helfer-T-Zellen (Th1)] oder anti-inflammatorische Eigenschaften [Typ-2-Helfer-T-Zellen (Th2)] besitzen.

Zu den Zytokinen der Gruppe Th1 gehören Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Interferon- γ , Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-2 (IL-2) und Interleukin-6 (IL-6), zu der Th2 Gruppe zählen u.a. Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-12 (IL-12). Zytokine wie z.B. Interferon- γ können umgekehrt Makrophagen und dendritische Zellen aktivieren, wohingegen anti-inflammatorische Zytokine wie z.B. Interleukin-10 eine Makrophagen Aktivierung inhibieren.

Die Faktoren, die bestimmen, ob aktivierte CD4-T-Zellen Th1 oder Th2 Mediatoren freisetzen, sind unbekannt, können aber von der Art des Pathogens, der Bakteriengröße und der Lage der Infektion abhängen ^{12,13}.

Makrophagen oder dendritische Zellen, die vorher nekrotische Zellen phagozytiert haben, induzieren ein pro-inflammatorisches Zytokinprofil. Verarbeitung von Apoptose-Zellen durch Makrophagen oder dendritischen Zellen stimuliert entweder anti-inflammatorische Zytokine oder bewirkt eine Anergie. Als Anergie bezeichnet man einen Zustand der nicht-Reaktion auf ein Antigen. T-Zellen sind anergisch, wenn sie nicht befähigt sind, Zytokine als Antwort auf ein spezifisches Antigen zu proliferieren oder zu sezernieren ¹². Eine Übersicht über die Aktivierung von Zytokinen mit entweder pro-inflammatorischen oder anti-inflammatorischen Eigenschaften gibt Abb.1.1.

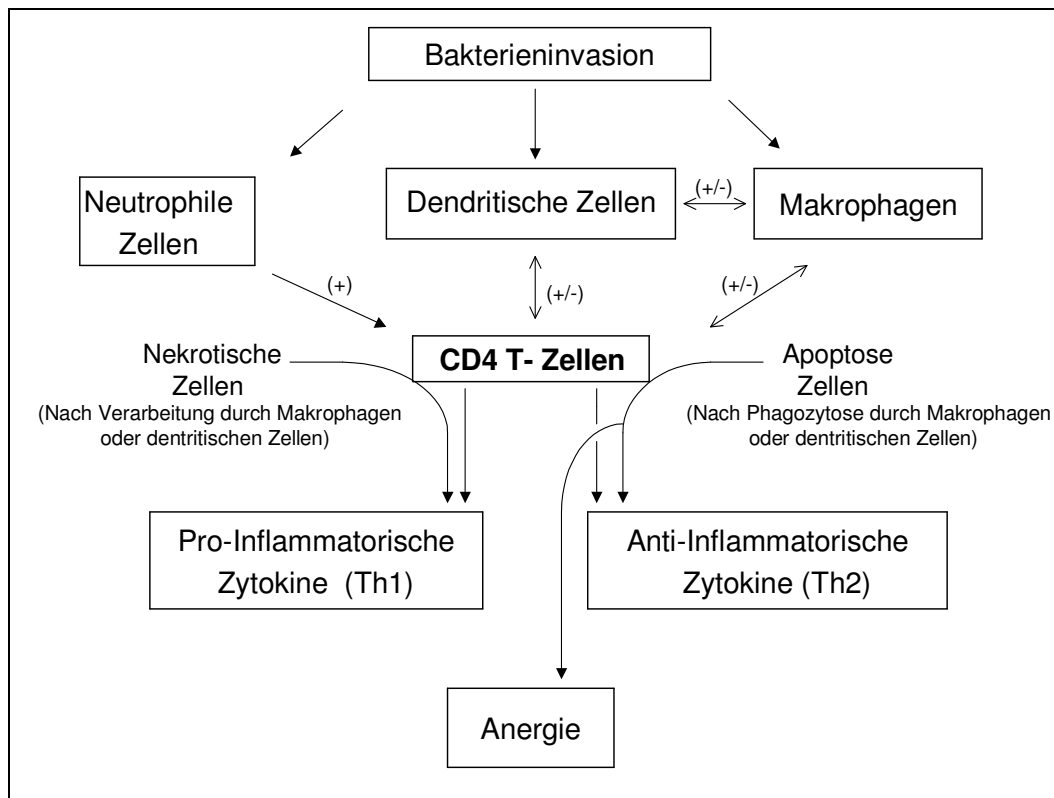


Abb. 1.1: Zytokinaktivierung nach Bakterieninvasion ¹²

Während der Entwicklung des septischen Prozesses tritt eine Kaskade der genannten Prozesse ein. Das inflammatorische System gerät in einen hyperaktiven Zustand, in den sowohl zelluläre als auch humorale Abwehrmechanismen involviert sind ¹⁴. Dabei werden zahlreiche pro-inflammatorische Mediatoren gebildet, gleichzeitig setzt eine vermehrte Produktion von Akut-Phase-Proteinen, wie z.B. des C-reaktiven Proteins, ein. Humorale Abwehrmechanismen, wie das Komplement System, werden aktiviert. Dieses bewirkt ebenfalls eine Bildung von pro-inflammatorischen Mediatoren, inklusive dem Komplement Kaskaden Produkt C5a. Letzteres erhöht die Zytokin- und Chemokinproduktion.

Viele der beschriebenen Mediatoren bewirken bei Neutrophilen Zellen und bei Makrophagen die Freisetzung von granulären Enzymen und die Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten, wie z.B. H_2O_2 . Bei der Abtötung von Bakterien ist H_2O_2 von entscheidender Bedeutung. Gleichzeitig bewirkt es aber auch einen Gewebeschaden, was zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und letztendlich zur Organschädigung führt.

Im weiteren Verlauf der Sepsis werden zunehmend anti-inflammatorische Mediatoren gebildet, was zu einer Verringerung der Produktion von pro-inflammatorischen Faktoren führt. In dieser Phase wird vor allem die Funktion der neutrophilen Zellen unterdrückt, woraus ein hyporeaktives Immunsystem resultiert. Dieser Prozeß kann bis zum vollständigen Erliegen der Immunantwort führen, ein Zustand, der als Immunoparalyse bezeichnet wird.

1.1.2. Hämodynamische Auswirkungen

Stickstoffmonoxid (NO) wird ubiquitär durch verschiedene Zelltypen gebildet ¹⁵. Es gibt drei verschiedene Isoformen der NO-Synthasen (NOS). Dabei handelt es sich um Produkte verschiedener Gene mit verschiedenen Lokalisationen, Regulationen und katalytischen Eigenschaften. Die Isoformen werden als neuronale (nNOS, Typ I, NOS-I), induzierbare (iNOS, Typ II, NOS-II) und endotheliale (eNOS, Typ III, NOS-III) NO-Synthasen bezeichnet ¹⁶. Die beiden konstitutiven NO-Synthasen endotheliale NOS und die neuronale NOS sind basal bereits hoch exprimiert und werden über eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums aktiviert ¹⁷. Eine Variante der neuronalen NOS ist die mitochondriale NOS (mtNOS) ¹⁸. Diese findet sich in den Mitochondrien von Leber, Gehirn, Herz, Muskel, Nieren, Lunge, Hoden und Milz ¹⁹. Bei Ratten verursachte mitochondriales NO oxidativen Stress und beeinträchtigte die Zellatmung nach transients Hypoxie ²⁰.

Die Expression der induzierbaren NOS (iNOS) wird nach Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 und Interferon- γ , Makrophagen und Endotoxinen stimuliert. Diese Aktivierung ist funktionell unabhängig von der Bildung von intrazellulärem Kalzium. Einen Überblick über die eNOS, iNOS und über den NO Stoffwechsel gibt Abbildung 1.2.

Unter physiologischen Bedingungen wird NO aus L-Arginin (L-Arg) im Endothel durch die konstitutive NO-Synthasen gebildet. NO diffundiert in die benachbarten glatten Muskelzellen und aktiviert dort die Guanylatcyklase. Diese bildet zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), welches über eine Senkung des intrazellulären Kalziums eine Relaxation der glatten Muskelzellen bewirkt (s. auch Abb 1.2). Dabei kommt es zu einer Vasodilatation. Unter anderem kommt es auf Grund dieses

Mechanismus während einer Sepsis durch die vermehrte NO Freisetzung zu einem ausgeprägten Blutdruckabfall.

Die eNOS, welche hauptsächlich als Regulator der NO Produktion unter physiologischen Bedingungen gilt ²¹, reguliert vor allem den Vasotonus durch Vasodilatation und moduliert somit den Blutdruck. In eNOS-defizienten Mäusen konnte entsprechend ein erhöhter Blutdruck ²² und eine größere Blutdruckvariabilität beobachtet werden ²³.

Bislang wurde vor allem die durch den systemischen Entzündungsprozess induzierte iNOS für die generalisierte Vasodilatation und für die umfassenden hämodynamischen Veränderungen im Verlauf einer Sepsis verantwortlich gemacht ^{24,25}.

Bhagat et al. zeigten aber, dass eine lokale IL-1 β Stimulation zu einer iNOS unabhängigen, ausgeprägten Vasodilatation führt. Die Autoren konnten keine iNOS-mRNA-Expression aber eine deutliche eNOS-mRNA-Induktion nachweisen ²⁶. Die Rolle der eNOS im Rahmen einer Sepsis bleibt jedoch weiterhin unklar.

In der Lungenstrombahn kommt es während einer Sepsis zu einem Ungleichgewicht zwischen NO und den starken Vasokonstriktoren Endothelin sowie Thromboxan mit pulmonaler Vasokonstriktion und pulmonaler Hypertonie ¹⁵.

Bei einer Sepsis entwickelt sich weiterhin eine Kardiodepression und eine kardiale Dysfunktion. Es kann dabei schon früh zu einer deutlichen Einschränkung der linksventrikulären Pumpfunktion und der ventrikulären Compliance kommen ¹⁵. Im septischen Schock kommt es zur Ausbildung einer hyperdynamen Phase, die durch einen geringeren peripheren Widerstand bei erhöhtem Herz-Zeit-Volumen gekennzeichnet ist. Typischerweise folgt auf diese Phase die hypodyname Phase mit erhöhtem peripheren Widerstand bei erniedrigtem Herz-Zeit-Volumen ²⁷.

Die Ursachen der Kardiodepression bei der Sepsis sind noch nicht eindeutig geklärt, eine wichtige Ursache scheint NO zu sein. Dabei kommt es NO vermittelt zu einer Veränderung der cGMP abhängigen Proteinkinase-Aktivität und des L-Typ Ca⁺⁺ Kanals und zu einer Desensibilisierung der Myofilamente gegenüber Kalzium. Desweiteren bindet während einer Sepsis NO an Enzymen und bewirkt eine zelluläre Dysfunktion, stimuliert Makrophagen und gilt als Auslöser des so genannten „respiratory burst“ (Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite, s.u.) der Leukozyten ¹⁵ (s. auch Abb 1.2).

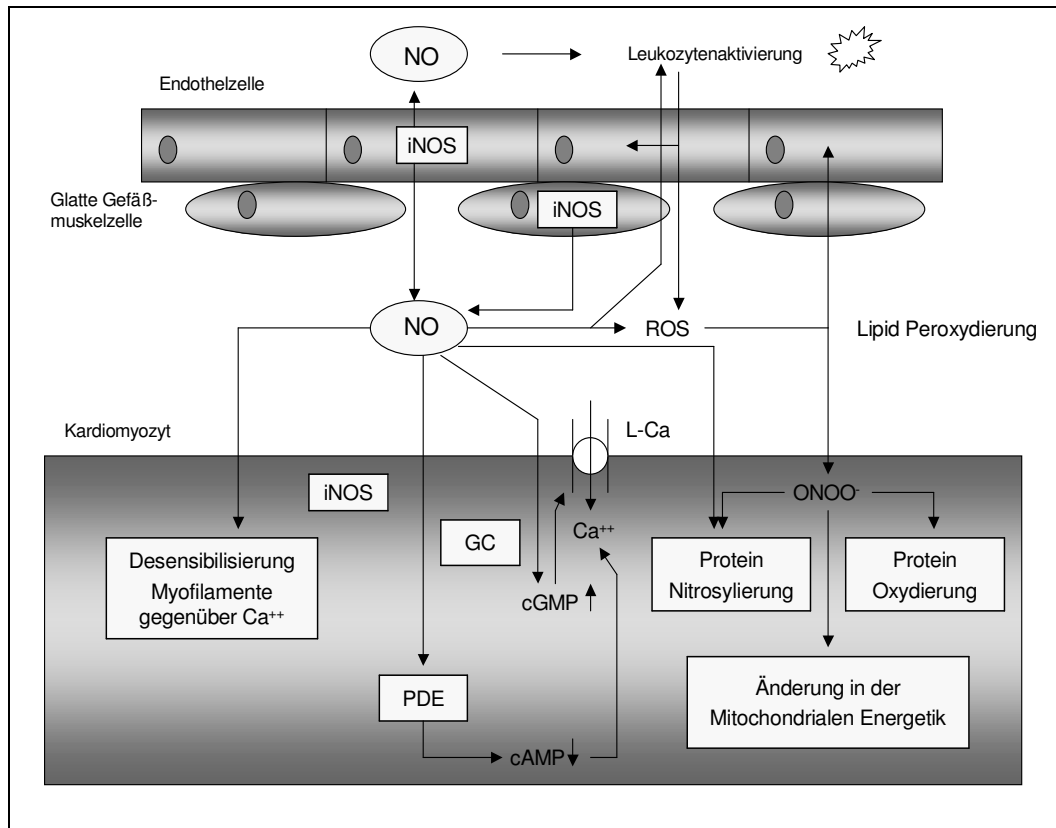


Abb. 1.2: Modifiziert nach U. Janssens und S. Price et al ^{15,28}. Mögliche Mechanismen von Stickstoffmonoxid (NO) bei der Modulation der myokardialen Funktion unter physiologischen Bedingungen und im septischen Schock. iNOS=induzierbare NO Synthase; ROS=reaktive Sauerstoffspezies; Ca^{++} = Kalzium; GC=Guanylatcyklase; cGMP=zyklisches Guanosinmonophosphat; L-CA=L-Typ Kalziumkanal; PDE=Phosphodiesterase; cAMP=zyklisches Adenosinmonophosphat; ONOO^- = Peroxynitrit.

Ein wesentlicher Grund für die Organ-Dysfunktion während einer Sepsis scheint in der Störung der zellulären Sauerstoffverwertung zu liegen. Die Enzym-Komplexe der Atmungskette, speziell NADH-Ubiquinon-Oxireduktase (Komplex I) und Cytochrom-C-Oxidase (Komplex IV) können direkt durch NO oder durch Peroxynitrit (ONOO^-) inhibiert werden ^{15,28-31}. Peroxynitrit entsteht aus der Kombination von reaktiven Sauerstoff-Spezies und NO und verursacht zusätzlich Schäden an der Zellmembran und enzymatische Dysfunktionen ^{28,32,33} (s.a. Abb 1.2). Die Inhibierung von Komplex-IV ist reversibel und entsteht durch die kompetitive Verdrängung von O_2 durch NO an der Cytochrom Oxidase ³¹, während die Inhibierung von Komplex-I persistent ist und

mit Abnahme der Konzentration des protektiv wirkenden intrazellulären reduzierten Gluthathion (GSH) zunimmt.

Unter physiologischen Bedingungen befinden sich Zellen in einem empfindlichen Zustand einer Redox-Balance, bestehend aus einem Gleichgewicht aus der Bildung von freien Sauerstoffradikalen und ihrer Entfernung durch anti-oxidative Mechanismen. In Studien wurde beschrieben, dass reaktive Sauerstoff-Spezies die linksventrikuläre Kontraktilität herabsetzen und die mitochondriale Funktion beeinträchtigen. Tierversuche zeigen zusätzlich in Sepsis Modellen einen erhöhten Marker an oxidativem Stress^{28,34,35}.

Zusammenfassend ergibt sich, dass NO potentiell die myokardiale Energie-Bildung herabsetzt und somit auch eine deutliche Kontraktilitätsdysfunktion induziert. NO beeinträchtigt die kardiale Kontraktilität mit einer extrem schnellen Kinetik, was nahe legt, dass dieser Mechanismus eine wichtige Rolle bei der Regulation der kardialen Funktion unter pathophysiologischen Bedingungen spielen kann³⁶.

Eine wesentliche Rolle bei der intrazellulären Inaktivierung von NO spielt Myoglobin (Mb) (s. auch Abb 1.3) und bestimmt somit die dosisabhängigen Effekte von NO auf den koronaren Blutfluss und die kardiale Kontraktilität. Bei der Reaktion von oxygeniertem Myoglobin (MbO_2) + NO zu Metmyoglobin (metMb) + NO_3^- wird effektiv die zytosolische NO Konzentration vermindert³⁷.

Zu hohe Mengen an NO überlasten jedoch die protektive zelluläre Wirkung des Myoglobins und beeinträchtigen die mitochondrial gerichtete Sauerstoffdiffusion, was zu einem direkten zellulären Schaden nach Bindung an reaktiven Sauerstoffspezies und zur Bildung von Peroxynitrit führt^{15,27}. Dies führt zu einer signifikanten Beeinträchtigung der linksventrikulären Kontraktilität und zu einem reduziertem O_2 Verbrauch³⁸.

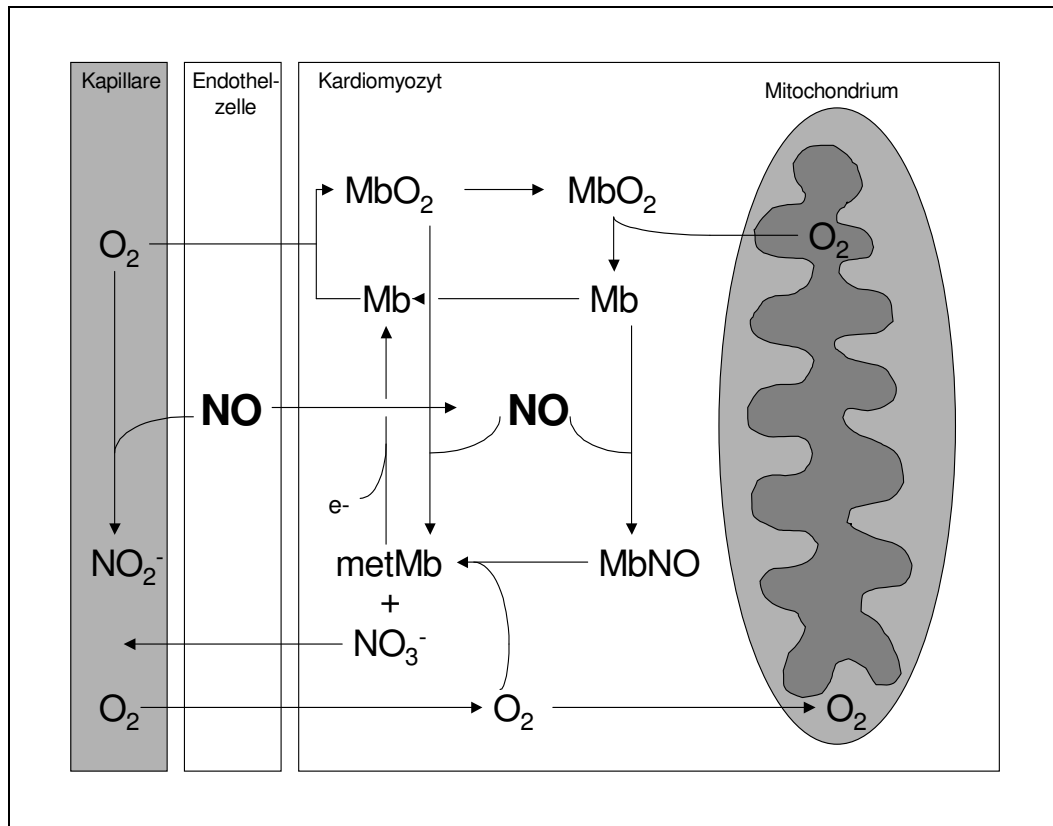


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der möglichen Interaktionen der verschiedenen Myoglobin Komponenten mit O_2 und NO, modifiziert nach Flögel et al.³⁷.

MetMb wird dabei auf zwei verschiedenen Wege gebildet: (1) direkt durch die Interaktion von NO und MbO₂ oder (2) durch Nitrosylierung von deoxigeniertem Mb, wobei MbNO als intermediär Produkt hervorgebracht wird und nachfolgend mit O_2 reagiert.

1.1.3. Therapie

Wesentliche Ziele in der Behandlung der Sepsis liegen in der Beherrschung der Schocksymptomatik, der Behandlung der Grundkrankheit, der Fokussanierung, in der supportiven Therapie des Multiorganversagens und in einer additiven Therapie der systemisch-entzündlichen Reaktion. Letzteres beinhaltet die Unterbrechung des Toxin–Mediator Netzwerkes durch Neutralisation, Antagonisierung und Elimination^{39,40}.

In verschiedenen Studien wurden mittlerweile neue, vielversprechende Behandlungskonzepte verfasst. Rivers et al. zeigen, dass mit einer frühen, aggressiven Therapie, die die kardiale Vorlast, Nachlast und die Kontraktilität optimiert, die Überlebensrate von Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock verbessert wird^{12,41}. Dabei sind u.a. Infusionen von Erythrozyten, die den Sauerstofftransport und die Sauerstoffsättigung erhöhen, verabreicht worden. Als zusätzlicher Leitwert für einen adäquaten Sauerstofftransport dient dabei die Normalisierung der Werte für die gemischt-venöse-O₂-Sättigung.

Andere klinische Studien belegen, dass die intensivierte Insulintherapie (Blutzucker Zielbereich 80-110 mg/dl) die Todesrate durch Multiorganversagen bei Patienten auf Intensivstationen, die an einer Sepsis erkrankt waren, reduziert⁴². Dabei ist es für den Therapieerfolg nicht von Bedeutung, ob die Patienten eine Diabetes Anamnese haben.

Desweiteren profitieren Patienten mit einer Sepsis im Gegensatz zur Gabe von hochdosierten Kortikosteroiden von „physiologischen“ Gaben von Kortikosteroiden¹².

Die bislang einzige kausale Therapie wird durch das rekombinante humane aktivierte Protein C dargestellt. Dabei handelt es sich um einen Antikoagulant, der zusätzlich eine effektive antiinflammatorische Wirkung entfaltet⁴³. Dabei ist die Wirkung in einem Rückkopplungsmechanismus zwischen dem Gerinnungssystem und der inflammatorischen Kaskade begründet. Hemmung der Thrombinbildung durch aktiviertes Protein C senkt die Inflammation durch reduzierte Plättchenaktivierung und bewirkt die Hemmung der Rekrutierung von Neutrophilen und die Mastzelldegeneration. Daneben weist aktiviertes Protein C noch direkte antiinflammatorische Eigenschaften durch Blockade der Zytokinproduktion und der Zelladhäsion auf. Bernard et al. zeigen in einer Patientenstudie, dass die Gabe von

rekombiniertem humanen aktivierten Protein C bei Patienten mit einem septischen Schock eine relative Mortalitätsreduktion von 19,4 % bewirkt ⁴⁴.

Weitere potentielle Ansätze zur Behandlung der Sepsis finden sich in tierexperimentellen Studien, in denen die Überlebensrate bei Sepsis Fällen durch den HMG-CoA Reduktase Inhibitor Simvastatin ⁴⁵ oder die Blockade des Macrophage migration inhibitory factor (MIF) ⁴⁶, des High-mobility group B1 protein (HMBG1) ⁴⁷ oder des Faktors C5 des Komplementsystems ^{48,49} verbessert werden konnte.

1.2. Ziel dieser Studie

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung, Validierung und hämodynamische Charakterisierung eines reproduzierbaren murinen Sepsis Modells. Dabei wurde zunächst ein standardisiertes Modell zur Sepsisinduktion durch Coecumligatur und -punktion (CLP, siehe auch Kapitel 2.2.) entwickelt.

Im zweiten Abschnitt unserer Versuchsreihe wurde nach CLP das Blutdruckverhalten und die kardiale Funktion durch Messungen am isolierten Herzen im Langendorff Modell von septischen mit nicht septischen Mäusen verglichen.

Die zwei am häufigsten praktizierten experimentellen Modelle zur Sepsisinduktion bei Mäusen oder Ratten sind (I) die CLP und (II) die intraperitoneale oder intravenöse Injektion von Lipopolysacchariden (LPS). Gut charakterisierte CLP-Modelle existieren für Ratten ^{50,51}. Auch bei Mäusen wurde dieses Verfahren schon angewendet ^{52,53}.

Wir wählten in unserer Studie das CLP Modell, da es ein klinisch relevantes Modell zur Induktion einer bakteriellen Sepsis ist und der Pathophysiologie der menschlichen Sepsis ähnelt ⁵⁴. Es spiegelt eine akute bakterielle Peritonitis wieder, wie sie postoperativ, posttraumatisch oder nach Keimdurchwanderung des Darmes auftritt.

Limitationen bisheriger CLP-Modelle liegen neben der Heterogenität der Modelle hinsichtlich der Überlebensdauer, Punktionsnadelgröße und der postoperativen Therapie (z.B. Substitution von NaCl, Applikation von Antibiotika) darin, dass bislang

noch keine strukturierte Untersuchung und Charakterisierung der kardiovaskulären Funktion septischer Mäuse in vivo und ex vivo durchgeführt wurde.

Wir wählten den Mausstamm C57 Black 6 vor allem deswegen aus, da für diesen Stamm auch eNOS Knock-Out (eNOS^{-/-}) und iNOS überexprimierte (iNOS^{+/+}) Mäuse vorliegen. Somit kann diese Arbeit auch als Grundlage für weitere Sepsis Untersuchungen dienen. In nachfolgenden Studien könnte damit die große Bedeutung der NO-Synthasen für den Pathomechanismus kardiovaskulärer Veränderungen während einer Sepsis weiter betrachtet werden.

Da für nicht-septische Mäuse bezüglich hämodynamischer Parameter in vivo und ex vivo eine relative grosse Varianz zwischen den verschiedenen Stämmen beschrieben ist ⁵⁵, ist eine strukturierte Validierung und Charakterisierung der Sepsis in dem Mausstamm C57 Black 6 unerlässlich.

