

**Mechanismen der protektiven Wirkung des  
Adenosinanalogs 3-Deazaadenosin  
bei der Lipopolysaccharid induzierten  
septischen Kardiomyopathie**

**INAUGURALDISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von  
SIMON DIETRICH  
aus Fulda**

**Gießen 2006**

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
des Universitätsklinikums Gießen  
Medizinische Klinik I, Abteilung Kardiologie/Angiologie  
Leiter: Prof. Dr. med. H. Tillmanns**

**Gutachter: PD Dr. R. Braun-Dullaes  
Gutachterin: PD Dr. J. Michel-Behnke**

**Tag der Disputation: 17.01.2007**

**Meinen Eltern und Großeltern gewidmet**

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
2.1	<b>Sepsis und das Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS)</b>	<b>3</b>
2.1.1	Epidemiologie	3
2.1.2	Allgemeine therapeutische Ansätze	4
2.2	<b>Definition der Sepsis</b>	<b>4</b>
2.3	<b>Pathophysiologie des SIRS unter besonderer Berücksichtigung der septischen Kardiomyopathie</b>	<b>5</b>
2.4	<b>Adhäsionsmoleküle</b>	<b>7</b>
2.5	<b>Nuklear Faktor <math>\kappa</math>B (Nf-<math>\kappa</math>B)</b>	<b>8</b>
2.6	<b>Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math> und Interleukin-1<math>\beta</math></b>	<b>9</b>
2.7	<b>Stickstoffmonoxid</b>	<b>9</b>
2.8	<b>Reaktive Sauerstoffradikale und NADPH-Oxidase</b>	<b>11</b>
2.9	<b>3-Deazaadenosin</b>	<b>12</b>
2.10	<b>Zielsetzung</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN UND MATERIALIEN</b>	<b>16</b>
3.1	<b>Tiere</b>	<b>16</b>
3.2	<b>Allgemeiner Versuchsaufbau</b>	<b>16</b>
3.3	<b>Immunhistochemische Untersuchungen</b>	<b>17</b>
3.3.1	Präparation	17
3.3.2	Aufarbeitung	17
3.3.3	Alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase-Technik (APAAP)	17
3.3.4	Immunhistochemische Färbung	18
3.3.5	Auswertung der immunhistochemischen Schnitte	20
3.3.6	Verwendete Antikörper	20
3.3.7	Sonstige Reagenzien und Materialien	21
3.4	<b>Quantifizierung und Visualisierung von Stickstoff (NO) in den Kapillaren des Myokards</b>	<b>22</b>
3.4.1	Präparation und Aufarbeitung des Gewebes	22
3.4.2	Messung der Fluoreszenzintensität	22
3.5	<b>Quantifizierung Reactive Oxygen Species (ROS) produzierender Leukozyten</b>	<b>23</b>
3.5.1	Präparation und Aufarbeitung des Gewebes	23
3.5.2	Analyse	23

<b>3.6</b>	<b>FACS-Analyse</b>	<b>23</b>
3.6.1	Vorbereitung der Proben	23
3.6.2	Messung	24
<b>3.7</b>	<b>Kernextraktion und Electrophoretic Mobility Shift Analysis (EMSA)</b>	<b>25</b>
<b>3.8</b>	<b>Rezepturen der eingesetzten Lösungen</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>30</b>
5.1	Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle	30
5.2	Myokardiale Leukozytenakkumulation	34
5.3	Leukozytäre NO- und ROS-Produktion	37
5.4	Effekt von c3Ado auf die endotheliale Stickstoffproduktion in den Kapillaren des Myokards	42
5.5	Expression von CD11b auf der leukozytären Seite	44
5.6	NF- $\kappa$ B Aktivierung	46
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>47</b>
6.1	3-Deazaadenosin hemmt die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 am Endothel und die Leukozytenmigration ins Myokard	47
6.2	Die Expression von P-Selektin wird durch c3Ado nicht beeinflusst	49
6.3	Untersuchung zur leukozytären Seite der Leukozyten-Endothel-Interaktion bei Sepsis	49
6.4	Einfluss von c3Ado auf iNOS und eNOS	50
6.5	Wirkung von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) und ROS auf die septische Kardiomyopathie	52
6.6	3-Deazaadenosin hemmt die NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität	53
6.7	Kritische Betrachtung einer möglichen klinischen Relevanz von c3Ado	55
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>58</b>

**10 DANKSAGUNG**

**70**

**11 LEBENSLAUF**

**71**

# 1 Abkürzungsverzeichnis

AdoHcy	S-Adenosylhomocystein
AdoMet	S-Adenosylmethionin
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
c3Ado	3-Deazaadenosin
c3AdoHcy	3-Deazaadenosylhomocystein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD11b	Cluster of Differentiation 11b
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DNA	Desoxyribonucleid Acid
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FACS	Fluorescence Aktivated Cell Scanner
F <sub>ab</sub>	antigenbindende Fragmente
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Hcy	Homocystein
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
iNOS	induzierbare NO-Synthase
i.p.	intraperitoneal
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
MDS	Myocardial Depressant Substance
Met	Methionin
MODS	Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
nNOS	neuronale NO-Synthase
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
ROS	Reactive Oxygen Species, Sauerstoffradikale

SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

## **2 Einleitung**

### **2.1 Sepsis und das Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS)**

#### **2.1.1 Epidemiologie**

In einer von Angus 2001 veröffentlichten Studie wurden die Inzidenz, die Kosten und das Outcome der Patienten mit schwerer Sepsis mittels Auswertung der Krankenhausdatenbank des Jahres 1995 in sieben Bundesstaaten der USA ermittelt.

Die Inzidenz lag bei drei Erkrankungen pro 1000 Einwohner. Die mittleren Fallkosten betragen 22100 \$ pro Patient bei einem durchschnittlichen Krankenhausaufenthalt von 19,6 Tagen. Das mittlere Alter der Patienten lag bei 63,8 Jahren und zeigt, dass das Krankheitsbild der schweren Sepsis vor allem den älteren Patienten betrifft. Die Gesamtmortalitätsrate lag bei 28,6 % (5).

Martin et al. werteten für ihre epidemiologischen Untersuchungen zur Sepsis Daten aus Entlassungsakten aus, die zwischen den Jahren 1979 und 2000 erhoben worden waren. In dem beobachteten Zeitraum zeigte sich ein Anstieg der Inzidenz der Sepsis von 0,8 auf 2,4 Fälle pro 1000 Einwohner. Die Gesamtmortalität war jedoch über den beobachteten Zeitraum abfallend. Bis zum Jahr 1984 konnten noch gramnegative Bakterien als dominierende Organismen nachgewiesen werden, in den nachfolgenden Jahren waren dies grampositive Bakterien. Die Daten für das Jahr 2000 zeigten folgende Verteilung der nachgewiesenen Mikroorganismen: 52,1 % grampositive Bakterien, 37,6 % gramnegative Bakterien, 4,7 % Mischinfektionen, 1 % Anaerobier und 4,6 % Pilze (86).

Für Deutschland werden jährlich circa 44000 bis 95000 Fälle von schwerer Sepsis geschätzt (91). In einer von Moerer an drei deutschen Intensivstationen durchgeführten retrospektiven Studie war der durchschnittliche Aufenthalt 16,6 Tage, die durchschnittlichen Kosten lagen bei ca. 23000 € pro Patient und die Mortalität der Patienten mit schwerer Sepsis betrug 42,6 %.

Der Zeitpunkt der Diagnosestellung und der frühzeitige Beginn der Therapie waren entscheidende Faktoren für die Prognose (91).

### **2.1.2 Allgemeine therapeutische Ansätze**

Man unterscheidet bei der Therapie der Sepsis zwischen kausalen Maßnahmen auf der einen Seite und supportiven Maßnahmen auf der anderen Seite.

Kausale Maßnahmen wie antimikrobielle Therapie und chirurgische Intervention dienen der Herdsanierung.

Supportive Maßnahmen umfassen z.B. die Beatmungs- und Kreislauftherapie mit Volumenersatz, Transfusionstherapie und Katecholamineinsatz. Durch eine frühe Therapie der gestörten Hämodynamik soll vor allem ein Organversagen verhindert werden. Ziel der supportiven Maßnahmen ist die Sicherstellung eines adäquaten Volumenstatus, Sauerstoffangebots und Perfusionsdrucks.

Gerade bei der kausalen Therapie ist ein möglichst schnelles Eingreifen überaus wichtig, da jede Verspätung die Prognose des Patienten verschlechtert. Sie stellt den wichtigsten therapeutischen Ansatz dar.

Eine weitere Option sind adjunktive oder adjuvante Therapiemaßnahmen.

Darunter werden Maßnahmen zur Toxinneutralisation und -elimination, zur Immunregulation und Hemmung der Entzündungsreaktion zusammengefasst (63, 132). Im Blickpunkt immunmodulatorischer Therapieansätze der Sepsis stehen u.a. TNF- $\alpha$ -Antikörper, IL-1-Rezeptorantagonisten, Glucokorticoide, Immunglobuline und Radikalfänger.

## **2.2 Definition der Sepsis**

In einer Konsensuskonferenz wurde 1991 von zwei großen amerikanischen Fachgesellschaften, dem American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM), die Sepsis als die systemische Reaktion auf eine Infektion definiert. Schwere Sepsis ist assoziiert mit Organdysfunktion, von einem septischen Schock spricht man bei Hypotonie trotz adäquater Volumensubstitution.

Der Begriff SIRS wurde als eine eigenständige, systemisch inflammatorische Reaktion auf verschiedenartige infektiöse und nichtinfektiöse Stimuli definiert. Nichtinfektiöse Stimuli können beispielsweise Verbrennungen, Traumen oder eine Pankreatitis sein.

Für die Diagnose Sepsis muss eine Infektion die Ursache des SIRS sein.

Ein SIRS liegt vor, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt werden (16):

- Körpertemperatur  $> 38^{\circ}\text{C}$  oder  $< 36^{\circ}\text{C}$

- Herzfrequenz > 90/min
- Atemfrequenz > 20/min oder arterieller Kohlendioxidpartialdruck ( $P_aCO_2$ ) < 32 mmHg
- Leukozytenzahl > 12.000/ $\mu$ l oder < 4000/ $\mu$ l bzw. > 10 % unreife Neutrophile im Differentialblutbild

Diese Kriterien sind seitdem besonders in klinischen Studien als Grundlage für Einschlusskriterien verwendet worden und haben eine große Verbreitung.

Im Jahr 2001 wurde in der „International Sepsis Definitions Conference“ von mehreren nordamerikanischen und europäischen Fachgesellschaften versucht, die Stärken und Schwächen der aktuellen Definitionen aufzuzeigen und Verbesserungsmöglichkeiten zu erarbeiten (82). Es zeigten sich einige Kritikpunkte: Ein präzises Staging des Patienten und Prognoseaussagen sind nicht möglich. Außerdem sind die Kriterien zwar sehr sensitiv, aber nicht spezifisch. Insgesamt kam man zu dem Entschluss, dass die derzeitigen Konzepte der Sepsis, der schweren Sepsis und des septischen Schocks für Klinik und Forschung weiter nützlich sind, in Zukunft aber biochemische und immunologische Marker zu einer Änderung der Sepsisdefinition führen könnten. Um auf dieser Grundlage Änderungen durchführen zu können, muss das Verständnis der immunologischen und biochemischen Charakteristika jedoch weiter verbessert werden.

### **2.3 Pathophysiologie des SIRS unter besonderer Berücksichtigung der septischen Kardiomyopathie**

Im derzeitigen Konzept des SIRS führen infektiöse oder nicht infektiöse Stimuli zu einer Aktivierung des unspezifischen Abwehrsystems und lösen eine mediatorvermittelte Abwehrkaskade aus. Beteiligt sind sowohl das humorale Abwehrsystem mit dem Komplement- und Gerinnungs-/Fibrinolyse-System als auch das zelluläre Abwehrsystem.

Mediatorzellen beim zellulären Abwehrsystem sind zirkulierende oder gewebsständige Abwehrzellen wie Monozyten/Makrophagen und polymorphkernige Neutrophile. Aber auch Endothelzellen spielen eine wichtige Rolle. Die Regulation und Koordination einer Immunantwort durch Zytokine oder andere Mediatoren ist für den Körper zwar essentiell, eine überschießende Freisetzung führt jedoch zu Zell- und Organschäden. Es resultiert ein mediatorinduziertes Multiorgan dysfunktionsyndrom (MODS). Bei den primären Mediatoren handelt es sich um proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Interleukin-1

und Interleukin-6. Durch die primären Mediatoren werden sekundäre Mediatoren freigesetzt, zu denen auch Sauerstoffradikale und Stickstoffmonoxid gehören.

Stimulus einer solchen Aktivierung von Mediatorzellen können alle Klassen von Mikroorganismen, aber auch isolierte bakterielle Toxine wie Lipopolysaccharid (LPS) sein. Lipopolysaccharid, sogenanntes Endotoxin, ist Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Es wird nach bakteriellem Zerfall freigesetzt, gelangt in die Zirkulation und entwickelt so seine Toxizität. Die in dieser Arbeit angewandte intraperitoneale Applikation von LPS ist ein etabliertes Sepsis-Modell (33, 41, 44).

Bestandteil des MODS bei Sepsis ist eine Dysfunktion des Herzens, die als septische Kardiomyopathie bezeichnet wird. Analog dazu wird eine Myokardschädigung bei nicht infektiöser Ursache als SIRS-Kardiomyopathie bezeichnet (94). Ursache der myokardialen Dysfunktion und Kardiodepression ist die am Ende einer mediatorvermittelten Kaskade stehende Kontraktilitätsstörung der Kardiomyozyten, die durch eine Störung der Calciumfreisetzung und Desensibilisierung der Myofilamente gegenüber Calcium hervorgerufen wird (94).

Die Ausprägung der Myokarddepression im Rahmen der akuten septischen Kardiomyopathie ist mitbestimmend für die Prognose. Etwa 10% aller Sepsis-Todesfälle sind allein auf die Folgen einer nicht kontrollierbaren, schwersten akuten septischen Kardiomyopathie zurückzuführen (106).

Aus der Myokardschädigung bei der akuten septischen Kardiomyopathie resultiert eine im Verhältnis zum systemischen Gefäßwiderstand verminderte Pumpfunktion (15).

Das Herzzeitvolumen ist beim septischen Patienten meist normal oder sogar leicht erhöht (127). Da die Sepsis mit Tachykardie einhergeht, ist trotz des erhöhten Herzzeitvolumens das Schlagvolumen normal oder eher niedrig. Der zur Aufrechterhaltung eines ausreichenden Mitteldrucks erforderliche Anstieg des Herzzeitvolumens bei zunehmender sepsisbedingter Vasodilatation kann zwar von einem gesunden Herzen erbracht werden, im Rahmen einer Sepsis werden die notwendigen Herzzeitvolumina in der Regel jedoch nicht erreicht (95).

Es zeigt sich eine Verminderung der links- und rechtsventrikulären Auswurfraction bei gleichzeitiger Dilatation beider Ventrikel, das enddiastolische Volumen ist erhöht (104, 107). Die Dilatation des linken Ventrikels geht ohne eine entsprechende Erhöhung des enddiastolischen Druckes einher, was auf eine erhöhte Ventrikelcompliance schließen lässt (94). In Studien konnte gezeigt werden, dass das Auftreten einer linksventrikulären Dilatation mit einer besseren Prognose und verminderten Mortalität einhergeht, was zu der Hypothese geführt hat, dass die beobachtete Dilatation als Kompensationsmechanismus gegen die

myokardiale Dysfunktion entsprechend des Frank-Starling-Mechanismus zu verstehen ist. Der linke Ventrikel kann dabei über die vermehrte diastolische Füllung ein größeres Schlagvolumen aufrecht erhalten (98, 103). Kommt es im Rahmen der Sepsis zu einem ARDS (Adult Respiratory Distress Syndrom), bewirkt die rechtsventrikuläre Dysfunktion infolge der pulmonalen Hypertonie über die Abnahme des Füllungsdrucks eine zusätzliche linksventrikuläre Verschlechterung (46, 75, 76). Typischerweise tritt die kardiale Dysfunktion beim septischen Schock innerhalb der ersten 24 Stunden auf und ist bei den Überlebenden innerhalb von 7 bis 10 Tagen reversibel (38, 103, 105).

## **2.4 Adhäsionsmoleküle**

Die endothelial gesteuerte Adhäsion und Transmigration von Neutrophilen aus der Blutbahn in das Gewebe ist ein zentraler Mechanismus der körpereigenen Abwehr gegen eine bakterielle Infektion. Durch Bakterien und proinflammatorische Mediatoren wie TNF- $\alpha$  und IL-1 kommt es zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen und Liganden auf den Endothelzellen und den polymorphkernigen Neutrophilen (21, 137).

Viele der proinflammatorischen Mediatoren, die zu der gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen führen, sind bei Patienten mit Sepsis oder septischen Schock erhöht (32, 85).

Die Transmigration von Neutrophilen erfolgt in drei Schritten, bei denen unterschiedliche Familien von Zelloberflächen-Rezeptoren beteiligt sind: Selektine, Integrine und Immunglobuline.

Das Rollen (rolling) stellt den ersten Schritt dar. Die in der Blutbahn zirkulierenden Neutrophilen gehen dabei eine reversible Bindung mit der Gefäßwand ein. Diese Bindung wird über die Gruppe der Selektine vermittelt. Beteiligt sind L-Selektin, das auf den Neutrophilen exprimiert wird, sowie P-Selektin und E-Selektin auf der endothelialen Seite. L-Selektin wird auf den Leukozyten konstitutiv exprimiert, P-Selektin wird vorgebildet und in den  $\alpha$ -Granula von Blutplättchen oder den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen gespeichert. E-Selektin wird ausschließlich von Endothelzellen nach Aktivierung durch Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 gebildet (11, 48).

Die durch die Selektine vermittelte Bindung an das Endothel ist locker, so dass die Neutrophilen durch die Scherkräfte des Blutflusses entlang des Endothels „rollen“.

Im nächsten Schritt kommt es zu einer Hochregulation und Aktivierung der  $\beta$ 2-Integrine (CD11a/18, CD11b/18 und CD11c/18) auf den Neutrophilen. Durch Bindung der aktivierten Integrine an die Rezeptoren ICAM-1 und ICAM-2 auf der endothelialen Seite kommt es zu einer festen Adhäsion der Neutrophilen an der Gefäßwand. ICAM-1 und ICAM-2 gehören zu der Familie der Immunglobuline. ICAM-2 wird konstitutiv exprimiert, während ICAM-1 neben einer geringen konstitutiven Expression zusätzlich durch Mediatorstimulation induziert und hochreguliert wird (36). Auch das vaskuläre Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) ist im Zusammenspiel mit ICAM-1 an der Bindung von Neutrophilen beteiligt (70). VCAM-1 ist wie ICAM-1 induzierbar und gehört ebenfalls der Immunglobulin-Superfamilie an (28). VCAM-1 ist sowohl an der primären lockeren Adhäsion (rolling) als auch der finalen Phase der Adhäsion mit fester Bindung beteiligt (4). Während der Aktivierung und Transmigration können die extrazellulären Domänen von L-, P- und E-Selektin sowie ICAM-1 als lösliche Formen im Blut erscheinen (12).

Der festen Bindung der Neutrophilen an die Gefäßwand folgt als dritter Schritt die Transmigration. Dabei wandern die Neutrophilen mittels interzellulärer Bindung durch die Endotheloberfläche in die extrazelluläre Matrix. Dieser letzte Schritt der Migration wird durch PECAM (platelet endothelial adhesion molecule),  $\alpha$ v $\beta$ 3 und IAP (integrin associated protein) vermittelt, die alle sowohl auf den Neutrophilen als auch auf der endothelialen Seite exprimiert werden.

In dieser Arbeit wurden immunhistochemische Färbemethoden zur Quantifizierung der Expression von ICAM-1, VCAM-1 und P-Selektin am Endothel eingesetzt.

Färbungen gegen CD11b dienen zur Darstellung von aktivierten Granulozyten und Makrophagen, für die Monozyten-Makrophagen-Linie wurde ED1 als spezifischer Marker verwendet.

## **2.5 Nuklear Faktor $\kappa$ B (Nf- $\kappa$ B)**

Die Synthese von Messenger-RNA aus der DNA im Zellkern wird als Transkription bezeichnet. Die Transkription wird von Proteinen kontrolliert, die als Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden. Nf- $\kappa$ B als Transkriptionsfaktor wurde erstmals als Regulator bei der Expression von kappa-Leichtketten in B-Lymphozyten identifiziert (115). Zu den Entzündungsmediatoren, die von Nf- $\kappa$ B reguliert werden, gehören unter anderem TNF- $\alpha$  und IL-1. Aber auch Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 und die Genexpression von

iNOS werden über Nf- $\kappa$ B reguliert (26, 134). Nf- $\kappa$ B besteht aus den zwei Untereinheiten p50 und p65, die entweder homozygot (p50/p50) oder heterozygot (p65/p50) vorliegen können. In der nicht-stimulierten Zelle liegt Nf- $\kappa$ B durch die Bindung an das Inhibitorprotein  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) inaktiv im Zytoplasma vor. I $\kappa$ B maskiert die nukleare Translokationssequenz von Nf- $\kappa$ B, wodurch Nf- $\kappa$ B im Zytoplasma verbleibt. Bei Stimulation der Zelle kommt es durch die I $\kappa$ B Kinase (IKK) zur Phosphorylierung von I $\kappa$ B, was über eine Degradation zur Demaskierung der Translokationssequenz von Nf- $\kappa$ B führt. Dies erlaubt nun Nf- $\kappa$ B vom Zytoplasma in den Zellkern zu gelangen und ermöglicht die Transkription des entsprechenden Gens. Proinflammatorische Faktoren wie TNF- $\alpha$  und IL-1, die über Nf- $\kappa$ B reguliert werden, führen ihrerseits wieder zu einer Aktivierung von Nf- $\kappa$ B. Somit spielt Nf- $\kappa$ B eine Schlüsselrolle in der Regulation von Entzündungsreaktionen.

