

Einfluss von L-NAME und Pentoxifyllin auf die Blutclearance und Organverteilung von intravenös zugeführten Escherichia coli beim Kaninchen unter Normoxämie und Hypoxämie

---

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus – Liebig – Universität Gießen

vorgelegt von        Frank Eickmeier  
aus                      Bad Homburg v. d. Höhe

Gießen 2006

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
Medizinische Klinik I  
Leiter: Prof. Dr. med. H. Tillmanns  
Klinische Pathophysiologie und Experimentelle Medizin  
Ehem. Leiter: Prof. Dr. med. H. Neuhof  
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

und

Aus dem Medizinischen Zentrum für  
Medizinische Mikrobiologie und Virologie  
Institut für Medizinische Mikrobiologie  
Leiter: Prof. Dr. med. T. Chakraborty  
Funktionsbereich Spezielle Medizinische Mikrobiologie  
Ehem. Leiter: Prof. Dr. med. H. G. Schiefer

Gutachter: Prof. Dr. H. Neuhof

Gutachter: PD Dr. E. Domann

Tag der Disputation: 02.11.2006

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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.

Meiner Frau, meinen Kindern und meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit  
gewidmet

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
Abkürzungen	I
A. Einleitung und Fragestellung	1
B. Material und Methodik	11
1. Versuchstiere	
2. Präparation der Versuchstiere	
3. Monitoring	
4. Bakterieninokulation	
5. Substanzen	
5.1. N $\omega$ -Nitro-L-Arginin Methyl Ester (L-NAME)	
5.2. Pentoxifyllin (PTX)	
6. Leukozytenzählung	
7. Versuche am septikämischen Ganztiermodell	
7.1. Kontrollgruppe	
7.2. Kontrollgruppe Hypoxie	
7.3. Pentoxifyllin-Gruppe	
7.4. Pentoxifyllin-Hypoxie-Gruppe	
7.5. L-NAME-Gruppe 7,5 mg/kg KG	
7.6. L-NAME-Gruppe 15 mg/kg KG	
7.7. Quantitative Mikrobiologie	
8. Statistik	
9. Zeitraum der Experimente	
C. Ergebnisse	18
1. Clearance von intravenös zugeführten Escherichia coli aus dem Blut und ihre Organverteilung ohne additive Substanzen unter PaO <sub>2</sub> = 100 mmHg nach Inokulation mit 1,3 x 10 <sup>8</sup> CFU E. coli	
2. Beeinflussung der Clearance und Organverteilung von E. coli unter L-NAME	
2.1. Clearance aus dem peripheren Blut	
2.2. Organverteilung	

2.3. Verhalten des arteriellen Mitteldruckes nach Injektion von E. coli unter L-NAME	
2.4. Beeinflussung des PaCO <sub>2</sub> nach Injektion von E. coli unter L-NAME	
2.5. Beeinflussung des pH-Wertes nach Injektion von E. coli durch L-NAME	
2.6. Leukozytenzählung	
3. Beeinflussung der Clearance und Organverteilung von E. coli durch Pentoxifyllin	
3.1. Clearance aus dem peripheren Blut	
3.2. Organverteilung	
3.3. Verhalten des arteriellen Mitteldrucks nach Injektion von E. coli	
3.4. Verhalten der Clearance von E. coli aus dem Blut bei Hypoxie PaO <sub>2</sub> = 40 mmHg und Pentoxifyllin 20 mg/kg KG	
3.5. Organverteilung nach Injektion von E. coli unter Hypoxie und Pentoxifyllin 20 mg/kg KG	
3.6. Verhalten von arteriellem Mitteldruck nach Injektion von E. coli unter Hypoxie und PTX + Hypoxie im Vergleich zur Kontrolle	
3.7. Verhalten des PaCO <sub>2</sub> nach Injektion von E. coli	
3.8. Verhalten des pH-Wertes nach Injektion von E. coli unter PTX und Hypoxie	
D. Diskussion	32
E. Zusammenfassung	42
F. Summary	44
G. Literaturverzeichnis	46
H. Danksagungen	62
I. Lebenslauf	63