Zusammenfassend ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen:

- 1.) Wie wirkt sich eine standardisierte, reproduzierbare Sepsisinduktion durch CLP auf die Überlebensrate der Versuchstiere beim Mausstamm C57 Black 6 aus? Wie groß ist die Varianz der Überlebensdauer?
- 2.) Welche Effekte auf die Hämodynamik zeigen sich nach CLP im Mausmodell? Wie verhält sich der arterielle Blutdruck von septischen Mäusen im Vergleich zum Blutdruck nicht septischer Tiere? Wie lässt sich der Blutdruck durch vasoaktive Substanzen beeinflussen?
- 3.) Wie lässt sich die Sepsis bedingte Herzinsuffizienz nach CLP charakterisieren?

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Verwendet wurden C57 Black 6 Mäuse mit einem Körpergewicht zwischen 25-35 g und einem Mindestalter von 6 Wochen.

Für die Unterbringung und Pflege der Tiere standen Räumlichkeiten und Personal des Instituts für Versuchstierkunde der RWTH Aachen zur Verfügung. Die medizinische Versorgung erfolgte durch den Versuchsleiter Dr. Merx mit Unterstützung der Veterinärmediziner des Instituts für Versuchstierkunde.

Die Tiere wurden in Käfigen vorgeschriebener Größe auf Holzgranulat unter SPF (Specific Pathogen Free) Bedingungen gehalten, die Versorgung mit Futter und Wasser erfolgte ad libitum. Es bestand ein 12 Stunden Tag/Nacht Zyklus.

2.2. Sepsisinduktion durch Coecum Ligatur und Punktion (CLP)

Die Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (60 µg/g Körpergewicht) und Xylazin (10 µg/g Körpergewicht) anästhesiert. Nach Feststellung einer ausreichenden Narkosetiefe per „tail pinch“ (Setzen eines Schmerzreizes mit einer chirurgischen Pinzette am Mausschwanz) wurden sie auf einem auf 37°C erwärmten Operationstisch in Rückenlage fixiert.

Unter Narkose wurde mittels eines elektrischen Kleintierrasiergerätes (Aesculap Favorita II) das Fell im Bereich des Abdomens entfernt und die Haut in diesem Bereich mit Antisepticum behandelt (Abb. 2.1). Als Zugang zum Coecum wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt. Nach Hautinzision von 15 mm Länge mit einer gebogenen chirurgischen Schere (FST 14075-11) wurde die eröffnete Haut mit feinen, anatomischen Pinzetten (Aesculap, OC021 R) gespreizt. Danach wurde das Peritoneum mit einer geraden, feinen Schere (FST 14088-10) ebenfalls in einer Länge von 15 mm in medianer Schnittführung entlang der Linea Alba durchtrennt, so dass die Bauchhöhle frei eröffnet wurde (Abb. 2.2). Die Muskelschicht wurde mit einer feinen, anatomischen Pinzette gespreizt. Mit einem sterilem Wattestäbchen, das vorher mit NaCl befeuchtet wurde, wurde vorsichtig, ohne umliegende Strukturen zu schädigen, das Coecum aus der Bauchhöhle heraus mobilisiert und sein

gesamter Verlauf dargestellt. Hierbei wurde das Coecum mit einem NaCl getränktem Tupfer hinterlegt (Abb. 2.3).

Unmittelbar distal der Ileocecal-Klappe wurde das Coecum mit einem 5-0 Seidenfaden ligiert, wobei streng darauf geachtet wurde, das Lumen von Ileum und Colon nicht einzuengen. Mit einer Kanüle (20G) wurde das Coecum anschließend kurz distal der Ligatur punktiert. Dabei wurde die Punktionsmethode „durch und durch“ angewendet, bei der die Kanüle nach ventraler Punktion des Coecum-Lumens vorgeschoben und dorsal aus dem Coecum hinausgeführt wurde. Hierdurch entstanden zwei Punktionsstellen (Abb. 2.4). Danach wurde manuell eine kleine Stuhlmenge aus beiden Punktionsstellen aus dem Darm herausgedrückt, so dass diese Öffnungen mit einer minimalen Menge Stuhl versehen waren. Somit konnte ein unmittelbarer Verschluss der Punktionsstellen durch Verkleben verhindert werden. Anschließend wurde das Coecum vorsichtig mit Wattestäbchen in die Bauchhöhle reponiert. Zuerst wurden Peritoneum und Muskelschicht adaptiert und mit einem 4-0 Seidenfaden mit Einzelkopfnähten verschlossen. Danach wurde die Haut mit einem 2-0 Seidenfaden in derselben Nahttechnik verschlossen. Abschließend wurde die Hautnaht äußerlich mit Beta Isodona Lösung bestrichen.

Bei einer zweiten Gruppe von Mäusen wurde lediglich eine Sham Behandlung durchgeführt. Hierbei wurde analog zur CLP Methode bei den Tieren eine mediane Laparotomie durchgeführt und das Coecum mobilisiert und freipräpariert. Es wurde aber weder mit einer Ligatur versehen noch punktiert. Nach der reinen Darstellung wurde das Coecum unversehrt in die Bauchhöhle reponiert. Es ist also davon auszugehen, dass bei diesen Sham behandelten Tieren keine Sepsis induziert wurde, sie aber, von der eigentlichen Punktion abgesehen, denselben Operationsbedingungen unterlagen wie die Tiere der CLP Versuchsgruppe.

Unmittelbar postoperativ wurde allen Mäusen 0,05 ml/g Körpergewicht NaCl (0,9%) subcutan infundiert. Alle Mäuse wurden bis zum Narkoseende in auf 37°C erwärmten Käfigen gehalten.

Alle 6h $\pm$ 1h im postoperativen Verlauf wurde den Mäusen zur Volumensubstitution NaCL (0,9%) 0,05ml/g Körpergewicht subcutan verabreicht. Zusätzlich wurde zur Analgesie alle 12 Stunden Tramal 20 μ g/g Körpergewicht per os gegeben.



Abb. 2.1: Narkotisierte Maus in Rückenlage fixiert; abrasiertes Fell im Bereich des Abdomens und Bestreichung mit Antisepticum



Abb. 2.2: Mediane Laparotomie

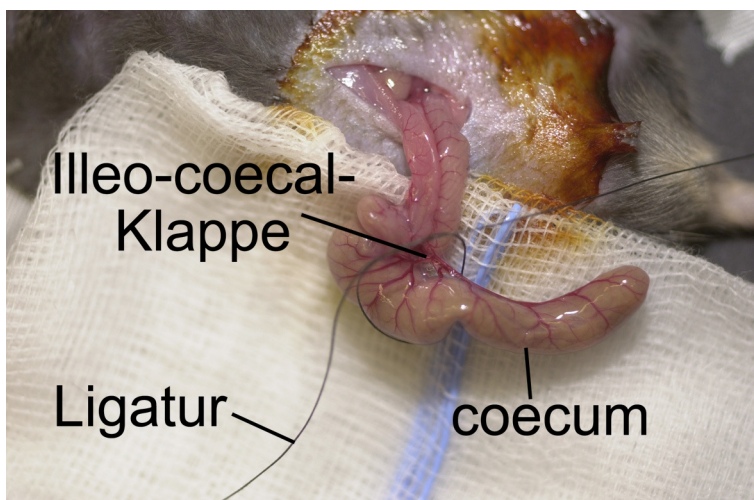


Abb. 2.3: Freigelegtes Coecum mit loser Ligatur

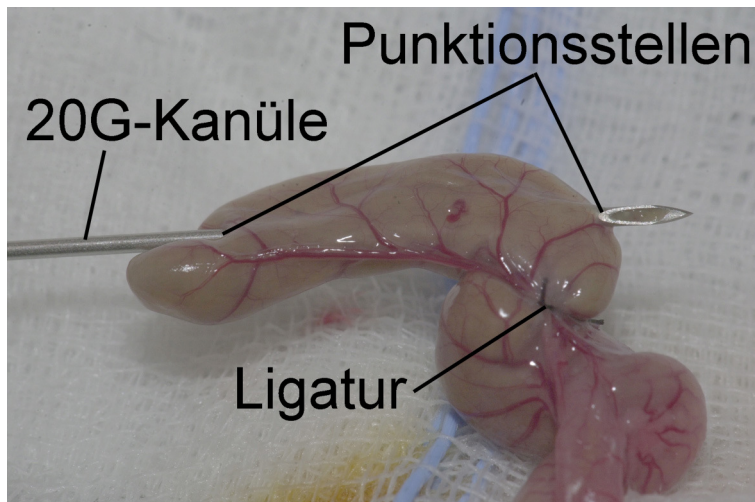


Abb. 2.4: Ligiertes und punktiertes Coecum, Punktionsmethode „durch und durch“

2.3. Überlebensdauer nach Sepsisinduktion

Im ersten experimentellen Ansatz wurde bei der einen Gruppe (n=10) mittels CLP eine Sepsis induziert und die andere Gruppe (n=8) einer Sham Behandlung unterzogen.

Beide Gruppen wurden engmaschig (stündliche Kontrollen) über einen Zeitraum von mindestens 168 Stunden überwacht und die jeweilige Überlebenszeit des einzelnen Versuchstieres festgehalten.

2.4. Invasive arterielle Blutdruck Messung

Basierend auf die in der o.g. Versuchsphase ermittelten Überlebenszeiten wurde für die hämodynamischen Evaluationen ein Zeitfenster von 20 ± 2 Stunden postoperativ festgelegt. Zu diesem Zeitpunkt wurden alle Experimente der invasiven Blutdruckmessung und alle Messungen am isolierten Herzen im Langendorff Modell durchgeführt.

Zur Bestimmung der arteriellen Blutdruckwerte wurden zwei Gruppen von Versuchstieren gebildet. Dabei bestand die erste Gruppe aus den CLP behandelten Tieren und die zweite Gruppe aus den Mäusen, die einer Sham Behandlung unterzogen wurden.

Es wurden Werte der Baseline sowie nach Applikation von Dobutamin und Ethylisothiourea (ETU) erfasst.

2.4.1. Versuchsaufbau

Präparation

Die jeweiligen Versuchstiere wurden mit Urethan (1 molar) körpergewichtsadaptiert intraperitoneal narkotisiert. Nach Feststellung einer ausreichenden Narkosetiefe per „tail pinch“ wurden die Tiere auf einem auf 37°C erwärmten Operationstisch in Rückenlage fixiert (Abb. 2.5). Als Zugang zur Arteria Carotis Communis wurde auf der rechten Halsseite in Höhe lateral des Kehlkopfes mit einer gebogenen chirurgischen Schere ein etwa 2 cm langer cranial-caudal verlaufender Hautschnitt gesetzt und die Haut vorsichtig mit Pinzetten retrahiert. Die weiteren Präparationsschritte wurden alle mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Leica MZ 9-5) zur besseren Darstellung der einzelnen Strukturen vorgenommen. Als Leitstruktur zur weiteren Präparation diente der M. sternocleidomastoideus. Medial davon wurden die einzelnen Faszien mit gebogenen Mikro Pinzetten (Aesculap BD333 R) gespalten, ohne umliegende Strukturen zu schädigen. Nach Öffnung der Halsfaszie wurde der Thymus zur Seite geschoben, so dass in der Tiefe in direkter Nachbarschaft zur Trachea die A. Carotis Communis, Vena Jugularis und der N. Vagus zur Darstellung kamen (Abb. 2.6). Der N. Vagus liegt der Arteria Carotis Communis direkt an, so

dass dieser mittels der Mikro Pinzette dargestellt und sorgfältig von dem Verlauf dieser Arterie getrennt wurde. Die Arteria Carotis Communis wurde in ihrem Verlauf etwa 2 cm lang bis zur Bifurcatio Carotis, unter sorgfältiger Schonung von angrenzenden Gefäßen, Nerven oder der Trachea, dargestellt. Nachdem die rechte Arteria Carotis Communis dargestellt und freigelegt wurde, wurde das Gefäß unmittelbar caudal der Bifurcatio Carotis mit einer 5-0 Seide Ligatur abgebunden. Etwa 1-2 cm weiter caudal dieser Stelle wurde die Arterie mit einer Gefäßclip (FST Mico Serrendines) abgeklemmt, so dass zwischen der Ligatur und der Klemme eine von der Blutzirkulation abgetrennte Gefäßstelle entstand (Abb. 2.7). Mit einer geraden Sprungschere (FST 15003-8) wurde in diesem abgetrennten Gefäßbereich die Gefäßwand eingeschnitten, so dass über diese Öffnung ein Katheter eingeführt werden konnte. Zur besseren Führung des Katheters wurde ein Katheterhalter (S&T 00608) verwendet (Abb. 2.8).

Bei dem Katheter handelte es sich um einen in unserem Labor hergestellten Katheter aus Polyethylen, dessen Spitze auf einen Außendurchmesser von 0,5 mm und einen Innendurchmesser von 0,3 mm ausgezogen wurde und im übrigen Verlauf einen Außendurchmesser von 0,8 mm und einen Innendurchmesser von 0,4 mm hatte. An den Kathether wurde über ein T-Stück ein Schenkel zur Applikation von Medikamenten (Schenkel durch eine Klemme blockierbar) und über einen Drei-Wege-Hahn ein weiterer Schenkel zur Applikation eines Gemisches aus Heparin und NaCl (Verhältnis 1:9 Heparin:NaCl, max. applizierte Menge an Heparin 10 IE) integriert. Das gesamte Kathetersystem wurde luftblasenfrei mit diesem Heparin/NaCl Gemisch gefüllt, zusätzlich diente es als Spülflüssigkeit des Systems. Das Heparin bewirkte eine Antikoagulation des Blutes in der Maus als auch im Kathetersystem. Der Drei-Wege-Hahn wurde mit dem Druckmesser verbunden (Abb. 2.11). Der Katheter wurde in die Arteria Carotis Communis eingeführt (Abb. 2.8) und mit einer 5-0 Seide Ligatur fixiert. Danach wurde die Gefäßklemme gelöst, so dass der Blutdruck auf den Druckwandler übertragen wurde (Abb. 2.9 und Abb. 2.10). Über den Druckmesser wurde das Blutdrucksignal aufgenommen. Vor jedem neuen Versuch wurde der Druckmesser neu kalibriert.

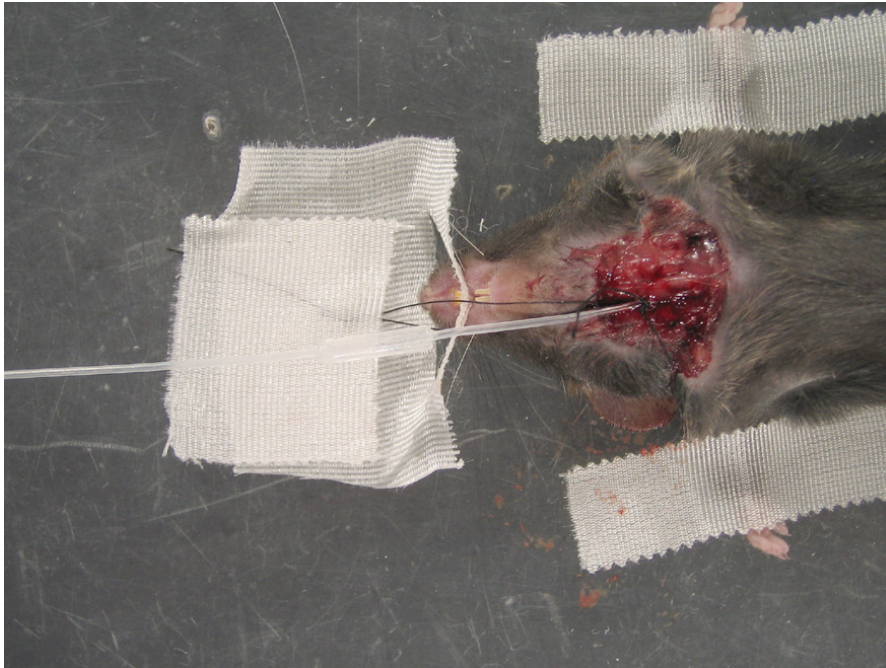


Abb. 2.5: Übersicht Maus nach erfolgter Katheterisierung

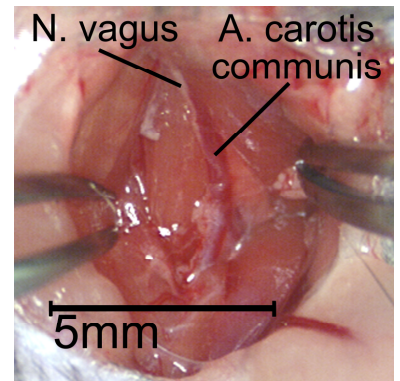


Abb. 2.6: Übersicht der Carotisregion

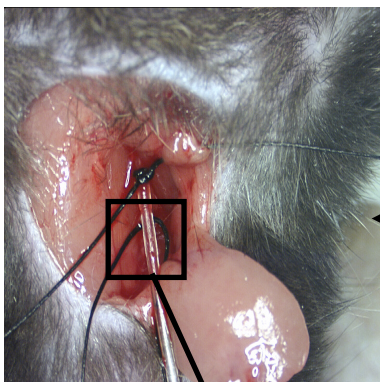


Abb. 2.9

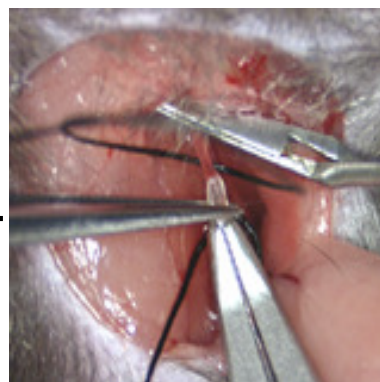


Abb. 2.8

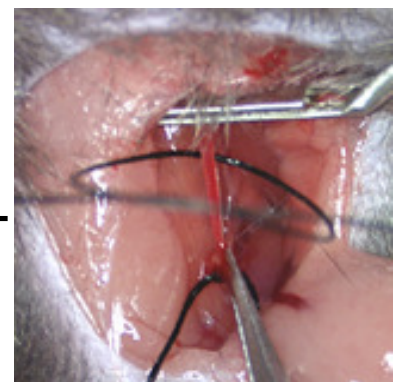


Abb. 2.7

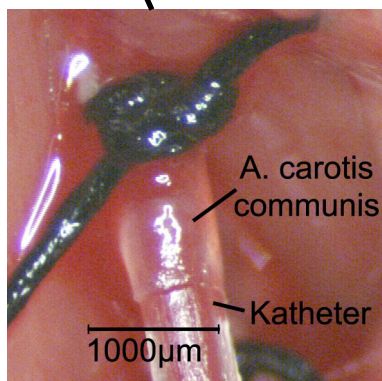


Abb. 2.10: Katheterisierte A. carotis communis

Abb. 2.5 – 2.10: Präparation und Katheterisierung der A.carotis

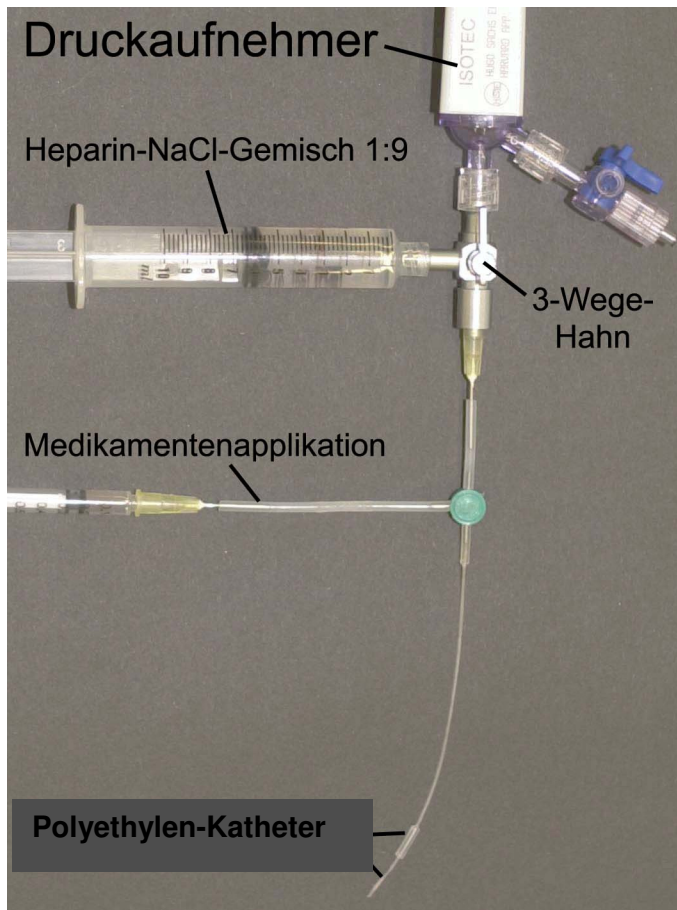


Abb. 2.11: Karotiskatheter in Übersicht

2.4.2. Versuchsdurchführung

2.4.2.1. Messwerte

Aus der Blutdruckkurve wurden kontinuierlich und in Echtzeit folgende Parameter abgeleitet:

- Systolischer Blutdruck in mmHg
- Diastolischer Blutdruck in mmHg
- Blutdruckamplitude in mmHg
- Mittlerer Blutdruck in mmHg
- Herzfrequenz in Schläge pro Minute
- Cardiac Power in mmHg/min: Berechneter Wert aus der Herzfrequenz multipliziert mit dem systolischen Blutdruck.

2.4.2.2. Versuchsprotokoll

Zunächst wurde über einen Zeitraum von 1 Minute die Baseline der o.g. Parameter erfasst und gespeichert. Danach wurden nacheinander Dobutamin und ETU über den entsprechenden Katheterschenkel appliziert.

Zur besseren Steuerung und Kontrolle der Substanzengabe war der Katheter so hergestellt, dass er nur ein geringes Totraumvolumen besaß. Das Volumen der verabreichten Medikamente war dem Volumen der Körperflüssigkeit der Tiere angepasst, so dass unerwünschte Konsequenzen von Flüssigkeitsübersättigungen, wie z.B. Lungenödeme, vermieden werden konnten.

Dobutamin wurde in einer Konzentration von 1,5 µg/g Körpergewicht im Bolus gegeben. Unmittelbar nach Applikation wurde auf den Druck-Schenkel des Katheters umgeschaltet und das Blutdrucksignal kontinuierlich vom Druckmesser erfasst und gespeichert. Dabei kam es nach einer Anflutphase sowohl von Dobutamin als auch von ETU regelhaft zur Ausbildung eines Plateau. Nach selbigem wurde noch die jeweilige Rückbildungsphase dokumentiert und nach Abklingen des Effektes die Datenspeicherung unterbrochen. Da die Substanzen direkt intraarteriell appliziert wurden, stellte sich der jeweilige Effekt rasch ein. Nach der Dobutamin Gabe wurde das Kathetersystem mit einem NaCl-Heparin Gemisch ausgiebig gespült.

Im nächsten Schritt wurde ETU (1 µmol/g=185,1 µg/g Körpergewicht) über den Schenkel zur Applikation von Substanzen des Katheters injiziert. Hierbei wurde darauf geachtet, die Substanz langsam über einen Zeitraum von etwa 1 Minute zu applizieren, um unerwünschte Nebenwirkungen des ETU durch zu rasches Anfluten zu vermeiden. Direkt nach der Injektion wurde auf den Druck Schenkel des Katheters umgeschaltet und das Blutdrucksignal wieder kontinuierlich vom Druckmesser erfasst und gespeichert. Einen Überblick über den Versuchsablauf gibt Abb. 2.12 sowie Tabelle 2.1.

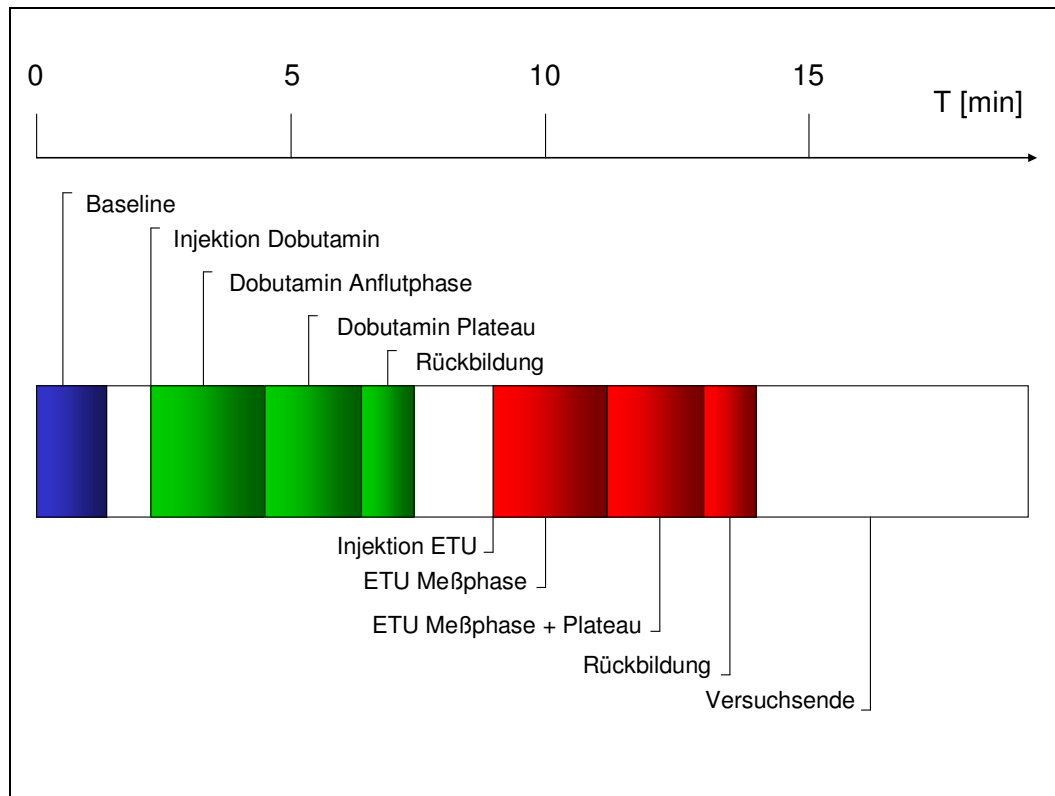


Abb. 2.12: Zeitlicher Ablauf der einzelnen Versuchselemente bei der invasiven arteriellen Blutdruckmessung

Protokoll der Versuchsdurchführung		
1. Phase	2.Phase	3. Phase
Beginn der Messung der Baseline	Injektion Dobutamin	Injektion ETU
Speicherzeit = 1 Minute	Beginn der Messung	Beginn der Messung
danach Spülen des Katheters	Anflutphase	Anflutphase
	Plateau	Plateau
	Abklingphase	Abklingphase
	Ende der Messung	Ende der Messung
	Danach Spülen des Katheters	danach Spülen des Katheters
	Speicherzeit jeweils 5 Minuten	

Tab. 2.1: Protokoll der Versuchsdurchführung der invasiven arteriellen Blutdruckmessung

2.4.2.3. Pharmaka

2.4.2.3.1. Dobutamin

Dobutamin ist ein synthetisches Katecholamin mit einer Halbwertszeit von ca. 2 Minuten. Die beta-sympathomimetische Wirkung ist hierbei stärker ausgeprägt als die alpha sympathomimetische Wirkung. Innerhalb der β -sympathomimetischen Wirkung zeigt Dobutamin vor allem durch Erregung von beta-1 Rezeptoren positiv inotrope Effekte. Durch die schwächere Stimulation von beta-2 Rezeptoren wirkt Dobutamin vasodilatierend, in erster Linie auf die Skelettmuskel- und Koronararterien, wodurch der periphere Gefäßwiderstand gesenkt wird. Diese vasodilatierende Wirkung überwiegt den gleichzeitig in geringem Maße vorhandenen, über alpha Rezeptoren vermittelten vasokonstriktorischen Einfluss⁵⁶.