## **2.6 Tumornekrosefaktor- $\alpha$ und Interleukin-1 $\beta$**

TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  werden vorwiegend von aktivierten Makrophagen und Monozyten sezerniert. Da Makrophagen ubiquitär vorkommen, ist eine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Produktion in nahezu allen Organen möglich. Endotoxin ist eines von mehreren klinisch relevanten Stimulantien, die zu einer TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Produktion führen. Meng et al. konnten zeigen, dass es bei LPS- behandelten Ratten nach einer Stunde zu einem Anstieg des zirkulierenden und myokardialen TNF- $\alpha$  kam. Nach 4 Stunden konnte eine Verschlechterung der myokardialen Kontraktilität nachgewiesen werden. Durch Behandlung mit TNF- $\alpha$  inhibierenden oder neutralisierenden Substanzen konnte die Kontraktilität erhalten bleiben (90). TNF- $\alpha$  wirkt sowohl in vitro an isolierten Kardiomyozyten als auch in vivo kardiodepressiv (69, 96, 99). Chain et al. konnten zeigen, dass TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  getrennt voneinander humane Myokardzellen schädigen, aber auch synergistisch wirken (22). TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  besitzen über mehrere Signaltransduktionswege negativ inotrope Wirkmechanismen.

## **2.7 Stickstoffmonoxid**

Schon 1980 konnten Furchgott und Zawadzki zeigen wie bedeutungsvoll Endothelzellen bzw. die von ihnen ausgeschütteten Substanzen für die Vasodilatation an der glatten Gefäßmuskulatur sind (45). Furchgott bezeichnete diese Substanz als endothelium-derived

relaxing factor (EDRF). 1987 kamen Furchgott und Ignarro unabhängig zu der Erkenntnis, dass EDRF und NO identisch sind (65). NO entsteht bei der Umsetzung von L-Arginin in L-Citrullin durch die Stickstoffsynthasen (NOS).

Man unterscheidet drei Isoformen der NO-Synthasen:

- neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS I)
- induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS II)
- endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS III)

Man unterteilt die NO-Synthasen in konstitutive NOS (nNOS und eNOS) und induzierbare NOS (iNOS). NO besitzt im Gegensatz zu anderen Signalmolekülen keinen spezifischen Oberflächenrezeptor, sondern diffundiert durch die biologischen Membranen. Über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) wird die Umsetzung von Guanosintriophosphat (GPT) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) katalysiert.

Der Anstieg von cGMP bewirkt in der glatten Gefäßmuskelzelle über Phosphorylierungsreaktionen eine Verringerung des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Gehalts, was zur Relaxation führt. Die Produktion kleiner NO-Mengen, die regulative Effekte auf Vasodilatation, Plättchenaggregation und myokardiale Kontraktion zu haben scheinen (8, 62), erfolgt über die Calcium/Calmodulin-abhängige Aktivierung der konstitutiven NOS. Diese Aktivierung kann sehr schnell erfolgen, da keine Neusynthese der NOS notwendig ist. Frühe LPS induzierte und NO vermittelte kardiovaskuläre Veränderungen sind somit auf eine Aktivierung der eNOS zurückzuführen (108). Für die Aktivierung der Calcium/Calmodulin-unabhängigen induzierbaren NOS, die in Makrophagen, Neutrophilen und Mastzellen vorkommen, ist eine Proteinneusynthese erforderlich, die mehrere Stunden in Anspruch nimmt. Nach der Neusynthese können jedoch große Mengen Stickstoffmonoxids produziert werden, die z.B. zur Immunabwehr notwendig sind (19, 43, 50). Eine anhaltende massive Ausschüttung von NO führt jedoch zu verstärkter Vasodilatation mit Pooling im venösen Kapazitätsgefäßsystem, Blutdruckabfall und inadäquater Gewebsperfusion (92, 125) sowie Schädigung auf zellulärer Ebene (39, 102). Das zytotoxische Potential findet sich somit in der induzierbaren Form der NOS (iNOS), die eine wichtige Rolle in der Entwicklung des zirkulatorischen Versagens bei Sepsis und septischen Schock spielt.

Die NO vermittelte Zytotoxizität im Rahmen der unspezifischen Immunantwort gegen Bakterien beruht auf einer Hemmung des Elektronentransports der Atmungskette. Über eine reversible Hemmung des Komplex IV durch NO kommt es zu einer gesteigerten Produktion von Superoxid. NO kann mit Superoxid zu dem Radikal Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) reagieren. Peroxynitrit diffundiert in andere Zellen und wirkt dort stark zytotoxisch (10, 111). NO und

Peroxyinitrit wirken zusätzlich verstärkend auf die Synthese von TNF- $\alpha$  und IL-1, was möglicherweise auf Transkriptionsebene über Induktion von Nf- $\kappa$ B erfolgt (37, 78, 84).

Den Zusammenhang zwischen NO und seiner kardiodepressiven Wirkung beschreibt Müller-Werdan mit der „Endotoxin-TNF-NO-cGMP-Kaskade“ (94). Dabei stimuliert zirkulierendes Endotoxin die Monozyten/Makrophagen zur Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Über Stimulation der induzierbaren Stickoxid-Synthetase (iNOS) bewirken diese die Bildung von NO, welches wiederum die lösliche Guanylatzyklase der Kardiomyozyten stimuliert. Der Anstieg des zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) hemmt den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zelle und desensibilisiert die Myofilamente gegenüber Ca<sup>2+</sup>, was letztendlich zur Kardiodepression führt.

## 2.8 Reaktive Sauerstoffradikale und NADPH-Oxidase

Reaktive Sauerstoffderivate (ROS) sind Moleküle, die bei schrittweiser Reduktion von molekularem Sauerstoff entstehen. Zu den wichtigsten Molekülen zählen das Superoxidradikal (O<sup>2•-</sup>), Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und das Hydroxylradikal (HO•). Neben der mitochondrialen Atmungskette scheinen vor allem Cytochrom P450 abhängige Reaktionen, NADH/NADPH-Oxidasen oder auch NO-Synthasen als potente Quellen für Superoxid in Frage zu kommen (51, 133).

Eine potente enzymatische Quelle stellen vor allem neutrophile Granulozyten dar, die das Superoxid nutzen, um pathogene Erreger abzutöten. Eine Überproduktion der reaktiven Sauerstoffderivate aus diesen Zellen kann aber zu Gewebsschäden führen (130).

NADPH-Oxidasen sind eine Gruppe von plasmamembranassoziierten Enzymen, die unter Verwendung von NADPH als Elektronenspender die Produktion von Superoxid (O<sup>2•-</sup>) nach der Formel  $2 \text{O}_2 + \text{NADPH} \rightarrow 2 \text{O}_2^- + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$  katalysieren.

Die NADPH-Oxidase in Neutrophilen besteht aus 5 Untereinheiten: p40phox, p47phox, p67phox, p22phox, gp91phox. In der nicht-aktivierten Zelle liegen p40phox, p47phox und p67phox als Komplex im Zytosol vor, während p22phox und gp91phox in Vesikeln in der Zellmembran lokalisiert sind. p22phox und gp91phox zusammen werden auch als Cytochrom b558 bezeichnet. Bei der Aktivierung durch einen Stimulus wird die Komponente p47phox phosphoryliert und wandert in die Membran, wo sie sich mit dem Cytochrom b558-Komplex zur aktivierten Oxidase verbindet. An der Aktivierung sind ebenfalls zwei niedermolekulare Guanin-Nukleotid-bindende Proteine beteiligt (Rac2 und Rap1A). Neben der NADPH-

Oxidase in neutrophilen Granulozyten findet man auch in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen NADPH-Oxidasen. Diese unterscheiden sich jedoch deutlich von denen der Neutrophilen. Ihre Kapazität beträgt schätzungsweise nur etwa ein Drittel (52) und die Superoxid-Produktion hat eine wesentlich geringere Kinetik im Rahmen von Minuten bis Stunden. Ebenfalls scheint es bei der vaskulären NADPH-Oxidase eine konstitutive Aktivität zu geben, die man in Phagozyten nicht findet (101). Sauerstoffradikale scheinen auch in die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 involviert zu sein (24, 87). Die überschießende Produktion und Freisetzung von Sauerstoffradikalen während der unspezifischen zellulären Abwehr bei Entzündungsreaktionen wird als „oxidative burst“ bezeichnet. Die Sauerstoffradikale schädigen dabei zum einen direkt Zellmembranen und –organellen. Aber auch indirekt, als Substrat für Peroxynitrit, das aus der Verbindung von Superoxidradikalen mit Stickoxid entsteht, sind Sauerstoffradikale an Zell- und Gewebsschädigung beteiligt (10, 111, 121). So scheint die gesteigerte Generation von ROS im Myokard die Kontraktilität der Kardiomyozyten zu verschlechtern und zur kardialen Dysfunktion bei Sepsis beizutragen (72).

Aufgrund der äußerst kurzen Halbwertszeit von Sauerstoffradikalen ist eine direkte Messung nur sehr schwierig durchzuführen. Aus diesem Grund bedient man sich meistens indirekter Methoden, um den Nachweis einer vermehrten Freisetzung zu führen. In dieser Arbeit wurde Nitrobluetetrazolium (NBT) als indirekter Marker für eine ROS-Produktion verwendet. NBT reagiert mit ROS zu einem stabilen violetten Farbstoff.

## **2.9 3-Deazaadenosin**

Transmethylierungsprozesse, d.h. der Übergang einer Methylgruppe auf ein Akzeptormolekül, sind wichtige Reaktionsschritte u.a. bei Genexpression, Zellwachstum und Zelldifferenzierung.

Seitdem Mann und Mudd 1963 zeigen konnten, dass S-Adenosylhomocystein (AdoHcy) ein starker kompetitiver Inhibitor der Tyramin N-Methyltransferase ist (83) und in der Folge auch für weitere Methyltransferasen gezeigt werden konnte, dass sie durch AdoHcy gehemmt werden können, wurde nach einem synthetischen Analogon für AdoHcy gesucht. Die synthetischen Analoga zeigten in den meisten Fällen jedoch nicht die Effektivität der natürlichen Zusammensetzung. Aus diesem Grunde wurde als nächster Schritt nach einem Inhibitor der S-Adenosylhomocysteinhydrolase gesucht, um über die Enzyminhibition eine

Akkumulation des intrazellulären S-Adenosylhomocystein zu erreichen. Chiang et al. konnten zeigen, dass c3Ado ein potenter Inhibitor der S-Adenosylhomocysteinhydrolase ist (23).

3-Deazaadenosin ist Substrat der S-Adenosylhomocysteinhydrolase. Es reagiert mit Homocystein zu 3-Deazaadenosylhomocystein. Die Hydrolyse von S-Adenosylhomocystein in Adenosin und Homocystein als eigentliche Funktion der S-Adenosylhomocysteinhydrolase wird so inhibiert. Neben der Akkumulation von S-Adenosylhomocystein kommt es dadurch auch zu einer Anhäufung von 3-Deazaadenosylhomocystein. Dies unterscheidet c3Ado von anderen Inhibitoren der Methyltransferase, die an die S-Adenosylhomocysteinhydrolase binden, aber nicht als Substrat dienen. Ein Beispiel hierfür ist Neplanocin. 3-Deazaadenosin ist somit sowohl Inhibitor als auch Substrat (55, 110). Transmethylierungsreaktionen werden über diesen Mechanismus potent gehemmt. Somit hat c3Ado u.a. Einfluss auf die Methylierung von Phospholipiden, mRNA, DNA und Proteinen (35).

Abbildung 1 zeigt einen vereinfachten Ausschnitt der Transmethylierungsreaktion.

Für c3Ado konnte in vitro eine antivirale Aktivität gegen das Herpes simplex Virus, das Ebola Virus und das humane Immundefizienz-Virus nachgewiesen werden (64, 88, 93). c3Ado ist in der Lage, die Apoptose in humanen Leukämiezellen zu induzieren (74), das chemotaktische Potential von polymorphkernigen Neutrophilen zu schwächen (3, 47, 109), die Phagozytose von Makrophagen zu hemmen (120) und die LPS-induzierte Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 zu verhindern (67, 113). Des Weiteren inhibiert c3Ado in vitro (68) und in vivo die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle. Walker et al. konnten am Mausmodell die durch atherogene Diät induzierte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 durch Zugabe von c3Ado in das Futter inhibieren (129). Auch die Produktion von Superoxid wird durch c3Ado gehemmt (109, 135). Jeong et al. konnten zeigen, dass c3Ado die Transkriptionsaktivität von Nf $\kappa$ B inhibiert (66).

Die Inhibition der S-Adenosylhomocysteinhydrolase durch c3Ado bewirkt nicht nur eine Anhäufung von Adenosinhomocystein, sondern auch eine Verminderung von Homocystein. Ein Effekt, der c3Ado auch in dieser Hinsicht zu einer interessanten Substanz macht.

Die Hyperhomocysteinämie als ein unabhängiger Risikofaktor für thrombovaskuläre Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit und Atherosklerose rückt in den letzten Jahren immer mehr ins Blickfeld (42). Für c3Ado konnte gezeigt werden, dass atherosklerotische Plaques in apoE-defizienten Mäusen signifikant reduziert werden konnten. Der Homocystein-Spiegel im Serum war in der mit c3Ado behandelten Gruppe deutlich reduziert (79).



## 2.10 Zielsetzung

Trotz der Fortschritte in der Intensivmedizin bleibt die Mortalität von Patienten mit Sepsis hoch. In den letzten Jahren konnten neue Erkenntnisse der pathophysiologischen Abläufe bei Sepsis und septischer Kardiomyopathie gewonnen werden, die neue Therapieoptionen eröffnen. Besonderes Augenmerk wird dabei auf immunmodulatorische Substanzen gelegt. 3-Deazaadenosin ist als ein Inhibitor zellulärer Methylierungsprozesse bereits Gegenstand diverser Untersuchungen auf unterschiedlichen Forschungsgebieten gewesen. Besonders seine immunmodulatorischen und antiinflammatorischen Eigenschaften machen c3Ado zu einer interessanten Substanz im Hinblick auf die Beeinflussung der Entzündungskaskade bei Sepsis und SIRS.

In Untersuchungen im Rahmen dieser Studie konnten wir bereits zeigen, dass c3Ado die Lipolysaccharid induzierte Einschränkung der linksventrikulären Funktion am isoliert perfundierten Rattenherz sowohl in Ruhe als auch unter Katecholaminstimulation mit Adrenalin verhindern kann (18).

Unter Zuhilfenahme der Intravitalmikroskopie konnte im Bereich postkapillärer mesenterialer Venolen ein deutlicher Einfluss von c3Ado auf die endotheliale Adhärenz der Leukozyten gezeigt werden. Die vermehrte lokale Adhärenz und Diapedese von Leukozyten bei LPS behandelten Ratten konnte durch Zugabe von c3Ado signifikant gesenkt werden (18).

Mit dieser Arbeit sollten die Mechanismen der protektiven Wirkung von c3Ado bei der septischen Kardiomyopathie am Rattenmodell untersucht werden.

Folgende Fragestellungen standen dabei im Vordergrund:

- Lässt sich durch c3Ado die Expression von Adhäsionsmolekülen an Venolen des Myokards im Sepsismodell hemmen?
- Kann c3Ado die Extravasation und Akkumulation aktivierter Leukozyten im Myokard und eine überschießende lokale Freisetzung von NO und ROS verhindern?
- Hat c3Ado einen Effekt auf die NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität?

## **3 Methoden und Materialien**

### **3.1 Tiere**

Für alle Experimente wurden männliche Wistar Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht zwischen 250 g und 300 g verwendet.

### **3.2 Allgemeiner Versuchsaufbau**

Die Ratten wurden zufällig einer der folgenden Versuchsgruppen zugeteilt:

Gruppe 1: Kontrolle

Gruppe 2: 3-Deazaadenosin (c3Ado)

Gruppe 3: Lipopolysaccharid (LPS)

Gruppe 4: Lipopolysaccharid und 3-Deazaadenosin (LPS + c3Ado)

LPS (Lipopolysaccharid from *Escherichia coli* Serotype 0111:B4, Fa. Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) wurde in einer Dosis von 1mg/kg Körpergewicht, gelöst in 0,9 % NaCl (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland), intraperitoneal appliziert.

3-Deazaadenosin (Fa. Southern Research Institute, Birmingham, AL, USA) wurde in einer Dosis von je 10 mg/kg Körpergewicht 30 Minuten vor und 4 Stunden nach LPS Gabe, gelöst in 0,9 % NaCl, intraperitoneal verabreicht. Die Vorbehandlung wurde gewählt, um einen ausreichenden Wirkspiegel im Sinne eines Pretreatment-Modells vor der LPS-Applikation zu erreichen. Zusätzlich sollte eine mögliche Interaktion zwischen c3Ado und LPS bei gleichzeitiger Injektion verhindert werden.

Die Dosis von c3Ado wurde in Anlehnung an pharmakokinetische Untersuchungen von Coulombe et al. mit carbozyklischen 3-Deazaadenosin gewählt (29).

Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten lediglich die entsprechende Gesamtmenge 0,9 % NaCl. Acht Stunden nach LPS-Gabe wurden die Herzen für die weiteren Analysen entnommen. Während des gesamten Versuchs bestand keine Futter- oder Wasserrestriktion für die Tiere.

### **3.3 Immunhistochemische Untersuchungen**

#### **3.3.1 Präparation**

Die Tiere wurden durch Isofluran-Inhalation getötet. Von einer abdominalen Inzision ausgehend wurde mittels bilateraler Thorakotomie das Herz nach Eröffnung des Perikards und Mobilisation des Thymusgewebes unter Durchtrennung der großen Gefäße entnommen.

Die Herzen wurden anschließend in drei Teile geschnitten:

1. Basis (Vorhöfe und Basis der Ventrikel)
2. Mitte (Mittelteil der Ventrikel)
3. Apex (Ventrikelapex)

Der Mittelteil wurde zur weiteren Aufarbeitung in Tissue Tek (O.C.T. Compound, SAKURA, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und in 2-Methylbutan (Isopentan, FLUKA-Chemika, Buchs, CH) schockgefroren um Gefrierartefakte möglichst zu vermeiden.

2-Methylbutan wurde dazu in flüssigem Stickstoff bis kurz vor den Gefrierpunkt abgekühlt.

Die Aufbewahrung des Gewebes erfolgte anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.3.2 Aufarbeitung**

Aus dem Mittelteil des Ventrikels wurden mittels Kryostat (LEICA CM 1900, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland)  $6\ \mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **3.3.3 Alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase-Technik (APAAP)**

Die immunhistochemische Analyse wurde mittels APAAP-Verfahren durchgeführt. Diese Methode wurde 1984 durch Cordell et al. beschrieben (27).

Die APAAP-Methode ist eine non-kovalent gebundene alkalische Phosphatase-Technik, die in der Immunhistochemie eine breite Anwendung hat.

Bei dieser Färbemethode hydrolysiert das Enzym Naphtolphosphat das Substrat Ester zu Phenolkomponenten und Phosphaten. Die Phenole kuppeln mit farblosen Diazoniumsalzen (Chromogene) und bilden unlösliche Azofarbstoffe. Das verwendete Neufuchsin liefert ein rotes Reaktionsprodukt.

Eine endogene alkalische Phosphatase-Aktivität, die man beispielsweise in einigen Leukozyten findet, wird dabei durch Zusatz von Levamisol zur Substratlösung unterdrückt.

Bei der APAAP-Färbung wird ein Enzym-Immunkomplex, bestehend aus alkalischer Phosphatase und entsprechenden Antikörpern, benutzt. APPAP-Komplexe bauen sich aus zwei Molekülen alkalischer Phosphatase und einem dagegen gerichteten Antikörper auf. Der Antigennachweis erfolgt bei der APPAP-Methode indirekt.

Im ersten Schritt bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen.

Nachfolgend bindet ein ebenfalls unkonjugierter Sekundärantikörper an den Primärantikörper. Der Sekundärantikörper, der auch als Brückenantikörper bezeichnet wird, muss dabei im Überschuss vorliegen, so dass einer der beider  $F_{ab}$ -Arme an den Primärantikörper bindet, der andere  $F_{ab}$ -Arm hingegen zur Anlage des Antikörpers aus dem Enzym-Immunkomplex verfügbar ist. Nach der Anlage des Enzym-Immunkomplexes folgt die Substratlösung.

Das Endprodukt ist leuchtend rot.

Enzym-Immunkomplex-Methoden gehören zu den empfindlichsten immunhistochemischen Techniken. Die hohe Sensitivität ist vor allem auf eine größere Zahl von Enzymmolekülen, die pro Gewebsantigen zur Verfügung stehen, zurückzuführen.

### **3.3.4 Immunhistochemische Färbung**

Die Schnittpräparate wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, 10 Minuten in eiskaltem Aceton fixiert und anschließend luftgetrocknet.

Zur Blockade von Kreuzreaktionen wurden die Schnitte mit Rattenserum in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert.

Anschließend folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper für 45 Minuten in folgender Verdünnung:

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Mouse monoclonal anti-rat ICAM-1 (CD54)	1:100
Mouse monoclonal anti-rat OX-42 (CD11b)	1:20
Mouse monoclonal anti-rat ED1	1:50
Mouse monoclonal antibody 54.1 (gp91phox)	1:2000
Rabbit polyclonal anti-rat iNOS	1:500
Rabbit polyclonal anti-human CD62P (P-Selektin)	1:50
Goat polyclonal anti-human VCAM-1	1:20

Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 10 Minuten.

Für die monoklonalen Primärantikörper ICAM-1, CD11b, ED1 und gp91phox wurde ein rabbit anti-mouse IgG Sekundärantikörper, für iNOS und P-Selektin ein mouse anti-rabbit IgG Sekundärantikörper und für VCAM-1 ein mouse anti-goat Sekundärantikörper in folgenden Verdünnungen verwendet:

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung des Sekundärantikörpers</b>
ICAM-1	1:350
CD11b	1:100
ED1	1:50
gp91phox	1:400
iNOS	1:500
P-Selektin	1:600
VCAM-1	1:400

Für die polyklonalen Primärantikörper VCAM-1, P-Selektin und iNOS war ein zusätzlicher Verbindungsantikörper notwendig. Diese Schnitte wurden mit einem rabbit anti-mouse Verbindungsantikörper in einer Verdünnung von 1:350 für weitere 10 Minuten inkubiert.