## Abkürzungen

AK	Antikörper
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome (Akutes Atemnotsyndrom)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CFU/g Gewebe	Colony Forming Units/g Gewebe
cNOS	constitutive NO-Synthase
FMLP	N-Formyl-L-Leucin-Methionin-L-Phenylalanin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
L-NAME	N $\omega$ -Nitro-L-Arginin Methyl Ester
L-NMME	N $\omega$ -Monomethyl-L-Arginin Ester
mg/kg KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
MAP	Mean Arterial Pressure (Mittlerer arterieller Druck)
NO	Stickstoffmonoxid (Nitric Oxide)
PaO <sub>2</sub>	Arterieller Sauerstoffgehalt
PaCO <sub>2</sub>	Arterieller CO <sub>2</sub> -Gehalt
PGF <sub>2</sub> alpha	Prostaglandin F <sub>2</sub> alpha
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PTX	Pentoxifyllin
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome (Syndrom der systemischen Entzündungsreaktion)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$

## A. Einleitung und Fragestellung

Die Therapie des septischen Schocks bleibt trotz vielfältigen medizinischen Fortschritten eine intensivmedizinische Herausforderung.

Trauma, Schock und thermische Schäden prädisponieren den Patienten zu einer vermehrten Anfälligkeit für Infektionen, die sich klinisch in systemischer Hypotension mit verminderter Reaktion auf Vasokonstriktoren, respiratorischer Insuffizienz bis zum „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) und Multiorganversagen manifestieren können [24]. Verbrauchskoagulopathie und disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) lassen in der Folge das Gerinnungssystem zusammenbrechen, es kann zum allgemeinen Organversagen kommen.

Als Quelle der Infektion und ihrer Folgen ist vielfach kein definierter Herd auszumachen. Objektive Hinweise für eine Infektion fehlen oft bei septischen Patienten. Davon abgesehen ist eine Bakteriämie nicht Voraussetzung für die Entwicklung eines septischen Schocks [14]. Obwohl grundsätzlich jeder Patient dieses Krankheitsbild entwickeln kann, sind es meist ältere Patienten mit urogenitalen, abdominellen oder thorakalen Infekten, die lebensbedrohlich erkranken.

In den letzten Jahren konnte nachgewiesen werden, dass der Darm als Quelle der Infektion bei einem Großteil der gram-negativen Infektionen in Frage kommt.

Erstmals wurde von Zweifach und Fine 1957 bzw. 1959 ein Zusammenhang zwischen Schock und Bakteriämie durch Bakterielle Translokation beschrieben [15;16]; weitere Studien haben die Pathogenese der bakteriellen Translokation untersucht.

Die intestinale Mukosa fungiert im Normalzustand außer als Verdauungs-, Sekretions- und Absorptionsorgan auch noch als Schranke für Bakterien und hindert diese, sich in Blut, Organen und anderem Gewebe auszubreiten. Unter bestimmten Bedingungen können jedoch Bakterien oder Bakterienprodukte wie das Endotoxin, die normalerweise im Gastrointestinaltrakt vorkommen, diese Mukosa-Schranke überwinden und in den regionalen Lymphknoten und anderen Organen auftauchen, ein Prozess, den man bakterielle Translokation nennt [25;18]. Unter physiologischen



Bedingungen wird das Immunsystem ständig mit geringen Mengen Lipopolysaccharide (LPS) als Zellwandbestandteile von *E. coli* konfrontiert, die aus dem Gastrointestinaltrakt über die Pfortader den Organismus erreichen und vermutlich wichtig sind, um eine Art Grundaktivität des Immunsystems zu gewährleisten. Im Fall einer Sepsis wird aber die geringe Menge an LPS deutlich überschritten.

Chemotherapie, Granulozytopenie oder Erkrankungen des Immunsystems tragen zur Schwächung des Organismus bei, Polytrauma, Verbrennungen und schwere Operationen können zu Kreislaufdepression führen [34]. Eine direkte Schädigung des Darms durch Strahlung oder Toxine, eine intravenöse Hyperalimentation oder die Minderperfusion nach einem hämorrhagischen Schock führt zu Mukosa-Schäden und dadurch zum Barriereverlust des Darms [18;33;65;66]. Nachweislich gibt es eine Relation zwischen vermehrten Translokationsraten und einer verstärkten hypermetabolischen Reaktion der verletzten und septischen Patienten. Durch eine bakterielle Translokation kann bei chirurgischen Patienten ohne nachweisbare Infektionsquelle eine Sepsis und ein Multiorganversagen verursacht werden [9;65]. Dabei sind es die bakteriellen Zellwandbestandteile Lipopolysaccharide (*E. coli*), Peptidoglycane, Lipoteichonsäuren und Teichonsäuren (*Staph. aureus*), die im Körper mit einer Vielzahl von Rezeptoren und Proteinen, unter anderem Plasma-Lipoproteinen und Lipopolysaccharid-bindendem Protein, interagieren und die deletären Folgen verursachen [114].