Bei der invasiven Blutdruckmessung wurde Dobutamin in einer Konzentration von 1,5 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht appliziert.

2.4.2.3.2. Ethylisothioharnstoff (Ethylisothiurea=ETU)

Ethylisothiurea ist ein globaler Hemmer der NO Synthase. Die endotheliale NO Synthase reguliert den Vasotonus durch Vasodilatation und moduliert somit den Blutdruck. ETU Gabe bewirkt einen erhöhten Blutdruck und eine Zunahme des peripheren Widerstands. ETU wurde in einer Konzentration von 0,05 molar injiziert.

ETU beeinflusst zusätzlich den Koronararterientonus über den o.g. Mechanismus. In Langendorff Experimenten am isolierten Herzen zeigt sich nach ETU Gabe ein signifikanter Anstieg des Perfusionsdruck unter konstanten Fluss Bedingungen³⁷. Der Bradykinin induzierte Anstieg des Koronarflusses kann durch ETU Applikation fast vollständig blockiert werden⁵⁷.

2.4.2.3.3. Narkosemittel

Urethan

Urethan wird vielfach als Anästhetikum für Tierversuche verwendet, da es nur minimal das Herz-Kreislaufsystem und die Atmung beeinflusst und gleichzeitig spinale Reflexe noch erhalten bleiben. Der Mechanismus der Wirkung von Urethan als Anästhetikum besteht in einer moderaten Potenzierung der Stimulation GABAergischer und Glyzinerger Transmitterrezeptoren kombiniert mit einer moderaten Depression der glutaminergen Transmitterrezeptoren Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure und N-methyl-D-aspartat ⁵⁸.

Urethan wurde wegen des geringen Einflusses auf die hämodynamischen Parameter zur Narkoseführung gewählt. Diese Substanz wurde aufgrund der im Falle eines Überlebens auftretenden schweren ZNS-Schäden nur als finale Narkose verwandt. Es wurde in einer Konzentration von 1 molar intraperitoneal verabreicht.

Ketamin & Xylazin

Zur Anästhesie vor Sepsisinduktion bzw. Sham Behandlung wurden Ketamin in einer Dosis von 60 µg/g Körpergewicht und 10 µg/g Körpergewicht Xylazin verabreicht.

Die Narkotisierung mit Xylazin und Ketamin ist bei Mäusen die zuverlässigste Methode zum Erreichen einer Relaxation, Sedation und Analgesie ⁵⁹.

Ketamin wirkt an verschiedenen Rezeptoren. Es bewirkt einen nicht-kompetitiven Antagonismus am NMDA-Rezeptor, welcher ein Subtyp des Glutamat Rezeptors ist. Am Opiatrezeptor wirkt es agonistisch und es beeinflusst die zentrale und periphere monoaminerge und cholinerge Übertragung. Unter Ketamin Einfluss tritt eine „dissoziative Anästhesie“ ein ⁶⁰. Ketamin kann intravenös, intramuskulär und intraperitoneal appliziert werden.

Xylazin ist ein Alpha-2-Adrenozeptoragonist mit sedativen und analgetischen Eigenschaften. Es wirkt muskelrelaxierend, bewirkt eine Bradykardie, verringert das Herzzeitvolumen, induziert einen vorübergehenden Anstieg des Blutdrucks, gefolgt von einer Phase niedrigeren Blutdrucks und senkt die Atemfrequenz ^{61,62}.

2.5. Häodynamische Eigenschaften des isolierten Herzens im Langendorff Modell

2.5.1. Einführung

Langendorff Modellbeschreibung

Bereits 1896 führte Oskar Langendorff ein Modell ein, in dem man isolierte Säugetierherzen mit einer geeigneten Nährlösung über mehrere Stunden schlagen lassen kann ⁶³. Dabei repräsentieren unter standardisierten Bedingungen durchgeführte Untersuchungen am isolierten Herzen ein funktionell und metabolisch über mehrere Stunden stabiles System.

In der Anwendung lassen sich durch Versuche am isolierten Herzen ein breites Spektrum an biochemischen, physiologischen, morphologischen und pharmakologischen Parametern messen. Diese bringen detaillierte Analysen zu intrinsischen ventrikulären Mechanismen, Metabolismen und koronaren vaskulären Antworten. Dabei treten bei diesen Messungen keine systemischen Beeinflussungen und Nebeneffekte wie z.B. zirkulierende neurohormonale Faktoren, sympathische und vagale Stimulation, Änderungen im systemischen oder pulmonalen Gefäßwiderstand oder Änderungen der links- und rechtsventrikulären Füllung auf. Desweiteren lassen sich experimentelle Bedingungen wie z.B. die ventrikuläre Vor- und Nachlast, Oxygenierung des Perfusats, Koronarfluss, Herzfrequenz und Herztemperatur individuell und präzise den jeweils gewünschten Fragestellungen anpassen.

Eine weitere Eigenschaft der Langendorff Anlage besteht darin, dass dem Herzen Medikamente direkt in die koronare Zirkulation zugeführt werden können. Somit können die Effekte dieser Medikamente am schlagenden, isolierten Herzen untersucht werden. Schließlich kann man in dem Modell noch eine globale oder regionale Ischämie induzieren und somit Aspekte zu Ischämie- und Reperfusionen induzierten Schäden untersuchen.

Für Experimente am isolierten perfundierten Mäuseherzen nach Langendorff kam in unserem Labor eine von der Firma Hugo Sachs entwickelte und in Zusammenarbeit mit Dr. Merx ⁶⁴ für Mäuse optimierte Apparatur zum Einsatz (s.a. Abb. 2.13).

Da das isolierte Herzen sehr anfällig gegenüber Temperaturänderungen ist, wurde, um konstante und definierte Temperaturen zu gewährleisten, das Herz und alle Temperatur-sensitiven Komponenten innerhalb einer Thermostatkammer (15),(16) installiert.

Das Herz ist mit der Anlage über eine Kanüle (2), die in der Aorta platziert wurde, verbunden. Über diese Kanüle wurde das Herz mit Perfusat versorgt. Die starre Edelstahlkanüle stellte mit ihrer nicht vorhandenen Compliance einen energetisch sehr ungünstigen Widerstand für die links-ventrikulären Ejektion dar. Daher war es von besonderer Bedeutung, den inneren Durchmesser der Kanüle so groß wie möglich zu wählen. Die Länge der Kanüle wurde aus denselben Gründen so kurz wie möglich gewählt.

Die Kanüle war oberhalb der Aortenklappe in der Aorta platziert, so dass das Perfusat von der Aorta in die Koronararterien gelangte. Das Herz wurde also retrograd perfundiert. Als Perfusat wurde ein zirkulierendes, nährstoffreiches, isotones Medium, welches konstant auf einer Temperatur von 37,5°C gehalten wurde, eingesetzt. Das Perfusat wurde über eine Rollpumpe (Firma IsmaTec) (11) in die Aorta befördert und konnte durch diese reguliert werden. Die Langendorff Anlage arbeitete unter konstanten-Druck-Bedingungen, was dadurch ermöglicht wurde, dass die Rollpumpe das Herz mit mehr Perfusat versorgte, als eigentlich benötigt wurde. Das Herz wurde also im Überfluß perfundiert. Der Überschuss an Perfusat wurde in einer Plexiglas Kammer aufgefangen und über eine Pumpe in ein Reservoir geleitet und anschließend verworfen (22). Der Perfusionsdruck ließ sich durch den Flusswiderstand (5) einstellen. Dieser Flusswiderstand bestand aus einer Membran gegen die von einer Seite das Perfusat gefördert wurde und von der anderen Seite Druck durch eine Kontroll-Druckpumpe mit Manometer (6) appliziert wurde. Zusätzlich wurde der Perfusionsdruck, der resultierende koronare Fluss und der linksventrikuläre Druck gemessen. Letzterer wurde durch einen flüssigkeitsgefüllten Polyvinylchlorid Ballon (19) gemessen, der über den linken Vorhof in den linken Ventrikel platziert wurde. Über den Füllungsgrad des Ballons (21) konnte die Vorlast des Herzens simuliert werden.

Über einen Seitenarm (17) konnten dem Herzen Medikamente über eine Infusionspumpe (Precidor Infors AG) zugeführt werden. Dieser Seitenarm befand sich in direkter Nähe der Aortenkanüle, somit konnte eine Kontamination des Systems vermieden werden.

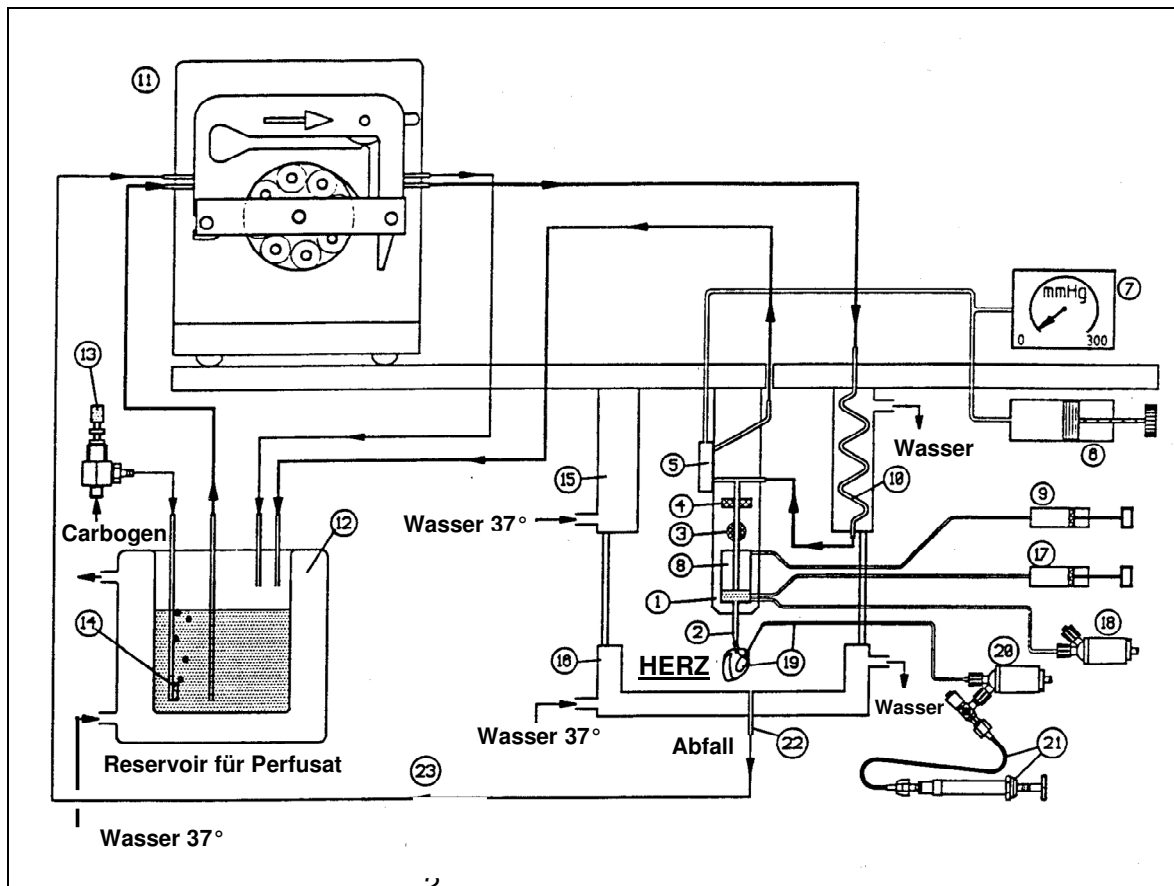


Abb. 2.13: Funktionsschema Langendorff-Herz ⁶⁵

(1) Aortenblock, (2) Aortenkanüle, (3) Absperrhahn, (4) Flussaufnehmer: erfasst das Effluat, welches dem Koronarfluß entspricht, (5) Einstellbarer Flusswiderstand, (6) Spindelspritze zum Einstellen des Flusswiderstands, (7) Zeigermanometer zur Anzeige des eingestellten Drucks am Flusswiderstand, (8) Windkessel, Luftvolumen zur Nachbildung der Compliance der Aorta, (9) Spritze zum Einstellen des Luftvolumens im Windkessel, (10) Wärmetauscher, im Oberteil der Herzkammer integriert, (11) Schlauchpumpe, Förderbereich bis etwa 25ml/min, (12) Perfusat Vorratsgefäß, doppelwandig, temperiert mit entsprechenden Zu- und Abgängen, (13) Nadelventil, justierbar zum Einstellen des Carbogenflusses durch die Fritte, (14) Glasfritte für die Begasung des Perfusats, (15) Oberteil der doppelwandigen Herzkammer, temperierbar, (16) Unterteil der doppelwandigen Herzkammer, temperierbar, (17) Spritze für die Gabe einer Wirksubstanz, (18) Druckaufnehmer zum Erfassen des Perfusionsdrucks, (19) Intraventrikulärer Ballon mit Anschlusskatheter zum Erfassen des isovolumetrischen Ventrikeldrucks, (20) Druckaufnehmer zum Messen des isovolumetrischen Ventrikel Drucks, (21) Spindelspritze zum Einstellen des diastolischen Ballondrucks, (22) Ablaufröhrchen zum Abfluß des abtropfenden Effluats, (23) Schlauch zum Absaugen des Effluats

2.5.2. Versuchsaufbau

2.5.2.1. Präparation / Herzentnahme

Die Mäuse wurden mit Urethan körpergewichtsadaptiert intraperitoneal narkotisiert. Direkt nach der Narkose Injektion wurden die Mäuse mit zusätzlich 5 IU/g Körpergewicht Heparin intraperitoneal antikoaguliert. Nach Feststellung einer ausreichenden Narkosetiefe per „tail pinch“ wurden die Tiere auf einem auf 37°C erwärmten Präparationstisch in Rückenlage fixiert.

Der Zugang zum Herzen erfolgte über eine antero-laterale Thorakotomie. Dabei wurde eine Hautinzision mit einer gebogenen chirurgischen Schere (FST 14075-11) entlang des Rippenbogens zwischen den beiden Medioklavikularlinien gesetzt. Nach Durchtrennung des subcutanen Fettgewebes und der Muskelschicht wurde die direkt darunter liegende Thorax Faszie ebenfalls eröffnet (Abb. 2.13). Nun wurde die medial eröffnete Thoraxhöhle beidseits lateral der Medioklavikularlinie nach cranial hin unter Durchtrennung der Rippen vom 10. Intercostalraum bis zum 2.-3. Intercostalraum weiter offen gelegt. Das Sternum wurde mit einer feinen, anatomischen, gebogenen Pinzette (Aesculap OC021 R) nach oben deflektiert, wodurch die Thoraxorgane, besonders Herz und Lunge, gut dargestellt wurden.

Hierauf wurde das Gefäßbündel caudal des Herzens, bestehend aus Vena cava inferior und Aorta abdominalis mit einer feinen, gebogenen Pinzette fixiert. Danach wurde das Gefäßbündel mit einer gebogenen Schere durchtrennt. Die Gefäße wurden weiter mit der Pinzette fixiert und gleichzeitig vorsichtig nach oben geführt. Nun wurde die Schere die Wirbelsäule von caudal nach cranial entlang geführt, um die Äste der Aorta und Vena Cava zu durchtrennen. Unter Beibehaltung der Schnittführung konnten so auch die cranialen Gefäßäste durchtrennt werden, so dass nun Herz und Lunge vollständig aus dem Thoraxraum herausgehoben werden konnten (Abb. 2.14). Bei der gesamten Präparation wurde genau darauf geachtet, Strukturen des Herzens und der Aorta ascendens nicht zu schädigen.

Die herausgenommen Organe wurden sofort in eine kontinuierlich auf 4°C gekühlte Präparierschale gegeben (Abb. 2.15). Die Präparierschale war mit einer präoxygenierten, modifizierten Krebs–Henseleit Lösung befüllt. Somit befand sich das Herz die ganze Präparationszeit in einer nährstoff-und sauerstoffreichen Lösung. Gleichzeitig konnte durch die Kühlung des Herzens eine starke Herabsetzung des

Herzmetabolismus erreicht werden, wodurch eine übermäßige Belastung des isolierten Herzens vermieden wurde.

In dieser Präparierschale wurde nun das Herz mit einer feinen, geraden Schere (FST 14088-10) von der Lunge, Bronchien, Thymus und Ösophagus getrennt. Danach wurde an dem isoliertem Herz die Aorta dargestellt und in einer Länge von etwa 1 cm mit Mikro Pinzetten (Aesculap BD 331 R) und einer gebogenen Federschere (FST 15004-8) freipräpariert. Gleichzeitig wurde durch Abtrennung der Venae Pulmonales ein Zugang in den linken Vorhof geschaffen.

Danach wurde das distale Ende der Aorta vorsichtig mit zwei feinen, geraden Pinzetten fixiert und auf die vorbereitete Kanüle gezogen. Es wurde streng darauf geachtet, dass hierbei die Koronarostien nicht verlegt wurden oder die Aortenklappe beschädigt wurde.

Danach wurde die Aorta mittels 5/0 Seide auf der Kanüle ligiert (Abb. 2.16) und die Kanüle samt Herz an die Langendorff Apparatur angeschlossen (Abb. 2.17 – 2.19).

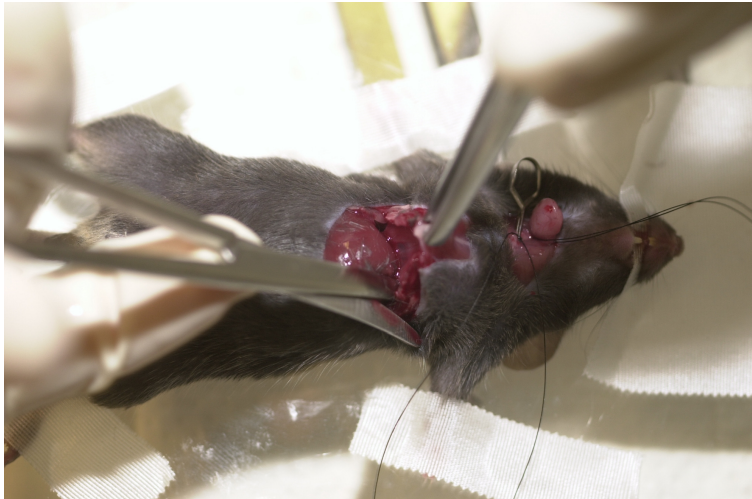


Abb. 2.14



Abb. 2.15

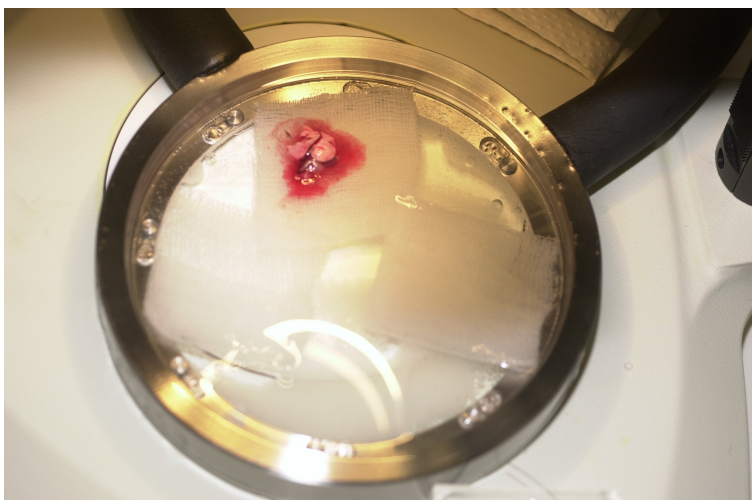


Abb. 2.16

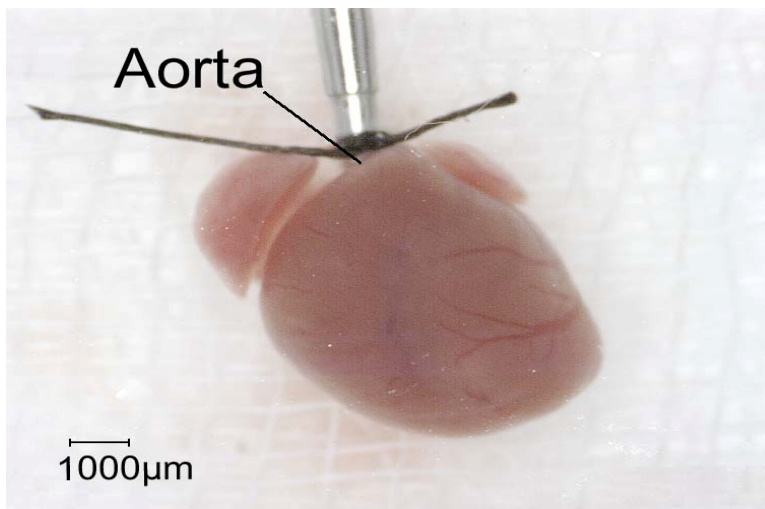


Abb. 2.17

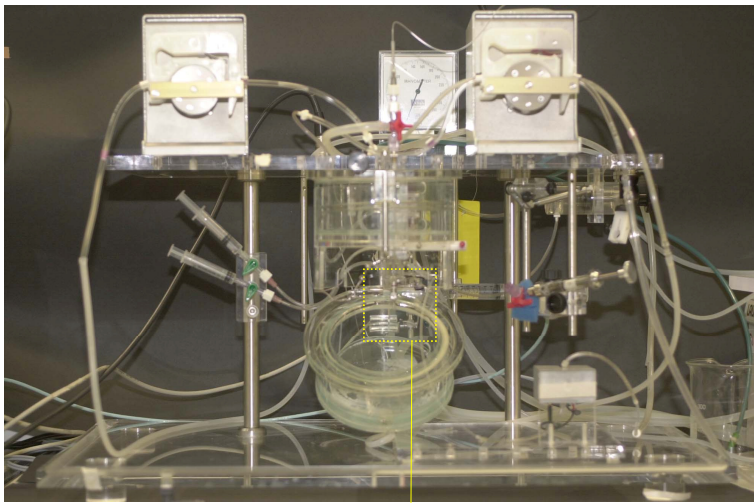


Abb. 2.18: Übersicht Langendorff-Anlage

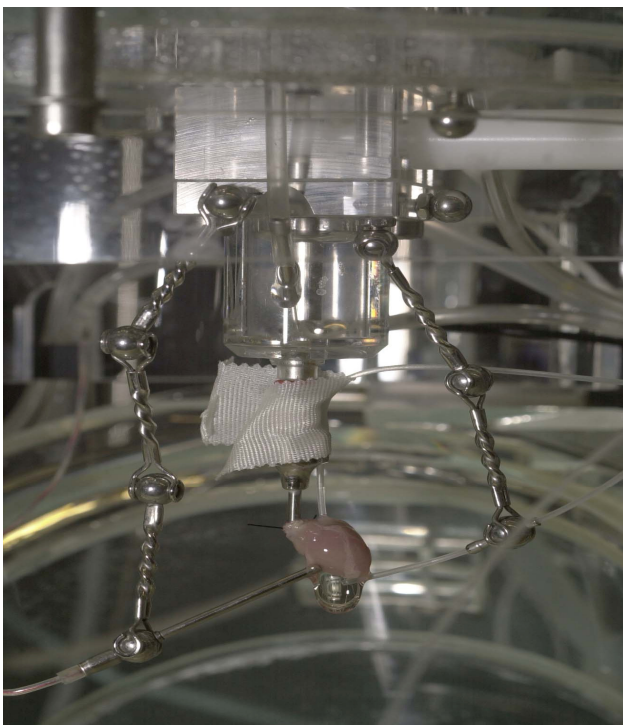


Abb. 2.19: Aufhängung eines Herzens im
Langendorff-Apparat

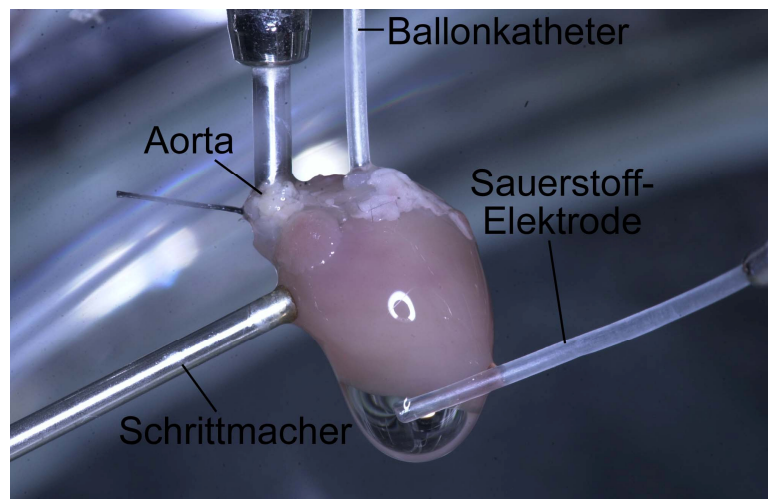


Abb. 2.20: Aufhängung eines Herzens in Vergrößerung

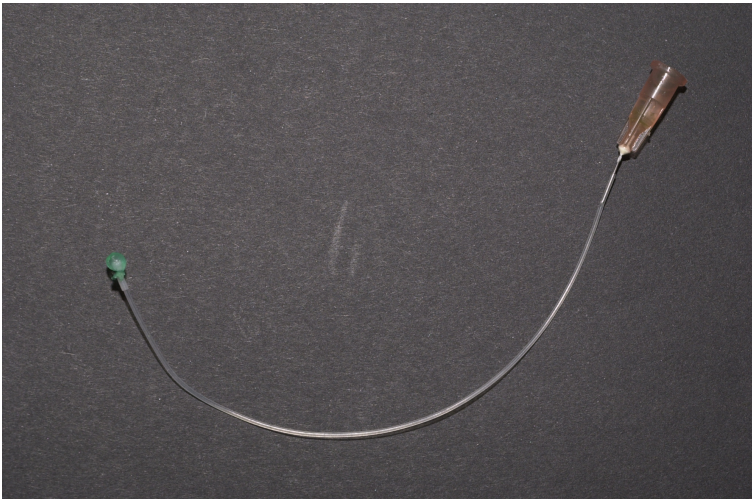


Abb. 2.21: Ballonkatheter zur Druckmessung. Verbindung über einen Polyethylenschlauch mit einer Kanüle

2.5.2.2. Krebs-Henseleit-Lösung

Für alle Versuche im Langendorff Modus wurde zur Perfusion des isolierten Herzens und als Nährlösung während der Präparation eine saline Lösung modifiziert nach Krebs-Henseleit verwendet. Das Perfusat diente dabei dazu, dem Herzen Nährstoffe zuzuführen und es gleichzeitig unter Erhalt einer pH-Hömoostase mit Sauerstoff zu versorgen. Die Lösung setzte sich zusammen aus:

NaCl 116 mmol/L, KCL 4.6 mmol/L, MgSO₄ 1.1 mmol/L, NaHCO₃ 24.9 mmol/L, CaCL₂ 2.5 mmol/L, KH₂PO₄ 1.2 mmol/L und Glucose 6,0 mmol/L.