Die Inkubation mit dem APAAP-Komplex erfolgte für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1:50. Zwischen jedem Inkubationsschritt wurden die Schnitte für 5 Minuten mit TRIS-Puffer gespült. Alle angegebenen Verdünnungen erfolgten mit RPMI als Medium.

Zur Auslösung der Färbereaktion wurden die Schnitte anschließend für 30 Minuten in der Neufuchsin-Lösung auf einem Schüttler entwickelt.

Nach Spülung mit Leitungswasser erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun für ca. eine Minute und die Eindeckung mit 45 ° C warmer Glyceringelantine.

### **3.3.5 Auswertung der immunhistochemischen Schnitte**

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch (LEICA DMRB, Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland).

Zur Quantifizierung der Expression von ICAM-1, VCAM-1 und P-Selektin wurde pro Herz an 100 Venolen des Myokards der Färbegrad anhand einer Skala von 1 bis 4 beurteilt.

Dazu wurde folgende Gradeinteilung verwendet:

1 = keine Färbung, 2 = schwach positiv, 3 = mäßig positiv, 4 = stark positiv.

Die Quantifizierung der CD11b-, ED1-, gp91phox- oder iNOS-positiven Leukozyten erfolgte durch Auszählung von 9 randomisierten Gesichtsfeldern bei einer 400fachen Vergrößerung. Dies entspricht ungefähr einer Fläche von 1 mm<sup>2</sup>.

Alle Auswertungen erfolgten geblindet.

### **3.3.6 Verwendete Antikörper**

#### **3.3.6.1 Primärantikörper**

Mouse monoclonal anti-rat ICAM-1(CD54) (Fa. Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan)

Mouse monoclonal anti-rat OX-42 (CD11b) (Fa. BMA, August, Schweiz)

Mouse monoclonal anti-rat ED1 (Fa. Serotec, Eching, Deutschland)

Mouse monoclonal antibody 54.1 (gp91phox) (James Burritt, Montana State University, Bozeman, USA)

Rabbit polyclonal anti-rat iNOS (Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland)

Rabbit polyclonal anti-human CD62P (P-Selektin) (Fa. Pharmingen, San Diego, CA, USA)

Goat polyclonal anti-human VCAM-1 (Fa. Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)

### **3.3.6.2 Sekundärantikörper**

Mouse Anti-Rabbit IgG (H+L) (Dianova, Hamburg, Deutschland)

Mouse Anti-Goat IgG (H+L) (Dianova, Hamburg, Deutschland)

Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L) (Dianova, Hamburg, Deutschland)

### **3.3.6.3 Verbindungsantikörper**

Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L) (Dianova, Hamburg, Deutschland)

### **3.3.6.4 APAAP**

APAAP-Komplex (mouse monoclonal antibody, Dianova, Hamburg, Deutschland)

### **3.3.7 Sonstige Reagenzien und Materialien**

Aceton (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

RPMI (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Rattenserum (Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland)

Hämalaunlösung nach Mayer (Mayers-Hämalaunlösung, Merck, Darmstadt, Deutschland)

Glyceringelantine (DAKO Glycergel, Mounting Medium, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA)

### **3.4 Quantifizierung und Visualisierung von Stickstoff (NO) in den Kapillaren des Myokards**

#### **3.4.1 Präparation und Aufarbeitung des Gewebes**

Pro Gruppe wurden vier Ratten durch Halothan-Inhalation getötet. Das Herz wurde mittels bilateraler Thorakotomie entnommen und sofort in eisgekühlte Krebs-Ringer-Lösung gegeben. Aus den Herzen wurden 2 je ca. 0,5 cm<sup>2</sup> große Gewebstücke entnommen und in Agarose (Agarose Low Melt Preparative, Bio-Rad Laboratories, USA) bei 37 ° C eingebettet. Nach Erstarrung der Agarose durch Abkühlung auf 4 ° C wurden mittels Vibratom (VT 1000S, Leica, Bensheim, Deutschland) 100 µm dicke Gewebsschnitte angefertigt und mit dem Stickstoffindikator 4,5-Diaminofluorescein-2 Diacetat (DAF-2DA, Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:1000 in RPMI Medium (GIBCO-BRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) für eine Stunde unter Normoxie bei 37 ° C inkubiert. NO reagiert mit DAF-2DA zu seinem fluoreszierenden Triazol-Derivat DAF-2T, wodurch die intrazelluläre NO-Produktion gemessen werden kann.

Die Schnitte wurden mit gepufferten 4 % Paraformaldehyd für 10 Minuten fixiert, zweimal je 5 Minuten in PBS gespült und mit gepufferten Glycerol eingedeckt.

#### **3.4.2 Messung der Fluoreszenzintensität**

Die Messung erfolgte mit einem konfokalen Lasermikroskop (confocal laser-scanning microscopy, Zeiss, Jena, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 488 nm. Die DAF-2T Fluoreszenzintensität wurde im Konfokal-Modus (pinhole = 30, 2 Sekunden Scan-Zeit, 20fach Objektiv, zweier Zoom) über 4 Bereichen pro Herz gemessen. Die Bereiche enthielten ausschließlich Kardiomyozyten und Kapillaren. Die Fluoreszenzintensität wurde anhand einer von 0 bis 255 begrenzten Grauwertskala quantifiziert.

## **3.5 Quantifizierung Reactive Oxygen Species (ROS) produzierender Leukozyten**

### **3.5.1 Präparation und Aufarbeitung des Gewebes**

Die Probenentnahme, Einbettung und Anfertigung der Gewebsschnitte erfolgte wie im vorherigen Abschnitt zur Stickstoffbestimmung beschrieben. Die 100 µm dicken Schnitte wurden mit NBT (nitrobluetetrazolium, Fa. Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg) in einer 1:5 Verdünnung mit RPMI Medium für eine Stunde unter Normoxie bei 37 ° C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit gepufferten 4 % Paraformaldehyd für 10 Minuten fixiert, 10 Minuten in PBS gespült und mit gepufferten Glycerol eingedeckt.

### **3.5.2 Analyse**

Die Analyse erfolgte durch lichtmikroskopische Auszählung NBT markierter Leukozyten in 9 randomisierten Gesichtfeldern pro Herz bei 100facher Vergrößerung, was ungefähr einer Fläche von 16 mm<sup>2</sup> entspricht.

## **3.6 FACS-Analyse**

### **3.6.1 Vorbereitung der Proben**

Pro Gruppe wurden fünf Tieren nach Eröffnung des Abdomens Vollblut aus der Vena cava inferior entnommen.

Jeweils 45 µl Vollblut wurden mit 5 µl des 1:100 verdünnten CD11b-Primärantikörpers (monoclonal mouse anti-rat antibody OX-42, BMA, Schweiz) versetzt und für 30 Minuten bei einer Temperatur von 4 ° C inkubiert. Danach wurden die Proben mit 2 ml 0,9 % NaCl aufgefüllt und bei einer Geschwindigkeit von 200 xg für 5 Minuten zentrifugiert.

Nach Abziehen des Überstandes wurde das Pellet resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 5 µl des FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-konjugierten Sekundärantikörpers (goat anti mouse IgG FITC-Conjugate, CALTAG Laboratories, Burlingame, CA, USA) zur Resuspension gegeben und für 30 Minuten bei 4 ° C inkubiert. Durch Zugabe von 300 µl destillierten Wassers wurde die Probe hämolysiert. Anschließend wurden die Proben mit 2 ml 0,9 % NaCl

aufgefüllt. Nach erneuter fünfminütiger Zentrifugation bei 200 xg wurde der Überstand abpipettiert. Dieser Reinigungsschritt wurde zweimal wiederholt.

Die Fixation erfolgte durch Zugabe von 500 µl 1 % PFA (Paraformaldehyd, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in PBS. Die Proben wurden bis zur Messung dunkel bei 4 ° C aufbewahrt.

### 3.6.2 Messung

Die FACS-Analyse (FACS-Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg; Software: Cell Quest) erfolgte durch Anregung mit Argon-Laser bei 488 nm, die Messung der Fluoreszenz bei 520 nm.

Abbildung 2 zeigt die charakteristische Aufteilung der Leukozytenpopulation der Proben. Der markierte Bereich stellt die Granulozytenpopulation dar. Die Messung der CD11b Expression erfolgte in diesem Bereich. Die Messung wurde für  $2 \times 10^3$  Zellen pro Probe durchgeführt. Pro Tier wurden 3 Proben gemessen und der Mittelwert der Meßergebnisse gebildet.

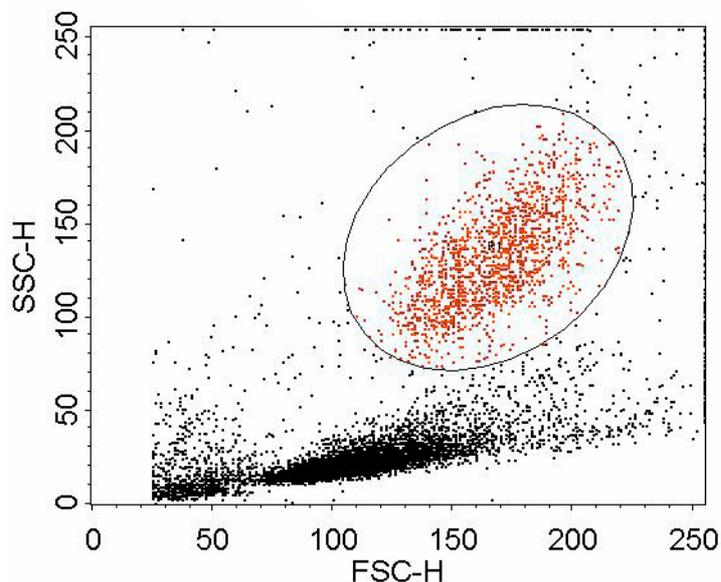


Abbildung 2:  
Dotplot einer Leukozytenpopulation, die Markierung entspricht der Granulozytenpopulation

### 3.7 Kernextraktion und Electrophoretic Mobility Shift Analysis (EMSA)

Zur Messung der NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität wurden Kernextrakte des Herzgewebes von vier Tieren pro Versuchsgruppe mittels EMSA untersucht.

Das Herzgewebe wurde in Stickstoff zerkleinert und homogenisiert. Zur Herstellung des Kernextraktionspuffers wurden kurz vor der Probenaufbereitung zu je einem Milliliter der Hauptlösung folgende Substanzen in der angegebenen Menge frisch hinzugegeben:

Substanz	Dosis
0,025 mM PMSF	5 $\mu$ l
1 % Leupeptin	5 $\mu$ l
1 % Aprotinin	5 $\mu$ l
DTT	10 $\mu$ l

Jede Gewebeprobe wurde mit 120  $\mu$ l Kernextraktionspuffer für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit je 30  $\mu$ l NP 40 versetzt und für weitere 5 Minuten inkubiert. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 200  $\times g$  und 4 ° C wurde der Proteinüberstand abpipettiert und bis zur weiteren Analyse bei -80 ° C aufbewahrt.

Aus dem Proteinüberstand wurde der Proteingehalt bestimmt. Oligonukleotide wurden mit T4 Kinase und [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP markiert. Die benutzte Oligonukleotid-Sequenz lautete: NF- $\kappa$ B (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3', 3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5').

10  $\mu$ g des Kernextrakts wurden mit 2  $\mu$ l Gel Shift Binding 5x Buffer (PROMEGA, Madison, WI, USA) versetzt, mit H<sub>2</sub>O auf 9  $\mu$ l aufgefüllt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je 1,75 pmol des markierten Oligonukleotids zu den Ansätzen hinzugegeben. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze auf einem nicht-denaturierenden 4 % Polyacrylamidgel bei 15 V/cm getrennt.

## 3.8 Rezepturen der eingesetzten Lösungen

### 3.8.1.1 Immunhistochemie

#### 3.8.1.1.1 Neufuchsin-Entwicklerlösung (Ansatz für 60 ml)

##### Ansatz A:

44 ml Entwicklungs-Tris-Puffer:

4,9 g Tris-Base

1,5 g Tris-HCl

8,7 g NaCl

1 l Aqua bidest.

mit 1 M HCl auf pH 8,7 einstellen

15,5 ml AMPD-Levamisol-Lösung:

25 mg Levamisol

15,5 ml 0,2 M 2- Amino-2-methyl-1,3,proprandiol

##### Ansatz B:

31 mg Naphtol-As-Bi-Phosphat

375 µl N, N-Dimethylformamid

##### Ansatz C:

320 µl 4 %-ige Na-nitritlösung:

12,8 mg Na-nitrit

320 µl Aqua bidest.

125 µl 5%-ige Neufuchsin-Stammlösung:

5 g Neufuchsin

100 ml 2 M HCl

Der Ansatz A wird mit Ansatz C gemischt, anschließend wird Ansatz B hinzugegeben und der pH auf 8,7 eingestellt. Nach 2 Minuten wird die Lösung filtriert.

#### 3.8.1.1.2 RPMI- Verdünnungsmedium

50 ml RPMI  
450 ml Aqua bidest.  
50 ml inaktiviertes Rinderserum  
0,5 g Natriumazid  
pH auf 7,4 bis 7,6 einstellen

#### 3.8.1.1.3 TRIS- Puffer

9,0 g Tris-Base  
68,5 g Tris-HCl  
87,5 g NaCl  
10 l Aqua bidest.

### **3.8.1.2 Quantifikation von Stickstoff (NO)**

#### 3.8.1.2.1 Gepuffertes Glycerol

Pufferlösung: 50 ml Natriumhydrogencarbonat mit 0,5 M Dinatriumcarbonat auf pH 8,6 einstellen.

Zwei Teile des Glycerols mit einem Teil Puffer mischen.

#### 3.8.1.2.2 Fixationslösung

4 % Paraformaldehyd in 0,1 M PP, pH 7,2-7,4

Ansatz: 40 g Paraformaldehyd ad 500 ml Aqua dest. langsam auf 70 ° C erhitzen.

Einige Tropfen 2 M NaOH zugeben bis die Lösung klar wird. Erkalten lassen,  
500 ml 0,2 PP zugeben. Anschließend den pH auf 7,2-7,4 einstellen,  
membranfiltrieren (3 µm) und bei 20 ° C lagern.

### 3.8.1.2.3 Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

28,75 ml Lösung A (0,2 M Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat)

96,20 ml Lösung B (0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat)

22,4 g Natriumchlorid

ad 5000 ml

### **3.8.1.3 EMSA**

#### 3.8.1.3.1 Hauptlösung des Kernextraktionspuffers

200  $\mu$ l 1 M Hepes (pH 7-8)

900  $\mu$ l 5 M NaCl

4  $\mu$ l 0,5 M EDTA

100  $\mu$ l 1 M Na<sub>2</sub>MO<sub>4</sub>

2,5 ml 25 % Glycerin

Mit Aqua dest. auf 10 ml auffüllen.

#### 3.8.1.3.2 Markierung des NF- $\kappa$ B Oligonukleotid

2  $\mu$ l NF- $\kappa$ B Oligonukleotid (1,75 pmol/ $\mu$ l)

1  $\mu$ l T-PNK 10fach Puffer

1  $\mu$ l [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP

5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

1  $\mu$ l T4- Polynukleotidkinase

Inkubation bei 37 ° C für 10 Minuten, Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 1  $\mu$ l 0,5 M

EDTA, Zugabe von 89  $\mu$ l TE-Puffer

## 4 Statistische Auswertung

Die Angabe der Daten erfolgte als Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes).

Gruppenmittelwerte wurde mit Hilfe einer Varianzanalyse (one-way-ANOVA) auf signifikante Unterschiede überprüft.

Die statistische Auswertung der Stickstoffproduktion erfolgte unter Verwendung des Statistikprogrammes SPSS 9.0 mit Angabe des Median, 25% und 75% Intervall, Minimal- und Maximalwert. Die Gruppen wurden mit den nicht-parametrischen Tests nach Kruskal-Wallis und Mann-Whitney miteinander verglichen.

Unterschiede wurden bei einem  $p < 0.05$  als signifikant erachtet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle

Die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und P-Selektin am Endothel der postkapillären Venolen wurde anhand des im Methodenteil beschriebenen Scores quantifiziert.

In der Kontrollgruppe zeigten sich eine geringe konstitutive Expression von ICAM-1 ( $1,4 \pm 0,1$ ) und VCAM-1 ( $1,1 \pm 0,1$ ).

P-Selektin wurde in der Kontrollgruppe nicht exprimiert ( $1,0 \pm 0,0$ ).

Die alleinige Gabe von c3Ado hatte im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikanten Effekt auf die Expression von ICAM-1 ( $1,4 \pm 0,1$ ), VCAM-1 ( $1,2 \pm 0,1$ ) und P-Selektin ( $1,0 \pm 0,0$ ).

Die LPS-Applikation bewirkte eine signifikante Steigerung der Expression von ICAM-1 ( $2,5 \pm 0,1$ ), VCAM-1 ( $3,4 \pm 0,2$ ) und P-Selektin ( $2,2 \pm 0,2$ ).

Die zusätzliche Gabe von c3Ado konnte diese Hochregulation bei ICAM-1 ( $1,5 \pm 0,1$ ) und VCAM-1 ( $1,8 \pm 0,1$ ) verhindern. Die Expression von P-Selektin blieb unter Behandlung mit c3Ado unverändert ( $2,1 \pm 0,1$ ).

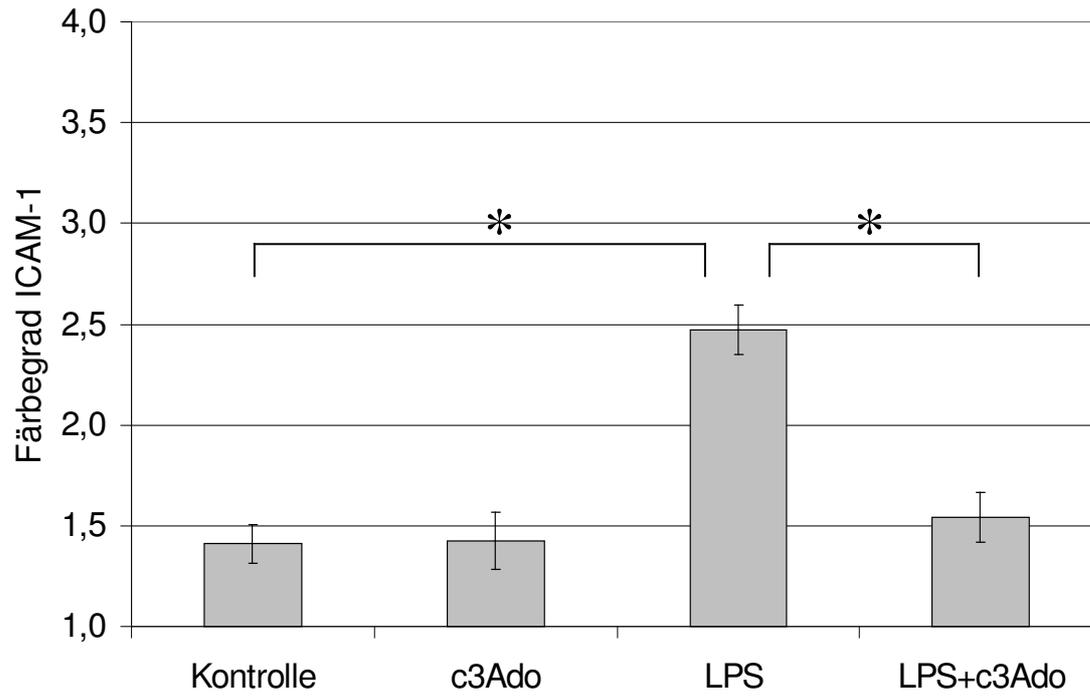


Abb. 3: Expression von ICAM-1, \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).

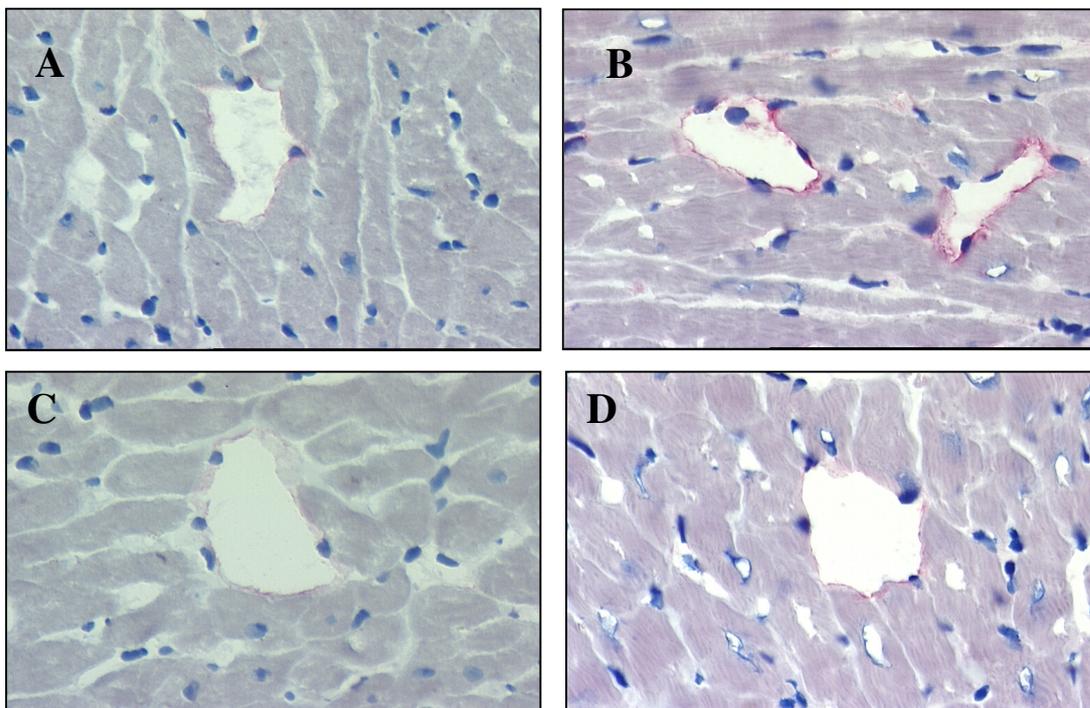


Abb. 4: Exemplarische immunhistochemische Gewebsschnitte ICAM-1, 400fache Vergrößerung.