Die primäre Abwehr gegen bakterielle Infektionen wird vor allem von zirkulierenden Makrophagen und der Immunantwort des RES bestimmt. Dabei sind zwei Wege wichtig: Erstens direkte Abtötung, Lyse und Phagozytose der Bakterien, und zweitens Verhinderung der Ausbreitung der Mikroorganismen durch Koagulation. Die zelluläre Abwehr beinhaltet Chemotaxis, Adhärenz an das Agens, dessen Phagozytose und intrazelluläre Lyse. Eine Beeinträchtigung dieses komplexen Mechanismus führt zur Vermehrung und Ausbreitung der Mikroorganismen [1]. Ein erkrankter Organismus kann, z. B. nach starkem Blutverlust oder durch andere belastende Ursachen, seine inflammatorische Reaktion und damit die Bakterienelimination nicht mehr adäquat aufrechterhalten. Ein massiver

Anfall von phagozytosepflichtigen Substanzen übersteigt die Kapazität des RES [17], die durch die zugrundeliegende Erkrankung beeinträchtigt ist und der Aufgabe der Bakterienelimination entweder eingeschränkt oder gar nicht nachkommen kann [8;73;64].

Untersuchungen an Patienten zeigten eine erhöhte intestinale Permeabilität 24 h nach Trauma. Bei Ratten war nach thermischer Schädigung schon 2 h danach eine bakterielle Translokation nachzuweisen [19].

Deitch und Kollegen wiesen bei Versuchen mit Ratten nach, dass starker Blutverlust und Schock die intestinale Morphologie und Permeabilität derart beeinflusst, dass dadurch Bakterien durch die Darmwand in Lymphknoten und dann weiter systemisch aus dem Darmreservoir translozieren können [18]. Verbrennungen und Endotoxingabe tragen ebenso wie intravenöse Hyperalimentation und Beeinträchtigungen des Immunsystems durch Tumoren und Operationen zu Translokationen bei [17;20;29;35;65;]. Eine Arbeitsgruppe zeigte, dass die durch Perfusionsstörung im Darm hervorgerufene Translokation durch Hyperoxie verhindert werden kann. Der Organismus kann den bei Abwehr von Mikroorganismen vorkommenden Sauerstoffbedarf bei Krankheit nicht decken und so keine effiziente Abwehr aufbauen [64]. Katayama et al. wiesen nach, dass Proteinmangelernährung allein nicht zu bakterieller Translokation führt, wohl aber zu Substanzverlust der Darmschleimhaut. Zusammen mit Endotoxin kam es sehr schnell zu massiver Translokation [65]. Der Verlust der intestinalen Integrität konnte bei Verbrennungsopfern durch vermehrte Permeabilität des Darms für Mannitol und Lactulose als Marker für Dysfunktionen des Darms nachgewiesen werden [19]. Xu et al. wiesen in einer Arbeit in vitro nach, dass Überproduktion von NO direkt eine Dysfunktion der Ileum-Mukosamembran auslöst und somit zu einer bakteriellen Translokation führt [102]. Alexander und Mitarbeiter zeigten, dass die Mikroorganismen direkt von Enterozyten aufgenommen werden. Nach dem Überwinden der Lamina propria diffundieren die Bakterien und deren Toxine entlang des Zellularspalts zur Serosa und von dort in die regionalen Lymphknoten bzw. ins Blut und in weitere Organe [9]. Einer weiteren Arbeit zufolge fungieren die Enterozyten als „nichtprofessionelle“ Makrophagen, d.h. sie nehmen Mikroorganismen auf als Teil der Abwehr. Ab einer gewissen Anzahl an phagozytierten

Mikroorganismen ist die Abwehrfunktion jedoch überfordert, und es kommt zur bakteriellen Translokation [9;66]. Der schwerkranke Patient hat eingeschränkte Immunfunktionen bis hin zur Immunsuppression. Dies trägt zur eingeschränkten Bakterienelimination, zur Persistenz der Organismen in mesenterialen Lymphknoten und deren weiteren Ausbreitung bei [20].