Um das Risiko zu vermeiden, dass sich Kalziumphosphat Präzipitate bildeten, wurden diese beiden Substanzen erst nach Einstellung der Lösung auf einen pH von 7,4 durch Begasung mit Carbogen (bestehend aus 95 % O₂ und 5 % CO₂) zugeführt. Das Perfusat wurde mit Reinstchemikalien angesetzt, so dass es nach der Herstellung ultrafiltriert und frei von Mikropartikeln war. So konnte das Risiko einer Embolisierung gesenkt werden. Dies war gerade in dem kleinen Gefäßkaliber der Maus von großer Bedeutung.

Das Perfusat wurde im weiteren Verlauf mit Carbogen kontinuierlich begast [Abb.2.13 (14)]. Über einen externen Wärmekreislauf wurde die Temperatur des Perfusates konstant auf 37.0°C gehalten. Vor Versuchsbeginn wurde die Krebs-Henseleit-Lösung mindestens 30 Minuten lang auf 37°C erwärmt und mit Carbogen begast, um eine optimale Nährtemperatur und eine vollständige Sättigung mit Sauerstoff zu erreichen.

2.5.2.3. Ballonkatheter

Zur Messung des isovolumetrischen Drucks im linken Ventrikel wurde ein selbsthergestellter Polyvinylchlorid Ballon im linken Ventrikel des isolierten Herzens platziert (Abb. 2.20).

Bei der Herstellung des Ballons wurde ein elastisches, vorgedehntes Stück Folie aus Polyvinylchlorid auf einen etwa 10 cm langen Polyethylen Tubus (Innendurchmesser 0,4mm, Außendurchmesser 0,8 mm) gesetzt und mit einer 2/0 Seide ligiert.

Es wurden im Vorfeld Ballons verschiedener Größen hergestellt. Die Größe des jeweils eingesetzten Ballons wurde so gewählt, dass der Ballon optimal den linken Ventrikel des jeweiligen Herzens ausfüllte. Während des Versuches wurde der Ballon auf einen enddiastolischen Druck von 5 mmHg eingestellt, wodurch eine ebensolche Vorlast gewährleistet war. Der Polyethylen Tubus war mit einer 26G Kanüle verbunden. Über diese Kanüle war das System mit einem Spezialdruckmesser (Isotec) verbunden. Durch einen Drei-Wege- Hahn am Druckmesser konnte der Ballon über eine mit Reinst-Wasser (Millipore) befüllte 20ml Spritze aufgedehnt und die Vorlast somit reguliert werden.

2.5.2.4. Koronarvenöse O₂ Messung am isolierten Herzen

Während der Dauer der Experimente wurde der O₂-Verbrauch des Herzens erfasst. Dazu wurde das Perfusat aus den Pulmonal Arterien durch einen Polyethylen Tubus (Innendurchmesser 0,4 mm, Außendurchmesser 0,8 mm) aufgenommen (s. Abb. 2.20). Das Medium lief über selbigen durch eine Sauerstoffelektrode (Clark Meßelektrode). Über diese Messelektrode wurde der O₂ Gehalt des Mediums erfasst. Der Fluss des Perfusats vom isolierten Herzen zur Sauerstoffmesselektrode hin wurde durch eine Rollpumpe (Firma IsmaTec) mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 1,024 ml/h hergestellt, die unter allen Bedingungen weniger als 60% des Koronarflusses entsprach.

Vor jedem Versuch wurde die Sauerstoffelektrode kalibriert. Der Nullwert als unterer Grenzwert wurde durch eine sauerstofffreie Lösung (S4150 pO₂ Zero Solution, 5mg) eingestellt. Der obere Grenzwert wurde durch die mit Carbogen begaste, auf 37°C erwärmte Krebs-Henseleit-Lösung auf den jeweils korrigierten Partialdruck kalibriert.

Zur Einstellung der Grenzwerte wurde die Nulllösung bzw. die Krebs-Henseleit-Lösung durch den Tubus zur Sauerstoffelektrode hin gepumpt.

Die gemessenen Werte des venösen Sauerstoffpartialdruckes wurden über folgende Formel in den myokardialen Sauerstoffverbrauch (mVO_2) umgerechnet:

$$mVO_2 = (art\ pO_2 - ven\ pO_2) * (0,0227/760) * KorF / 22,4 * 1000$$

Dabei sind:

art pO_2 = arterieller Sauerstoffpartialdruck

ven pO_2 = venöser Sauerstoffpartialdruck

KorF = Koronarfluss

2.5.3. Versuchsdurchführung

2.5.3.1. Messwerte

Im Langendorff Modell können inotrope, chronotrope, bathmotrope, dromotrope und Koronar-muskulotrope Effekte erfasst werden. Zusätzlich kann man spezielle Metaboliten (z.B. den myokardialen O_2 -Verbrauch) bestimmen.

Im Einzelnen wurden folgende Parameter gemessen:

HF [Schläge/min]	Herzfrequenz
$P_{\max}$ [mmHg]	Maximaler in einem Herzschlag gefundener Druck
$P_{\min}$ [mmHg]	Minimaler in einem Herzschlag gefundener Druck
DP [mmHg]	Der maximale systolische Druck minus dem enddiastolischen Punkt
LVDP [mmHg]	Linksventrikulär entwickelter Druck
LVEDP [mmHg]	Linksventrikulär enddiastolischer Druck
$dP/dT_{\max}$ [mmHg/sec]	Maximale Rate des Druckanstiegs während der Kontraktion (positive slope)
$dP/dT_{\min}$ [mmHg/sec]	Maximale Rate der Druckabnahme während der Relaxation (negative slope)
SEP [msec]	Zeit zwischen Beginn und Ende des Ejektions Punktes
MSP [mmHg]	Mitteldruck während SEP
MDP [mmHg]	Mitteldruck während DFP
AOP [mmHg]	Aortendruck
RT [msec]	Dauer der isovolumetrischen Relaxation (zwischen dem End-Ejektion Punkt und Beginn des distolischen Punktes)
CI [s-1]	Der maximale dP/dT dividiert durch den Druck zu diesem Punkt
Tau [msec]	Relaxations-Zeit-Konstante
MaxF [ml/min]	Höchster Fluss innerhalb eines Herzschlags
MinF [ml/min]	Niedrigster Fluss innerhalb eines Herzschlags
MBF [ml/min]	Mittlerer Fluss über einem gültigen Herzschlag
KorF [ml/min/g]	Koronarfluss pro Minute und Gramm Herzgewicht
vPO ₂ [mmHg]	Venöser Sauerstoffpartialdruck
mVO ₂ [μmol/min/g]	Myokardialer O ₂ Verbrauch (berechneter Wert, s.o.)

2.5.3.2. Versuchsprotokoll

Die Langendorff Experimente dienten der Untersuchung der kardialen Funktion von septischen Mäusen im Vergleich zu Sham behandelten Mäusen. Zusätzlich wurde der Einfluss der Substanzen Adenosin und Bradykinin auf den koronaren Fluß und auf den O₂-Verbrauch analysiert.

Alle Experimente wurden 20 Stunden nach Sepsisinduktion durch Coecumpunktion bzw. Sham Behandlung durchgeführt.

Für alle Versuche existierte ein vorher festgesetztes Versuchsprotokoll nach dem alle Versuche gleichmäßig abliefen. In diesem Versuchsprotokoll, welches im Software Programm IOX geschrieben und mit Hilfe desselben abgearbeitet wurde, waren alle Ereignisse des Versuches zeitlich genau festgesetzten Speicherphasen zugeordnet. Allen Ereignissen wurde ein eindeutiger Ereignisname zugeteilt. Bei der Auswertung wurden die Daten der Ereignisse getrennt ausgewertet und innerhalb sowie zwischen den Gruppen verglichen.

In der initialen Experimentphase direkt nach der Kanülierung der Aorta wurde das isolierte Mäuseherz über die Kanüle an der Langendorff Anlage aufgehangen. Es wurde sofort mit Krebs-Henseleit-Lösung bei einem initialem aortalen Perfusionsdruck (AOP) von 60 mmHg perfundiert. Darauf wurde über den linken Vorhof der Ballonkatheter in den linken Ventrikel geschoben und dort blockiert. Der enddiastolische Druck im Ventrikel wurde über die Ballonfüllung auf 5 mmHg konstant eingestellt. Somit war die Vorlast des Herzens festgelegt.

Das isolierte Herz wurde über einen externen Schrittmacher (Abb 2.20) auf eine Frequenz von 600 Schläge/min rhythmisiert. Diese Herzfrequenz wurde über das ganze Experiment beibehalten. Zum Erreichen dieser Frequenz wurde die Reizschwelle bei einer konstanten Impulsdauer bestimmt. Die Stimulationsamplitude betrug das zweifache der Reizfrequenz. Die Reizschwelle lag in der Regel bei 0,5 Volt. Die Spitze des Schrittmachers wurde im Bereich des rechten Ventrikels am Kammermyokard platziert.

Zur venösen Messung des O₂-Verbrauches wurde schließlich noch ein dünner Polyethylen Katheter in der Pulmonalerterie platziert.

Hierauf durchliefen die Herzen eine Äquilibrierungsphase von 20 Minuten bei einem konstanten Aortendruck von 100 mmHg.

Unmittelbar zu Beginn der Äquilibrierungsphase wurden 1 Minute lang alle Messparameter unter dem Versuchsnamen „Initial“ gespeichert. Im Anschluss an die Äquilibrierungsphase wurde ein Ischämie-Reperfusions Versuch am isolierten Herzen durchgeführt. Bei diesem Versuch wurde die reaktive Hyperämie nach einer 20 Sekunden dauernden Ischämiezeit ermittelt. Nach diesen 20 Sekunden wurde das Herz wieder mit 100 mmHg Perfusionsdruck perfundiert. Bei der Ischämie handelte es sich um eine globale Ischämie durch vollständige Unterbindung des Perfusatflusses. Direkt vor Beginn der Ischämie wurden wiederum 1 Minute lang alle Parameter in der Phase „Baseline“ gespeichert. Bei der Reperfusion wurde der maximale Koronarfluss gemessen. Die Erfassung der Ischämie-Reperfusionsdaten erfolgte in der „Reperfusion“ Speicherphase über einen Zeitraum von 5 Minuten. Diese Reperfusionsphase von 5 Minuten diente dem Myokard als Erholungszeit nach der Ischämie. Am Ende der Reperfusionsphase war der koronare Fluss jeweils wieder normalisiert.

Nach dem Ischämie-Reperfusion Versuchsteil wurden die Auswirkungen der Substanzen Bradykinin und Adenosin am isolierten septischen bzw. Sham behandelten Herzen ermittelt. Vor jeder Applikation wurden 1 Minute lang alle Parameter in der „Baseline Bradykinin“ bzw. „Baseline Adenosin“ Phase gespeichert. Diese Baseline Phase diente der Erfassung aller Parameter direkt vor Applikation der Substanzen. Dadurch konnten die Werte dieser Phase als Ausgangswerte für die durch die Applikation eintretenden Änderungen herangezogen werden.

Nach der Baseline Periode wurden 5 Minuten lang die jeweiligen Substanzen appliziert. Die Medikamentendosis wurde dabei adaptiert an den koronaren Fluss über eine für die Applikation minimaler Volumina optimierte Präzisions Infusionspumpe (Precidor Infors AG) appliziert. Der Perfusionsdruck wurde konstant bei 100 mmHg gehalten. Es wurde das Plateau des jeweiligen Effektes für die Auswertung herangezogen. Die auftretenden pharmakologischen Effekte auf die Herzparameter wurden als „Bradykinin“ bzw. „Adenosin“ Phase gespeichert.

Zwischen den Applikationen wurde das gesamte Infusionssystem mit Krebs-Henseleit-Lösung gespült, um Vermischungen beider Substanzen und damit gegenseitige Beeinflussungen zu vermeiden. Das Herz wurde zwischen den beiden Applikationen über einen Zeitraum von 10 Minuten bei konstantem Perfusionsdruck von 100 mmHg mit Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert, so dass die Effekte des Bradykinin vor der Adenosin Applikation vollständig abgeklungen waren. Nach

Beendigung der Adenosin Applikation wurden die Versuche beendet. Der Ballonkatheter, der O₂ Messtubus und der Schrittmacher wurden entfernt und das Herz von der Kanüle abgenommen. Abschließend wurde noch das Feuchtgewicht des Herzens bestimmt.

Einen zusammenfassenden Überblick über den Versuchsablauf gibt Abb.2.20 sowie Tab. 2.2.

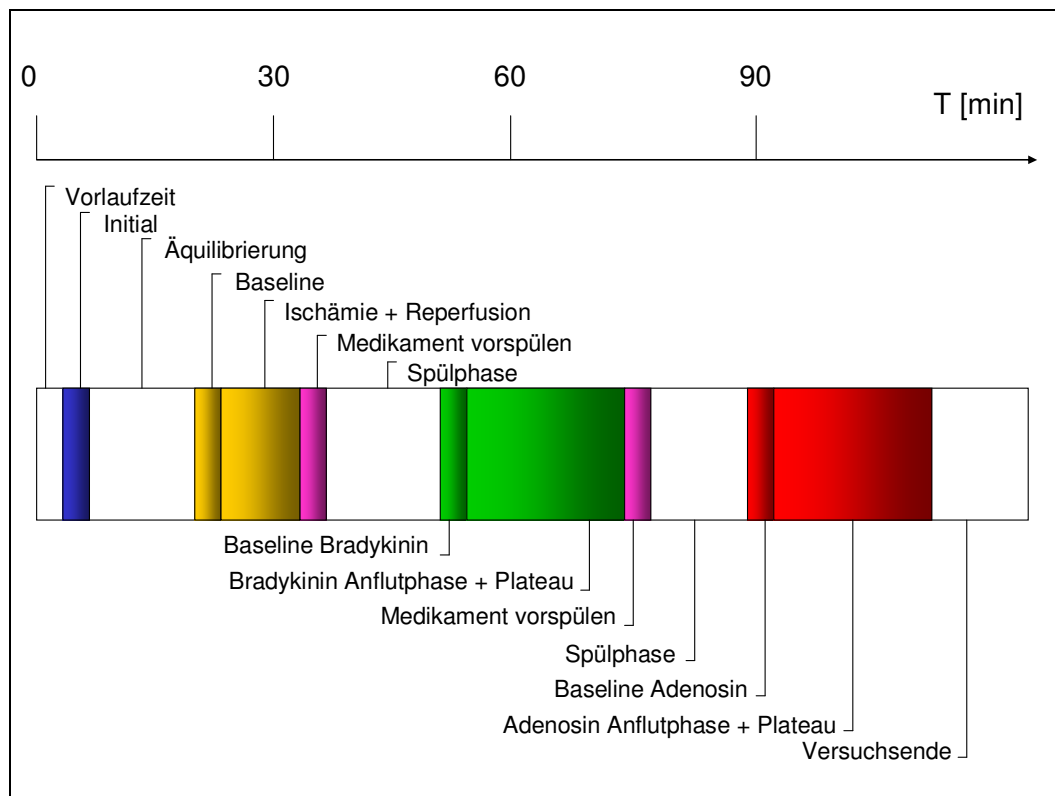


Abb. 2.22: Versuchsablauf der Langendorff Experimente.

Versuchsteil	Beschreibung
Versuchsbeginn	Anschluss des kanülierten Herzen an Langendorff Modell Perfusion im Überfluss, Perfusionsdruck 60 mmHg Einsetzen des Ballonkatheters, Anlage des O ₂ Messsystems, Stimulation mit 600 Schläge/min
Äquilibrierungsphase	Erhöhung des Perfusionsdruckes auf 100mm Hg Initial Speicherung aller Parameter für 1 Minute „Initial“ Äquilibrierung für mindestens 20 Minuten unter Konstant-Druck-Bedingungen
Ischämie-Reperfusion	Speicherung aller Parameter für 1 Minute unter "Baseline" Beginn der Speicherphase "Reperfusion" Ischämie des isolierten Herzens für 20 Sekunden Reperfusion, Messung des maximalen koronaren Flusses Erholungszeit des Myokards für 5 Minuten Ende der Speicherphase
Bradykinin / Adenosin Applikation	Speicherung aller Parameter für 1 Minute " Baseline Bradykinin" Bradykininapplikation für 5 Minuten, Beginn der Speicherphase Speicherung aller Parameter unter "Bradykinin" Adaption der Bradykinindosis an koronaren Fluss Plateau Ausbildung Ende der Bradykininapplikation nach 5 Minuten Spülen des Applikationssystems, Perfusion des isolierten Herzens für 10 Minuten mit Krebs-Henseleit-Lösung Speicherung aller Parameter für 1 Minute unter "Baseline Adenosin" Adenosinapplikation für 5 Minuten, Beginn der Speicherphase Speicherung aller Parameter unter "Adenosin" Adaption der Adenosindosis an koronaren Fluss Plateau Ausbildung Ende der Adenosinapplikation nach 5 Minuten Ende des Versuchs Bestimmung des Feuchtgewichtes des Herzens

Tab. 2.2: Versuchsablauf Langendorff Experimente

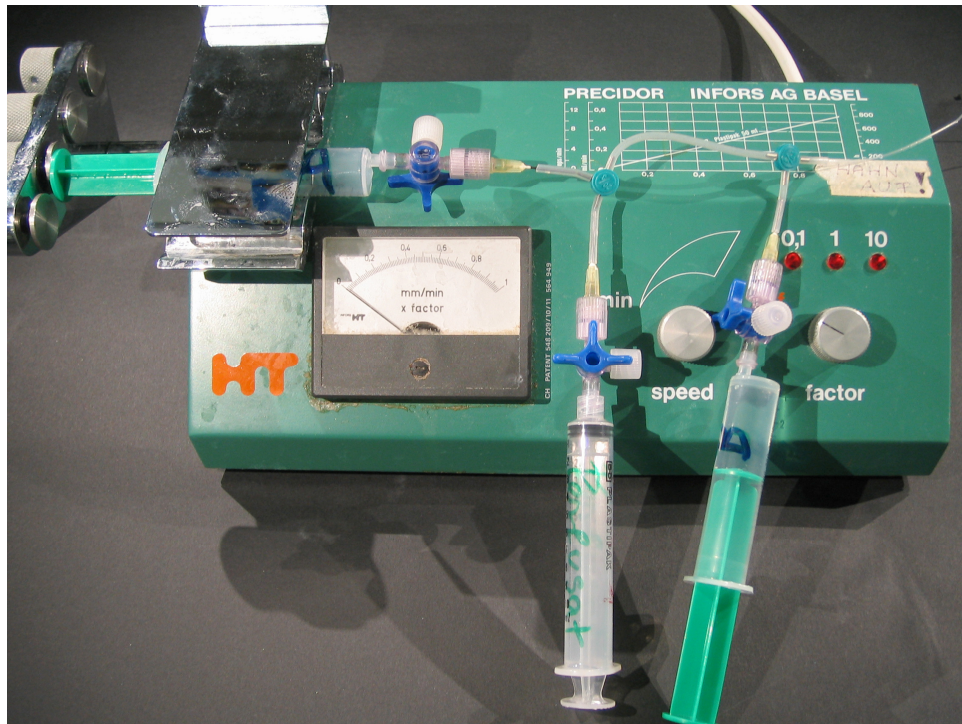


Abb. 2.23: Infusionspumpe mit Spritzen für die Applikation von Bradykinin, Adenosin und Perfusat zum Spülen des Systems

2.5.3.3. Pharmaka

2.5.3.3.1. Bradykinin

Bradykinin ist ein Nonapeptid und entsteht aus Kallidin. Bradykinin stimuliert als B₂- Kinin-Rezeptor-Agonist die endogene NO-Produktion über die Aktivierung der eNOS. Diese Produktion lässt sich durch Gabe von L-NAME inhibieren. NO diffundiert in die vaskulären Muskelzellen der Gefäße und bewirkt dort eine Vasorelaxation^{66,67}. Bradykinin wurde in einer Konzentration von 5 µmolar appliziert.

2.5.3.3.2. Adenosin

Adenosin ist ein Nukleosid aus der Purinbase Adenin und Ribose. Es ist im Gegensatz zu Bradykinin ein Endothelium unabhängiger Vasodilatator⁶⁸ und steigert den Koronarfluss bei Mäusen⁵⁷.

Bei der metabolischen Regulation der Koronardurchblutung besteht eine enge Verbindung zwischen Herzarbeit, Energiestoffwechsel und Adenosin. Die Grundzüge des Energiestoffwechsels des Herzens zeigen, dass bei adäquater Koronarperfusion die mitochondriale Bildungsrate von ATP in der oxidativen Phosphorylierung im wesentlichen der Hydrolyserate von ATP an den Myofibrillen entspricht. Bei einer Zunahme der Herzarbeit, d.h. bei vermehrtem ATP-Verbrauch, steigt nicht nur die Rate der oxidativen Phosphorylierung, sondern es kommt auch zu einer adaptiven Zunahme des Koronarflusses und damit des Sauerstoff- und Substratangebotes. Verantwortlich hierfür könnte Adenosin sein, das als Abbauprodukt aus den Adeninnukleotiden durch Dephosphorylierung von ADP zu AMP und Adenosin entsteht⁶⁹.

Die funktionelle Bedeutung von Adenosin scheint im wesentlichen eine pathophysiologische zu sein⁶⁹. Adenosin zeigt neben der koronardilatierenden Wirkung wichtige andere kardiale Wirkungen. Adenosin wirkt anti-adrenerg und schützt das Herz vor einer sympathischen Überstimulation, es hemmt die Erregungsbildung und –ausbreitung, schließlich hemmt es die Plättchenaggregation und ist für das Phänomen der myokardialen Präkonditionierung verantwortlich⁷⁰.

Adenosin A₁ Rezeptoren sind auf Kardiomyozyten und glatten Gefäßmuskelzellen lokalisiert und modulieren negativ inotrope, chronotrope und dromotrope Effekte. Adenosin A₂ Rezeptoren hingegen befinden sich auf endothelialen und vaskulären glatten Muskelzellen und beeinflussen die koronare Vasodilatation⁷¹. Adenosin A₃ Rezeptoren befinden sich ebenfalls auf Kardiomyozyten⁷². Adenosin wurde als 1 µmolar konzentriert verabreicht.

2.6. Datenerfassung

Alle Drucksignale der Blutdruck- und Langendorff Experimente wurden von jeweils Spezialdruckwandlern (Isotec der Firma Hugo Sachs Elektronik) kontinuierlich registriert. Dabei wurden die Signale eines jeden Druckwandlers von einem Verstärker aufgenommen, hierzu benutzten wir mehrere Transducer Amplifier Module „TAM A“. Es handelte sich dabei um universelle Messwertverstärker zur Messung von Kraft, Druck oder Weg.

Die Signale des koronaren Flusses wurden von einem Transit Time Flowmeter TTFM Typ 700 verstärkt. Dabei handelt es sich um einen einkanaligen Ultraschall Flussmesser. Der O₂-Verbrauch wurde von einer Messelektrode OP-PPM Typ 697 aufgenommen. Diese Elektrode misst den Sauerstoffpartialdruck unter Verwendung einer Clark Sauerstoffelektrode.

Die Module TAM A, TTFM Typ 700 und OP-PPM Typ 697 waren in einem Plugsys® Grundgehäuse (Hugo Sachs Elektronik) integriert, welches der Aufnahme der verschiedenen Funktionseinheiten des Plugsys Verstärkersystems diente, s.a. Abb. 2.22.

2.7. Datenverarbeitung

Die Messwerte wurden über die Verstärkermodule TAM A, TTFM Typ 700 und OP-PPM Typ 697 simultan an einen Personal Computer weitergeleitet und dort in Echtzeit weiterbearbeitet und gespeichert, s.a. Abb. 2.22.

Die Datenbearbeitung erfolgte mittels einer Spezialsoftware für in-vivo und in-vitro Experimente (IOX-Software Programm der Firma EMKA Technologies).

Dazu wurden die Rohdaten des Input Signals der Verstärker durch den A/D-Konverter von analog in digital gewandelt. Die zeitliche Auflösung der A/D-Konvertierung betrug bei unseren Experimenten 2000 Hz.

Spezielle Teilprogramme des Systems (sog. Analyzer) berechneten aus den Rohdaten spezifische Parameter. Diese Parameter sind von der ausgewählten Quelle (in diesem Fall den Druck- Fluss- und O₂ Signalen) abhängig.

In dem Softwareprogramm IOX wurde ein Versuchsprotokoll erstellt, nachdem jeder Versuch standardisiert ablief. Hierin wurde eine Sequenz von Befehlen festgelegt,

die bei jedem Versuch identisch wieder abgerufen wurde. Zusätzlich konnte in diesem Protokoll jedem Versuchsabschnitt ein definiertes Zeitintervall zugeteilt werden.