A= Kontrolle, B= LPS, C= c3Ado, D= LPS+c3Ado

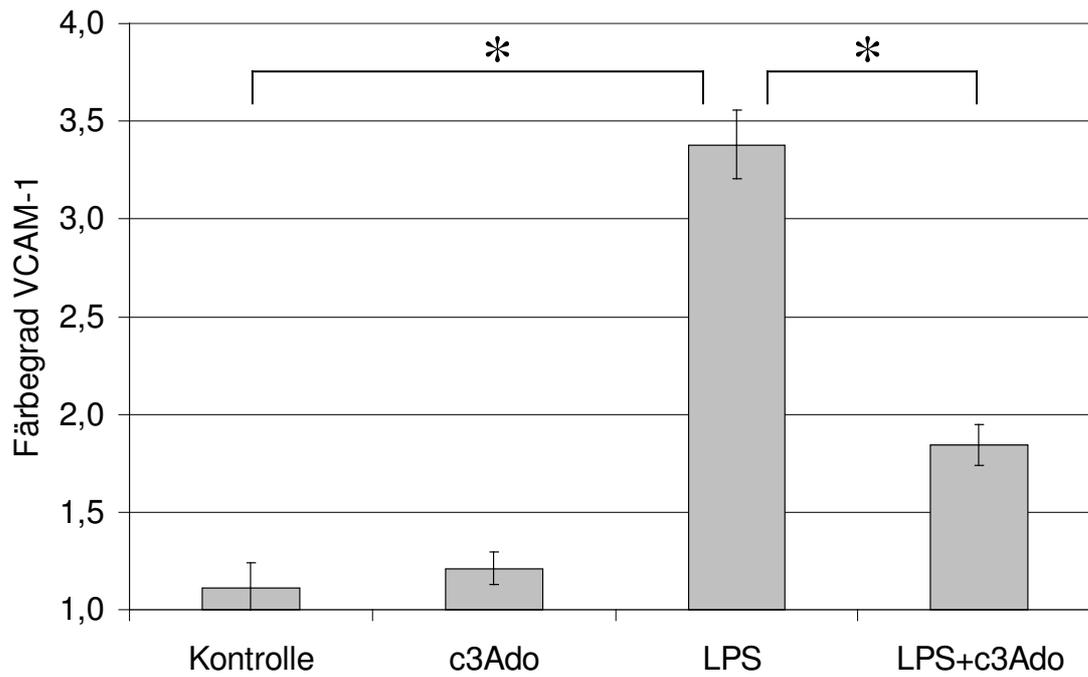


Abb. 5: Expression von VCAM-1, \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).

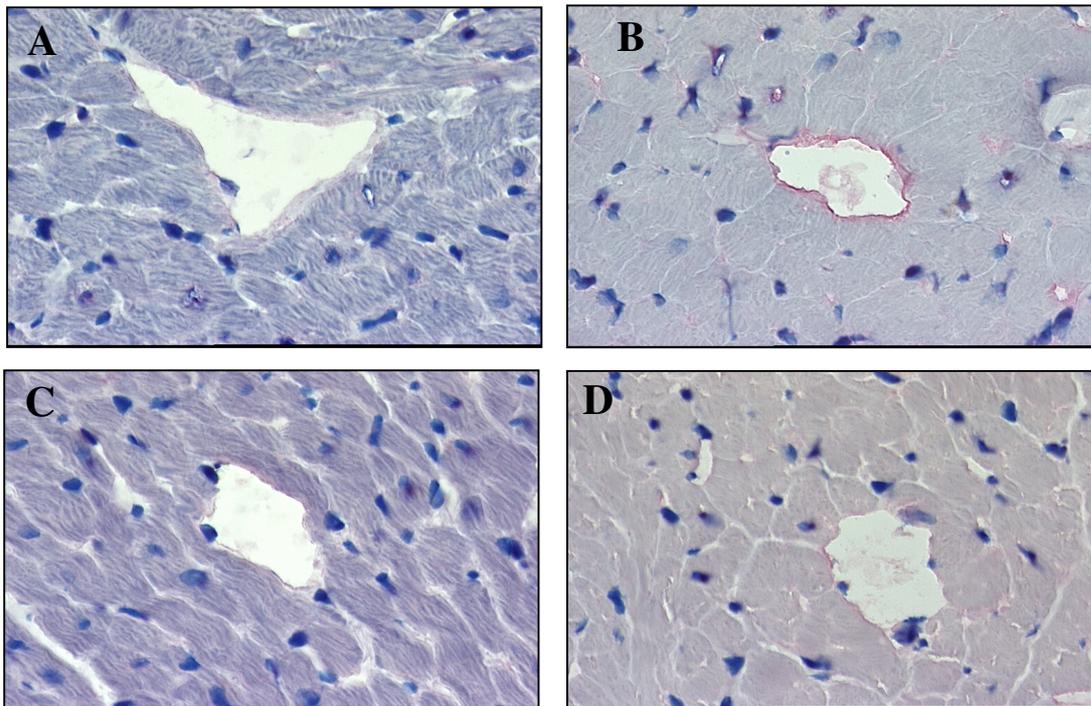


Abb. 6: Exemplarische immunhistochemische Gewebsschnitte VCAM-1, 400fache Vergrößerung.

A= Kontrolle, B= LPS, C= c3Ado, D= LPS+c3Ado

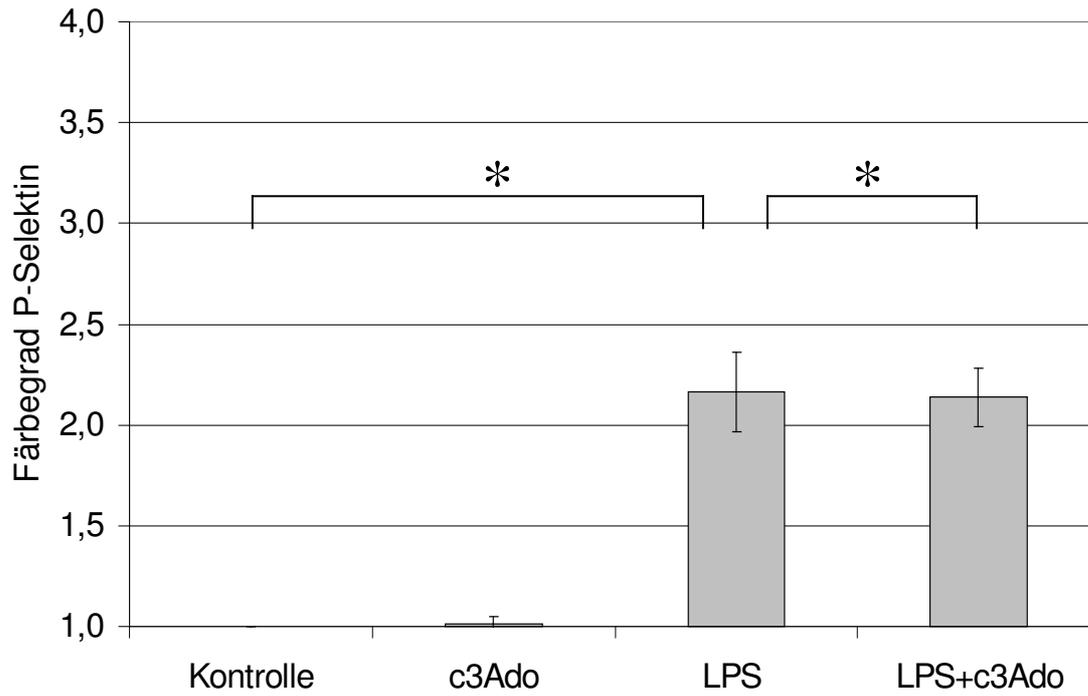


Abb. 7: Expression von P-Selektin, \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).

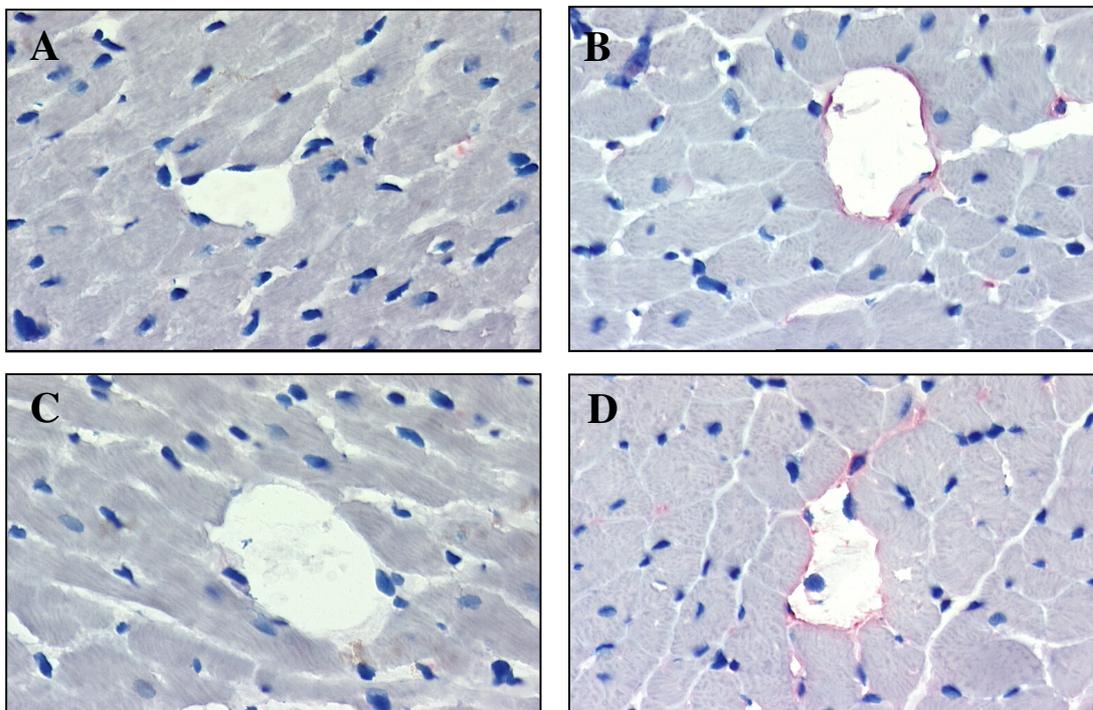


Abb. 8: Exemplarische immunhistochemische Gewebsschnitte P-Selektin, 400fache Vergrößerung.

A= Kontrolle, B= LPS, C= c3Ado, D= LPS+c3Ado

## 5.2 Myokardiale Leukozytenakkumulation

Zur Beurteilung der Leukozytenakkumulation wurden immunhistochemische Färbungen gegen die Leukozyten-Antigene ED1 und CD11b durchgeführt.

ED1 ist ein spezifischer Marker für Gewebsmakrophagen, CD11b ist ein Marker für aktivierte polymorphkernige Neutrophile und Makrophagen.

Für ED1 zeigte die c3Ado-Gruppe ( $19 \pm 8$  positive Zellen/mm<sup>2</sup>) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $24 \pm 7$  positive Zellen/mm<sup>2</sup>) keine Zunahme der Infiltration.

In der LPS-Gruppe kam es zu einer Verdopplung der ED1 positiven Zellen ( $48 \pm 8$  positive Zellen/mm<sup>2</sup>). Die Behandlung mit c3Ado konnte diese Akkumulation von Gewebsmakrophagen verhindern ( $23 \pm 6$  positive Zellen/mm<sup>2</sup>).

Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich für die CD11b-Färbung:

Die LPS Gabe führte im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $2 \pm 1$  positive Zellen/mm<sup>2</sup>) zu einer deutlichen Akkumulation CD11b-positiver Zellen ( $26 \pm 7$  positive Zellen/mm<sup>2</sup>), die durch c3Ado-Behandlung verhindert werden konnte ( $3 \pm 2$  positive Zellen/mm<sup>2</sup>).

3-Deazaadenosin allein zeigte keinen Effekt ( $2 \pm 2$  positive Zellen/mm<sup>2</sup>).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass c3Ado die LPS induzierte Akkumulation von Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen signifikant verhindern kann.

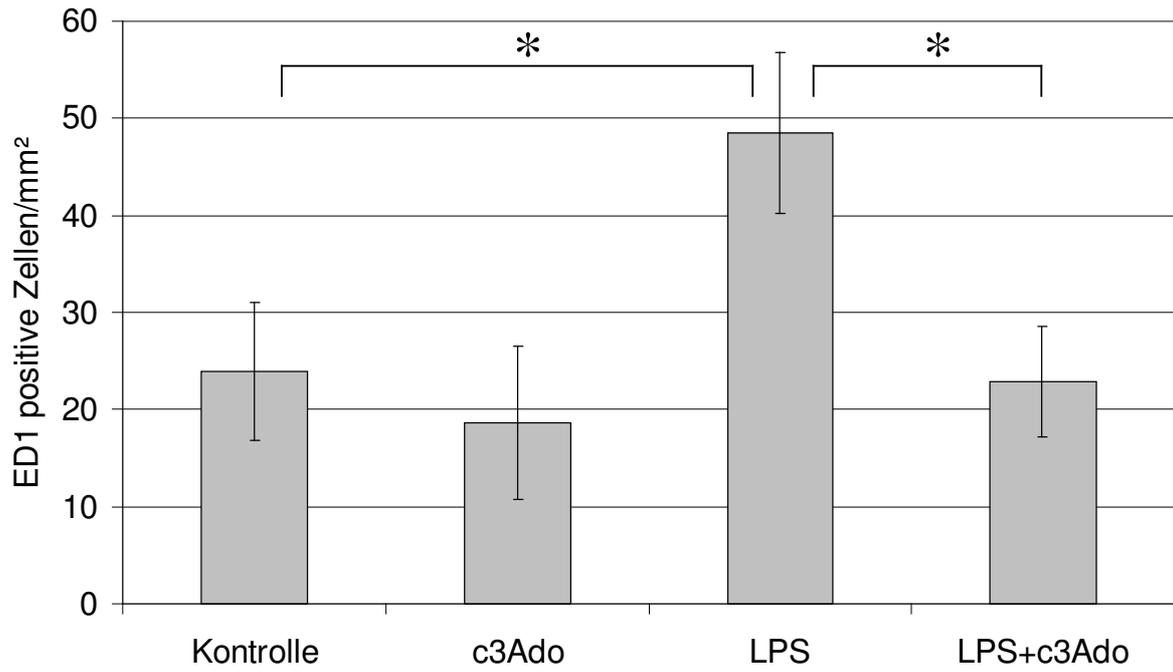


Abb. 9: Anzahl ED1 positiver Zellen , \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).

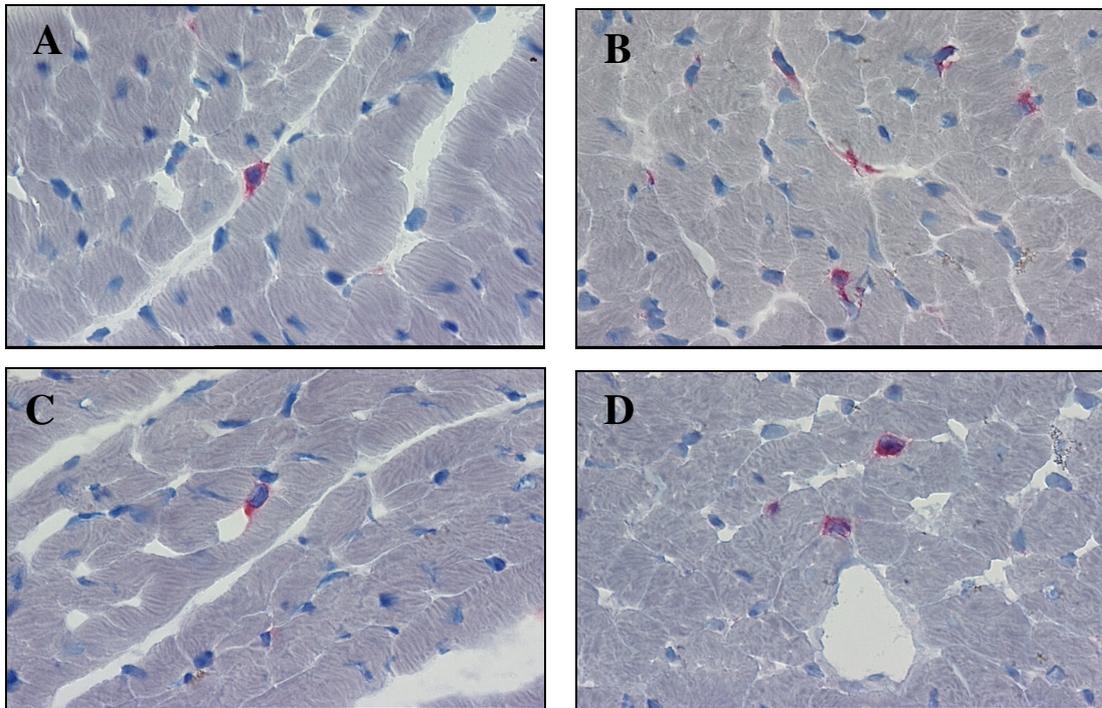


Abb. 10: Exemplarische immunhistochemische Gewebsschnitte ED1, 400fache Vergrößerung.

A= Kontrolle, B= LPS, C= c3Ado, D= LPS+c3Ado

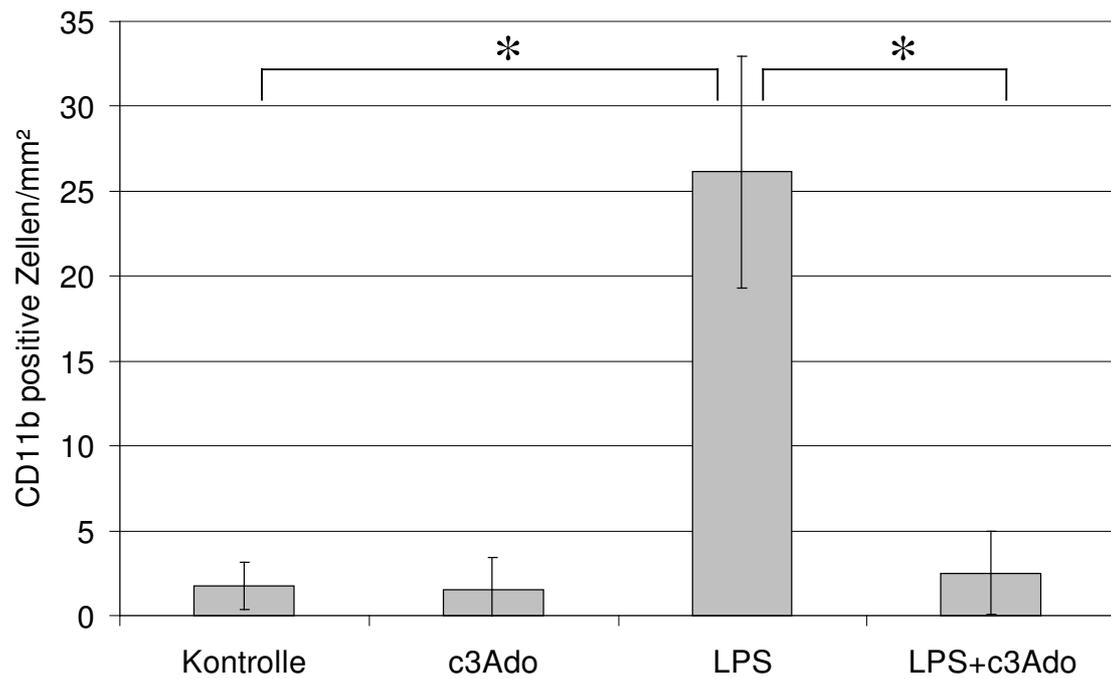


Abb. 11: Anzahl CD11b positiver Zellen, \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).

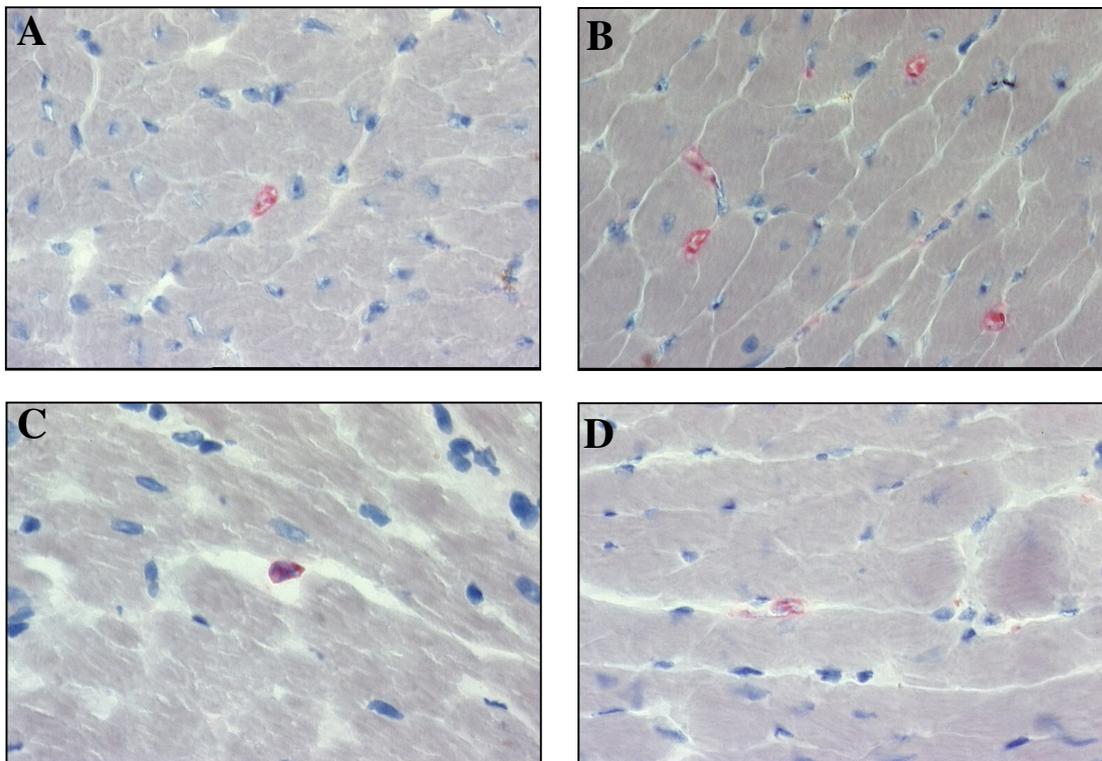


Abb. 12: Exemplarische immunhistochemische Gewebsschnitte CD11b, 400fache Vergrößerung;  
A= Kontrolle, B= LPS, C= c3Ado, D= LPS+c3Ado

### 5.3 Leukozytäre NO- und ROS-Produktion

Bei der myokardialen Dysfunktion bei Sepsis spielen Stickstoffmonoxid (NO) und reaktive Sauerstoffradikale (ROS) eine wichtige Rolle.