Einige Studien am isolierten perfundierten Lungenmodell zeigten, dass Endotoxine und gram-negative Bakterien eine Kaskade von Mediatoren freisetzen, die für die deletären Auswirkungen des septischen Schocks und des Lungen- und Multiorganversagens verantwortlich sind [6, 81]. Studien mit TNF- $\alpha$  an Mäusen zeigten die selben systemischen Auswirkungen, wie sie auch bei der Sepsis zu beobachten waren [34]. TNF- $\alpha$  wird durch Makrophagen bei Kontakt mit LPS als eines der ersten Zytokine freigesetzt. Weitere Mediatoren sind u.a. Interleukin 1 (IL1), IL6, IL12, Plättchen-aktivierender Faktor (PAF), Prostanoiden und Leukotriene, die durch die Aktivierung des Komplementsystems in Leukozyten freigesetzt werden und ihrerseits für eine weitere Mediatoren-Freisetzung verantwortlich sind [77]. Zusammen mit den Komplementsystem-Antigenen C3a und C5a ziehen die Mediatoren PMNs aus dem Kreislauf an und aktivieren sie, wobei wieder Zytokine freigesetzt werden. C3a und C5a verursachen verstärkte vaskuläre Permeabilität und regulieren die Adhäsionsmolekül-Expression in Endothelzellen und Neutrophilen nach oben. Die aktivierten PMNs exprimieren CD14, CD11/CD18 und einige Komplement- und Fc-Rezeptoren und sind dadurch in der Lage, LPS, Bakterienfragmente und ganze Bakterien zu erkennen und zu phagozytieren. Dabei werden Lysozyme, Sauerstoffradikale und Porine freigesetzt. Diese Stoffe werden zum Abtöten der Mikroorganismen benötigt. Eine hohe Konzentration der Zytokine lokal oder generalisiert kann aber auch zu Endothel- und Organschäden führen [114]. Die Ursache des septischen Geschehens und seiner Folgen ist in einer Überstimulation des Immunsystems zu suchen, die sich selbst verstärkt und eine generalisierte hyperinflammatorische Reaktion verursacht. Deshalb wird auch von einem „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ SIRS gesprochen [6].

Verschiedene Ansätze wurden in den vergangenen Jahren gemacht, um die fatalen Auswirkungen des septischen Schocks zu bekämpfen. LPS-

Antikörper, TNF- $\alpha$ -Antikörper und Antioxidantien [53] brachten nicht den gewünschten Erfolg [116]. Eine Studie ging von der Annahme aus, dass bei länger andauernder Sepsis eine Gegenregulation bezüglich der Ausschüttung der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auf-, und damit eine antiinflammatorische und immunsuppressive Phase eintritt. Den septischen Patienten wurde  $\gamma$ -Interferon verabreicht, was die TNF- $\alpha$ -Produktion der Makrophagen stimulierte und zum Überleben der Patienten beitrug [117]. Einen Erfolg in letzter Zeit zeigte die PROWESS-Studie: Sie zeigte einen positiven Effekt auf das Überleben septischer Patienten bei Behandlung mit aktiviertem Protein C. Durch aktiviertes Protein C wird Thrombenbildung und die Inflammation wirksam gehemmt, die Fibrinolyse aber gefördert [115]. Ein weiterer Weg, das Outcome in der Sepsis zu verbessern, wurde durch eine intensive Insulintherapie beschritten, um eine Hyperglykämie in der Sepsis zu verhindern. Die phagozytotische Funktion neutrophiler Granulozyten ist bei septischen Patienten mit Hyperglykämie beeinträchtigt. Die Hyperglykämie zu korrigieren trägt zur Verbesserung der bakteriellen Phagozytose bei [118].

Im Zuge der Forschung wurde man auf Stickstoffmonoxid (NO) aufmerksam als einen Faktor, der an Entzündungsreaktionen wichtigen Anteil hat. Stickstoffmonoxid ist ein ubiquitäres Molekül, das an der Regulation der Funktion jedes Organsystems beteiligt zu sein scheint. Entdeckt 1987 als Molekül, das mit dem bis dahin so genannten EDRF identisch ist [46], wurden die biologischen Charakteristika von NO unter normalen und pathologischen Organfunktionen studiert, um seine Rolle in dem pathologischen Geschehen zu verstehen. NO wird von Endothelzellen und Makrophagen vom terminalen Guanidin-Nitrogen der Aminosäure L-Arginin synthetisiert [44;54]. Das Molekül mit einer Halbwertszeit von 3-5 Sekunden wirkt lokal über die Guanylat-Zyklase durch Erhöhung der 3',5'-cGMP-Bildung im Gefäßmuskel, führt zur Muskelrelaxation und damit zur Vasodilatation [39]. Als zytotoxisches Molekül ist NO wirksam gegen eindringende Bakterien und Tumorzellen durch Hemmung deren mitochondrialer Atmung [43;41]. Benannt nach dem Zelltyp, in dem die NO-Synthase (NOS) zuerst entdeckt wurde, gibt es 3 bekannte Isoformen.