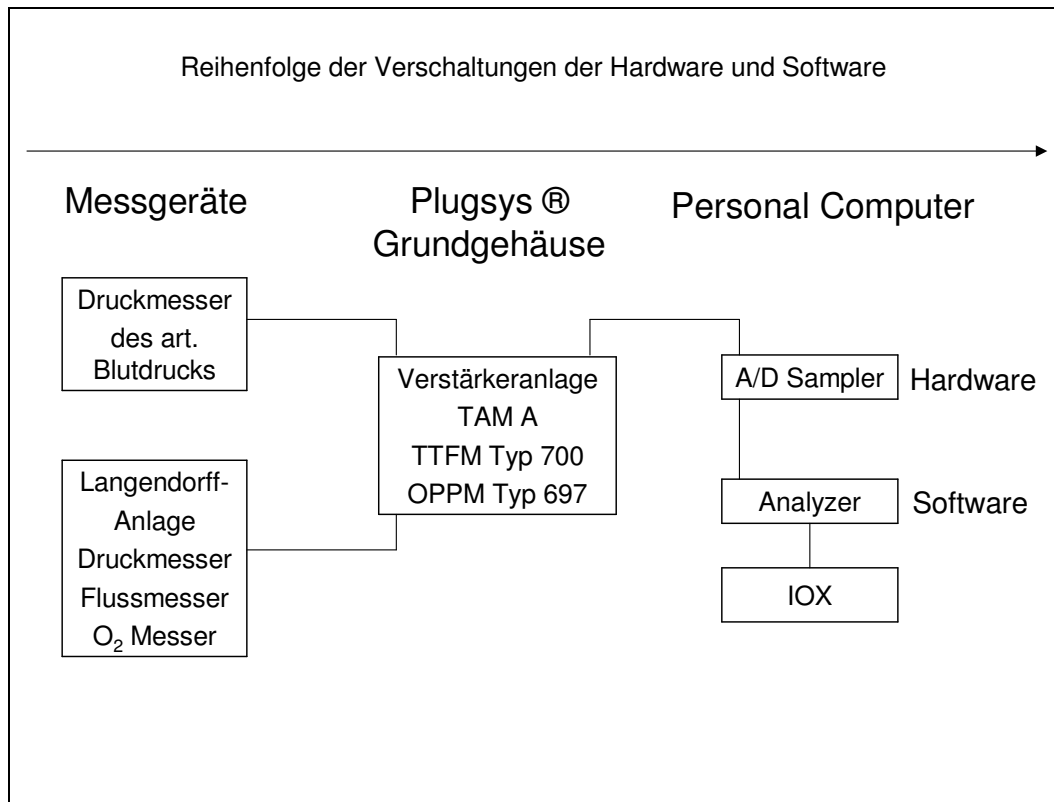


Abb. 2.24: Übersicht über die Verschaltung der Hardware- und Software Module in der Datenaufnahme. Aufnahme der Rohdaten der Blutdruckmessungen durch einen Druckmesser und im Langendorff Modell durch Druck-Fluß- und O₂ Messgeräte. Verstärkung über die Module TAM A, TTFM Typ 700, OPPM Typ 697 sowie endgültige Darstellung und Verarbeitung an einem Personal Computer.

2.8. Statistische Auswertung

Aus den Einzeldaten wurden die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen berechnet. Die Signifikanztestung innerhalb der Gruppen erfolgte mittels des Students T-Test. Für multiple Vergleiche wurde eine ANOVA Signifikanztestung mit nachfolgender Bonferroni Korrektur verwendet. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Überlebensdauer nach Sepsisinduktion

In einem initialen Versuchsansatz wurde die Überlebensrate nach standardisierter, reproduzierbarer Sepsisinduktion mit der Überlebensrate der Sham behandelten Tiere verglichen. In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe konnten wir in der Folge einer Sepsisinduktion zunächst einen hyperdynamen Kreislaufzustand gefolgt von einem hypodynamen Kreislaufzustand feststellen. Diese hämodynamischen Veränderungen finden sich parallel auch bei septischen Patienten wieder. Echokardiographische Untersuchungen belegten einen signifikanten Anstieg des Herz-Zeit-Volumens von wenigstens 20% bei allen septischen Mäusen 6 Stunden post-CLP.

Alle Mäuse zeigten nach CLP typische äußere Merkmale wie Konjunktivitis, Fehlen von selbstpflegenden Aktivitäten mit resultierendem gekräuseltem Fell, Fehlen von oraler Flüssigkeit- bzw. Nahrungsaufnahme sowie Lethargie.

Abbildung 3.1 gibt den prozentuellen Anteil der überlebenden Tiere im zeitlichen postoperativen Verlauf wieder. In der Gruppe der Mäuse, die einer Sepsisinduktion mittels CLP unterzogen wurden, überlebte kein Tier länger als 52 Stunden. 50 % der Tiere starben innerhalb der ersten 36 Stunden. Der erste Exitus letalis in dieser Gruppe trat nach 27 Stunden und 48 Minuten auf.

In der Gruppe der Sham behandelten Mäuse zeigte sich, dass auch nach 150 Stunden postoperativ noch 100 % der operierten Tiere überlebt hatten.

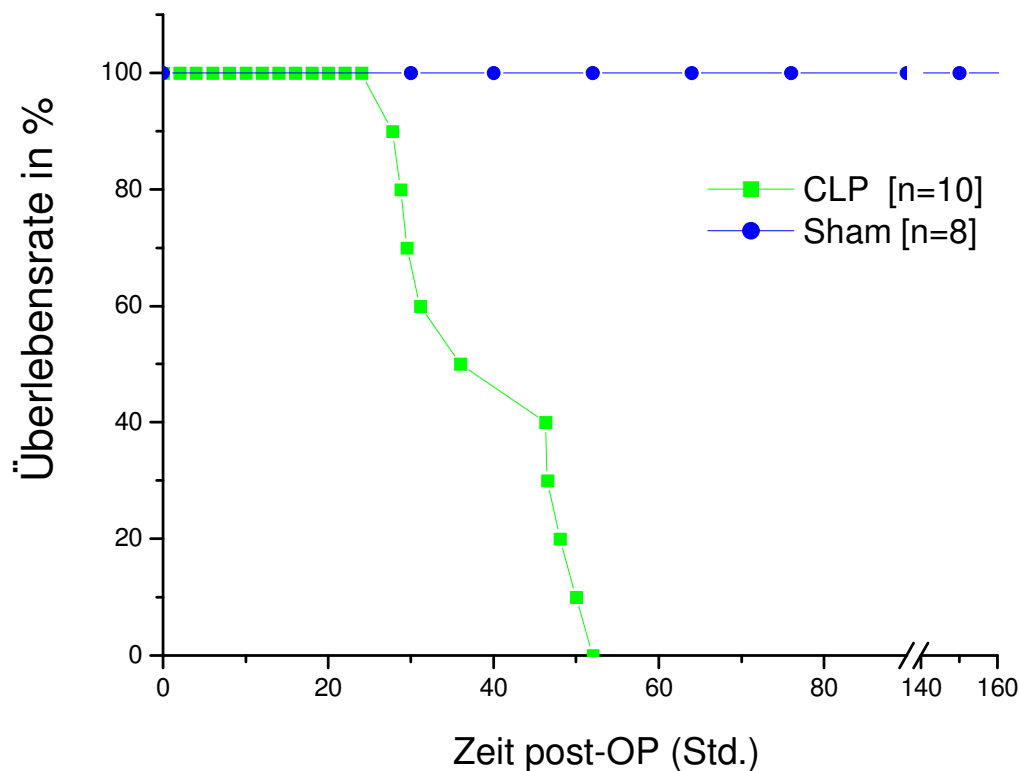


Abb. 3.1: Überlebensrate in Prozent der CLP und der Sham behandelten Tiere im postoperativen Verlauf.

3.2. Invasive arterielle Blutdruckmessung

3.2.1. Mittlerer arterieller Blutdruck

Da schwere inflammatorische Entzündungszustände und besonders septische Erkrankungen zu einer ausgeprägten Hypotension führen, führten wir arterielle Blutdruckmessungen (20 ± 2 Stunden post-CLP) durch Kanülierung der A.carotis communis an narkotisierten Mäusen durch. Zusätzlich untersuchten wir die Auswirkungen β -adrenerger, inotroper Stimulation durch Dobutamin auf den arteriellen Blutdruck (s. Abb. 3.2). Um festzustellen, ob Blutdruckveränderungen durch erhöhte Mengen von bioaktiven NO bedingt sind, wurden weitere Messungen nach Gabe des unspezifischen NO-Synthase Inhibitors ETU durchgeführt.

Der mittlere arterielle Blutdruck nach CLP ist während der Baseline Phase ($p<0,05$), nach Dobutamin Applikation ($p<0,005$) und nach ETU Applikation ($p<0,01$) signifikant niedriger als nach Sham Behandlung. Dabei lag der Mitteldruck in der Baseline Phase bei $78,2\pm 16,7$ mmHg bei den Sepsis Tieren und bei $98,0\pm 15,8$ mmHg bei den Sham Tieren, nach Dobutamin Applikation bei $79,4\pm 17,2$ mmHg in der Sepsis Gruppe und bei $112,6\pm 13,9$ mmHg in der Sham Gruppe und nach ETU Applikation bei $118,6\pm 16,9$ mmHg bei den Sepsis Tieren und bei $148,6\pm 14,1$ mmHg bei den Sham Tieren.

Bei den Sepsis Tieren zeigte sich nur nach Applikation von ETU ein signifikanter ($p<0,005$) Anstieg des arteriellen Mitteldruckes ausgehend von der Baseline. Bei den Sham Experimenten hingegen kam es sowohl nach Dobutamin Gabe ($p<0,05$) als auch nach ETU Applikation ($p<0,005$) zu signifikanten Anstiegen des arteriellen Mitteldruckes ausgehend von der Baseline.

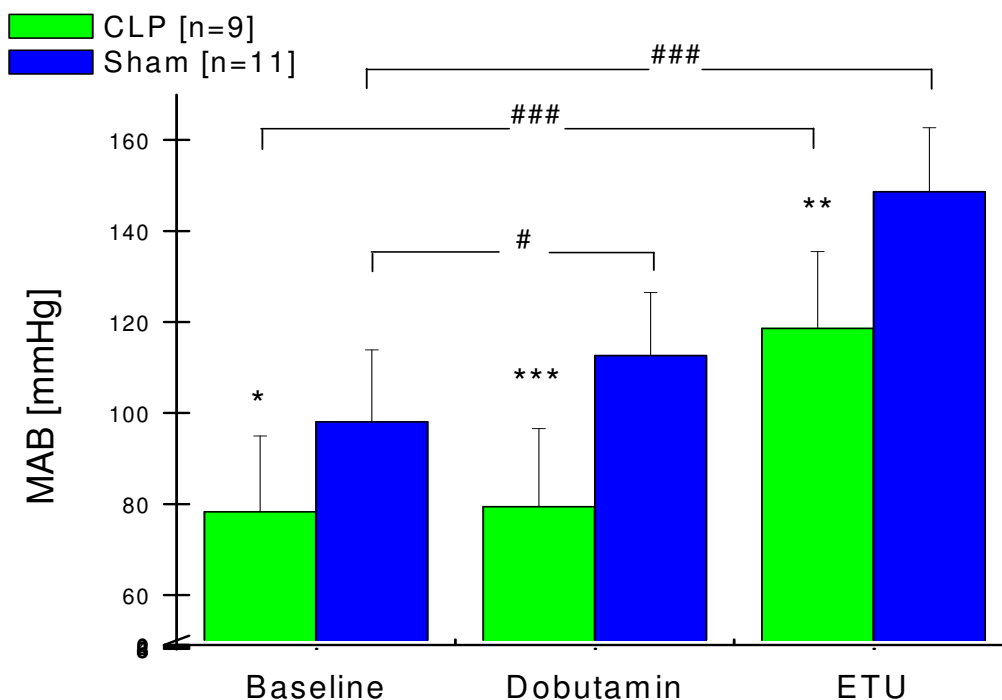


Abb. 3.2: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAB) im Vergleich der CLP und der Sham Tiere während der Baseline Phase, Dobutamin Phase und ETU Phase. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. * $p<0,05$ bei Sham vs. CLP, ** $p<0,01$ bei Sham vs. CLP, *** $p<0,005$ bei Sham vs. CLP. # $p<0,05$ bei Baseline vs. Substanz, ### $p<0,005$ bei Baseline vs. Substanz.

3.2.2. Cardiac Power

Analog zu den Ergebnissen der arteriellen Blutdruckmessung zeigte sich bei den septischen Tieren eine Katecholaminresistenz, da Dobutamin keine deutliche inotrope Reaktion zeigte. Jedoch kam es nach Gabe von ETU zu einem signifikanten prozentuellen Anstieg ($p < 0,005$) des Cardiac Power in der septischen Gruppe.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass der Anstieg der Werte der septischen Tiere ($32,0 \pm 17,3$ %) nach ETU nicht signifikant größer war als in der Vergleichsgruppe ($15,1 \pm 15,7$ %).

Die Sham operierten Tiere zeigten sowohl nach Dobutamin Applikation einen signifikanten ($p < 0,01$) Effekt durch β -adrenerge Stimulation als auch nach ETU Gabe einen signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg des Cardiac Power von der Baseline.

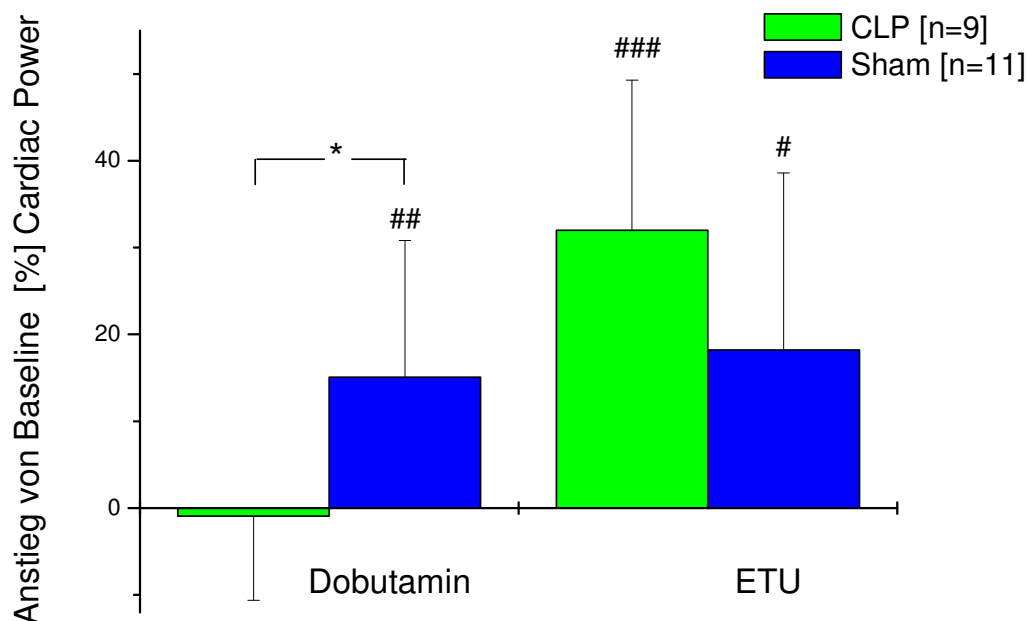


Abb. 3.3: Prozentueller Anstieg des Cardiac Power von der Baseline im Vergleich der CLP und der Sham Tiere während der Dobutamin Phase und ETU Phase in den Blutdruckexperimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. * $p < 0,05$ bei Sham vs. CLP, # $p < 0,05$ bei Baseline vs. Substanz, ## $p < 0,01$ bei Baseline vs. Substanz, ### $p < 0,005$ bei Baseline vs. Substanz.

3.2.3. Herzfrequenz

Die Auswertung der Baseline Werte der Herzfrequenz ergab eine signifikant ($p < 0.005$) niedrigere Baseline der septischen Tiere verglichen mit der Baseline der Sham Tiere. Dabei lag die Baseline der Sepsis Tiere bei $483,8 \pm 53,8$ Schlägen pro Minute während die Baseline der Sham Tiere einen Wert von $588,7 \pm 65,5$ Schlägen pro Minute zeigte.

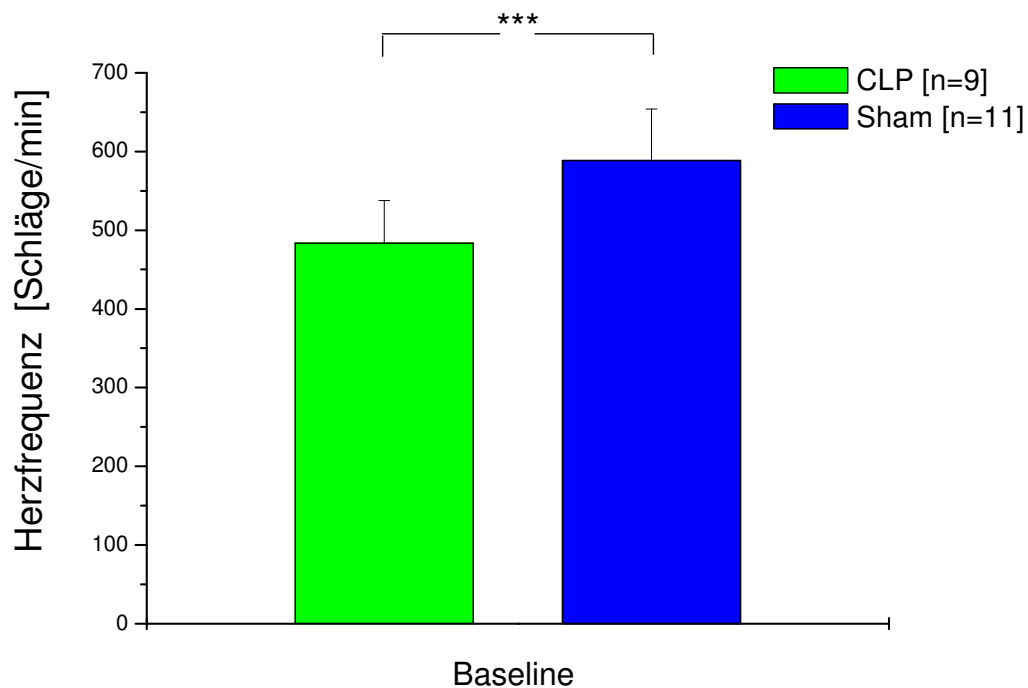


Abb. 3.4: Herzfrequenz in Schläge pro Minute während der Baseline Phase. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. *** $p < 0.005$ bei Sham vs. CLP

3.3. Häodynamische Eigenschaften des isolierten Herzens im Langendorff Modell

Um mögliche Veränderungen der linksventrikulären Kontraktilität im septischen Prozeß zu ermitteln, führten wir Messungen des LVDP, $dP/dT_{\max}$ und des Cardiac Powers am isolierten, schlagenden Herzen im Langendorff Modell durch.

3.3.1. LVDP

Bei den LVDP Werten zeigte sich erstens, dass die septischen Tiere die präparationsbedingte Ischämie signifikant ($p < 0,005$) schlechter tolerierten als die Vergleichstiere. Dies drückte sich in einem deutlich erniedrigtem LVDP von $50,08 \pm 10,28$ mmHg im Vergleich zu $130,01 \pm 16,14$ mmHg der Sham Tiere aus. Im zeitlichen Verlauf wurde jedoch ein Erholungspotential der linksventrikulären Kontraktilität ($81,55 \pm 12,2$ mmHg während der Baseline ($p < 0,005$) bei den septischen Tieren deutlich.

Zweitens erkennt man, dass der LVDP sowohl in der Initial als auch in der Baseline Phase nach Sepsisinduktion signifikant ($p < 0,005$) niedriger lag als in der Sham Gruppe. Dabei resultierten die LVDP Werte der Sham Tiere in der Baseline Phase bei $119,89 \pm 7,75$ mmHg.

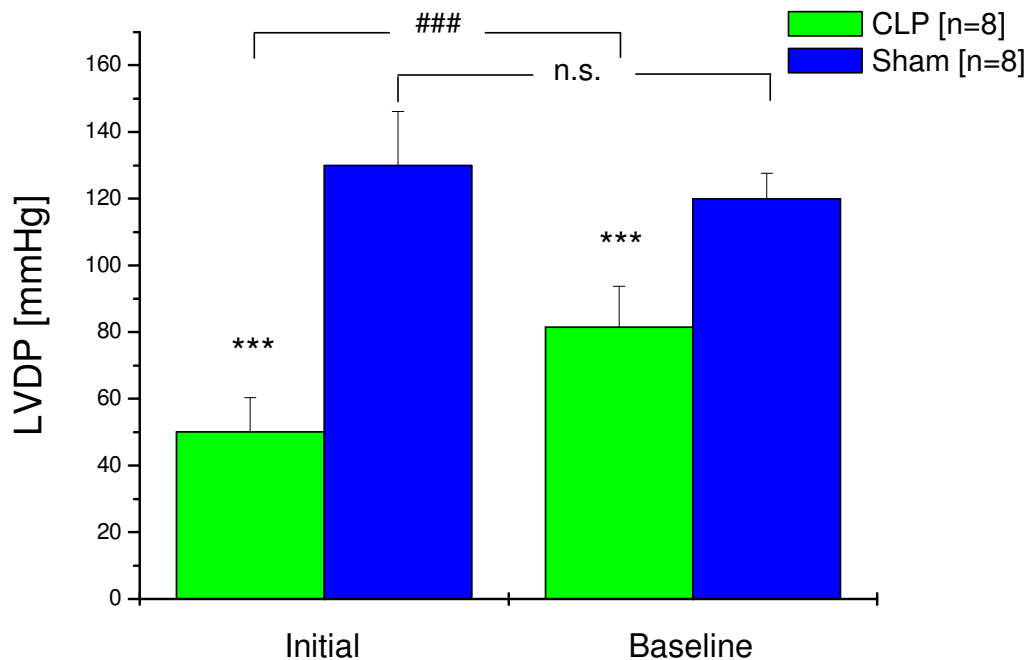


Abb. 3.5: LVDP in mmHg im Vergleich der Sham und CLP Tiere während der Initial und Baseline Phase in den Langendorff Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

*** p < 0,005 bei Sham vs. CLP, ### p < 0,005 bei Initial vs. Baseline, n.s.= nicht signifikant.

3.3.2. dP / dT

In Analogie zu den Ergebnissen des LVDP wird deutlich, dass die $dP/dT_{\max}$ Werte der CLP Versuche sowohl in der Initial Phase als auch in der Baseline Phase signifikant ($p < 0,005$) niedriger lagen als die der Sham Versuchsgruppe (s.Abb 3.6).

Auch hier zeigt sich wiederum ein signifikanter Anstieg des $dP/dT_{\max}$ der CLP Tiere von $2213,4 \pm 323,2$ mmHg/Sekunde in der Initial Phase auf $3549,55 \pm 287,12$ mmHg/Sekunde im Baseline Versuchsteil. Die Sham Werte lagen dabei bei $6081,68 \pm 1069,97$ mmHg/Sekunde in der Initial Phase und bei $(5263,16 \pm 521,27$ mmHg/Sekunde) während der Baseline Phase.

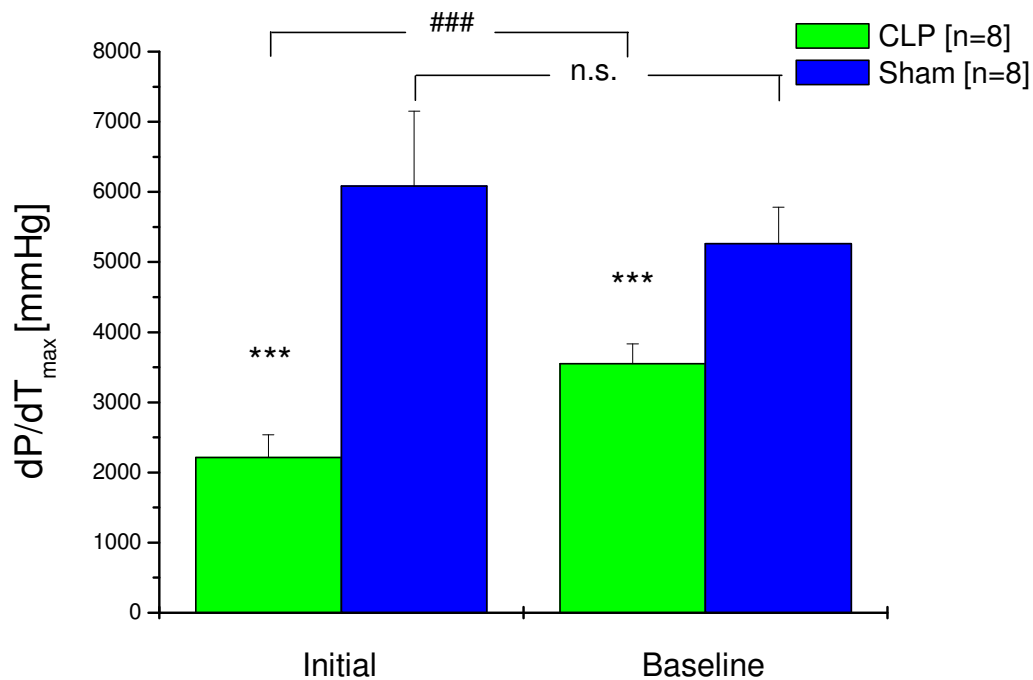


Abb. 3.6: $dP/dT_{\max}$ in mmHg im Vergleich der CLP und Sham Tiere während der Initial und Baseline Phase in den Langendorff Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

*** $p < 0,005$ bei Sham vs. CLP, ### $p < 0,005$ bei Initial vs. Baseline, n.s.= nicht signifikant.

3.3.3. Cardiac Power

Abb. 3.7 veranschaulicht ebenfalls eine signifikant ($p < 0,005$) herabgesetzte linksventrikuläre Kontraktilität in der Initial und in der Baseline Phase bei den CLP Tieren im Vergleich mit den Sham Versuchstieren. Es zeigte sich wiederum, dass der niedrigste Wert des Cardiac Power bei den CLP Tieren in der Initial Phase ($30045,20 \pm 6168,42$ mmHg/min) gemessen wurde, sich jedoch in dem Baseline Versuchsteil signifikant ($p < 0,005$) auf $48894,98 \pm 7286,91$ mmHg/min verbesserte. Sham Werte hier bei $77973,59 \pm 9722,17$ mmHg/min (Initial) und $72005,73 \pm 4629,54$ mmHg/min (Baseline).