Als Marker für die lokale NO-Produktion im Myokard wurde die Expression der induzierbaren Stickstoffsynthase (iNOS) in den Leukozyten immunhistochemisch dargestellt. NO entsteht bei der Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin durch die Stickstoffsynthasen (NOS). Bei der Sepsis kommt es im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr zu einer gesteigerten Expression der induzierbaren Stickstoffsynthase in Neutrophilen und Makrophagen. Dadurch können große Mengen von NO freigesetzt werden. Die Immunhistochemie gegen die iNOS der Leukozyten ist repräsentativ für die lokale NO Bildung, da die Aktivität des Enzyms über dessen Proteinspiegel reguliert wird.

In der Kontrollgruppe ( $0 \pm 0$  positive Zellen/mm<sup>2</sup>) und der c3Ado-Gruppe ( $0 \pm 0$  positive Zellen/mm<sup>2</sup>) waren keine iNOS positiven Zellen nachweisbar.

Durch LPS-Applikation kam es zu einem deutlichen Anstieg iNOS positiver Zellen im Herzgewebe ( $32,0 \pm 8,1$  positive Zellen/mm<sup>2</sup>).

Die mit LPS und c3Ado behandelte Gruppe zeigte dagegen eine signifikant geringere Zahl ( $6,4 \pm 2,5$  positive Zellen/mm<sup>2</sup>).

Um eine Aussage bezüglich der Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen treffen zu können, wurde zunächst gegen die Subeinheit gp91phox der leukozytären NADPH-Oxidase gefärbt. Diese findet sich als extramitochondriale ROS-Quelle in neutrophilen Granulozyten. Es zeigte sich, dass die Gabe von LPS zu einem deutlichen Anstieg NADPH positiver Leukozyten im Myokard führte ( $50,8 \pm 6,0$  positive Zellen/mm<sup>2</sup>).

Die Behandlung mit c3Ado konnte diese Akkumulation signifikant verhindern ( $22,0 \pm 5,5$  positive Zellen/mm<sup>2</sup>).

Die alleinige Gabe von c3Ado ( $19,0 \pm 3,2$  positive Zellen/mm<sup>2</sup>) führte im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $19,3 \pm 4,5$  positive Zellen/mm<sup>2</sup>) zu keiner Zunahme.

Die Detektion des Enzyms NADPH-Oxidase in den Neutrophilen lässt jedoch keinen direkten Rückschluss auf eine ROS-Produktion der Zelle zu.

Um zu untersuchen, ob die Zahl ROS produzierender Zellen durch die Behandlung mit c3Ado beeinflusst wird, wurden Gewebsschnitte mit Nitroblue Tetrazolium (NBT) inkubiert.

Durch Superoxidradikale kommt es zur Reduktion von NBT. Dies führt zur Bildung von Diformazan, einem bläulich/gelblichen Präzipitat.

Die Quantifikation ROS produzierender Zellen kann anschließend unter dem Lichtmikroskop erfolgen.

In der LPS-Gruppe ( $34,0 \pm 8$  positive Zellen/16mm<sup>2</sup>) zeigte sich eine zur Kontrollgruppe ( $3,7 \pm 2$  positive Zellen/16mm<sup>2</sup>) signifikant erhöhte Zahl ROS produzierender Zellen.

Die zusätzlich mit c3Ado behandelte Gruppe zeigte eine signifikant niedrigere Zahl ROS produzierender Zellen, die annähernd auf Niveau der Kontrollgruppe lag ( $5,0 \pm 2$  positive Zellen/16mm<sup>2</sup>).

3-Deazaadenosin allein zeigte keinen Effekt ( $4,0 \pm 2$  positive Zellen/16mm<sup>2</sup>).

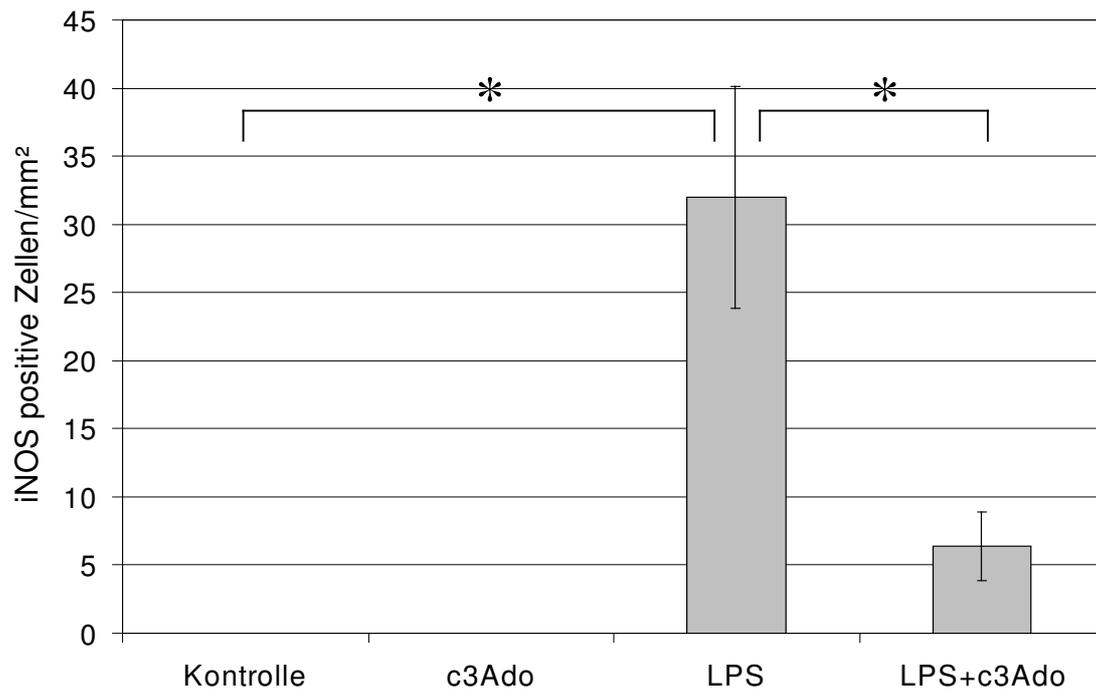


Abb. 13: Anzahl iNOS positiver Zellen, \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).

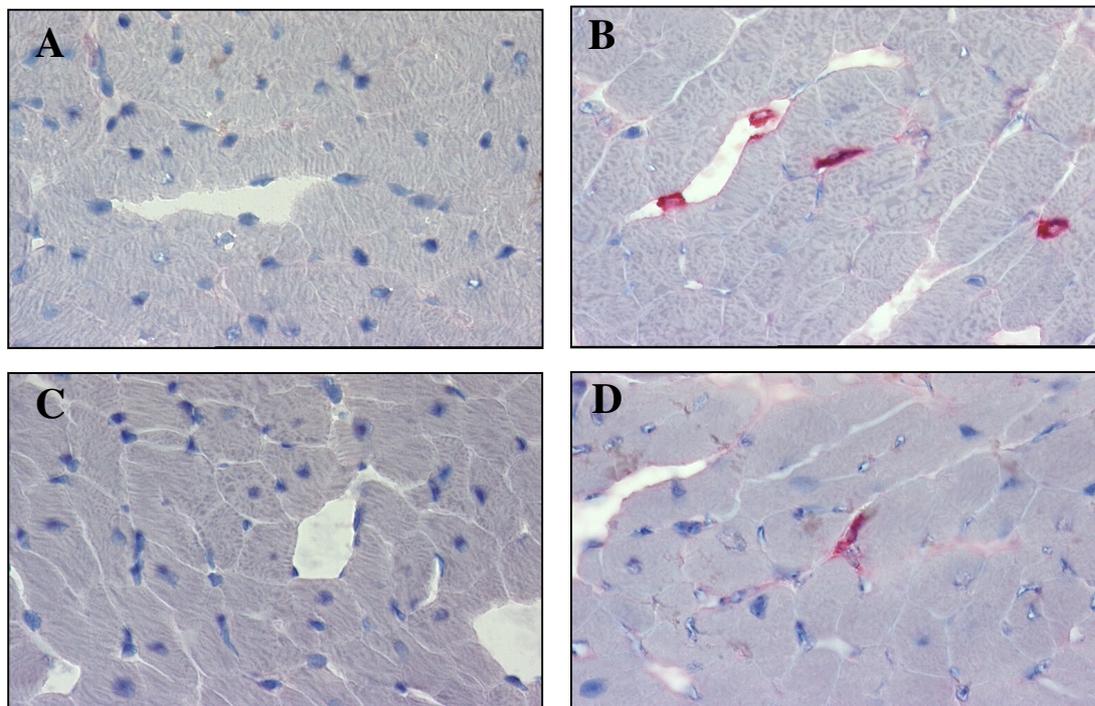


Abb. 14: Exemplarische immunhistochemische Gewebsschnitte iNOS, 400fache Vergrößerung;  
A= Kontrolle, B= LPS, C= c3Ado, D= LPS+c3Ado

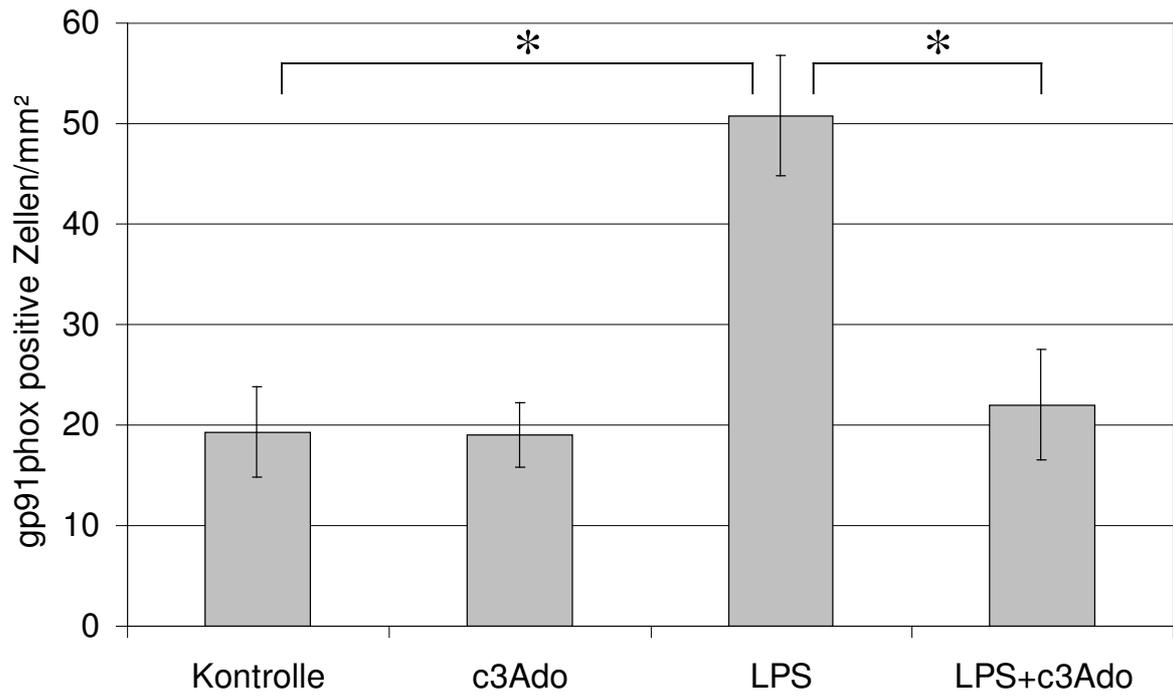


Abb. 15: Anzahl gp91phox positiver Zellen, \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).

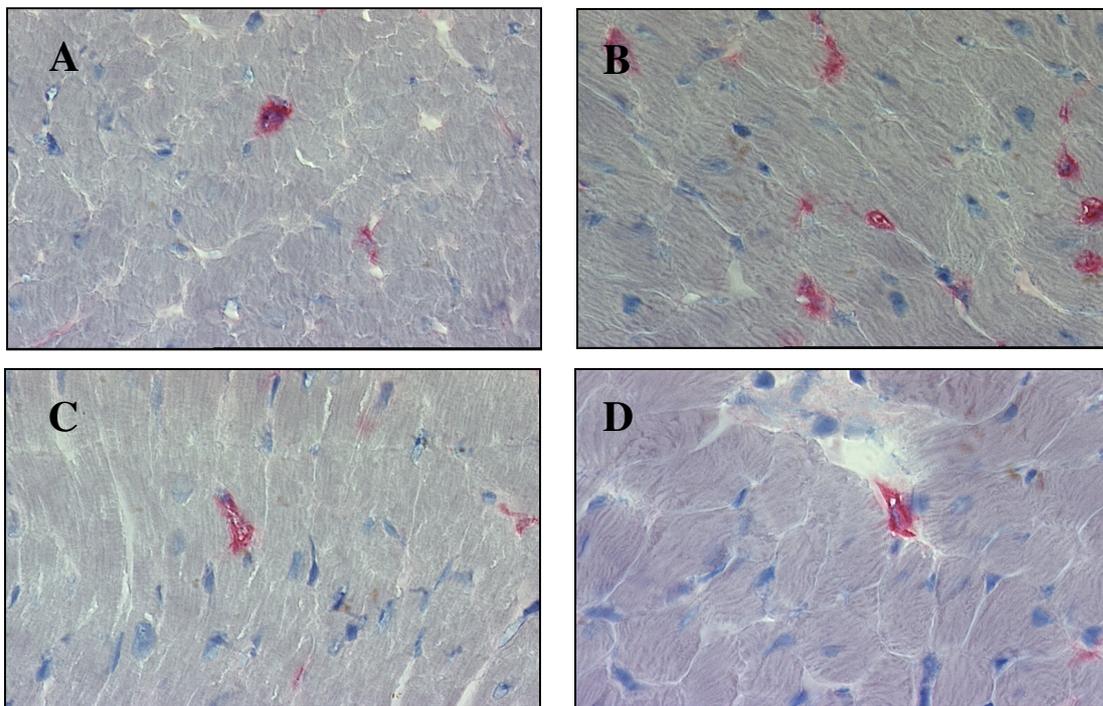


Abb. 16: Exemplarische immunhistochemische Gewebsschnitte gp91phox, 400fache Vergrößerung.  
 A= Kontrolle, B= LPS, C= c3Ado, D= LPS+c3Ado

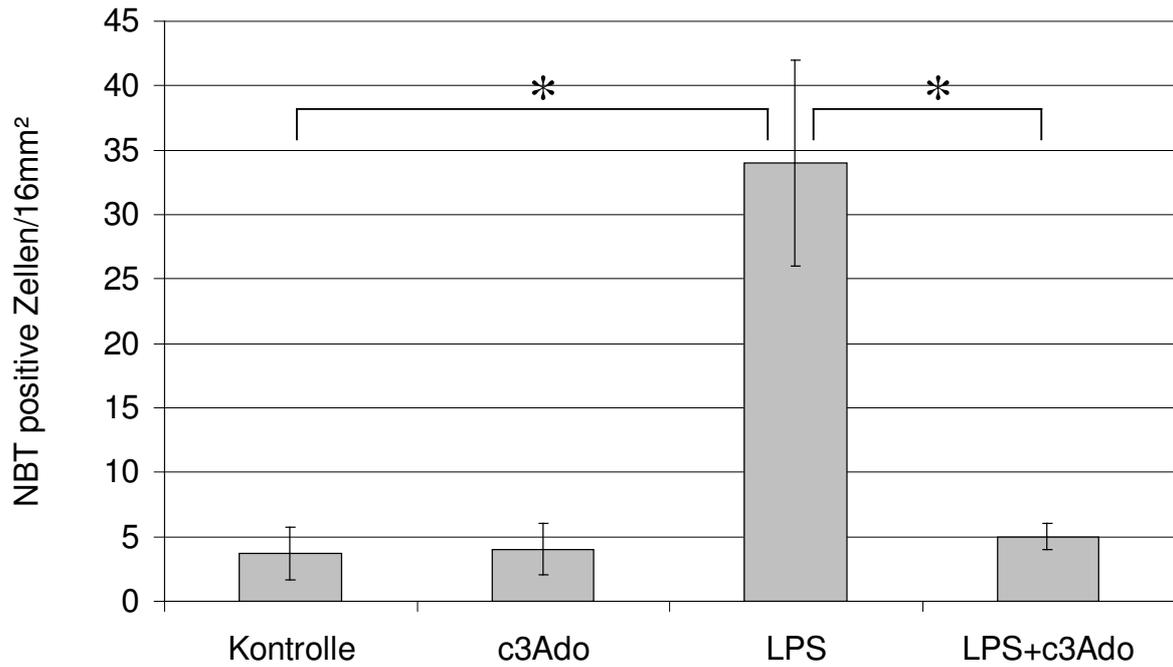


Abb. 17: Anzahl NBT positiver Zellen, \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).

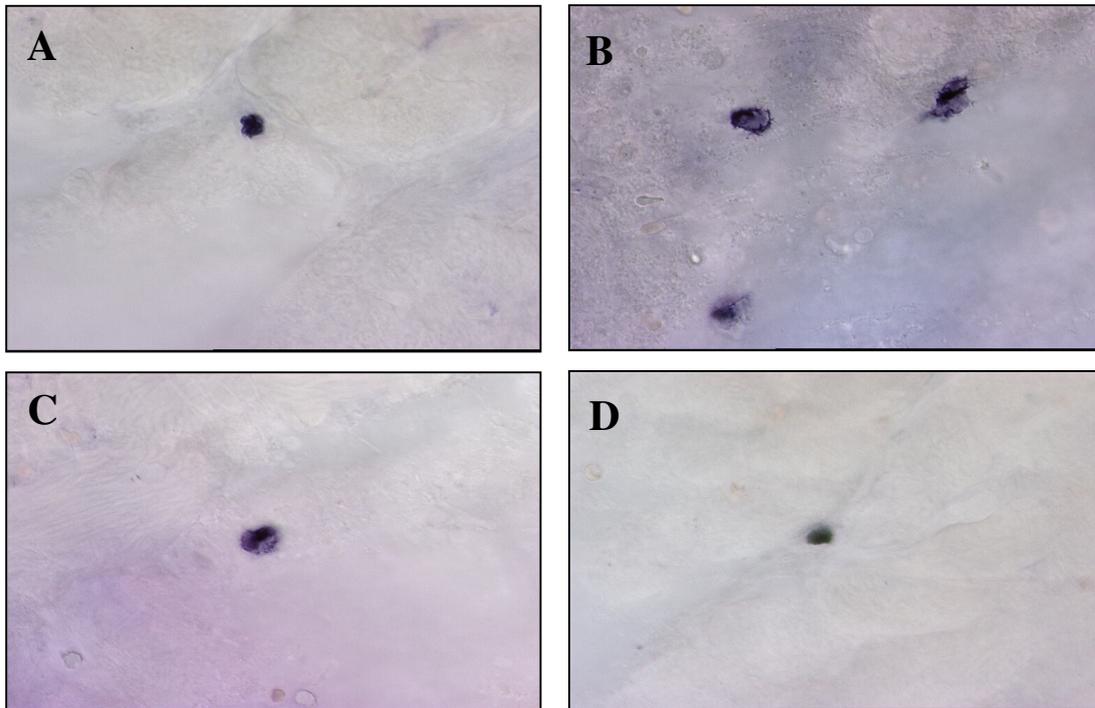


Abb. 18: Exemplarische immunhistochemische Gewebsschnitte NBT, 400fache Vergrößerung.

A= Kontrolle, B= LPS, C= c3Ado, D= LPS+c3Ado

## 5.4 Effekt von c3Ado auf die endotheliale Stickstoffproduktion in den Kapillaren des Myokards

Die Messung der endothelialen Stickstoffproduktion erfolgte mittels konfokalen Lasermikroskops.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 und Tabelle 1 dargestellt.

Zwischen den einzelnen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die kapilläre NO Produktion wurde durch die Behandlung mit c3Ado nicht beeinträchtigt.

Abbildung 20 zeigt exemplarische Gewebsschnitte.

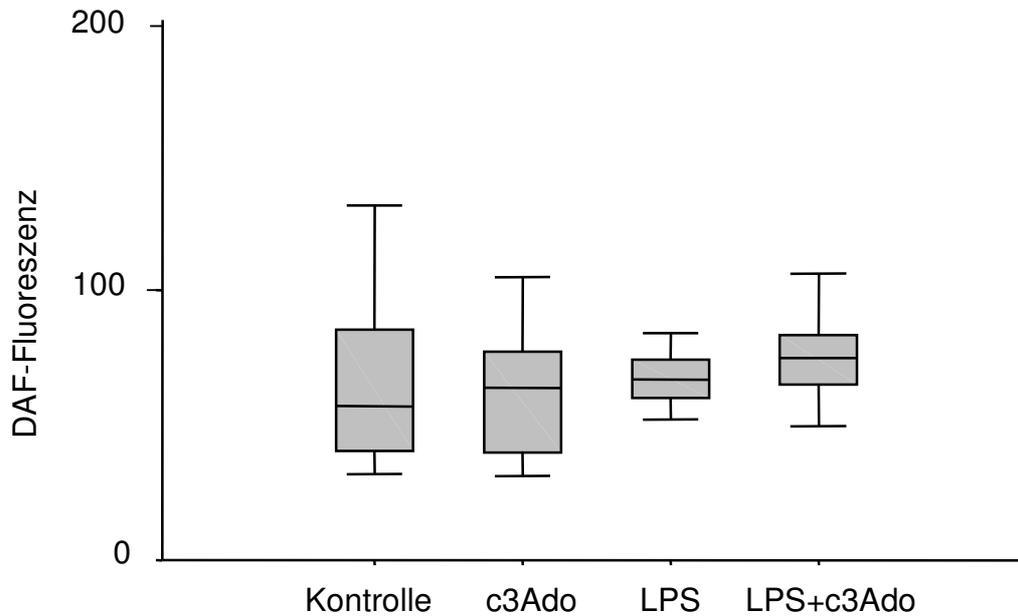


Abb. 19: Quantifikation der DAF-Fluoreszenz, dargestellt sind Median, 25%- und 75%-Perzentile und die minimalen und maximalen Werte

	<b>Kontrolle</b>	<b>c3Ado</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS + c3Ado</b>
Minimum	32,00	31,00	52,00	50,00
25% Perzentile	40,25	39,50	59,50	63,50
Median	57,00	63,50	67,00	75,00
75% Perzentile	92,75	77,75	74,00	85,25
Maximum	131,00	105,00	84,00	106,00

Tab. 1: Statistische Zusammenfassung der DAF-Fuoreszenz der einzelnen Versuchsgruppen.