Studien zeigten, dass sie nicht auf einen einzigen Zelltyp beschränkt bleiben. Endotheliale NOS und neuronale NOS werden unter Normalbedingungen gebildet und als „constitutive NOS“ (cNOS) zusammengefaßt [48]. cNOS ist verantwortlich für die „Basaldilatation“ der Gefäße, also den Grundtonus. Daraus ergibt sich der lokale Blutdruck [57]. Die induzierbare NOS (iNOS) wird durch Lipopolysaccharide (LPS) oder Bakterien sowie TNF- $\alpha$ , IL1 und INF- $\gamma$  nach einer Latenzzeit von 3 - 4 h zu lang anhaltender Bildung großer Mengen von NO stimuliert [48;47;42;43].

Bei Sepsis oder Inflammation wird NO zugleich mit  $O_2^-$  gebildet. In Makrophagen dient das daraus gebildete Peroxynitrit ONOO $^-$  zur Abtötung von E. coli [74]. Überproduktion von NO verursacht Zellschäden, behindert die Zellatmung, erhöht die Permeabilität des Darms und verursacht vor allem eine Hypotonie, die nicht mehr auf Katecholamine anspricht. Außerdem kommt es zu Störungen des regionalen Blutflusses durch Shuntbildung. Um der katecholaminrefraktären Hypotonie zu begegnen, wurden Substanzen gesucht, die die NO-Synthese hemmen und damit der NO-vermittelten Vasodilatation entgegenwirken.

Studien mit NOS-Inhibitoren wie L-NAME und L-NMMA zeigten einen deutlichen Anstieg des arteriellen Mitteldrucks (MAP) [34;44]. Der Einsatz dieser Substanzen bei zwei therapierefraktären Patienten im septischen Schock zeigte eine Steigerung sowohl des systolischen als auch des diastolischen Drucks sowie des MAP, so dass nach einigen Stunden die Katecholaminzufuhr verringert beziehungsweise bei einem Patienten ganz beendet werden konnte [47].

In einer Studie bei endotoxinämischen Hunden wurden der Effekt von LPS durch L-NAME auf die Hämodynamik unterdrückt und ein deutlicher Anstieg des Blutdrucks und eine Zunahme des systemischen und regionalen Blutdrucks festgestellt [50;55]. Es zeigte sich aber auch, dass am Ende des Experiments der Sauerstoffbedarf des Darms unter L-NAME nicht mehr gedeckt wurde.

Die Lunge zeigt bei schwerer Hypoxie eine Zunahme des pulmonalarteriellen Widerstandes. Dieser Euler-Liljestrand-Reflex führt normalerweise dazu,

dass minderbelüftete Areale auch weniger durchblutet und somit das Herz-Zeit-Volumen für die Oxygenierung des Körpers optimal ausgenutzt wird. Bei generalisierter Hypoxie führt dies allerdings zu Shuntbildung, damit vermehrter Herzarbeit und weiterer Verschlechterung der Sauerstoffversorgung des Organismus. Bei einer Sepsis sinkt der pulmonale Widerstand deutlich ab, es kommt zu massiven Shunts. Eine Studie an Schafslungen zeigte, dass für den Verlust des Tonus NO verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass unter L-NMMA der Pulmonalgefäßwiderstand anstieg und es zu einer Verminderung der Shunts kam. Eine vollständige Wiederherstellung des Gefäßtonus ließ sich jedoch nicht erreichen, was die Autoren zu der Vermutung veranlasste, dass es auch noch andere Mediatoren geben muss, die für die Vasodilatation der Gefäße zuständig sind [113]. Eine neue Studie beschäftigt sich mit der pulmonalen Vasokonstriktion bei Hypoxie unter Sepsis, experimentell durch LPS-infusion hervorgerufen bei Mäusen. Dabei zeigte sich eine deutlich geringere Vasokonstriktion des pulmonalen Gefäßbettes bei septischen Mäusen unter Hypoxie als bei unbehandelten Mäusen. Eine Perfusion der Lunge mit L-NAME stellte die ausgefallene Vasokonstriktion nur teilweise bei den septischen Mäusen wieder her. Die NO-Überproduktion durch NOS2 verhindert eine adäquate Vasokonstriktion im pulmonalen Gefäßbett und fördert Shuntbildung [120].