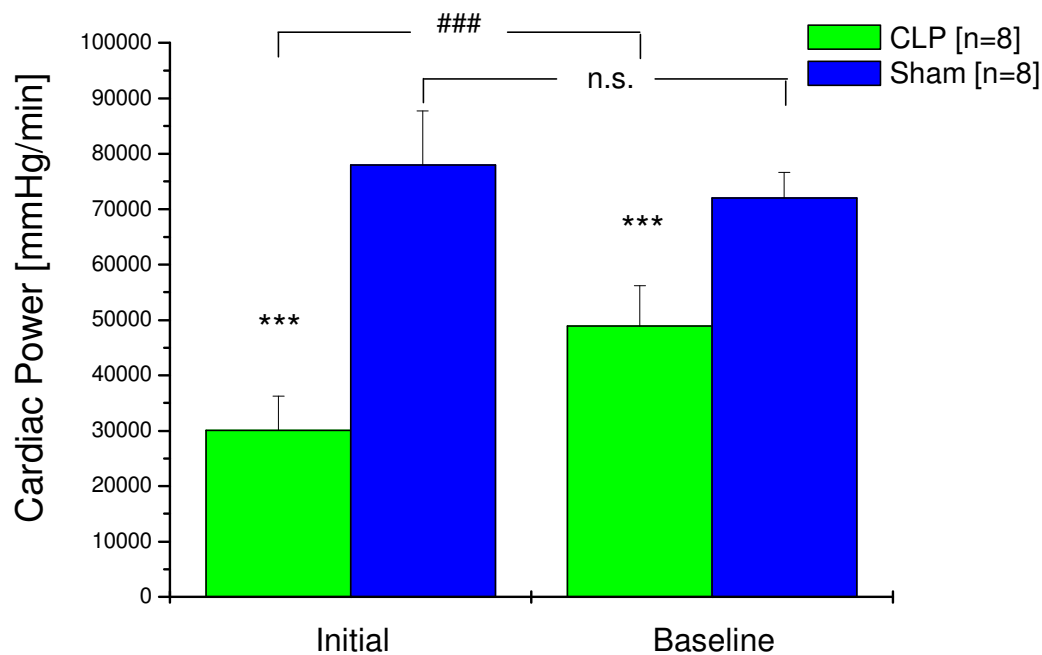


Abb. 3.7: Cardiac Power in mmHg/min im Vergleich der CLP und der Sham Tiere während der Initial und Baseline Phase in den Langendorff Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. *** $p < 0,005$ bei Sham vs. CLP, ### $p < 0,005$ bei Initial vs. Baseline, n.s.= nicht signifikant.

3.3.4. Koronarfluss

Desweiteren wurden die Auswirkungen der Vasodilatoren Bradykinin und Adenosin auf den koronaren Fluß im Langendorff Modell während einer Sepsis untersucht.

Der NO abhängige Vasodilatator Bradykinin induzierte bei den septischen Tieren einen deutlich stärkeren Anstieg ($p < 0,05$) des koronaren Flusses als bei den Sham Tieren. Dabei stieg der koronare Fluß um $33,5 \pm 17,7$ % nach CLP und um $11,4 \pm 5,0$ % nach Sham-Behandlung (s. Abb 3.8).

Im Vergleich der beiden Vasodilatoren erzielte in beiden Gruppen der NO-unabhängige Vasodilatator Adenosin den prozentuell stärksten Anstieg des koronaren Flusses von der Baseline. Dabei kam es im Gegensatz zur Bradykiningabe zu einem signifikant ($p < 0,05$) stärkeren Anstieg des Koronarflusses bei den nicht septischen Tieren. Anstieg dabei von $83,1 \pm 39,8$ % nach Sham-Behandlung und $44,3 \pm 17,7$ % bei den septischen Tieren.

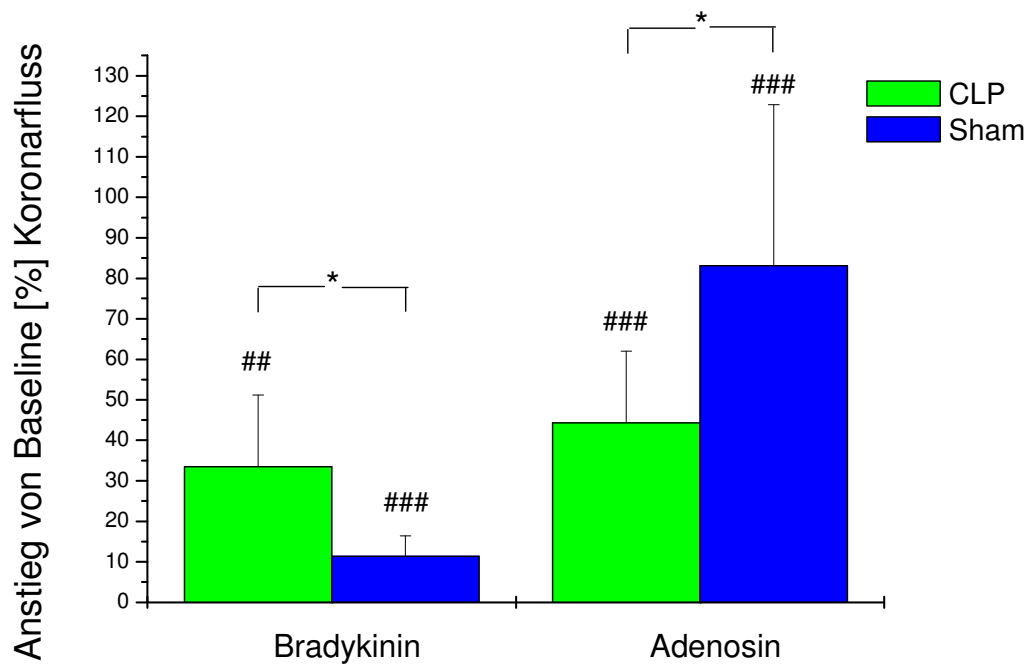


Abb. 3.8: Prozentueller Anstieg des Koronarflusses im Vergleich der CLP und der Sham Tiere während der Bradykinin und Adenosin Phase in den Langendorff Experimenten. Baseline dabei bei 0%. Dabei folgende Mäusezahlen: CLP Bradykinin n=5, CLP Adenosin n=8, Sham Bradykinin und Adenosin n=7. Die Fehlerbalken zeigen die $\pm$ Standardabweichungen. * $p < 0,05$ bei Sham vs. CLP, ## $p < 0,01$ bei Baseline vs. Substanz, ### $p < 0,005$ bei Baseline vs. Substanz.

3.3.5. mVO_2

Zur weiteren Qualifizierung der Organ-Dysfunktion wurde im Hinblick auf Störungen der zellulären Sauerstoffverwertung während einer Sepsis der myokardiale Sauerstoffverbrauch mVO_2 gemessen. Aus der Abb. 3.9 wird deutlich, dass bei den septischen Tieren der Sauerstoffverbrauch vermindert war ($18,29 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g} \pm 3,34 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ nach CLP und $22,85 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g} \pm 3,76 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ nach Sham Behandlung).

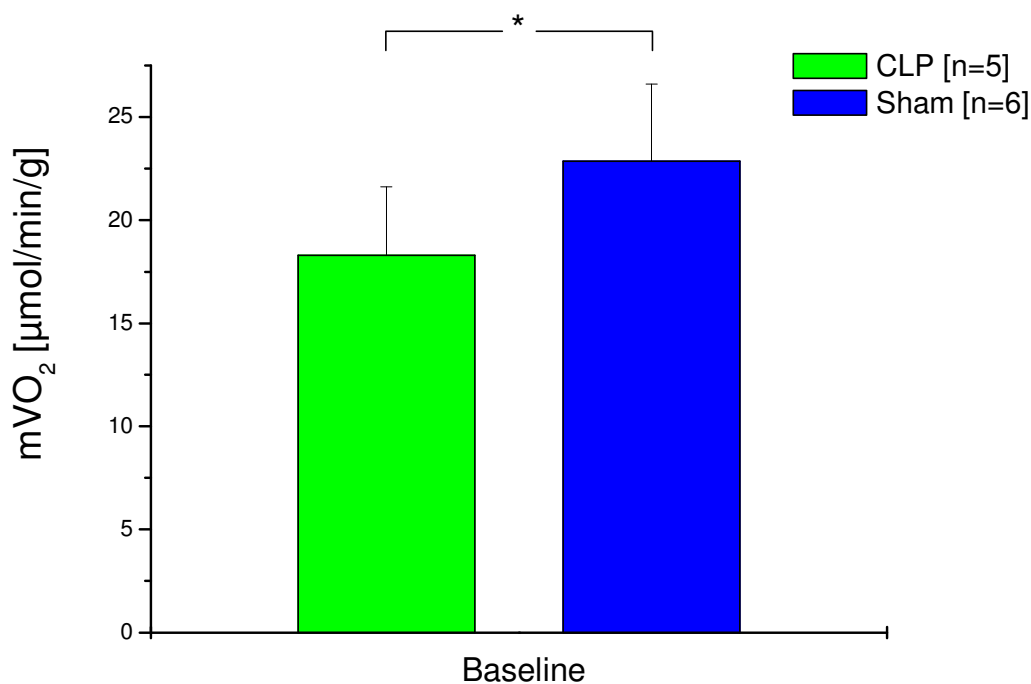


Abb. 3.9: Basaler Sauerstoffverbrauch mVO_2 in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ im Vergleich der CLP und Sham Tiere während der Baseline Phase in den Langendorff Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. * $p < 0,05$ bei Sham vs. CLP.

4. Diskussion

4.1. Mortalität nach Sepsisinduktion

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals bei dem Mausstamm C57 Black 6 grundlegende Daten zu Überlebensraten und hämodynamischen Veränderungen nach standardisierter, reproduzierbarer Sepsisinduktion durch CLP im Vergleich zu Sham behandelten Tieren erhoben.

Zur Induktion der Sepsis wurde hier das CLP Modell eingesetzt, da es ein klinisch relevantes und valides Modell zur Induktion einer bakteriellen Sepsis darstellt, welches der Pathophysiologie der menschlichen Sepsis weitgehend ähnelt ⁵⁴. Es spiegelt eine akute bakterielle Peritonitis wieder, wie sie postoperativ, posttraumatisch oder nach Keimdurchwanderung des Darmes auftritt.

Die vorliegenden Daten der Überlebenszeiten nach Sepsisinduktion und nach Sham Behandlung zeigen, dass in der Gruppe der Sham Tiere nach 150 Stunden postoperativ kein Tier verstorben war, während in der CLP Gruppe nach 52 Stunden postoperativ alle Mäuse verstorben waren. Hieraus ergibt sich, dass

- a.) der Sham Eingriff zwar einen operativen Stressfaktor für die Versuchstiere darstellt, jedoch die reine Exposition des Coecum ohne Punktion kein Sepsis-induzierendes Ereignis darstellt und
- b.) dahingegen die Punktion des Coecums mit der daraus folgenden Kontamination des Peritoneums eine schwere abdominelle Sepsis induziert, welche eine Letalität von 100% verursachte.

Sämtliche Tiere überlebten die initialen postoperativen 24 Stunden. Dies macht deutlich, dass der septische Prozess ein sich über Stunden entwickelnder Prozess ist. Tierexperimentell ist demonstriert worden, dass die pro-inflammatorischen Zytokine TNF-alpha und IL-6 nach Coecumpunktion mit einer 21G Nadel ihren ersten Anstieg im Serum zwischen 4-8 Stunden postoperativ zeigen und der Peak jeweils nach 24 Stunden postoperativ erreicht wird ⁷³.

Die Überlebenszeiten der septischen Tiere lagen in der vorliegenden Arbeit zwischen 27 Stunden post-OP und 52 Stunden post-OP. Die Varianz der Überlebenszeiten in der CLP-Versuchsgruppe kann multifaktorielle Ursachen haben. So mag die schwere

der Sepsis z.B. von dem Verhältnis von pro-inflammatorischen zu anti-inflammatorischen Zytokinen oder der gebildeten Menge von NO abhängen, welche die Induktion eines Multiorganversagens mitbestimmen.

Es ist bereits gezeigt worden, dass die Schwere der Sepsis im CLP-Modell u.a. auch von der Größe der Punktionskanüle des Coecum abhängt. Punktionskanülen mit einem großen Durchmesser (18G Kanülen) führen dabei zu kürzeren Überlebenszeiten, höheren Anstiegen an peritonealem TNF und höheren Anstiegen an IL-6 und IL-1 β im Plasma verglichen mit den Ergebnissen bei kleineren Punktionskanülen (21G bzw. 25G) oder bei Sham Kontrollgruppen ⁷⁴.

Die Relation vom Durchmesser der Punktionskanüle und der Mortalität wird auch von Walley et al. betrachtet. Dabei zeigt sich, dass ein abnehmender Durchmesser der Kanülen eine Abnahme der Mortalität und Expression der Zytokine TNF-alpha und IL-6 bewirkt, jedoch die Konzentrationen des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 zunimmt. Es wird gefolgert, dass es bei einer schweren Sepsis zu einer überproportional großen Zytokinzunahme kommt, welche nicht eingedämmt werden kann und schließlich zum Tod führt. Bei einer weniger starken Sepsis wird die pro-inflammatorische Antwort durch eine relativ größere IL-10 Produktion vermindert und verzögert, was zu einer verbesserten Überlebensrate führt ⁷³.

In unseren Experimenten erfolgte eine standardisierte Punktion mit einer 20G Kanüle (s. Kap. 2.2). Ursächlich für die Varianz der Überlebenszeiten kann u.a. sein, dass dem Zufall unterliegende quantitative und qualitative Unterschiede der Keimbesiedlung im Coecum nicht zu vermeiden sind. Desweiteren sind andere Faktoren wie z.B. der Status der körpereigenen Immunantwort sowie das Vorliegen inapparenter Begleiterkrankungen nicht vollständig kontrollierbar.

Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung des Sepsisschweregrads liegt im Umfang der (supportiven) Therapie. So werden von einigen Arbeitsgruppen Antibiotika verabreicht ^{74,75}, um eine kontrollierte Entzündungsreaktion zu erreichen, die je nach Zeitpunkt und Dosis der Gabe auch überlebt werden kann. Wie bei von einer Sepsis betroffenen Patienten stellt auch beim CLP Modell die Volumenapplikation eine entscheidende therapeutische Maßnahme dar. Auch hier variiert die Praxis im internationalen Vergleich der Arbeitsgruppen erheblich. So führen Steinhauser et al.

im CLP-Modell einen Single-Shot von 1 ml NaCl s.c. direkt post-OP durch ⁷⁶, während in anderen Modellen ein Flüssigkeitsersatz mit NaCl kombiniert mit einem Antibiotikum in regelmäßigen Abständen gegeben wird ^{74,75}. Bei letzteren wird direkt post-OP, nach 2 Stunden und nachfolgend alle 12 Stunden ⁷⁴ bzw. direkt post-OP und nachfolgend alle 6 Stunden ⁷⁵ ein Flüssigkeitsersatz appliziert.

In unseren Versuchen wurde den Mäusen direkt post-OP und jeweils im 6h Intervall Flüssigkeit (0,9 ml/kg Körpergewicht NaCl) subcutan verabreicht. Zur Analgesie wurde zusätzlich alle 12h eine Mischung aus Tramal und Glucose (Glucose 40%) in der Dosierung 20mg/kg Körpergewicht per os gegeben. Diese regelmäßige Volumensubstitution stützt sich auf Studien, in denen nachgewiesen werden konnte, dass diese regelmäßige Gabe im Vergleich zu keiner Gabe post-OP von Flüssigkeit bzw. Analgetika zu verbesserten Überlebenszeiten führt ⁷⁵.

Wir konnten zeigen, dass es nach Sepsisinduktion durch CLP zu charakteristischen Merkmalen einer Sepsis kommt, wie sie auch bei septischen Patienten beobachtet werden. Dazu gehört u.a. eine Bakteriämie, die in anderen experimentellen Untersuchungen nach sechs Stunden auftritt ⁷⁵.

Desweiteren treten hämodynamische Veränderungen auf. Dabei kommt es zu einer hyperdynamen Phase gefolgt von einem hypodynamen physiologischen Zustand ⁴⁵. Erstere manifestiert sich durch einen erniedrigten peripheren Widerstand bei gleichzeitig erhöhtem Herz-Zeit-Volumen. Letztere ist durch einen niedrigen peripheren Widerstand bei gleichzeitig verminderten Herz-Zeit-Volumen gekennzeichnet. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das beeinträchtigte Herz-Zeit-Volumen Folge einer reduzierten Kontraktilität der septischen Herzen ist. Diese akute septische Kardiomyopathie ist refraktär gegenüber einer Stimulation durch Katecholamine. All diese Phänomene laufen parallel zur menschlichen Pathophysiologie und stellen in der Humanmedizin eine große Herausforderung bei der Behandlung septischer Patienten dar ¹⁵.

Eine weitere, häufig angewandte Methode zur Sepsisinduktion im Mausmodell ist die intraperitoneale Injektion von Lipopolysacchariden (LPS). Dabei handelt es sich um ein Endotoxin von Escherichia Coli. Injektion von LPS bewirkt pro-inflammatorische Effekte und führt zu einem selektiven Zytokinanstieg von Tumornekrosefaktor-alpha

(TNF- α) und Interleukin-1-beta (IL-1 β). Diese Zytokine bewirken eine Induktion der iNOS mit signifikanten Anstiegen von NO im Plasma. Große Mengen an NO sowie Peroxynitrit sind verantwortlich für die Ausbildung eines endotoxischen Schocks mit hypodynamer Kreislaufdekompensation ⁷⁷. Nach LPS Gabe zeigt sich ein sehr rascher Anstieg von TNF- α mit einem Peak nach 1 Stunde, bei IL-1 β kommt es nach 2-4 Stunden zur Ausbildung der höchsten myokardialen Protein Produktion. Diese zeitlichen Varianzen verursachen erhöhte NO-Level zwischen 4-12 Stunden nach LPS und sind mitverantwortlich für Unterschiede der Überlebenszeiten nach Injektion von Endotoxinen ⁷⁸⁻⁸⁰.

Für die Induktion der iNOS ist die Aktivierung des Toll-like Rezeptor-4 und des Nuclear Transcription Factor NF- κ B erforderlich. Diese Aktivierung des NF- κ B in Endothelzellen und in Zellen myeloiden Ursprungs resultiert wiederum in der Aktivierung verschiedener Gene, die in Zusammenhang mit dem Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) stehen und zu einer Organdysfunktion führen ⁸¹.

Im Vergleich des LPS und CLP-Modells zeigen sich ähnliche Daten hinsichtlich Mortalitätsrate, Lethargie, motorische Aktivität und peripheren Blutbildveränderungen. Es zeigen sich jedoch kinetische Unterschiede der beiden Methoden.

Im LPS-Modell steigen die Zytokine TNF- α und IL-6 und die Chemokine KC und MIP-2 im Plasma deutlich stärker innerhalb der ersten vier Stunden an als nach CLP ⁵². Eine Applikation von Endotoxinen führt also zu einer übermäßig gesteigerten Zytokinfreisetzung, welche nicht die wichtigen klinischen Eigenschaften einer Sepsis in vollem Umfang widerspiegelt ⁸².

So besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen einem CLP und LPS Sepsismodell darin, dass sich nach LPS Gabe nur eine hypodynamische Phase ausbildet. Experimentell kann gezeigt werden, dass sich durch die Induktion der iNOS und den daraus resultierenden erhöhten NO Mengen schon innerhalb der ersten 2 Stunden nach LPS Injektion eine deutliche Hypotension ausbildet. Dabei geht der Hypotension keine hyperdynamische Kreislaufphase (d. h. erhöhtes Herz-Zeit-Volumen bei regelrechten Blutdrücken) voraus ⁷⁷.

Desweiteren wird bei der LPS-Methode nur eine standardisierte Menge eines bestimmten Endotoxins zu einem definierten Zeitpunkt injiziert. Dahingegen ist das CLP Modell ein polymikrobielles Modell mit qualitativen und quantitativen Unterschieden der Keimbesiedlung. Die Bakterieninvasion erfolgt also über einen längeren Zeitraum als die LPS Gabe.

In einem CLP Modell wie auch bei septischen Patienten kann man LPS als eine von einer Vielzahl von Mediatoren betrachten, die sekundär nach einer schweren Infektion freigesetzt werden. Darüber hinaus zeigen sich, ausgenommen bei einer Meningokokkämie ⁸³, niedrige oder nicht messbare LPS-Spiegel bei septischen Patienten ⁸⁴. Bei einer gram-positiven Sepsis, die ca. 50% der menschlichen Sepsis Fälle ausmacht ⁸⁵, kommt es sogar zu keiner LPS Freisetzung. Aus diesen Punkten ergibt sich eine verminderte Relevanz der LPS Methode für das Verständnis und für therapeutische Ansätze der menschlichen Sepsis.

4.2. Auswirkungen der Sepsis auf den arteriellen Blutdruck

In den vorliegenden Versuchen lagen sowohl der Ausgangswert des arteriellen Blutdrucks der septischen Tiere als auch die Werte nach Applikation von Dobutamin und ETU signifikant niedriger als bei den Sham behandelten Tieren.

Diese arterielle Hypotension der septischen Mäuse war teilreversibel nach globaler NOS-Blockade durch ETU.

Daraus folgt, dass der erniedrigte periphere Widerstand durch NO sowie weitere vasodilatatorisch wirkenden Mediatoren bedingt ist. Zu letzteren gehören z.B. anaerobe Metaboliten wie Laktatsäure. Diese wird regelmäßig bei septischen Patienten festgestellt und führt zu pathologisch niedrigen pH-Werten, welche mit Vasodilatation und Katecholaminresistenz einhergehen ¹⁵.

Weitere Daten belegen, dass sechs Stunden nach Endotoxin Schock durch E.Coli im Mausmodell der mittlere arterielle Blutdruck abzusinken beginnt ⁸⁶. Verbunden mit dem Blutdruckabfall zeigt sich ein Anstieg der Nitrat- und Nitritkonzentrationen im Plasma. 12 Stunden nach Endotoxinschock tritt der Tiefpunkt der Blutdruckkurve auf, während sich zum selben Zeitpunkt die Nitrat- und Nitritkonzentration auf dem Höhepunkt befindet ⁸⁶.

Die kardiale Dysfunktion und die hypodyname Kreislauffunktion stellen in den vorliegenden Experimenten schwere Manifestationen einer Sepsis dar und erklären die kurze Überlebenszeit der septischen Versuchstiere. In unseren Versuchen lag im Rahmen der Sepsis die Herzfrequenz während der Blutdruckmessung signifikant unter den Werten der Sham behandelten Tiere. Dies deutet auf eine regulatorische Dysfunktion hin, da im Rahmen des vorliegenden Schocks mit Hypotension mit einer erhöhten Herzfrequenz zu rechnen wäre. Wie bereits in anderen Studien beschrieben, führt der septische Schock zu einem deutlich herabgesetzten Herz-Zeit-Volumen, wobei das verminderte Schlagvolumen nicht über eine Steigerung der Herzfrequenz kompensiert werden kann ^{45,87}.

4.2.1. Sepsis bedingte Katecholaminresistenz

Wir demonstrierten in unserem Modell eine Katecholaminresistenz der septischen Tiere. Dobutaminapplikation bewirkte keinen signifikanten Blutdruckanstieg oder Anstieg des Cardiac Power. Im Vergleich dazu zeigte sich bei den Sham behandelten Mäusen eine deutliche Katecholaminsensitivität, was zu signifikanten Blutdruckanstiegen und Cardiac Power Zunahmen führte.

Diese Katecholaminresistenz der septischen Tiere mit einer verminderten Ansprechbarkeit der Adrenorezeptoren auf endogene und exogene Katecholamine trägt zu einer Abnahme des peripheren Widerstandes im vasodilatatorischen Schock bei ¹⁵. Der vasodilatatorische Schock ist gekennzeichnet durch einen erniedrigten Blutdruck als Folge eines erniedrigten peripheren Gefäßwiderstandes. Zusätzlich ist die Gewebeoxygenation unzureichend trotz eines in der Regel normalen oder gesteigerten Herzzeitvolumens ⁸⁶.

Patientenstudien zeigen, dass bei Entwicklung einer Katecholaminresistenz im Verlauf des vasodilatatorischen Schocks die Letalität auf über 70% ansteigt ⁸⁸. Ursache der Abnahme des peripheren Widerstandes im vasodilatatorischen Schock sind wahrscheinlich eine „down-regulation“ der Adrenorezeptoren an den Zellmembranen glatter Muskelzellen sowie eine Unterbrechung der Signaltransduktion auf Postrezeptorebene. Desweiteren entsteht ein Ungleichgewicht zwischen vasokonstriktorisches und vasodilatatorisch wirkenden Faktoren ⁸⁹.

Stickstoffmonoxid und andere inflammatorische Mediatoren spielen für die Induktion einer Katecholaminresistenz eine wesentliche Rolle ⁹⁰. In Tierexperimenten ist nach Endotoxingabe sowie nach CLP festgestellt worden, dass Inhibitoren des NO Stoffwechsels die Sensibilität gegenüber dem Katecholamin Noradrenalin und der Sympathikus Stimulation wiederherstellen ⁹¹. Neben der exzessiven Produktion vasodilatierend wirkender Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandinen oder Bradykinin kommt es durch Aktivierung ATP-sensitiver Kaliumkanäle zu einer Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzelle und damit zur Vasodilatation ⁹².

4.2.2. Blutdruckverhalten nach Blockade der NO Synthase

Unsere Ergebnisse belegen, dass eine globale Blockade der NO Synthase zu einem Blutdruckanstieg führt.

Dabei zeigen unsere Daten sowohl in der CLP als auch in der Sham Gruppe signifikante Blutdruckanstiege gegenüber den Ausgangswerten, wobei bereits der Ausgangsblutdruck der Sham Tiere höher lag als in der CLP Gruppe. Im septischen Schock moduliert jedoch nicht alleine NO den Blutdruck, sondern es muss berücksichtigt werden, dass noch weitere Substanzen wie z.B. die Laktatsäure und weitere Faktoren wie z.B. das Herz-Zeit-Volumen den Blutdruck beeinflussen (s.o.). Daher kann eine NO Inhibierung der septischen Tiere auch nicht zu gleich hohen Blutdruckwerten wie eine NO Inhibierung bei Sham operierten Tieren führen.

In unseren Experimenten untersuchten wir des Weiteren die Auswirkungen einer globalen Inhibition der NO Synthase durch ETU auf den Cardiac Power. Dabei stellte sich heraus, dass ETU im Rahmen einer Sepsis einen stärkeren Effekt zur Steigerung des Cardiac Power als bei nicht septischen Tieren hat. Als Grund dafür lässt sich wiederum die signifikant erhöhte NO-Produktion während einer Sepsis benennen.