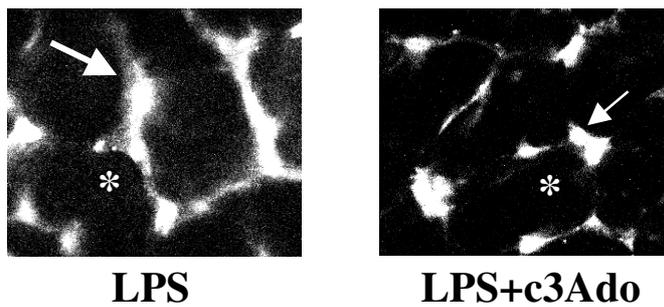


Abb. 20: Exemplarische Gewebsschnitte für die endotheliale NO-Produktion, \* markiert einen Kardiomyozyten, → markiert das Kapillarendothel.

## 5.5 Expression von CD11b auf der leukozytären Seite

Am „Fluorescence Activated Cell Scanner“ (FACS) wurde die Analyse mit CD11b als Marker für in der Blutbahn zirkulierende aktivierte Granulozyten durchgeführt.

Die Messung wurde auf den typischen Bereich der Granulozytenpopulation begrenzt.

Die Kontrollgruppe ( $42,7 \pm 12,6$  Fluoreszenzeinheiten) und die mit c3Ado ( $39,3 \pm 4,8$  Fluoreszenzeinheiten) behandelte Gruppe zeigten eine geringe Grundaktivität von CD11b.

Durch Stimulation mit LPS nahm die CD11b Expression deutlich zu ( $160,6 \pm 59,8$  Fluoreszenzeinheiten).

Die Behandlung mit c3Ado konnte die LPS induzierte Zunahme der CD11b Expression nicht verhindern. Es kam sogar zu einer Zunahme der CD11b Expression ( $298,4 \pm 115,6$  Fluoreszenzeinheiten), wobei eine große Streuweite der absoluten Messergebnisse zu beobachten war.

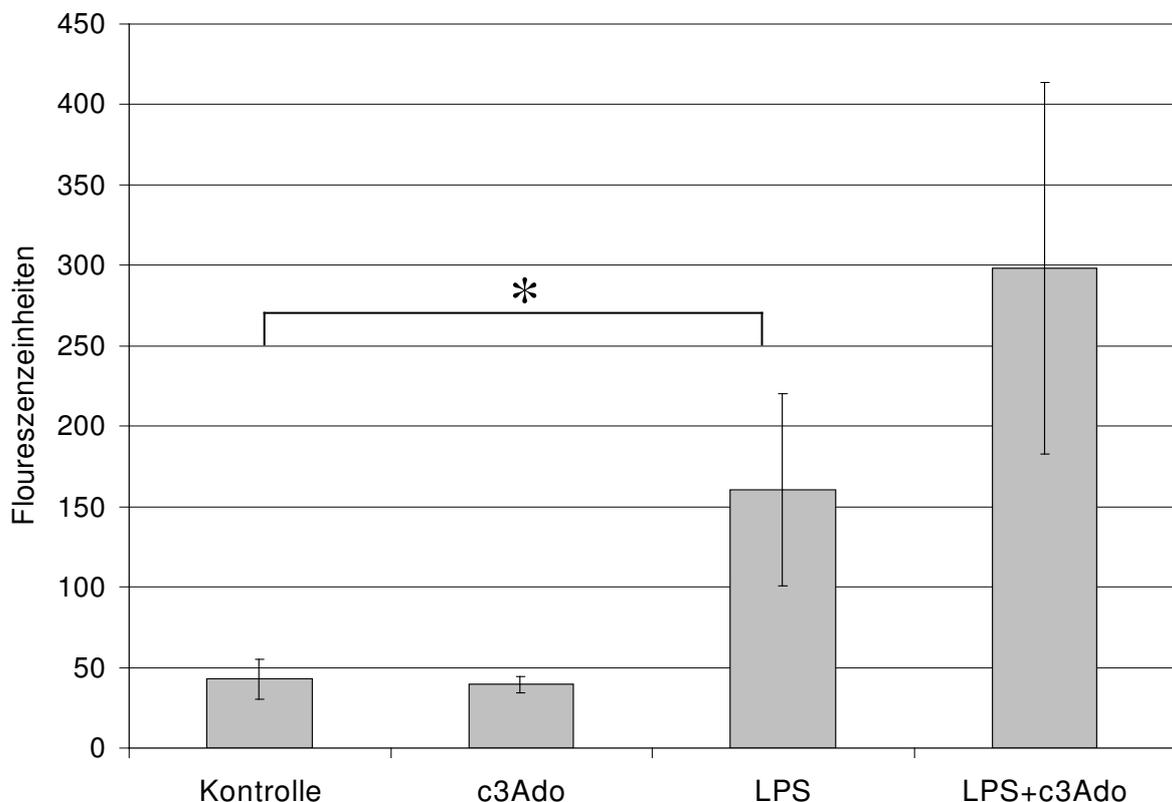


Abb. 21: CD11b-Expression der Granulozytenpopulation, \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).

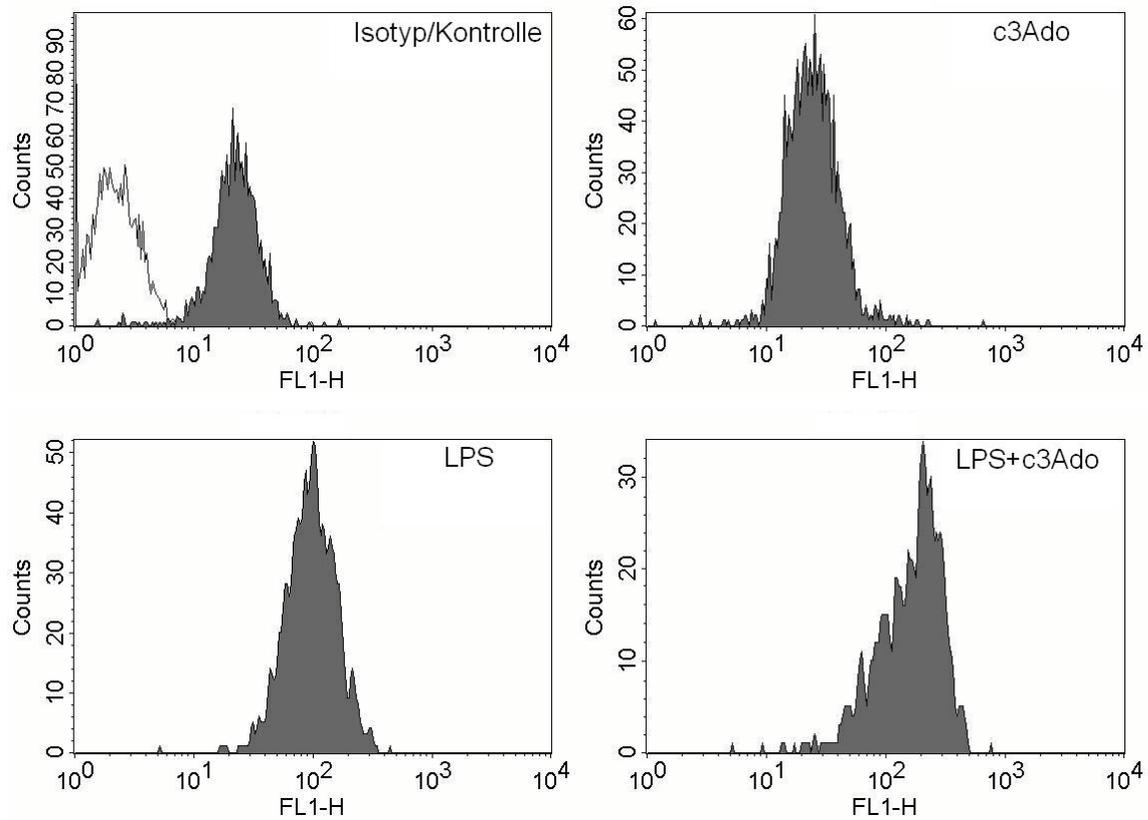


Abb. 22: FACS-Analyse der Expression von CD11b gemessen für die Granulozytenpopulation.

Dunkel unterlegt sind die Färbungen mit dem Primärantikörper und dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper, hell unterlegt ist die Kontrollfärbung mit dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper allein.

## 5.6 NF- $\kappa$ B Aktivierung

Mittels EMSA wurden Kernextrakte des Herzgewebes auf ihre NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität untersucht. Diese Methode hat breite Anwendung in der Untersuchung sequenzspezifischer DNA bindender Proteine wie Transkriptionsfaktoren gefunden.

Wie in Abbildung 23 exemplarisch dargestellt kam es durch LPS-Stimulation innerhalb von 30 Minuten zu einer deutlich erhöhten NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität.

Die Behandlung mit c3Ado konnte diese Aktivierung verhindern.

Die alleinige Gabe von c3Ado führte zu einer leichten NF- $\kappa$ B Aktivierung.

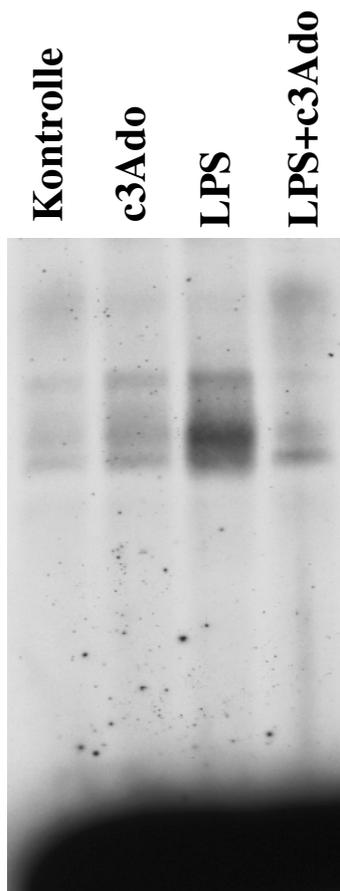


Abb. 23: Exemplarischer EMSA zur Darstellung der NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität.

## 6 Diskussion

Um die pathophysiologischen Mechanismen zu erklären, die zur kardialen Dysfunktion bei Sepsis führen, sind verschiedene Hypothesen und Modelle entwickelt worden.

Zuerst wurde eine globale myokardiale Ischämie als Ursache vermutet. Es konnte jedoch in klinischen Studien gezeigt werden, dass der koronare Blutfluss bei Patienten im septischen Schock nicht vermindert und die myokardiale Laktatproduktion nicht erhöht sind (30, 34).

Diese Ergebnisse sprechen gegen eine globale myokardiale Ischämie als Ursache für die kardiale Depression im septischen Schock (107). Eine regionale myokardiale Ischämie kann jedoch durchaus bei Patienten mit coexistenter koronarer Herzkrankheit von Bedeutung sein.

Lefler und Rovetto postulierten 1970 als Erste die Existenz einer zirkulierenden „Myocardial Depressant Substance“ (MDS) im septischen Schock (81). Während man anfangs noch von einer alleinigen Substanz ausging, geht man heute von einem synergistischen Effekt verschiedener Zytokine aus. Dabei scheinen TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  eine Hauptrolle zu spielen, insbesondere über die Induktion anderer Mediatoren wie Stickstoffmonoxid und reaktive Sauerstoffradikale (77, 89). Die myokardiale Dysfunktion bei Sepsis scheint somit über eine überschießende Produktion von Entzündungsmediatoren im Rahmen des SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) vermittelt zu werden.

### 6.1 3-Deazaadenosin hemmt die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 am Endothel und die Leukozytenmigration ins Myokard

Die Adhäsion von polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) am Endothel ist einer der initialen Schritte im Verlauf der akuten Entzündungsreaktion. Daher war es für uns von besonderem Interesse, ob c3Ado die Invasion von PMN und Monozyten über die Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen verringern und so eine überschießende Entzündungsreaktion verhindern kann.

Die Regulation der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel erfolgt primär über quantitative Veränderungen der Expression von Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche. Interaktionen zwischen CD11/CD18 auf der leukozytären Seite und ICAM-1 auf der endothelialen Seite sind hauptverantwortlich für die feste Adhäsion der Leukozyten am Endothel und ermöglichen somit erst die Extravasation (116, 124). Argenbright et al. konnten

zeigen, dass die Leukozyten-Endothel-Adhäsion durch Antikörper gegen CD18 oder ICAM-1 verhindert werden kann (7).

ICAM-1 und in einem geringeren Maße auch VCAM-1 werden konstitutiv an Endothelzellen exprimiert (59, 97), was sich auch in unseren Versuchen zeigte. TNF- $\alpha$ , IL-1 oder LPS führen sowohl in vitro (59, 97) als auch in vivo zu einer gesteigerten Expression von ICAM-1 und VCAM-1 (58). Henninger et al. zeigten in Versuchen an Mäusen, dass es nach intravenöser Gabe von TNF- $\alpha$  nach 2 bis 5 Stunden zu einem deutlichen Anstieg von ICAM-1 und VCAM-1 im Herzen kam. Der Maximalwert lag zwischen 5 bis 9 Stunden (58). In unserem Versuchsaufbau wurde ein Zeitraum von 8 Stunden nach LPS Gabe für die Entnahme der Herzen gewählt. 3-Deazaadenosin konnte die LPS induzierte gesteigerte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 signifikant hemmen.

Durch die immunhistochemische Färbung gegen ED1 als Marker für Gewebsmakrophagen und CD11b als Marker für aktivierte PMN und Makrophagen konnten wir zeigen, dass über die Hemmung der Adhäsionsmolekülexpression die Einwanderung von Entzündungszellen ins Myokard gehemmt werden kann. Folge ist eine reduzierte lokale Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Stickstoffmonoxid und Sauerstoffradikalen durch PMN und Makrophagen.

TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , die überwiegend von Monozyten/Makrophagen sezerniert werden, stellen mit ihrer kardiodepressiven Wirkung in der Pathogenese der kardialen Dysfunktion zwei zentrale Zytokine dar. Tierexperimentell konnte mit TNF- $\alpha$  Antikörpern die Verschlechterung der Kontraktilität verhindert werden (60). Im klinischen Einsatz führte die Gabe von TNF- $\alpha$  Antikörpern bei Patienten im septischen Schock zu einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion (128).

3-Deazaadenosin wirkt jedoch nicht nur indirekt über die Hemmung der Invasion von Leukozyten ins Myokard auf die TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Produktion, sondern auch direkt: Schmidt und Jeong konnten an Monozyten/Makrophagen in vitro zeigen, dass c3Ado ein potenter Inhibitor der TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Produktion nach LPS-Stimulation ist (67, 113).

Auch an unserem Modell konnte in weitergehenden Untersuchungen der LPS induzierte Anstieg der plasmatischen TNF- $\alpha$  Konzentration durch die Behandlung mit c3Ado signifikant verringert werden (18).

Die in dieser Arbeit mittels immunhistochemischer Nachweisverfahren dargestellte Hemmung der Adhäsion und Invasion von Leukozyten konnte auch durch Untersuchungen an mesenterialen Venolen mittels Intravitalmikroskopie unterstrichen werden: c3Ado war in der Lage die LPS induzierte vermehrte Adhäsion von Leukozyten signifikant zu vermindern (18).

Die dargestellten Effekte von c3Ado auf die initialen Schritte der Entzündungsreaktion mit Hemmung der Adhäsion, Transmigration und lokalen Freisetzung von Entzündungsmediatoren im Myokard könnten einen Mechanismus der protektiven Wirkung auf die septische Kardiomyopathie darstellen.

## **6.2 Die Expression von P-Selektin wird durch c3Ado nicht beeinflusst**

Die LPS-induzierte gesteigerte Expression von P-Selektin konnte durch c3Ado nicht verhindert werden. Sowohl P-Selektin als auch L-Selektin sind am Rolling der Leukozyten am Endothel des Gefäßes beteiligt, obwohl nur P-Selektin für die Adhärenz in den ersten 2 Stunden nach LPS Gabe notwendig ist (31). P-Selektin kann nach Stimulation innerhalb von Minuten an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (56). Zizzi et al. konnten am Mausmodell mittels Ischämie und Reperfusion der Niere zeigen, dass die P-Selektin Expression bereits nach 20 Minuten einen Höchstwert erreicht. Für 5 Stunden wurde ein Plateau gehalten, nach 10 Stunden fiel die P-Selektin-Expression wieder ab (138). Die extrem schnelle Expression ist möglich, weil P-Selektin nicht de novo synthetisiert werden muss, sondern bereits vorgeformt in den Weibel-Palade-Körperchen im Endothel vorliegt und schnell an die Zelloberfläche mobilisiert werden kann. Die fehlende de novo-Synthese in der frühen Entzündungsreaktion ist eine mögliche Erklärung, warum die Expression von P-Selektin nicht durch c3Ado gehemmt werden konnte.

## **6.3 Untersuchung zur leukozytären Seite der Leukozyten-Endothel-Interaktion bei Sepsis**

Neben der Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel wurde mittels FACS-Analyse auch die leukozytäre Seite untersucht. Dazu wurde wiederum CD11b als Marker für aktivierte Granulozyten im Blut verwendet. Nach LPS-Gabe konnte ein Anstieg der CD11b-Expression auf den zirkulierenden Neutrophilen gezeigt werden. Im Gegensatz zur endothelialen Seite konnte dieser Anstieg durch c3Ado nicht verhindert werden. Es zeigte sich sogar ein weiterer Anstieg in der mit LPS und c3Ado behandelten Gruppe. Dieser Effekt ist nicht eindeutig zu klären. Er ist sicherlich nicht allein auf einen möglichen negativen Einfluss von c3Ado zurückzuführen, da die CD11b-Expression der nur mit c3Ado behandelten Gruppe nicht erhöht war.

Goddard et al. konnten zeigen, dass die Adhäsion von PMN vor allem über Aktivierung des Endothels und nicht über die Aktivierung der Leukozyten vermittelt wird. Am isoliert perfundierten Kaninchenherzen wurde die Retention von Leukozyten an Koronarkapillaren untersucht. Getrennt voneinander wurde einerseits das perfundierende Blut, andererseits das zu perfundierende Herz mit Endotoxin stimuliert. Während für aktivierte PMN keine gesteigerte Retention am nicht aktivierten Endothel nachgewiesen werden konnte, zeigte sich bei aktiviertem Endothel sowohl für aktivierte als auch nicht aktivierte PMN eine signifikant erhöhte Retention (49).

3-Deazaadenosin stellt somit durch die Hemmung der Adhäsionsmoleküle auf der endothelialen Seite ein potentes Mittel zur Hemmung einer Invasion von PMN und Monozyten nach LPS-Stimulation dar, obwohl es keinen inhibitorischen Effekt auf der leukozytären Seite zeigt.

#### **6.4 Einfluss von c3Ado auf iNOS und eNOS**

Unter physiologischen Bedingungen hat die kontinuierliche Freisetzung von NO durch die endotheliale NO-Synthetase (eNOS), die konstitutiv in koronarvaskulären und endokardialen Endothelzellen sowie Kardiomyozyten exprimiert wird (71), eine wichtige Regulationsfunktion für Gefäßtonus, Blutdruck und Organperfusion sowie Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion (25, 92).

Erst nach Stimulation durch Bakterien oder Endotoxin kommt es, vermittelt über Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  oder IL-1, zur Aktivierung der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) in Leukozyten, was die Freisetzung großer Mengen NO zur Folge hat. Versuche am Tiermodell haben gezeigt, dass NO die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten und isoliert perfundierter Herzen herabsetzt (8, 17, 53). Stein et al. untersuchten den direkten Effekt von LPS, IL-1 und TNF- $\alpha$  auf die Kontraktilität und iNOS-Expression von Kardiomyozyten am Schweinmodell und konnten zeigen, dass iNOS für die kontraktile myokardiale Dysfunktion mitverantwortlich zu sein scheint (117). Dies ist auch in klinischer Hinsicht interessant, da bei Sepsispatienten eine signifikante Erhöhung der iNOS-Proteinexpression im Myokard und erhöhte Nitrit/Nitrat-Spiegel im Blut nachgewiesen werden konnten (118, 123). Die erhöhten Nitrit/Nitrat-Spiegel als stabile Nebenprodukte von NO zeigen eine gesteigerte Produktion von NO bei Sepsis an, die mit Niereninsuffizienz und Organdysfunktion einhergeht (54). Weiterhin kann über die Hemmung der iNOS-

Proteinexpression die vaskuläre Hyporeaktivität gegenüber Katecholaminen, die zur Entwicklung der Hypotension im septischen Schock beitragen kann, verhindert werden. Hoque et al. konnten dies mittels Antisense-Oligonukleotid gegen iNOS zeigen (62).

Wir konnten in dieser Studie nachweisen, dass es nach Stimulation mit LPS zu einem deutlichen Anstieg der iNOS positiven Leukozyten und somit der iNOS-Proteinexpression im Herzwewebe kommt. Dies lässt auf eine gesteigerte lokale NO-Produktion schließen. Eine Behandlung mit c3Ado konnte einen Anstieg iNOS positiver Leukozyten signifikant verhindern.