Im Unterschied zu den Katecholaminrezeptoren lassen sich die NO-Synthasen in Ihrer Funktion auch während einer Sepsis modulieren. Dadurch könnten sich bei der Behandlung der hypodynamen Phase neue therapeutische Ansatzmöglichkeiten ergeben.

Bislang wurde vor allem die durch den systemischen Entzündungsprozess induzierte iNOS für die generalisierte Vasodilatation und für die umfassenden hämodynamischen Veränderungen im Verlauf einer Sepsis verantwortlich gemacht (s. Kapitel 1.3). Die genaue Rolle der eNOS bei der Blutdruckmodulation im septischen Schock ist noch nicht vollständig geklärt. Neue Erkenntnisse zeigen aber, dass die eNOS eine zentrale Rolle spielt.

Versuche an septischen eNOS defizienten Mäusen (eNOS^{-/-}) zeigen einen signifikant höheren Blutdruck im Vergleich zum septischen Wildtyp⁹⁰. Weiterhin wird beschrieben, dass die Ausgangswerte homozygoter eNOS defizienter Mäuse einen signifikant höheren Blutdruck und eine signifikant niedrigere Herzfrequenz im Vergleich zum Wildtyp zeigen.

Echokardiographische Untersuchungen beschreiben in dieser Studie einen Anstieg des Herz-Zeit-Volumens auf 60% ausgehend von der Baseline beim septischen Wildtyp, während es bei septischen eNOS $-/-$ Mäusen oder nach unselektiver NOS-Inhibierung zu keinen signifikanten Anstiegen kommt ⁹⁰. Analog zu unseren Ergebnissen sind die Wildtyp CLP Tiere refraktär gegenüber einer Stimulation durch Katecholamine. Die septischen eNOS $-/-$ Mäuse zeigen jedoch eine ähnliche Antwort auf Katecholaminstimulation wie der Sham operierte Wildtyp ⁹⁰.

Desweiteren ist die Überlebenszeit der eNOS $-/-$ Mäuse signifikant besser als beim Wildtyp ⁹⁰. Interessanterweise vermindert eine globale Inhibierung der eNOS durch ETU diesen Benefit.

Die Gründe für diese Funktion der eNOS bei der Regulation der Hämodynamik während einer Sepsis könnten zum einen sein, dass die eNOS $-/-$ Mäuse nicht über den NO vermittelten vasorelaxierenden Mechanismus in den glatten Gefäßmuskelzellen verfügen. Zum anderen wird vermutet, dass durch den erhöhten Blutdruck der eNOS $-/-$ der Plasma Renin Spiegel erhöht ist, was wiederum eine Steigerung der Angiotensin-II Konzentration bewirkt. Die Ausgangswerte iNOS defizienter Mäuse manifestieren keine signifikanten Veränderungen des Blutdrucks und der Herzfrequenz im Vergleich zum Wildtypen ⁶⁶. Im Tierversuch stellt sich bei iNOS-überexprimierten Mäusen ein kleiner, jedoch signifikanter Blutdruckabfall dar ⁹³. Andere Daten zeigen ebenfalls einen höheren Blutdruck und eine größere spontane Blutdruckvariabilität bei eNOS defizienten Mäusen im Vergleich mit der Wildtyp Kontroll Gruppe ²³.

Bhagat et al. haben gezeigt, dass eine lokale IL-1 β -Stimulation zu einer iNOS unabhängigen, ausgeprägten Vasodilatation führt. Die Autoren können keine iNOS-mRNA-Expression aber eine deutliche eNOS-mRNA-Induktion nachweisen (s. auch Kapitel 1.3).

Nach LPS Injektion wurde jedoch im Vergleich von eNOS defizienten und iNOS defizienten Tieren diskutiert, dass der Anstieg der NO Produktion allein iNOS abhängig sei, während die eNOS vermittelte NO Produktion vermindert sei. Zusätzlich ist festgestellt worden, dass nach LPS Injektion der Blutdruck nur der Wildtyp Mäuse vermindert ist, bei den iNOS defizienten Mäusen jedoch nicht vermindert ist ⁹⁴. In dieser Studie ist jedoch nicht der Blutdruck und die Herzfrequenz der eNOS $-/-$ Mäuse gemessen worden. Zusätzlich muss man berücksichtigen, dass

in einem LPS Modell eine massive direkte iNOS Stimulation stattfindet, welche eNOS bezogene Eigenschaften überspielt. Dieses wird auch als „Zytokin Sturm“¹² beschrieben. Letzteres könnte auch erklären, warum in LPS Versuchen eNOS -/- Mäuse keine verbesserten Überlebenszeiten erreichen⁶⁶.

4.3. Auswirkungen der Sepsis auf das isolierte Herz im Langendorff Modell

Wir wählten für unsere Experimente das Langendorff Modell, da in diesem Modell Daten des linksventrikulären Druckes, des koronaren Flusses und des venösen O₂-Verbrauchs am isolierten Herzen gemessen werden können. Somit sind diese Messungen nicht durch Prozesse des Gesamtorganismus beeinflusst.

4.3.1. Kardiodepression nach Sepsisinduktion

Unsere Ergebnisse zeigen, dass während der hypodynamen Phase eine deutliche Kardiodepression auftritt. Diese zeigt sich in unseren Experimenten an den signifikant erniedrigten linksventrikulären Parametern LVDP, $dP/dT_{\max}$ und Cardiac Power.

Dabei stehen unsere Daten der linksventrikulären Parameter nach Sepsisinduktion und Sham Behandlung in guter Übereinstimmung mit bereits vorher beschriebenen Ergebnissen und mit zwischenzeitlich publizierten Arbeiten, die auf dem vorliegenden Modell basieren.

So zeigen Ullrich et al., dass nach Endotoxininjektion bei Mäusen die linksventrikuläre Verkürzungsfraction und $dP/dT_{\max}$ deutlich reduziert sind⁹⁵. Dabei kann eine frühzeitige, nach drei Stunden stattfindende Inhibition der iNOS mit L-N⁶-(1-iminoethyl)lysine Hydrochlorid eine Endotoxin induzierte myokardiale Dysfunktion verhindern, wohingegen sieben Stunden nach Endotoxingabe eine Inhibition die Dysfunktion nicht mehr umkehren kann.

Des Weiteren wird gezeigt, dass nach Endotoxingabe die Konzentration des second Messenger cGMP ansteigt⁹⁵. Durch die Induktion der iNOS in den vaskulären endothelialen Zellen und der glatten Gefäßmuskulatur und durch die Aktivierung der eNOS werden große Mengen an NO gebildet, welche am Herzen cGMP abhängige und cGMP unabhängige Wirkungen zeigen²⁸.

Inhibition der iNOS drei Stunden nach Bakterienapplikation verhindert die Anhäufung der cGMP Konzentrationen und die Entwicklung der kardialen Dysfunktionen.

Gleichzeitig zeigt sich aber auch, dass iNOS defiziente Mäuse und eine pharmakologische Blockade der iNOS nicht die Endotoxin-induzierte Mortalität verändern⁹⁵.

Andere Arbeiten belegen ebenfalls eine signifikante Reduzierung der prozentuellen Verkürzungsfraction, des linksventrikulären systolischen Spitzendrucks und des dP/dT_{max} nach LPS Behandlung der Mäuse^{79,96}. Auch hier wird eine Erhöhung der cGMP Konzentration nach LPS Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen⁹⁶.

Septische Tiere zeigten initial eine deutlich ausgeprägtere Kardiodepression und im zeitlichen Verlauf eine Teilerholung mit signifikanten Anstiegen der linksventrikulären Leistung. Bei den Sham Tieren hingegen entwickelten sich keine signifikanten Unterschiede der kardialen Pumpleistung während der Initial- und Baseline Phase.

Dieser Befund legt nahe, dass es bei den septischen Herzen bedingt durch den hypoxischen Stress durch die Ischämie bei der Organentnahme initial zu dieser ausgeprägten Kardiodepression kommt. Diese Kardiodepression der septischen Tiere könnte im Zusammenhang mit den erhöhten NO Konzentrationen stehen.

Es ist bereits in Ischämie-Reperfusion Studien beschrieben worden, dass es bei Wild-Typ Mäusen während der Reperfusion nach Ischämie durch verschiedene Faktoren zu einer gesteigerten NO Produktion kommt: Eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums⁹⁷ während Ischämie und Reperfusion stimuliert die Kalzium-abhängige NO-Synthase in Kardiomyozyten, koronaren Endothelzellen und im Endokard⁹⁸. Ein Wiedereintritt von molekularem Sauerstoff nach einer Ischämie begünstigt die Bildung von NO⁹⁹ und letztendlich steigert ein Gewebe-Stress während der Reperfusion die kardiale NO-Produktion¹⁰⁰.

Diese erhöhte NO-Freisetzung während der Reperfusion bewirkt zum einen negativ inotrope¹⁰¹ und chronotrope Effekte¹⁰² bei isolierten Kardiomyozyten, zum anderen kommt es NO abhängig zu einer Inhibierung der mitochondrialen Atmung¹⁰³. Bei eNOS defizienten Mäusen zeigte sich hingegen eine signifikante Verminderung der kardialen postischämischen Dysfunktion⁹⁹. Während einer Sepsis werden diese postischämischen Effekte durch zusätzlich erhöhte NO Level noch verstärkt.

In diesem Zusammenhang ist auf die Bedeutung der Reaktiven Oxygen Spezies (ROS) wie z.B. H_2O_2 und Superoxide für die initial deutlichere Kardiodepression der septischen Tiere hinzuweisen.

Sowohl nach Ischämie-Reperfusion als auch nach Sepsisinduktion liegt ein erhöhter Spiegel von ROS vor ^{15,104}. Diese freien Radikale sind hochtoxisch für sarkolemnale oder sarkoplasmatische Membranen ^{105,106}. Zusätzlich wird gezeigt, dass ROS die zytosolische Kreatinin Kinase CK_{cyto} inaktivieren. Nachfolgend kommt es zu einer verminderten Umwandlung von Phosphokreatinin zu ATP, was in einer erniedrigten zellulären Energieversorgung resultiert. Letzteres wird für die Kardiodepression verantwortlich gemacht.

Für die Inaktivierung der ROS und somit als als Vermittler der NO Entgiftung scheint Myoglobin eine Schlüsselrolle zu spielen. So wird Myoglobin komplementär zu den bekannten antioxidativen Schutzmechanismen als molekularer Radikal-Scavenger betrachtet ^{37,104}. Myoglobin reguliert die freie, intrazelluläre NO Konzentration und schützt die Mitochondrien vor Cytochrom vergiftenden NO Konzentrationsspitzen ³⁷. Dies bewirkt einen Schutz z.B. der Kreatininkinase vor transienten Anstiegen der ROS.

Darüber hinaus wird gezeigt, dass NO die Funktion in Herzen von Myoglobin defizienten Mäusen (myo -/-) stärker beeinträchtigt als in WT-Herzen ¹⁰⁷. Zusätzlich reagieren Myoglobin defiziente Herzen auf Stimulation bzw. Inhibition der NO-Freisetzung mit ausgeprägterer Vasodilatation respektive Vasokonstriktion im Vergleich zum WT.

Zusammenfassend scheint die initial deutlichere Kardiodepression mitbedingt durch erhöhte NO-Spiegel sowie vermehrt freigesetzte ROS zu sein. Die Teilerholung im weiteren Verlauf lässt sich durch nachlassende Wirkung der ROS, z.B. durch Inaktivierung mittels Myoglobin erklären.

4.3.2 Ursachen der Kardiodepression im Zusammenhang mit der zellulären Energetik und dem myokardialen Sauerstoffverbrauch (mVO_2)

Die Ursachen der Kardiodepression nach Sepsisinduktion sind noch nicht eindeutig geklärt. Über viele Jahre wurde hierfür eine globale Minderperfusion des Herzens mit resultierender Ischämie angenommen ¹⁰⁸. Neuere Studien belegen, dass der Macrophage migration inhibitory factor (MIF) ein kardiodepressiver Faktor ist, der im Tierexperiment nach Endotoxingabe als späterer Mediator der kardialen Dysfunktion fungiert. Bei MIF handelt es sich um ein pluripotentes, pro-inflammatorisches Zytokin, das ubiquitär in Organen, u.a. dem Herzen gebildet wird ¹⁰⁹. Nach wie vor wird die Gegenwart einer Substanz im Blutstrom diskutiert, die eine kardiodepressive Wirkung am Effektororgan Herz entfaltet, die sogenannte „myocardial depressant substance“ (MDS) ^{15,108}. Eine solche Substanz konnte bislang nicht eindeutig identifiziert werden.

Eine wichtige Ursache der Kardiodepression stellt NO dar, welches im septischen Prozeß vermehrt gebildet wird ⁸⁶. Versuche zum NO Stoffwechsel zeigen, dass bei nicht-septischen Mäusen mit zunehmender Menge an appliziertem NO der LVDP stetig abfällt ³⁷.

Bei isolierten Kardiomyozyten verursacht die Gabe von NO negativ inotrope Effekte. Dabei kommt es NO induziert zu einer Reduzierung der myofilamentären Calcium Sensitivität aufgrund der Phosphorylierung von Troponin I durch die cGMP abhängige Protein Kinase ¹⁰⁵ (s.a. Kap. 1.3, Abb.1.2). Untersuchungen am menschlichen Herzen haben ebenfalls eine Verkürzung der linksventrikulären Kontraktion, ein verringertes Ausmaß des linksventrikulären Drucks und ein Absinken des linksventrikulären endsystolischen Drucks nachgewiesen. Dabei sind NO-haltige Substanzen oder die Substanz P verabreicht worden. Substanz P bewirkt eine Freisetzung von NO im koronaren Endothelium ¹¹⁰.

Ein entscheidender Grund für die Kardiodepression liegt weiterhin in der Induktion einer mitochondrialen Dysfunktion durch NO. Wie unsere Daten belegen, ist der myokardiale Sauerstoffverbrauch mVO_2 nach Sepsisinduktion signifikant niedriger als in der Sham Kontroll Gruppe (s. Abb. 3.10).

Erhöhte Mengen an NO im septischen Verlauf führen u.a. direkt oder über die Bildung von Peroxynitrit zu einer mitochondrialen Dysfunktion und einer Inhibition der

Enzymkomplexe I und IV der Atmungskette^{15,28}. Daraus resultiert eine verringerte Bildung von ATP und somit eine Verringerung des zellulären Energiehaushaltes. Dies führt letztendlich zu einer kardialen Dysfunktion und spielt somit auch eine entscheidende Rolle in der Regulation der myokardialen Funktion unter pathophysiologischen Bedingungen im Tiermodell^{30,32,36,111} als auch bei septischen Patienten^{28,29}.

Versuche an septischen Ratten zeigen ein Absinken des reduzierten Glutathion (GSH) im Gewebe, was gleichzeitig mit der klinischen Schwere der Sepsis korreliert¹¹¹. Dieses Absinken ist assoziiert mit einer geringeren Komplex-I Aktivität und einer vermehrten NO-Produktion²⁹. GSH ist ein wichtiges intramitochondriales Antioxidant welches Peroxynitrit und Hydrogen-Peroxid entgiftet¹¹¹. Desweiteren wird in dieser Studie beschrieben, dass eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion zu einer Verbesserung von klinischen Parametern und einer Erholung von biochemischen Parametern führt.

Schließlich stellt sich noch die Frage, welche Isoform der NO-Synthasen zu einer Herabsetzung des mVO_2 führt. Studien zeigen, dass eine Endotoxin Behandlung signifikant den myokardialen Gewebe O_2 -Verbrauch von WT Mäusen, jedoch nicht von iNOS defizienten Mäusen herabsetzt. Dies führt zu der Vermutung, dass eine erhöhte NO Formation, iNOS vermittelt, den mVO_2 supprimiert⁸⁰. Andererseits wird auch festgestellt, dass die konstitutive Isoform der eNOS eine wichtige Rolle bei der Regulation des myokardialen Gewebe O_2 -Verbrauchs über die physiologische Regulation der mitochondrialen Atmung spielt⁸⁰.

Die mitochondriale Dysfunktion während einer Sepsis scheint aber nicht nur durch eine Inhibition der Enzymkomplexe durch NO bedingt zu sein. In morphologischen und histologischen Studien wird gezeigt, dass ein verringerter myokardialer Sauerstoffverbrauch auch durch eine herabgesetzte Anzahl an Mitochondrien bedingt ist¹¹². Dabei korreliert die Schwere des Endotoxinmodells mit den Schäden an den Mitochondrien. Es zeigt sich eine reduzierte kardiale mechanische Effektivität im Zusammenhang mit einer herabgesetzten Mitochondrienanzahl. Interessanterweise besteht bei den verbliebenen Mitochondrien ein deutlich erhöhter Metabolismus mit einem exzessiven Sauerstoff- und Substratverbrauch im Vergleich

zu Kontrollherzen. Dies führt zu einer metabolischen Ineffektivität und legt die Vermutung nahe, dass es dadurch zu einer Zerstörung der Mitochondrien kommt ¹¹².

Trotzdem bleibt es unklar, ob die vermehrte Produktion von NO im Rahmen der Sepsis einen ausschließlich negativen Einfluss besitzt. Experimentelle Studien lassen vermuten, dass NO auch nützliche und protektive Effekte entfaltet. So wirkt NO kardioprotektiv z.B. durch eine Zunahme der Myokardperfusion durch die Vasodilatation, reduziert den ischämischen Reperfusionsschaden und zeigt ein antiarrhythmisches Potenzial ^{15,27}.

4.3.3. Veränderungen des Koronarflusses und der Koronarreserve

Wir verglichen in unseren Experimenten die Ausgangswerte des koronaren Flusses zwischen septischen und Sham Herzen sowie die Auswirkungen einer Bradykinin und Adenosin Applikation unter konstanten Perfusionsdruck Bedingungen von 100mmHg.

Dabei wählten wir in unseren Experimenten die Bradykininapplikation, um die Auswirkungen eines NO abhängigen Vasodilatators am Herzen zu ermitteln.

Es zeigte sich dabei eine deutlich stärkere Wirkung von Bradykinin bei den septischen Tieren, was einen signifikant stärkeren Anstieg des Koronarflusses bewirkte.

Bradykinin induziert eine Stimulation der endogenen NO-Freisetzung. Nachfolgend diffundiert NO in die vaskulären glatten Muskelzellen und bewirkt dort eine Vasorelaxation ⁶⁶.

Des Weiteren ist tierexperimentell gezeigt worden, dass der Koronarfluss proportional mit der Bradykinin induzierten NO Freisetzung ansteigt. Umgekehrt führt eine Inhibition der eNOS vermittelten Vasodilatation durch L-NAME zu einer verminderten NO Freisetzung und einem vermindertem Koronarfluss ¹¹³. Der NO Synthase Inhibitor ETU reduziert den basalen koronaren Fluss im Vergleich zu einer Kontrollgruppe unter gleichzeitiger Bradykininapplikation um 40% ⁵⁷. Im Lichte der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse erscheint es hoch wahrscheinlich,

dass durch die Sepsis die eNOS aktiviert und somit die Bradykininwirkung potenziert wird.

Nach Adenosinapplikation lag der Anstieg des koronaren Flusses der CLP behandelten Tiere, trotz hoher NO Konzentrationen, signifikant unter den Werten der Sham Gruppe. Es zeigte sich also, dass die Koronarreserve der septischen Tiere deutlich geringer ist. Dies lässt sich u.a. auch darauf zurückführen, dass der basale Fluss dieser Tiere NO vermittelt schon erhöht ist.

In unseren Experimenten bewirkte Adenosin signifikante Anstiege des Koronarflusses von der Baseline in beiden Versuchsgruppen. Gleichzeitig erreichte der Koronarfluss Adenosin vermittelt in beiden Gruppen den höchsten Wert in allen Koronarfluss Experimenten.

Studien an septischen Rattenherzen belegen, dass in Ischämie-Reperfusion Versuchen die endogene Adenosin Produktion den Anstieg des Koronarflusses während der Reperfusion bewirkt und gleichzeitig das septische Herz vor Ischämie-Reperfusionsschäden schützt. Bislang ist nicht ganz geklärt, welche Komponenten für die komplette Erholung des septischen Herzen verantwortlich sind. Es lässt sich aber vermuten, dass während einer Sepsis freigesetztes Adenosin intrazelluläre biochemische Pfade aktiviert, die den Pfaden bei der myokardialen Präkonditionierung ähneln. Bei der myokardialen Präkonditionierung bewirkt die Stimulation von Adenosin A_1/A_3 - Rezeptoren protektive Effekte wie eine Reduzierung des intrazellulären Kalziums¹¹⁴, eine Schwächung oxidativen Schadens¹¹⁵ und eine Reduktion der post-ischämischen Dysfunktion^{116,117}. Desweiteren kann die potentielle Interaktion von Adenosin, intrazellulären Botenstoffen, Hitze-Schock Proteinen und antioxidativen Enzymen zur Kardioprotektion beitragen¹¹⁶.

Diese Erkenntnisse werden auch durch andere Versuche wiedergegeben. Experimente an Ratten haben gezeigt, dass das Zytokin TNF-alpha, welches vermehrt während einer Sepsis gebildet wird, eine negative Einwirkung auf das Herz-Zeit-Volumen hat und seine Applikation zu signifikanten Anstiegen des arteriellen Widerstandes führt¹¹⁸.

Diese Verschlechterung des Herz-Zeit-Volumens kann jedoch durch die Gabe eines Adenosin A_{2A} Agonisten verbessert werden¹¹⁸. Letzteres verdeutlicht eine positive Eigenschaft dieses Agonisten auf zahlreiche kardiovaskuläre Faktoren. So steigt z.B. der dP/dT_{max} deutlich an, was sehr wahrscheinlich Folge einer erhöhten koronaren

arteriellen Conductance und einer gesteigerten Myokardperfusion ist. Interessanterweise kann in denselben Experimenten die Depression des Herz-Zeit-Volumens, bedingt durch eine TNF-alpha Gabe, nicht durch die Applikation des Katecholamins Noradrenalin vermindert werden ¹¹⁸.

Aus dem gesagten lässt sich demzufolge eine therapeutische Option von Adenosin während einer Sepsis herleiten. Dieses wird auch noch mal nach Versuchen mit Pentostatin, einem Inhibitor der Adenosin Deaminase, deutlich. Vaskulärer Gefäßschaden während einer Sepsis, direkt oder indirekt durch eine Aktivierung von Neutrophilen vermittelt, trägt signifikant zum Multiorganversagen bei. Pentostatin führt zu günstigen Veränderungen der Leukozyten-endothelialen Interaktionen als auch zu Verminderungen an zirkulierenden Mengen von systemischen Mediatoren einer Entzündung. Zusätzlich führte die Hemmung des Adenosin Abbaus durch Pentostatin in einem Sepsis Tiermodell zu verbesserten Überlebenszeiten ¹¹⁹.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Etablierung, Validierung und hämodynamischen Charakterisierung eines reproduzierbaren murinen Sepsis Modells. Dabei wurde zunächst ein standardisiertes Modell zur Sepsisinduktion durch Coecumligatur und Coecumpunktion (CLP) entwickelt.

Im zweiten Abschnitt unserer Versuchsreihe wurde das Modell hämodynamisch evaluiert. Hierzu erfolgten in vivo Blutdruckmessungen sowie Untersuchungen am isolierten Herzen im Langendorff Modell jeweils mit und ohne pharmakologischer Stimulation.

Unsere Daten belegen, dass es nach Sepsisinduktion durch CLP zu charakteristischen Merkmalen einer Sepsis kommt, wie sie auch bei septischen Patienten beobachtet werden. Dazu gehört eine Bakteriämie und die Entwicklung einer hyperdynamen Phase gefolgt von einem hypodynamen Kreislaufzustand.

Die Ergebnisse der Überlebensstudien zeigen, dass durch die CLP eine schwere Sepsis mit dem Auftreten eines Exitus letalis in 100% der Fälle bewirkt wurde. Nach reiner Sham Behandlung hingegen traten keine Todesfälle auf.

Die Überlebenszeiten der septischen Tiere zeigten eine Varianz zwischen 27 Stunden post-OP und 52 Stunden post-OP. Diese Varianz kann u.a. von dem Verhältnis von pro-inflammatorischen zu anti-inflammatorischen Zytokinen, der gebildeten Menge von NO, quantitativen und qualitativen Unterschieden der Keimbeseidlung im Coecum sowie vom Status der körpereigenen Immunantwort abhängen.

In den durchgeführten in vivo Blutdruckmessungen lagen sowohl der Ausgangswert des arteriellen Blutdrucks der septischen Tiere als auch die Werte nach Applikation von Dobutamin und Ethylthioharnstoff (ETU) signifikant niedriger als bei den Sham behandelten Tieren. Dabei zeigte sich die arterielle Hypotension der septischen Mäuse teilreversibel nach globaler NOS-Blockade durch ETU. Daraus folgt, dass der erniedrigte periphere Widerstand neben NO durch weitere vasodilatatorisch wirkenden Mediatoren bedingt ist. Die kardiale Dysfunktion und die hypodynamie Kreislauffunktion stellen schwere Manifestationen einer Sepsis dar und erklären die

kurze Überlebenszeit der septischen Versuchstiere. Diese akute septische Kardiomyopathie ist refraktär gegenüber einer Stimulation durch Katecholamine.

Die Untersuchungen am isolierten Herzen im Langendorff Modell belegen eine deutliche Kardiodepression nach Sepsisinduktion, einhergehend mit einer signifikanten Reduzierung der linksventrikulären Kontraktilität. Die septischen Tiere zeigten initial eine deutlich ausgeprägtere Kardiodepression und im zeitlichen Verlauf eine Teilerholung mit signifikanten Anstiegen der linksventrikulären Leistung. Dies lässt vermuten, dass es bei den septischen Herzen bedingt durch die erhöhten NO Konzentrationen und den hypoxischen Stress durch die Ischämie bei der Organentnahme initial zu dieser ausgeprägten Kardiodepression kommt.

Der erniedrigte mVO_2 nach Sepsisinduktion legt eine mitochondriale Dysfunktion mit Inhibition der Atmungskette nahe. Die damit verbundene Einschränkung des zellulären Energiehaushaltes könnte einen Beitrag zur Kardiodepression im septischen Schock leisten.

Der koronare Fluss wurde durch Bradykinin über eine Stimulation der endogenen NO Freisetzung bei den septischen Tieren deutlich stärker gesteigert als bei der Sham Kontrollgruppe. Dies zeigt, dass durch die Sepsis die eNOS aktiviert und somit die Bradykininwirkung potenziert wird.

Nach Adenosinapplikation stellten wir eine deutlich geringere Koronarreserve der septischen Tiere mit signifikant niedrigeren Anstiegen des koronaren Flusses fest. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass der basale Fluss dieser Tiere NO vermittelt bereits erhöht ist.

Die vorliegende Arbeit dient als Grundlage für Therapiestudien im Mausmodell der Sepsis. Auf sie aufbauend konnten zwischenzeitlich in unserem Labor bereits Studien durchgeführt werden, die eine verbesserte Überlebensrate septischer Mäuse nach Gabe des HMG-CoA-Reduktase Inhibitors Simvastatin belegten.

Ebenso werden durch die vorliegende Arbeit methodische Grundlagen gelegt zur Klärung der Rolle der eNOS während einer Sepsis sowie der Bedeutung von Myoglobin vermittelter NO Entgiftung im Rahmen einer Sepsis an Hand des Einsatzes des hier etablierten Modells in eNOS bzw. Myoglobin defizienten Mäusen.

6. Literaturverzeichnis

1. Pinner RW, Teutsch SM, Simonsen L, et al: Trends in infectious diseases mortality in the United States. JAMA 1996;275:189-193.
2. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP: The Natural History of the Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS). JAMA 1995;273:117-123.
3. Schoenberg MH, Weiss M, Radermacher P: Outcome of patients with sepsis and septic shock after ICU treatment. Langenbecks Arch Surg 1998;383: 44-48.
4. G. S. Martin, D. M. Mannino, S. Eaton, and M. Moss. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N.Engl.J.Med. 348 (16):1546-1554, 2003.
5. Friedman G, Silva E, Vincent JL: Has the mortality of septic shock changed with time? Crit Care Med 1998;26:2078-2086.
6. A. P. Wheeler and G. R. Bernard. Treating patients with severe sepsis. N.Engl.J.Med. 340 (3):207-214, 1999.
7. O. Moerer, A. Schmid, M. Hofmann, A. Herklotz, K. Reinhart, K. Werdan, H. Schneider, and H. Burchardi. Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. Intensive Care Med. 28 (10):1440-1446, 2002.
8. O. Moerer, H. Burchardi. Epidemiologie und Kosten der Sepsis. Klinikarzt 2004; 33 (6): 177-180
- 9 A. Wehr. Therapie der Sepsis: Herausforderung für die Intensivmedizin. Deutsches Ärzteblatt 102, Ausgabe 10 vom 11.03.2005, Seite A-685

10. D. L. Hoyert, E. Arias, B. L. Smith, S. L. Murphy, and K. D. Kochanek. Deaths: final data for 1999. *Natl.Vital Stat.Rep.* 49 (8):1-113, 2001.
11. C. Brun-Buisson. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med.* 26 Suppl 1:S64-S74, 2000.
12. R. S. Hotchkiss and I. E. Karl. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N.Engl.J.Med.* 348 (2):138-150, 2003.
13. A. K. Abbas, K. M. Murphy, and A. Sher. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383 (6603):787-793, 1996.
14. N. C. Riedemann, R. F. Guo, and P. A. Ward. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat.Med.* 9 (5):517-524, 2003.
15. U. Janssens. Die septische Kreislauferkrankung. *Dtsch Med Wochenschr* 2003; 128:803-809
16. W. K. Alderton, C. E. Cooper, and R. G. Knowles. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem.J.* 357 (Pt 3):593-615, 2001.
17. C. Thiemermann. Nitric oxide and septic shock. *Gen.Pharmacol.* 29 (2):159-166, 1997.
18. A. Kanai, M. Epperly, L. Pearce, L. Birder, M. Zeidel, S. Meyers, J. Greenberger, W. de Groat, G. Apodaca, and J. Peterson. Differing roles of mitochondrial nitric oxide synthase in cardiomyocytes and urothelial cells. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 286 (1):H13-H21, 2004.
19. S. L. Elfering, T. M. Sarkela, and C. Giulivi. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J.Biol.Chem.* 277 (41):38079-38086, 2002.

20. L. Schild, T. Reinheckel, M. Reiser, T. F. Horn, G. Wolf, and W. Augustin. Nitric oxide produced in rat liver mitochondria causes oxidative stress and impairment of respiration after transient hypoxia. *FASEB J.* 17 (15):2194-2201, 2003.
21. S. Moncada, R. M. Palmer, and E. A. Higgs. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol.Rev.* 43 (2):109-142, 1991.
22. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, et al: Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995;377:239-242.
23. Stauss HM, Godecke A, Mrowka R, Schrader J, Persson PB: Enhanced blood pressure variability in eNOS knockout mice. *Hypertension* 1999;33:1359-1363.
24. R. G. Kilbourn, A. Jubran, S. S. Gross, O. W. Griffith, R. Levi, J. Adams, and R. F. Lodato. Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 172 (3):1132-1138, 1990.
25. C. A. Appleby, J. H. Bradbury, R. J. Morris, B. A. Wittenberg, J. B. Wittenberg, and P. E. Wright. Leghemoglobin. Kinetic, nuclear magnetic resonance, and optical studies of pH dependence of oxygen and carbon monoxide binding. *J.Biol.Chem.* 258 (4):2254-2259, 1983.
26. K. Bhagat, A. D. Hingorani, M. Palacios, I. G. Charles, and P. Vallance. Cytokine-induced venodilatation in humans in vivo: eNOS masquerading as iNOS. *Cardiovasc.Res.* 41 (3):754-764, 1999.
27. E. Belcher, J. Mitchell, and T. Evans. Myocardial dysfunction in sepsis: no role for NO? *Heart* 87 (6):507-509, 2002.
28. S. Price, P. B. Anning, J. A. Mitchell, and T. W. Evans. Myocardial dysfunction in sepsis: mechanisms and therapeutic implications. *Eur.Heart J.* 20 (10):715-724, 1999.

29. D. Brealey, M. Brand, I. Hargreaves, S. Heales, J. Land, R. Smolenski, N. A. Davies, C. E. Cooper, and M. Singer. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 360 (9328):219-223, 2002.
30. E. Clementi, G. C. Brown, M. Feelisch, and S. Moncada. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 (13):7631-7636, 1998.
31. G. C. Brown and C. E. Cooper. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 356 (2-3):295-298, 1994.
32. B. Zingarelli, B. J. Day, J. D. Crapo, A. L. Salzman, and C. Szabo. The potential role of peroxynitrite in the vascular contractile and cellular energetic failure in endotoxic shock. *Br.J.Pharmacol.* 120 (2):259-267, 1997.
33. C. Szabo. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia- reperfusion injury. *Shock* 6 (2):79-88, 1996.
34. H. F. Goode and N. R. Webster. Free radicals and antioxidants in sepsis. *Crit Care Med.* 21 (11):1770-1776, 1993.
35. H. F. Goode, H. C. Cowley, B. E. Walker, P. D. Howdle, and N. R. Webster. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med.* 23 (4):646-651, 1995.
36. M. Kelm, S. Schafer, R. Dahmann, B. Dolu, S. Perings, U. K. Decking, J. Schrader, and B. E. Strauer. Nitric oxide induced contractile dysfunction is related to a reduction in myocardial energy generation. *Cardiovasc.Res.* 36 (2):185-194, 1997.
37. Flogel, U. et al. "Myoglobin: A scavenger of bioactive NO." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98.2 (2001): 735-40.

38. M. W. Merx, U. Flogel, T. Stumpe, A. Godecke, U. K. Decking, and J. Schrader. Myoglobin facilitates oxygen diffusion. *FASEB J.* 15 (6):1077-1079, 2001.
39. Müller-Werdan U. Akute septische Kardiomyopathie. *Internist* 1998;39: 467-478.
40. Müller – Werdan U, Werdan K. Prophylaxe und Therapie der akuten septischen Kardiomyopathie. Springer – Verlag Heidelberg, New York, Berlin, IN Schuster HP und Werdan K (Hrsg.) *Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen.* 3 Aufl. 2000:333-396
41. E. Rivers, B. Nguyen, S. Havstad, J. Ressler, A. Muzzin, B. Knoblich, E. Peterson, and M. Tomlanovich. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N.Engl.J.Med.* 345 (19):1368-1377, 2001.
42. Berghe G. Van den, P. Wouters, F. Weekers, C. Verwaest, F. Bruyninckx, M. Schetz, D. Vlasselaers, P. Ferdinande, P. Lauwers, and R. Bouillon. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N.Engl.J.Med.* 345 (19):1359-1367, 2001.
43. M. A. Matthay. Severe sepsis--a new treatment with both anticoagulant and antiinflammatory properties. *N.Engl.J.Med.* 344 (10):759-762, 2001.
44. G. R. Bernard, J. L. Vincent, P. F. Laterre, S. P. LaRosa, J. F. Dhainaut, A. Lopez-Rodriguez, J. S. Steingrub, G. E. Garber, J. D. Helterbrand, E. W. Ely, and C. J. Fisher, Jr. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N.Engl.J.Med.* 344 (10):699-709, 2001.
45. M. W. Merx, E. A. Liehn, U. Janssens, R. Lutticken, J. Schrader, P. Hanrath, and C. Weber. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin profoundly improves survival in a murine model of sepsis. *Circulation* 109 (21):2560-2565, 2004.
46. Calandra, T. et al. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat. Med* 6, 164-170 (2000).

47. Ulloa, L. et al. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 12351-12356 (2002).
48. Czermak, B.J. et al. Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nat. Med.* 5, 788-792 (1999).
49. Riedemann, N.C. et al. Increased C5a receptor expression in sepsis. *J. Clin. Invest.* 110, 101-108 (2002).
50. Lopaschuk GD, Barr RL: Measurements of fatty acid and carbohydrate metabolism in the isolated working rat heart. *Mol Cell Biochem.* 1997;172:137-147.
51. Pisarenko OI, Lakomkin VL, Studneva IM, Korchazhkina OV, Kuzmin AI, Kapelko VI: Association of pre-ischaemic disturbances in energy metabolism with postischaemic dysfunction of the rat isolated working heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1998;25:10-16.
52. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR: Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* 2000;13:110-116.
53. Remick DG, Garg SJ, Newcomb DE, Wollenberg G, Huie TK, Bolgos GL: Exogenous interleukin-10 fails to decrease the mortality or morbidity of sepsis. *Crit Care Med* 1998;26:895-904.
54. E. A. Deitch. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock* 9 (1):1-11, 1998.
55. Doevendans PA, Daemen MJ, de Muinck ED, Smits JF: Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res.* 1998;39:34-49.
56. Estler. *Pharmakologie und Toxikologie*, 4. Auflage, S. 290

57. A. Godecke, M. Ziegler, Z. Ding, and J. Schrader. Endothelial dysfunction of coronary resistance vessels in apoE^{-/-} mice involves NO but not prostacyclin-dependent mechanisms. *Cardiovasc.Res.* 53 (1):253-262, 2002.
58. K. Hara and R. A. Harris. The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesth.Analg.* 94 (2):313-8, table, 2002.
59. W. Erhardt, A. Hebestedt, G. Aschenbrenner, B. Pichotka, and G. Blumel. A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate). *Res.Exp.Med.(Berl)* 184 (3):159-169, 1984.
60. Karow, Lang. *Pharmakologie und Toxikologie*, S.353
61. Patricia Skavle, abgerufen am 20.11.2003,
<http://www.uchsc.edu/animal/anesthetic%20discussion%20on%20xylazine.htm>
62. Bueno, A. C., J. Cornick-Seahorn, T. L. Seahorn, G. Hosgood und R. M. Moore: Cardiopulmonary and sedative effects of intravenous administration of low doses of medetomidine and xylazine to adult horses. *Am. J. Vet. Res.* 60, 1371–1376 (1999).
63. Hans-Gerd Zimmer, The isolated perfused Heart and Its Pioneers, *News in Physiological Sciences*, Vol. 13, August 1998 S.208
64. M.W. Merx. J. Schrader. *Methods in cardiovascular research*. S.173-189, 2005. Springer Verlag
65. Bedienungsanleitung zur Apparatur Isoliertes Herz, Größe 1 (Maus Herz), Modell IH-1, Typ 844, Hugo Sachs Elektronik, S. 5-7, Februar 2000
66. Edward G. Shesely et. al. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 93, pp.13176-13181, November 1996

67. A. Adler, H. Huang, Z. Wang, J. Conetta, E. Levee, X. Zhang, and T. H. Hintze. Endocardial endothelium in the avascular frog heart: role for diffusion of NO in control of cardiac O₂ consumption. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 287 (1):H14-H21, 2004.
68. Godecke, A. et al. "Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice." *Circ.Res.* 82.2 (1998): 186-94.
69. J. Schrader and U. Decking. [Regulation of coronary circulation by adenosine]. *Z.Kardiol.* 85 Suppl 6:153-159, 1996.
70. Imai S, Nakazawa M (1991) Role of adenosine and adenine nucleotides in the biological system. Elsevier, Amsterdam
71. L. Belardinelli, J. Linden, and R. M. Berne. The cardiac effects of adenosine. *Prog.Cardiovasc.Dis.* 32 (1):73-97, 1989.
72. J. A. Auchampach, A. Rizvi, Y. Qiu, X. L. Tang, C. Maldonado, S. Teschner, and R. Bolli. Selective activation of A₃ adenosine receptors with N⁶-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methyluronamide protects against myocardial stunning and infarction without hemodynamic changes in conscious rabbits. *Circ.Res.* 80 (6):800-809, 1997.
73. Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL: Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun* 1996;64:4733-4738.
74. S. Ebong, D. Call, J. Nemzek, G. Bolgos, D. Newcomb, and D. Remick. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect.Immun.* 67 (12):6603-6610, 1999.
75. S. M. Hollenberg, A. Dumasius, C. Easington, S. A. Colilla, A. Neumann, and J. E. Parrillo. Characterization of a hyperdynamic murine model of resuscitated sepsis using echocardiography. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 164 (5):891-895, 2001.

76. Steinhauser ML, Hogaboam CM, Lukacs NW, Strieter RM, Kunkel SL: Multiple roles for IL-12 in a model of acute septic peritonitis. *J Immunol.* 1999;162:5437-5443.
77. P. P. Wolkow. Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. *Inflamm.Res.* 47 (4):152-166, 1998
78. G. Baumgarten, P. Knuefermann, N.Nozaki, N. Sivasubramanian, D.L. Mann and J.G. Vallejo. In vivo expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: The role of Toll-like Receptor 4
79. P. Knuefermann, S. Nemoto, A. Misra, N. Nozaki, G. Defreitas, S. M. Goyert, B. A. Carabello, D. L. Mann, and J. G. Vallejo. CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation* 106 (20):2608-2615, 2002.
80. K. E. Loke, P. I. McConnell, J. M. Tuzman, E. G. Shesely, C. J. Smith, C. J. Stackpole, C. I. Thompson, G. Kaley, M. S. Wolin, and T. H. Hintze. Endogenous endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide is a physiological regulator of myocardial oxygen consumption. *Circ.Res.* 84 (7):840-845, 1999.
81. R. R. Neviere, G. Cepinskas, W. S. Madorin, N. Hoque, M. Karmazyn, W. J. Sibbald, and P. R. Kvietys. LPS pretreatment ameliorates peritonitis-induced myocardial inflammation and dysfunction: role of myocytes. *Am.J.Physiol* 277 (3 Pt 2):H885-H892, 1999.
82. C. Natanson, W. D. Hoffman, A. F. Suffredini, P. Q. Eichacker, and R. L. Danner. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann.Intern.Med.* 120 (9):771-783, 1994.
83. P. Brandtzaeg, P. Kierulf, P. Gaustad, A. Skulberg, J. N. Bruun, S. Halvorsen, and E. Sorensen. Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *J.Infect.Dis.* 159 (2):195-204, 1989.

84. L. C. Casey, R. A. Balk, and R. C. Bone. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann.Intern.Med.* 119 (8):771-778, 1993.
85. S. F. Lowry. Sepsis and its complications: clinical definitions and therapeutic prospects. *Crit Care Med.* 22 (7):S1-S2, 1994.
86. D. D. Rees, J. E. Monkhouse, D. Cambridge, and S. Moncada. Nitric oxide and the haemodynamic profile of endotoxin shock in the conscious mouse. *Br.J.Pharmacol.* 124 (3):540-546, 1998.
87. M. W. Merx, E. A. Liehn, J. Graf, Sandt A. van de, M. Schaltenbrand, J. Schrader, P. Hanrath, and C. Weber. Statin treatment after onset of sepsis in a murine model improves survival. *Circulation* 112 (1):117-124, 2005.
88. D. J. Goldstein and M. C. Oz. Mechanical support for postcardiotomy cardiogenic shock. *Semin.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 12 (3):220-228, 2000.
89. M. Dunser, V. Wenzel, A. J. Mayr, and W. R. Hasibeder. [Arginine vasopressin in vasodilatory shock: a new therapy approach?]. *Anaesthesist* 51 (8):650-659, 2002.
90. M.W. Merx et al. eNOS is a regulator of hemodynamics in sepsis. (submitted)
91. J. R. Parratt. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. *J.Antimicrob.Chemother.* Suppl A:31-39, 1998.
92. D.W. Landry and J. A. Oliver. The ATP-sensitive K⁺ channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog. *J.Clin.Invest* 89 (6):2071-2074, 1992.
93. J. Heger, A. Godecke, U. Flogel, M. W. Merx, A. Molojavyi, W. N. Kuhn-Velten, and J. Schrader. Cardiac-specific overexpression of inducible nitric oxide synthase does not result in severe cardiac dysfunction. *Circ.Res.* 90 (1):93-99, 2002.

94. M. M. Hallemeesch, B. J. Janssen, W. J. de Jonge, P. B. Soeters, W. H. Lamers, and N. E. Deutz. NO production by cNOS and iNOS reflects blood pressure changes in LPS-challenged mice. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 285 (4):E871-E875, 2003.
95. R. Ullrich, M. Scherrer-Crosbie, K. D. Bloch, F. Ichinose, H. Nakajima, M. H. Picard, W. M. Zapol, and Z. M. Quezado. Congenital deficiency of nitric oxide synthase 2 protects against endotoxin-induced myocardial dysfunction in mice. *Circulation* 102 (12):1440-1446, 2000.
96. S. Nemoto, J. G. Vallejo, P. Knuefermann, A. Misra, G. Defreitas, B. A. Carabello, and D. L. Mann. Escherichia coli LPS-induced LV dysfunction: role of toll-like receptor-4 in the adult heart. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 282 (6):H2316-H2323, 2002.
97. Barry WH. 1991. Calcium and ischemic injury. *Trends Cardiovasc Med* 1: 162-166
98. R. Schulz, J. A. Smith, M. J. Lewis, and S. Moncada. Nitric oxide synthase in cultured endocardial cells of the pig. *Br.J.Pharmacol.* 104 (1):21-24, 1991.
99. U. Flogel, U. K. Decking, A. Godecke, and J. Schrader. Contribution of NO to ischemia-reperfusion injury in the saline-perfused heart: a study in endothelial NO synthase knockout mice. *J.Mol.Cell Cardiol.* 31 (4):827-836, 1999.
100. M. M. Kostic and J. Schrader. Role of nitric oxide in reactive hyperemia of the guinea pig heart. *Circ.Res.* 70 (1):208-212, 1992.
101. A. J. Brady, J. B. Warren, P. A. Poole-Wilson, T. J. Williams, and S. E. Harding. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am.J.Physiol* 265 (1 Pt 2):H176-H182, 1993.
102. J. L. Balligand, L. Kobzik, X. Han, D. M. Kaye, L. Belhassen, D. S. O'Hara, R. A. Kelly, T. W. Smith, and T. Michel. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling

is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J.Biol.Chem.* 270 (24):14582-14586, 1995.

103. Y. Henry, M. Lepoivre, J. C. Drapier, C. Ducrocq, J. L. Boucher, and A. Guissani. EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J.* 7 (12):1124-1134, 1993.

104. U. Flogel, A. Godecke, L.O. Klotz and J. Schrader. Role of Myoglobin in the antioxidant defense of the heart. *The FASEB Journal*, Vol.18, 1156-1158, July 2004.

105. W. J. Paulus and J. G. Bronzwaer. Myocardial contractile effects of nitric oxide. *Heart Fail.Rev.* 7 (4):371-383, 2002.

106. J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, and B. A. Freeman. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87 (4):1620-1624, 1990.

107. A. Godecke, U. Flogel, K. Zanger, Z. Ding, J. Hirchenhain, U. K. Decking, and J. Schrader. Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (18):10495-10500, 1999.

108. S. Krishnagopalan, A. Kumar, J. E. Parrillo, and A. Kumar. Myocardial dysfunction in the patient with sepsis. *Curr.Opin.Crit Care* 8 (5):376-388, 2002.

109. L. B. Garner, M. S. Willis, D. L. Carlson, J. M. DiMaio, M. D. White, D. J. White, G. A. Adams, J. W. Horton, and B. P. Giroir. Macrophage migration inhibitory factor is a cardiac-derived myocardial depressant factor. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 285 (6):H2500-H2509, 2003.

110. W. J. Paulus, P. J. Vantrimpont, and A. M. Shah. Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion. *Circulation* 89 (5):2070-2078, 1994.

111. D. Brealey, S. Karyampudi, T. S. Jacques, M. Novelli, R. Stidwill, V. Taylor, R. T. Smolenski, and M. Singer. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 286 (3):R491-R497, 2004.
112. J. A. Watts, J. A. Kline, L. R. Thornton, R. M. Grattan, and S. S. Brar. Metabolic dysfunction and depletion of mitochondria in hearts of septic rats. *J.Mol.Cell Cardiol.* 36 (1):141-150, 2004.
113. S.Fujita, D. L. Roerig, Z. J. Bosnjak, and D. F. Stowe. Effects of vasodilators and perfusion pressure on coronary flow and simultaneous release of nitric oxide from guinea pig isolated hearts. *Cardiovasc.Res.* 38 (3):655-667, 1998.
114. H. S. Silverman and M. D. Stern. Ionic basis of ischaemic cardiac injury: insights from cellular studies. *Cardiovasc.Res.* 28 (5):581-597, 1994.
115. T. Ishida, K. Yarimizu, D. C. Gute, and R. J. Korthuis. Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock* 8 (2):86-94, 1997.
116. J. A. Ismail and K. H. McDonough. The role of coronary flow and adenosine in postischemic recovery of septic rat hearts. *Am.J.Physiol* 275 (1 Pt 2):H8-14, 1998.
117. R. D. Lasley and R. M. Mentzer, Jr. Adenosine improves recovery of postischemic myocardial function via an adenosine A1 receptor mechanism. *Am.J.Physiol* 263 (5 Pt 2):H1460-H1465, 1992.
118. R. Tabrizchi. The influence of tumour necrosis factor-alpha on the cardiovascular system of anaesthetized rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 363 (3):307-321, 2001.
119. E. S. Cohen, W. R. Law, C. R. Easington, K. Q. Cruz, B. A. Nardulli, R. A. Balk, J. E. Parrillo, and S. M. Hollenberg. Adenosine deaminase inhibition attenuates microvascular dysfunction and improves survival in sepsis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 166 (1):16-20, 2002.

7. Materialienliste

Medikamente

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

Nahtmaterial

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

Kanülen

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

Instrumente

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

Katheter

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

Infusionspumpe

Precidor Infors Ag Basel

Mikroskop

Leica MZ 9-5

Waagen

Sartorius Feinwaage
Sartorius Mikrowaage

Rasiergerät

Aesculap Favorita II Typ GT109

Chemikalien:

Merck KGaA, Darmstadt

NaCL M=58.44g/mol

Kaliumdihydrogenphosphat M 136,09g/mol KH₂PO₄

Calciumchlorid Dihydrat CaCl₂ *2h₂O M=147.02 g/mol

Kaliumchlorid M=74,56 g/mol

Natriumhydrogencarbonat NaHCO₃ M=84.01g/mol

Sigma Chemical Company:

Magnesium Sulfat FW 246.5

Pyruvat FW 110,0

Calbiochem:-Novabiochem Corp. D+Glucose MW 198.2

Verstärkermodule:

ECGA Modul Typ 689, Erfassung und Verstärkung von EKG Signalen

OPPM Typ 697: Messung des Sauerstoffpartialdruck unter Verwendung einer Clark Meßelektrode

Transit Time Flowmeter TTFM Typ 700: Ultraschall Flußmeßgerät, einkanal
Trasonic Ultraschall Transit Time Flu0meßgerät. Pulsatiler Ausgang, Anschluß an
PC

Transducer Amplifier Modul TAM A (Analog), universelle
Gleichspannungsmeßbrücke+ohmscher Meßwertaufnehmer; Messung von Kraft,
Druck oder Weg, Verstärkung in großem Bereich (x2,x3,...,x10000), Ausgangsfilter
100-300Hz dient der Glättung des Signalverlaufs

8. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. P. Hanrath für die Überlassung der Arbeit, seine wohlwollende Unterstützung sowie seine gutachterliche Tätigkeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Marc Merx für die arbeits- und zeitintensive Unterstützung dieser Arbeit. Dank seines hervorragenden fachlichen Wissens und seiner kollegialen, freundlichen Laborleitung ließ ich mich angesichts der kleinen und großen Schwierigkeiten beim Durchführen dieser Arbeit nicht entmutigen.

Den weiteren Doktoranden Cornelia Stüttgen und Michael Goldnau danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit, ebenso wie den weiteren Mitarbeiterinnen des Labors, besonders Berit Peters, Stefanie Becher und Irina Moshkova.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir mein Studium der Medizin ermöglicht haben und mich immer bei der Durchführung dieser Arbeit wie auch im Berufsleben jederzeit unterstützt haben.

Bei ihnen, meiner Familie, Sandra Stein und meinen Freunden und Verwandten bedanke ich mich für ihr Verständnis, ihre Geduld und ihre aufbauenden Worte.

9. Curriculum Vitae

Jens Kellinghaus

15.06.1976	Geboren in Mettingen, Westfalen
1982-1986:	Besuch der Ludgeri-Grundschule in Mettingen
1986-1995:	Besuch des Kardinal von Galen Gymnasiums in Mettingen
Oktober 1996:	Beginn des Medizinstudiums an der RWTH Aachen
August 1998:	Physikum
August 1999:	1. Staatsexamen
März 2002:	2. Staatsexamen
November 2003:	3. Staatsexamen
Januar 2004:	Beginn des AiP in der Abteilung für Unfallchirurgie im Krankenhaus Marienhöhe in Würselen
Oktober 2004:	Weiterbeschäftigung in selbiger Abteilung als Assistenzarzt
November 2005:	Fortführung der Facharztausbildung in der Abteilung für Orthopädie des St. Franziskus Hospitals in Köln