Untersuchungen mittels Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop zur direkten Visualisation und Quantifikation von NO in den Kapillaren des Myokards zeigten hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

Wie in Abbildung 20 exemplarisch dargestellt, beeinträchtigt c3Ado nicht die konstitutive NO-Produktion der eNOS.

Für nicht-selektive NOS-Inhibitoren wie L-Arginin und N-Nitro-L-Arginin (L-NAME), die neben einem geringen Effekt auf iNOS vor allem die eNOS hemmen, zeigten sich unerwünschte Effekte wie vermehrte Endotheladhäsion von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten, die auf die Hemmung der eNOS-Aktivität zurückzuführen waren (73, 80). Auch Sundrani et al. konnten dies an LPS behandelten Ratten demonstrieren (119). Durch Infusion von N-methyl-L-Arginin (L-NMMA), einem überwiegenden Inhibitor der iNOS mit nur geringem Einfluss auf die eNOS, konnte hingegen die endotoxininduzierte Verschlechterung der kardialen Funktion mit Hypotension und vaskulärer Hyporeaktivität verhindert werden (122). In Untersuchungen am isoliert perfundierten Herzen konnten auch wir für c3Ado einen protektiven Effekt auf die myokardiale Funktion nach LPS-Exposition demonstrieren (18), der eine Folge der verminderten iNOS-Expression durch c3Ado sein kann.

## **6.5 Wirkung von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) und ROS auf die septische Kardiomyopathie**

Durch Aktivierung von Leukozyten werden neben NO auch verschiedene andere Substanzen wie Proteasen, Prostaglandinmetabolite, Leukotriene und in erheblichem Maße auch reaktive Sauerstoffradikale (ROS) freigesetzt.

Sauerstoffradikale tragen wesentlich zur bakteriziden Funktion der neutrophilen Polymorphkernigen bei. Sind Entzündungszellen nicht in der Lage, Sauerstoffradikale zu produzieren, wie z.B. bei der septischen Granulomatose, führt dies zu einer schweren Störung der immunologischen Abwehr.

Bei der Sepsis und dem septischen Schock kommt es jedoch durch eine überschießende Freisetzung von Sauerstoffradikalen direkt und indirekt zu Zell- und Gewebsschäden. Besonders mehrfach gesättigte Fettsäuren, die z.B. als Phospholipide in hoher Konzentration in Zellmembranen vorkommen, reagieren direkt mit Sauerstoffradikalen. Solche sogenannten Lipidperoxidationen schädigen dabei nicht nur die Zellmembran, sondern auch die intrazellulären Organellen.

Zu den Enzymen, die für die Bildung von ROS verantwortlich sind, gehören neben anderen die Xanthin-Oxidase und die NADPH-Oxidase.

NADPH-Oxidasen sind am Herzen sowohl in glatten Muskelzellen als auch in Myozyten zu finden. Die kardiovaskulären NADPH-Oxidasen sind, von den biochemischen Charakteristika her gesehen, langsam arbeitende Enzyme mit einer niedrigen Produktionskapazität von reaktiven Sauerstoffradikalen. Damit unterscheiden sie sich deutlich von NADPH-Oxidasen in neutrophilen Granulozyten, die eine wesentlich höhere Kapazität besitzen. Während die Produktion von ROS in glatten Muskelzellen Minuten bis Stunden dauert, können ROS in Neutrophilen unmittelbar freigesetzt werden.

Kennzeichnend ist ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung reaktiver oxidativer Sauerstoffradikale und der antioxidativen Abwehr der Zellen in Form antioxidativer Enzyme, wie z.B. der Superoxiddismutase (SOD). Dieses Ungleichgewicht wird auch als „oxidative stress“ bezeichnet.

1990 beschrieben Beckman et al. (9), dass die Anwesenheit von  $\text{NO}^\cdot$  und  $\text{O}^{2-\cdot}$  zu Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) führt. Eine spezielle enzymatische Quelle für die Produktion von  $\text{ONOO}^-$  ist bisher

noch nicht beschrieben worden. Es wird angenommen, dass die schnelle Reaktion zwischen  $O_2^{\cdot-}$  und  $NO^{\cdot}$  entscheidend ist.

Peroxynitrit hat zytotoxische Eigenschaften unter anderem über Peroxidation von Lipiden, Inhibition der mitochondrialen Atmungskette, DNA-Strangbruch und Induktion von Apoptose (10, 111, 121). Zytokinvermittelt kommt es zur kardialen Dysfunktion (40). Khadour et al. konnten am Rattenmodell zeigen, dass es nach Injektion von LPS zu einer gesteigerten Bildung von Superoxid und NO im Myokard kommt, welche die Ausgangssubstrate für Peroxynitrit darstellen. Neben gesteigerter iNOS Expression konnten in diesem Modell erhöhte Lipidhydroperoxid-Spiegel nachgewiesen werden, was auf eine oxidative Stressreaktion schließen lässt. Diese Veränderungen führten am isoliert perfundierten Herzen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer verminderten Kontraktilität und Effektivität (72).

Die Endotoxin induzierte und Zytokin vermittelte Bildung von freien Sauerstoffradikalen kann somit ein weiterer Mechanismus der verschlechterten Inotropie bei Sepsis sein.

Als Methode zur Darstellung der ROS produzierenden Leukozyten wurde die Reduktion von Nitroblue Tetrazolium (NBT) verwendet.

In der LPS behandelten Gruppe kam es zu einem signifikanten Anstieg positiv gefärbter Leukozyten, die durch ihre NBT reduzierende Aktivität die lokale Produktion von Sauerstoffradikalen widerspiegeln. Durch Behandlung mit c3Ado konnte die Invasion und Akkumulation aktivierter Leukozyten verhindert werden, was den günstigen Effekt von c3Ado auf die exzessive lokale Produktion von Sauerstoffradikalen bei Sepsis zeigt.

## **6.6 3-Deazaadenosin hemmt die NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität**

Der Transskriptionsfaktor NF- $\kappa$ B reguliert proinflammatorische Moleküle wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , Adhäsionsmoleküle und Enzyme wie iNOS. NF- $\kappa$ B spielt somit eine zentrale Rolle in der Regulation akuter Entzündungsreaktionen.

Böhrer et al. konnten an einem kleinen Kollektiv septischer Patienten zeigen, dass ein Anstieg der NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität in peripheren Monozyten mit einer erhöhten Mortalität einherging (13). Am Mausmodell konnte durch intravenösen Gentransfer des Inhibitorproteins I $\kappa$ B $\alpha$  die NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität vermindert und die Überlebensrate erhöht werden. Auch Giroir et al. konnten das therapeutische Potential der Inhibition von NF- $\kappa$ B zeigen. Durch Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  konnte bei transgenen Mäusen die endotoxininduzierte myokardiale Dysfunktion verhindert werden (57).

Jeong et al. konnten in vitro an Mausmakrophagen demonstrieren, dass c3Ado die Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  hemmt. Die Untersuchungen wurden neben c3Ado auch mit den Analoga 3-Deazaaristeromycin und 3-Deazaneplanomycin durchgeführt, die alle spezifische Inhibitoren der S-Adenosylhomocysteinhydrolase sind. Zwar konnte auch für die Analoga eine Inhibition von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  gezeigt werden, aber nur durch c3Ado wurde die TNF- $\alpha$  Messenger-RNA-Expression gehemmt. Somit wirkt c3Ado bei der TNF- $\alpha$  Produktion auf Transkriptionsebene, die Analoga dagegen auf Translationsebene. Da bei der Induktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  der Transkriptionsfaktor Nf- $\kappa$ B eine wichtige Rolle spielt, wurde ein Effekt von c3Ado auf Nf- $\kappa$ B als zugrundeliegender Mechanismus vermutet (67). Diese Vermutung konnte wenige Jahre später durch dieselbe Arbeitsgruppe bestätigt und die inhibitorische Wirkung von c3Ado auf Nf- $\kappa$ B nachgewiesen werden. In den in vitro Versuchen an Makrophagen führte die Gabe von c3Ado jedoch überraschend nicht zu einer Hemmung der LPS induzierten Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B. Auch die Translokation in den Zellkern war nicht reduziert. Es konnte dargestellt werden, dass c3Ado die Phosphorylierung der p65 Untereinheit von NF- $\kappa$ B hemmt und so vermutlich die Transkriptionsaktivität reduziert wird (66). Wir konnten anhand unserer in vivo Versuchen mit Kernextrakten aus dem Myokard jedoch zeigen, dass c3Ado auch die NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität hemmt. Vermutlich scheint c3Ado auf mehreren Ebenen die Aktivität von NF- $\kappa$ B zu inhibieren. Unabhängig des zugrundeliegenden Mechanismus konnte auch in unseren Untersuchungen ein Anstieg der LPS induzierten plasmatischen TNF- $\alpha$  Konzentration verhindert werden (18).

Neben dieser direkten Wirkung von c3Ado auf NF- $\kappa$ B sind auch indirekte Effekte denkbar.

Durch Modulation der Expression vieler immunregulatorischer Mediatoren ist NF- $\kappa$ B am oxidativen Stress und der Freisetzung von ROS beteiligt (126).

Sauerstoffradikale wiederum scheinen eine wichtige Rolle bei der NF- $\kappa$ B Aktivierung zu spielen. Durch Behandlung mit Antioxidantien konnte eine solche Aktivierung verhindert werden (114). Die Behandlung mit 3-Deazaadenosin vermindert die lokale Freisetzung von ROS über die Hemmung der Extravasation von Neutrophilen in das Myokard.

Welch et al. konnten zeigen, dass Homocystein über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu einer gesteigerten Produktion von Stickstoffmonoxid durch iNOS führt (131). 3-Deazaadenosin bewirkt über die Hemmung der S-Adenosylhomocysteinhydrolase neben einer Anhäufung von S-Adenosylhomocystein und 3-Deazaadenosylhomocystein auch eine verminderte Bildung von Homocystein. Somit zeigt sich, dass c3Ado auch indirekt eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B verhindern kann.

## 6.7 Kritische Betrachtung einer möglichen klinischen Relevanz von c3Ado

In klinischer Hinsicht wäre die Substanz 3-Deazaadenosin mit seinen immunmodulatorischen und antiinflammatorischen Eigenschaften in die Gruppe adjunktiver Therapieoptionen einzuordnen.

Viele tierexperimentelle Untersuchungen haben das pathophysiologische Verständnis der Sepsis stark erweitert und neue Therapieansätze eröffnet, über immunmodulierende Strategien in das inflammatorische Geschehen einzugreifen. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass ein klinischer Nutzen einer solchen Strategie bis jetzt meist nicht gesichert werden konnte. Die vielversprechenden tierexperimentellen Versuche mit TNF $\alpha$ -Antikörpern konnten bis jetzt in klinischen Untersuchungen größtenteils keine signifikante Verbesserung der Letalität zeigen (1, 2). Die Hochdosistherapie mit Kortikosteroiden zeigt keinen Benefit bezüglich der Letalität der Patienten, ja sogar negative Effekte mit Anstieg der Sekundärinfektionsrate wurden beobachtet. Eine Substitutionstherapie mit Hydrokortison kann empfohlen werden, da sich dadurch ein Überlebensvorteil zeigte (6). Durch die Behandlung mit Hydrokortison war eine kürzere Therapie mit Vasopressoren möglich (14), die Behandlungsdauer war niedriger und die Inzidenz von Organversagen geringer (20). Als Ursache des Effektes von Hydrokortison werden neben einer relativen Nebenniereninsuffizienz auch antiinflammatorische Wirkmechanismen diskutiert.

Klinische Studien mit anderen immunmodulatorischen Substanzen wie IL-1-Rezeptorantagonisten oder Antikörpern gegen Endotoxin konnten bislang keinen eindeutigen Überlebensvorteil zeigen (100, 136). Insgesamt haben die experimentellen Erfolge die Erwartungen und Hoffnungen im klinischen Einsatz nicht erfüllt und weitere Studien zu den pathophysiologischen Grundlagen der Sepsis müssen folgen. Auch muss man sich fragen, ob die gängigen experimentellen Sepsismodelle die pathophysiologischen Vorgänge bei Patienten mit Sepsis/SIRS hinreichend abbilden. Im bisherigen Verständnis der Pathophysiologie bleiben immunmodulatorische Substanzen wie c3Ado jedoch weiter interessante Substanzen.

Unser Versuchsaufbau stellt bisher noch keinen therapeutischen Ansatz dar, da ein c3Ado Wirkspiegel bereits vor der Applikation von LPS bestand. Hinweise auf eine mögliche klinische Relevanz von c3Ado haben sich durch unsere Arbeit jedoch ergeben, die in Untersuchungen weiter geprüft werden müssen.

## 7 Zusammenfassung

Sepsis und septischer Schock gehen noch immer mit einer hohen Mortalität einher. Neben einer generellen Organdysfunktion kommt es zu einer Verschlechterung der kardialen Funktion, die als septische Kardiomyopathie bezeichnet wird und zu der hohen Mortalität beiträgt. Ursächlich steht eine überschießende Entzündungsreaktion im Vordergrund.

Die Extravasation und Akkumulation von aktivierten Leukozyten im Gewebe spielt dabei eine wichtige Rolle, da es dadurch zu einer exzessiven lokalen Freisetzung von Entzündungsmediatoren im Herzgewebe kommt.

Für 3-Deazaadenosin (c3Ado), ein potenter Inhibitor der S-Adenosylhomocysteinhydrolase, sind immunmodulatorische und antiinflammatorische Eigenschaften bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, diese Eigenschaften von c3Ado bei der septischen Kardiomyopathie zu untersuchen und Mechanismen der protektiven Wirkung von c3Ado auf die Myokarddepression aufzuzeigen. Die Untersuchungen wurden am Rattenmodell mit Lipopolysaccharid (LPS) induzierter Sepsis durchgeführt.

Durch Behandlung mit c3Ado konnte die LPS-induzierte Endothelzellaktivierung/vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 verhindert werden.

Die Expression von P-Selektin, das bereits vorgeformt in den Weibel-Palade-Körperchen im Endothel vorliegt, wurde nicht beeinflusst. Durch immunhistochemische Färbung gegen CD11b, ED1 und gp91phox konnte eine Hemmung der Migration aktivierter Leukozyten aus den postkapillären Venolen in das Myokard nachgewiesen werden. Dies führte zu einer verminderten Akkumulation iNOS positiver polymorphkerniger Neutrophiler und konsekutiver NO-Produktion sowie einer verminderten lokalen Sauerstoffradikalfreisetzung. Die Aktivität der endothelialen Stickstoffsynthetase (eNOS) wurde durch c3Ado nicht beeinflusst.

3-Deazaadenosin beeinflusst vor allem die endotheliale Seite der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion: Mittels FACS-Analyse war eine Hemmung der CD11b-Expression auf den zirkulierenden aktivierten Neutrophilen nicht nachweisbar.

Wir konnten im Myokard einen inhibitorischen Effekt von c3Ado auf die Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B als einen zentralen Entzündungsmediator zeigen.

3-Deazaadenosin greift somit auf verschiedenen Ebenen in die Entzündungskaskade bei der septischen Kardiomyopathie ein. Die kardioprotektive Wirkung macht c3Ado zu einer interessanten potentiellen Substanz zur Behandlung der kardialen Dysfunktion bei Sepsis.

## 8 Summary

Mortality from severe sepsis and septic shock remains high. In addition to general organ dysfunction, myocardial depression is a characteristic feature of cardiocirculatory changes during severe sepsis. The so called septic cardiomyopathy contributes to the high mortality of the syndrome. The leading process is an excessive inflammatory response to an infection. The migration to extravascular sites and accumulation of activated leukocytes in the myocardium contributes to an excessive local release of NO and reactive oxygen species (ROS).

3-Deazaadenosine (c3Ado) is a strong inhibitor of the S-adenosylhomocysteine hydrolase. Immune-modulating and anti-inflammatory effects of c3Ado have been described.

This study aimed to elucidate the underlying mechanisms of the positive effect of c3Ado in a rat model of LPS-induced cardiomyopathy.

The treatment with c3Ado prevented the LPS-induced upregulation of the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1. 3-Deazaadenosine was not able to prevent LPS-induced expression of P-selectin, which is already preformed in the Weibel-Palade bodies of the endothelium.

Immunohistochemical staining for CD11b, ED1 and gp91phox demonstrated that c3Ado prevented local recruitment of monocytes and polymorph nuclear neutrophils to the myocardium. Accordingly, significantly fewer leukocytes producing nitric oxide or reactive oxygen species accumulated within the myocardium.

The activity of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) was not affected by c3Ado.

3-Deazaadenosine has its main impact on the endothelial site of the leukocytes-endothelium-interaction: FACS analysis demonstrated, that c3Ado was not able to prevent the CD11b expression on circulating activated neutrophils.

3-Deazaadenosine was able to prevent the activation of NF- $\kappa$ B within the myocardium of LPS-treated rats. NF- $\kappa$ B is one of the main mediators of inflammatory response.

3-Deazaadenosine interferes with different levels of the inflammatory cascade leading to septic cardiomyopathie. The cardioprotective effect makes c3Ado an interesting potential drug for the treatment of myocardial dysfunction in sepsis.

## 9 Literaturverzeichnis

1. Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, Tessler S, San Pedro G, Wunderink R, Dal Nogare A, Nasraway S, Berman S, Cooney R, Levy H, Baughman R, Rumbak M, Light RB, Poole L, Allred R, Constant J, Pennington J, Porter S. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet* 351 (9107): 929-33., 1998.
2. Abraham E, Laterre PF, Garbino J, Pingleton S, Butler T, Dugernier T, Margolis B, Kudsk K, Zimmerli W, Anderson P, Reynaert M, Lew D, Lesslauer W, Passe S, Cooper P, Burdeska A, Modi M, Leighton A, Salgo M, Van der Auwera P. Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1,342 patients. *Crit Care Med* 29 (3): 503-10., 2001.
3. Aksamit RR, Falk W, Cantoni GL. Inhibition of chemotaxis by S-3-deazaadenosylhomocysteine in a mouse macrophage cell line. *J Biol Chem* 257 (2): 621-5., 1982.
4. Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* 128 (6): 1243-53., 1995.
5. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29 (7): 1303-10., 2001.
6. Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, Capellier G, Cohen Y, Azoulay E, Troche G, Chaumet-Riffaut P, Bellissant E. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *Jama* 288 (7): 862-71., 2002.
7. Argenbright LW, Letts LG, Rothlein R. Monoclonal antibodies to the leukocyte membrane CD18 glycoprotein complex and to intercellular adhesion molecule-1 inhibit leukocyte-endothelial adhesion in rabbits. *J Leukoc Biol* 49 (3): 253-7., 1991.
8. Balligand JL, Ungureanu D, Kelly RA, Kobzik L, Pimental D, Michel T, Smith TW. Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. *J Clin Invest* 91 (5): 2314-9., 1993.

9. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (4): 1620-4., 1990.
10. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271 (5 Pt 1): C1424-37., 1996.
11. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 91 (2): 379-87., 1993.
12. Bird MI, Foster MR, Priest R, Malhotra R. Selectins: physiological and pathophysiological roles. *Biochem Soc Trans* 25 (4): 1199-206., 1997.
13. Bohrer H, Qiu F, Zimmermann T, Zhang Y, Jllmer T, Mannel D, Bottiger BW, Stern DM, Waldherr R, Saeger HD, Ziegler R, Bierhaus A, Martin E, Nawroth PP. Role of NFkappaB in the mortality of sepsis. *J Clin Invest* 100 (5): 972-85., 1997.
14. Bollaert PE, Charpentier C, Levy B, Debouverie M, Audibert G, Larcan A. Reversal of late septic shock with supraphysiologic doses of hydrocortisone. *Crit Care Med* 26 (4): 645-50., 1998.
15. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS and CARS. *Crit Care Med* 24 (7): 1125-8., 1996.
16. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101 (6): 1644-55., 1992.
17. Brady AJ, Poole-Wilson PA, Harding SE, Warren JB. Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am J Physiol* 263 (6 Pt 2): H1963-6., 1992.
18. Braun-Dullaeus RC, Dietrich S, Schoaff MJ, Sedding DG, Leithaeuser B, Walker G, Seay U, Matthias RF, Kummer W, Tillmanns H, Haberbosch W. Protective effect of 3-deazaadenosine in a rat model of lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction. *Shock* 19 (3): 245-51., 2003.
19. Brecht DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (2): 682-5., 1990.
20. Briegel J, Forst H, Haller M, Schelling G, Kilger E, Kuprat G, Hemmer B, Hummel T, Lenhart A, Heyduck M, Stoll C, Peter K. Stress doses of hydrocortisone reverse hyperdynamic septic shock: a prospective, randomized, double-blind, single-center study. *Crit Care Med* 27 (4): 723-32., 1999.

21. Brown EJ, Lindberg FP. Leucocyte adhesion molecules in host defence against infection. *Ann Med* 28 (3): 201-8., 1996.
22. Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, Meng X, Joo KS, Banerjee A, Harken AH. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med* 27 (7): 1309-18., 1999.
23. Chiang PK, Richards HH, Cantoni GL. S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase: analogues of S-adenosyl-L-homocysteine as potential inhibitors. *Mol Pharmacol* 13 (5): 939-47., 1977.
24. Chiu JJ, Wung BS, Shyy JY, Hsieh HJ, Wang DL. Reactive oxygen species are involved in shear stress-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (12): 3570-7., 1997.
25. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91 (10): 3527-61., 1998.
26. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *Faseb J* 9 (10): 899-909., 1995.
27. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 32 (2): 219-29., 1984.
28. Couffinhal T, Duplaa C, Moreau C, Lamaziere JM, Bonnet J. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74 (2): 225-34., 1994.
29. Coulombe RA, Jr., Huie JM, Sharma RP, Huggins JW. Pharmacokinetics of the antiviral agent carbocyclic 3-deazaadenosine. *Drug Metab Dispos* 21 (4): 555-9., 1993.
30. Cunnion RE, Schaer GL, Parker MM, Natanson C, Parrillo JE. The coronary circulation in human septic shock. *Circulation* 73 (4): 637-44., 1986.
31. Davenpeck KL, Steeber DA, Tedder TF, Bochner BS. P- and L-selectin mediate distinct but overlapping functions in endotoxin-induced leukocyte-endothelial interactions in the rat mesenteric microcirculation. *J Immunol* 159 (4): 1977-86., 1997.

32. de Boer JP, Wolbink GJ, Thijs LG, Baars JW, Wagstaff J, Hack CE. Interplay of complement and cytokines in the pathogenesis of septic shock. *Immunopharmacology* 24 (2): 135-48., 1992.
33. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock* 9 (1): 1-11., 1998.
34. Dhainaut JF, Huyghebaert MF, Monsallier JF, Lefevre G, Dall'Ava-Santucci J, Brunet F, Villemant D, Carli A, Raichvarg D. Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose, and ketones in patients with septic shock. *Circulation* 75 (3): 533-41., 1987.
35. Duerre JA, Buttz HR, Ackerman JJ. Effect of methylation inhibitors on gene expression in HL-60 cells. *Biochem Cell Biol* 70 (8): 703-11., 1992.
36. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137 (1): 245-54., 1986.
37. Eigler A, Sinha B, Endres S. Nitric oxide-releasing agents enhance cytokine-induced tumor necrosis factor synthesis in human mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 196 (1): 494-501., 1993.
38. Ellrodt AG, Riedinger MS, Kimchi A, Berman DS, Maddahi J, Swan HJ, Murata GH. Left ventricular performance in septic shock: reversible segmental and global abnormalities. *Am Heart J* 110 (2): 402-9., 1985.
39. Estrada C, Gomez C, Martin C, Moncada S, Gonzalez C. Nitric oxide mediates tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 186 (1): 475-82., 1992.
40. Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res* 87 (3): 241-7., 2000.
41. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 49 (2): 186-96., 1990.
42. Finkelstein JD, Martin JJ. Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol* 32 (4): 385-9., 2000.
43. Forstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 42 (10): 1849-57., 1991.

44. Freise H, Bruckner UB, Spiegel HU. Animal models of sepsis. *J Invest Surg* 14 (4): 195-212., 2001.
45. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 (5789): 373-6., 1980.
46. Garber BG, Hebert PC, Yelle JD, Hodder RV, McGowan J. Adult respiratory distress syndrome: a systemic overview of incidence and risk factors. *Crit Care Med* 24 (4): 687-95., 1996.
47. Garcia-Castro I, Mato JM, Vasanthakumar G, Wiesmann WP, Schiffmann E, Chiang PK. Paradoxical effects of adenosine on neutrophil chemotaxis. *J Biol Chem* 258 (7): 4345-9., 1983.
48. Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 14 (10): 506-12., 1993.
49. Goddard CM, Poon BY, Klut ME, Wiggs BR, vanEeden SF, Hogg JC, Walley KR. Leukocyte activation does not mediate myocardial leukocyte retention during endotoxemia in rabbits. *Am J Physiol* 275 (5 Pt 2): H1548-57., 1998.
50. Granger DL, Hibbs JB, Jr. High-output nitric oxide: weapon against infection? *Trends Microbiol* 4 (2): 46-7., 1996.
51. Griendling KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 96 (10): 3264-5., 1997.
52. Griendling KK, Ushio-Fukai M. Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *J Lab Clin Med* 132 (1): 9-15., 1998.
53. Grocott-Mason R, Fort S, Lewis MJ, Shah AM. Myocardial relaxant effect of exogenous nitric oxide in isolated ejecting hearts. *Am J Physiol* 266 (5 Pt 2): H1699-705., 1994.
54. Groeneveld PH, Kwappenberg KM, Langermans JA, Nibbering PH, Curtis L. Nitric oxide (NO) production correlates with renal insufficiency and multiple organ dysfunction syndrome in severe sepsis. *Intensive Care Med* 22 (11): 1197-202., 1996.
55. Guranowski A, Montgomery JA, Cantoni GL, Chiang PK. Adenosine analogues as substrates and inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Biochemistry* 20 (1): 110-5., 1981.
56. Hattori R, Hamilton KK, Fugate RD, McEver RP, Sims PJ. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem* 264 (14): 7768-71., 1989.

57. Haudek SB, Spencer E, Bryant DD, White DJ, Maass D, Horton JW, Chen ZJ, Giroir BP. Overexpression of cardiac I-kappaBalpha prevents endotoxin-induced myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280 (3): H962-8., 2001.
58. Henninger DD, Panes J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, Anderson DC, Granger DN. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol* 158 (4): 1825-32., 1997.
59. Henseleit U, Steinbrink K, Sunderkotter C, Goebeler M, Roth J, Sorg C. Expression of murine VCAM-1 in vitro and in different models of inflammation in vivo: correlation with immigration of monocytes. *Exp Dermatol* 3 (6): 249-56., 1994.
60. Herbertson MJ, Werner HA, Goddard CM, Russell JA, Wheeler A, Coxon R, Walley KR. Anti-tumor necrosis factor-alpha prevents decreased ventricular contractility in endotoxemic pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 152 (2): 480-8., 1995.
61. Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, Ortiz D, Collins SC, Shea TB, Rogers E. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis* 14 (1): 32-42., 2003.
62. Hoque AM, Papapetropoulos A, Venema RC, Catravas JD, Fuchs LC. Effects of antisense oligonucleotide to iNOS on hemodynamic and vascular changes induced by LPS. *Am J Physiol* 275 (3 Pt 2): H1078-83., 1998.
63. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348 (2): 138-50., 2003.
64. Huggins J, Zhang ZX, Bray M. Antiviral drug therapy of filovirus infections: S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors inhibit Ebola virus in vitro and in a lethal mouse model. *J Infect Dis* 179 (Suppl 1): S240-7., 1999.
65. Ignarro LJ. Contributions to a quest. *Nature* 330 (6148): 526., 1987.
66. Jeong SY, Ahn SG, Lee JH, Kim HS, Kim JW, Rhim H, Jeong SW, Kim IK. 3-deazaadenosine, a S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, has dual effects on NF-kappaB regulation. Inhibition of NF-kappaB transcriptional activity and promotion of IkappaBalpha degradation. *J Biol Chem* 274 (27): 18981-8., 1999.
67. Jeong SY, Lee JH, Kim HS, Hong SH, Cheong CH, Kim IK. 3-Deazaadenosine analogues inhibit the production of tumour necrosis factor-alpha in RAW264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide. *Immunology* 89 (4): 558-62., 1996.
68. Jurgensen CH, Huber BE, Zimmerman TP, Wolberg G. 3-deazaadenosine inhibits leukocyte adhesion and ICAM-1 biosynthesis in tumor necrosis factor-stimulated human endothelial cells. *J Immunol* 144 (2): 653-61., 1990.

69. Kapadia S, Torre-Amione G, Yokoyama T, Mann DL. Soluble TNF binding proteins modulate the negative inotropic properties of TNF-alpha in vitro. *Am J Physiol* 268 (2 Pt 2): H517-25., 1995.
70. Kaplanski G, Marin V, Fabrigoule M, Boulay V, Benoliel AM, Bongrand P, Kaplanski S, Farnarier C. Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106). *Blood* 92 (4): 1259-67., 1998.
71. Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 79 (3): 363-80., 1996.
72. Khadour FH, Panas D, Ferdinandy P, Schulze C, Csont T, Lalu MM, Wildhirt SM, Schulz R. Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283 (3): H1108-15., 2002.
73. Kilbourn RG, Szabo C, Traber DL. Beneficial versus detrimental effects of nitric oxide synthase inhibitors in circulatory shock: lessons learned from experimental and clinical studies. *Shock* 7 (4): 235-46., 1997.
74. Kim HS, Jeong SY, Lee JH, Kim BE, Kim JW, Jeong SW, Kim IK. Induction of apoptosis in human leukemia cells by 3-deazaadenosine is mediated by caspase-3-like activity. *Exp Mol Med* 32 (4): 197-203., 2000.
75. Knaus WA. The ongoing mystery of ARDS. *Intensive Care Med* 22 (6): 517-8., 1996.
76. Krafft P, Fridrich P, Pernerstorfer T, Fitzgerald RD, Koc D, Schneider B, Hammerle AF, Steltzer H. The acute respiratory distress syndrome: definitions, severity and clinical outcome. An analysis of 101 clinical investigations. *Intensive Care Med* 22 (6): 519-29., 1996.
77. Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 183 (3): 949-58., 1996.
78. Lander HM, Sehajpal PK, Novogrodsky A. Nitric oxide signaling: a possible role for G proteins. *J Immunol* 151 (12): 7182-7., 1993.
79. Langheinrich AC, Braun-Dullaeus RC, Walker G, Jeide I, Schilling R, Tammoscheit K, Dreyer T, Fink L, Bohle RM, Haberbosch W. Effects of 3-deazaadenosine on homocysteine and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 171 (2): 181-92., 2003.

80. Laszlo F, Whittle BJ. Actions of isoform-selective and non-selective nitric oxide synthase inhibitors on endotoxin-induced vascular leakage in rat colon. *Eur J Pharmacol* 334 (1): 99-102., 1997.
81. Lefer AM, Rovetto MJ. Influence of a myocardial depressant factor on physiologic properties of cardiac muscle. *Proc Soc Exp Biol Med* 134 (1): 269-73., 1970.
82. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31 (4): 1250-6., 2003.
83. Mann JD, Mudd, S.H. Alkaloids and plant metabolism IV: the thyramine methyltransferase of barley roots. *Biol. Chem.* (238): 381-385, 1963.
84. Marcinkiewicz J, Grabowska A, Chain B. Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages. *Eur J Immunol* 25 (4): 947-51., 1995.
85. Marsh CB, Wewers MD. The pathogenesis of sepsis. Factors that modulate the response to gram-negative bacterial infection. *Clin Chest Med* 17 (2): 183-97., 1996.
86. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348 (16): 1546-54., 2003.
87. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 92 (4): 1866-74., 1993.
88. Mayers DL, Mikovits JA, Joshi B, Hewlett IK, Estrada JS, Wolfe AD, Garcia GE, Doctor BP, Burke DS, Gordon RK, et al. Anti-human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) activities of 3-deazaadenosine analogs: increased potency against 3'-azido-3'-deoxythymidine-resistant HIV-1 strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1): 215-9., 1995.
89. Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol* 274 (3 Pt 2): R577-95., 1998.
90. Meng X, Ao L, Meldrum DR, Cain BS, Shames BD, Selzman CH, Banerjee A, Harken AH. TNF-alpha and myocardial depression in endotoxemic rats: temporal discordance of an obligatory relationship. *Am J Physiol* 275 (2 Pt 2): R502-8., 1998.
91. Moerer O, Schmid A, Hofmann M, Herklotz A, Reinhart K, Werdan K, Schneider H, Burchardi H. 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): 1440-6., 2002.

92. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43 (2): 109-42., 1991.
93. Montgomery JA, Clayton SJ, Thomas HJ, Shannon WM, Arnett G, Bodner AJ, Kion IK, Cantoni GL, Chiang PK. Carbocyclic analogue of 3-deazaadenosine: a novel antiviral agent using S-adenosylhomocysteine hydrolase as a pharmacological target. *J Med Chem* 25 (6): 626-9., 1982.
94. Muller-Werdan U, Prondzinsky R, Witthaut R, Stache N, Heinroth K, Kuhn C, Schmidt H, Busch I, Werdan K. [The heart in infection and MODS (multiple organ dysfunction syndrome)]. *Wien Klin Wochenschr Suppl* 1: 3-24., 1997.
95. Müller-Werden U, Reithmann C, Werdan K. Cytokines and the heart: Molecular mechanisms of septic cardiomyopathy: R.G. Landes Company, Georgetown USA/Chapmann&Hall, New York USA/Springer Heidelberg, 1996.
96. Murray DR, Freeman GL. Tumor necrosis factor-alpha induces a biphasic effect on myocardial contractility in conscious dogs. *Circ Res* 78 (1): 154-60., 1996.
97. Myers CL, Wertheimer SJ, Schembri-King J, Parks T, Wallace RW. Induction of ICAM-1 by TNF-alpha, IL-1 beta, and LPS in human endothelial cells after downregulation of PKC. *Am J Physiol* 263 (4 Pt 1): C767-72., 1992.
98. Natanson C, Danner RL, Fink MP, MacVittie TJ, Walker RI, Conklin JJ, Parrillo JE. Cardiovascular performance with E. coli challenges in a canine model of human sepsis. *Am J Physiol* 254 (3 Pt 2): H558-69., 1988.
99. Natanson C, Eichenholz PW, Danner RL, Eichacker PQ, Hoffman WD, Kuo GC, Banks SM, MacVittie TJ, Parrillo JE. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J Exp Med* 169 (3): 823-32., 1989.
100. Opal SM, Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, Sadoff JC, Slotman GJ, Levy H, Balk RA, Shelly MP, Pribble JP, LaBrecque JF, Lookabaugh J, Donovan H, Dubin H, Baughman R, Norman J, DeMaria E, Matzel K, Abraham E, Seneff M. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med* 25 (7): 1115-24., 1997.
101. Pagano PJ, Tornheim K, Cohen RA. Superoxide anion production by rabbit thoracic aorta: effect of endothelium-derived nitric oxide. *Am J Physiol* 265 (2 Pt 2): H707-12., 1993.

102. Palmer RM, Bridge L, Foxwell NA, Moncada S. The role of nitric oxide in endothelial cell damage and its inhibition by glucocorticoids. *Br J Pharmacol* 105 (1): 11-2., 1992.
103. Parker M, Suffredini A, Natanson C, Ognibene F, Shelhamer J, Parrillo J. Responses of left ventricular function in survivors and nonsurvivors of septic shock. *J Crit Care* 4: 19-25, 1989.
104. Parker MM, McCarthy KE, Ognibene FP, Parrillo JE. Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans. *Chest* 97 (1): 126-31., 1990.
105. Parker MM, Shelhamer JH, Bacharach SL, Green MV, Natanson C, Frederick TM, Damske BA, Parrillo JE. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med* 100 (4): 483-90., 1984.
106. Parrillo JE. Cardiovascular dysfunction in human septic shock. *Prog Clin Biol Res.* 308: 191-9., 1989.
107. Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 328 (20): 1471-7., 1993.
108. Paya D, Gray GA, Fleming I, Stoclet JC. Effect of dexamethasone on the onset and persistence of vascular hyporeactivity induced by *E. coli* lipopolysaccharide in rats. *Circ Shock* 41 (2): 103-12., 1993.
109. Pike MC, Snyderman R. Transmethylation reactions regulate affinity and functional activity of chemotactic factor receptors on macrophages. *Cell* 28 (1): 107-14., 1982.
110. Richards HH, Chiang PK, Cantoni GL. Adenosylhomocysteine hydrolase. Crystallization of the purified enzyme and its properties. *J Biol Chem* 253 (12): 4476-80., 1978.
111. Ronson RS, Nakamura M, Vinten-Johansen J. The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite. *Cardiovasc Res* 44 (1): 47-59., 1999.
112. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 95 (2): 320-3., 1997.
113. Schmidt JA, Bomford R, Gao XM, Rhodes J. 3-Deazaadenosine--an inhibitor of interleukin 1 production by human peripheral blood monocytes. *Int J Immunopharmacol* 12 (1): 89-97., 1990.
114. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* 17 (4): 221-37., 1992.

115. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46 (5): 705-16., 1986.
116. Smith CW. Molecular determinants of neutrophil adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2 (6): 487-9., 1990.
117. Stein B, Frank P, Schmitz W, Scholz H, Thoenes M. Endotoxin and cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. *J Mol Cell Cardiol* 28 (8): 1631-9., 1996.
118. Strand OA, Leone A, Giercksky KE, Kirkeboen KA. Nitric oxide indices in human septic shock. *Crit Care Med* 28 (8): 2779-85., 2000.
119. Sundrani R, Easington CR, Mattoo A, Parrillo JE, Hollenberg SM. Nitric oxide synthase inhibition increases venular leukocyte rolling and adhesion in septic rats. *Crit Care Med* 28 (8): 2898-903., 2000.
120. Sung SJ, Silverstein SC. Inhibition of macrophage phagocytosis by methylation inhibitors. Lack of correlation of protein carboxymethylation and phospholipid methylation with phagocytosis. *J Biol Chem* 260 (1): 546-54., 1985.
121. Szabo C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 6 (2): 79-88., 1996.
122. Thiemermann C, Ruetten H, Wu CC, Vane JR. The multiple organ dysfunction syndrome caused by endotoxin in the rat: attenuation of liver dysfunction by inhibitors of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 116 (7): 2845-51., 1995.
123. Thoenes M, Forstermann U, Tracey WR, Bleese NM, Nussler AK, Scholz H, Stein B. Expression of inducible nitric oxide synthase in failing and non-failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 28 (1): 165-9., 1996.
124. Tonnesen MG. Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium. *J Invest Dermatol* 93 (2 Suppl): 53S-58S., 1989.
125. Vallance P, Moncada S. Role of endogenous nitric oxide in septic shock. *New Horiz* 1 (1): 77-86., 1993.
126. Victor VM, De la Fuente M. Immune cells redox state from mice with endotoxin-induced oxidative stress. Involvement of NF-kappaB. *Free Radic Res* 37 (1): 19-27., 2003.
127. Vincent JL. Cardiovascular alterations in septic shock. *J Antimicrob Chemother* 41 (Suppl A): 9-15., 1998.

128. Vincent JL, Bakker J, Marecaux G, Schandene L, Kahn RJ, Dupont E. Administration of anti-TNF antibody improves left ventricular function in septic shock patients. Results of a pilot study. *Chest* 101 (3): 810-5., 1992.
129. Walker G, Langheinrich AC, Dennhauser E, Bohle RM, Dreyer T, Kreuzer J, Tillmanns H, Braun-Dullaeus RC, Haberbosch W. 3-deazaadenosine prevents adhesion molecule expression and atherosclerotic lesion formation in the aortas of C57BL/6J mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (11): 2673-9., 1999.
130. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320 (6): 365-76., 1989.
131. Welch GN, Upchurch GR, Jr., Farivar RS, Pigazzi A, Vu K, Brecher P, Keaney JF, Jr., Loscalzo J. Homocysteine-induced nitric oxide production in vascular smooth-muscle cells by NF-kappa B-dependent transcriptional activation of Nos2. *Proc Assoc Am Physicians* 110 (1): 22-31., 1998.
132. Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med* 340 (3): 207-14., 1999.
133. Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (13): 6770-4., 1996.
134. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269 (7): 4705-8., 1994.
135. Yagawa K, Nakanishi M, Hayashi S, Kaku M, Ichinose Y, Itoh T, Tomoda A, Yoneyama Y, Shigematsu N. Abolishment of inhibitory effects of 3'-deazaadenosine on superoxide generation of guinea pig phagocytes by pre-exposure to phorbol myristate acetate. *FEBS Lett* 201 (2): 287-90., 1986.
136. Ziegler EJ, Fisher CJ, Jr., Sprung CL, Straube RC, Sadoff JC, Foulke GE, Wortel CH, Fink MP, Dellinger RP, Teng NN, et al. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 324 (7): 429-36., 1991.
137. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions. *J Clin Invest* 100 (11 Suppl): S3-5., 1997.
138. Zizzi HC, Zibari GB, Granger DN, Singh I, Cruz LD, Abreo F, McDonald JC, Brown MF. Quantification of P-selectin expression after renal ischemia and reperfusion. *J Pediatr Surg* 32 (7): 1010-3., 1997.

## 10 Danksagung

Mein Dank gilt als erstes Herrn PD Dr. R.C. Braun-Dullaeus für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und die freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Tillmanns, dass ich diese Arbeit in der Abteilung Kardiologie/Angiologie der Medizinischen Klinik I anfertigen konnte.

Ein Dankeschön den medizinisch-technischen Assistenten Frau Antje Weber, Tiziana Wieth und Herrn Harald Michnacz. Ein besonderer Dank gilt Frau Ulrike Seay für ihre Hilfe und die freundliche Zusammenarbeit.

Einen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe. Die gute Arbeitsatmosphäre hat viel Spaß gemacht. Besonders aber möchte ich mich bei Herrn Dr. Michael Schoaff für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Versuchsdurchführung bedanken.

Einen herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. W. Kummer, Frau Tamara Fischbach, Frau Dr. Alexandra Sell und Frau Dr. Karin Hoffmann aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Zusammenarbeit bei den Versuchsreihen zur endothelialen Stickstoffproduktion und Nachweis von ROS.

Vielen Dank auch an Herrn Matthias Heil aus dem Max Planck Institut in Bad Nauheim für die Zusammenarbeit bei der FACS-Analyse.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Dijana, die mich während der gesamten Zeit durch alle Höhen und Tiefen begleitet hat und für die zeitintensive Arbeit immer Verständnis hatte. Es ist schön, dich an meiner Seite zu haben und den Weg mit dir gemeinsam zu gehen.

Genauso herzlich danke ich meinen Eltern Ursula und Gerhard Dietrich, die immer an mich geglaubt haben. Ohne ihre Unterstützung wäre mein bisheriger Weg nicht möglich gewesen. Ich bin von Herzen dankbar für den Rückhalt, den ich in allen Situationen bei ihnen finde.

# 11 Lebenslauf

## PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Simon Dietrich  
Geburtstag: 15. Dezember 1974  
Geburtsort: Fulda  
Familienstand: Verheiratet

## SCHULBILDUNG:

1981-1985 Grundschule Großenlöder  
1985-1994 Rabanus-Maurus-Schule (Domgymnasium) in Fulda mit dem Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

## ZIVILDIENST:

07/94-09/95 St. Antoniusheim Fulda, Wohngruppe Luise  
Vollzeiteinrichtung für Schwerst- und Mehrfachbehinderte

## HOCHSCHULAUFBILDUNG:

10/95 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen  
09/97 Ärztliche Vorprüfung  
08/98 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
09/01 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/02 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## PRAKTISCHES JAHR:

1. Tertial: Innere Medizin am Klinikum Wetzlar-Braunfels  
2. Tertial: Chirurgie an der University of Utah, Salt Lake City, USA  
3. Tertial: Rheumatologie an der Kerckhoff Klinik Bad Nauheim

## BERUFSWEG:

01/03-06/04 Arzt im Praktikum im Klinikum Fulda, Medizinische Klinik II,  
Chefarzt Prof. Dr. Jaspersen  
seit 01/05 Assistenzarzt im Inselkrankenhaus Föhr-Amrum,  
Chefärzte Dr. Paluch und Dr. Ottersky

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“