Eine andere Studie an kleinen isolierten Pulmonalarterien von Ratten zeigte die essentielle Rolle von NO: Die Pulmonalarterien wurden mit PGF<sub>2</sub>alpha vorkontrahiert und dann einer schweren Hypoxie ausgesetzt. Vorausgegangen war eine Vorbehandlung der Ratten mit LPS. Bei der Kontrollgruppe, die nur mit Kochsalzlösung behandelt war, konnte die unter Hypoxie massiv ausgelöste Kontraktion entweder durch Entfernung des Endothels oder durch Applikation von L-NAME unterdrückt werden. Bei der LPS-Gruppe kontrahierten sich die Arterien, egal ob mit oder ohne Endothel. Die Kontraktion konnte durch L-NAME sehr stark unterdrückt werden. Bei milder Hypoxie dagegen war bei keiner Gruppe eine Veränderung des Vaskulartonus feststellbar. Die Autoren schlossen daraus, dass ein schwerer Mangel an O<sub>2</sub> als Substrat für die NO-Produktion herrschen muss, um eine Kontraktion im Fall einer Sepsis zu erreichen [112].

NO scheint auch direkt für Schäden im Darm und für eine bakterielle Translokation verantwortlich zu sein. Versuche mit Mäusen, denen das Gen zur Expression der iNOS fehlt, zeigten eine Resistenz gegen endotoxinverursachte Schäden im Darm sowie gegen bakterielle Translokation. Die Autoren folgern, dass Darmschädigung sowie bakterielle Translokation mit der Aktivierung von iNOS zusammenhängen [43]. Vermutet wird eine Schädigung des Darms durch hohe lokale NO-Konzentrationen. Die Zellatmung wird behindert, eine Fehlverteilung des regionalen Blutflusses und eine erhöhte Permeabilität des Darms resultiert. Diese These wird gestützt durch eine Arbeit von Eleftheriadis et al. [109] die zeigt, dass NO direkt am Prozess der bakteriellen Translokation beteiligt zu sein scheint. Ratten, die im hämorrhagischen Schock mit L-NAME behandelt wurden, zeigten eine verlängerte Überlebenszeit [110].

Im Falle eines septischen Schocks mit Beteiligung sämtlicher Organsysteme kommt es zur Überstimulierung von Granulozyten, monozytären Makrophagen und anderen Gewebszellen. Diese bilden TNF- $\alpha$  und andere Zytokine, die Gewebeschäden verursachen können. Verschiedene therapeutische Strategien begegnen der Problematik mit dem Versuch, die überschießende inflammatorische Reaktion zu beeinflussen.

Eine andere Substanz, die in diesem Zusammenhang das Interesse auf sich gezogen hat, ist das Xanthin-Derivat Pentoxifyllin (PTX). PTX wird seit Jahren bei vaskulärer Insuffizienz, v. a. der Claudicatio intermittens bei der chronischen arteriellen Verschlusskrankheit, eingesetzt [26,27;85]. PTX reduziert die Blutviskosität, verbessert die Verformbarkeit der Erythrozyten und vermindert die Aggregation von Thrombozyten [28]. Weiterhin inhibiert PTX die unkontrollierte Aktivierung von Granulozyten und supprimiert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL6 durch Makrophagen [63]. TNF- $\alpha$  aktiviert polymorphkernige Granulozyten und erhöht ihre Adhärenz an das Endothel. In Versuchen mit TNF- $\alpha$ -Inhibitoren bei Kaninchen, die E. coli injiziert erhielten, zeigte sich ein verändertes Besiedlungsmuster der Organe im Vergleich zu Kaninchen ohne TNF- $\alpha$ -Inhibitoren: Die Lunge war weniger besiedelt durch E. coli als bei voller

Wirksamkeit des TNF- $\alpha$ . Dieser Mediator verzögert indirekt die Bakterien-Clearance aus bestimmten Organen, setzt andererseits aber auch die Zytokin-Kaskade für die Bakterien-Elimination frei. [4; 75].

PTX hemmt darüber hinaus die Freisetzung lysosomaler Enzyme, die Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub>, einem Plättchenaggregationsfaktor, und die Bildung von Sauerstoffradikalen. Als zugrundeliegender Mechanismus dieser Effekte auf Neutrophile wurde eine Zunahme an intrazellulärem cAMP festgestellt: Die Phagozytoserate der Makrophagen wird durch PTX reduziert und die Superoxid-Anionen-Produktion inhibiert [29]. Eine neue Studie von 2005 am Ganztiermodell zeigte, dass die durch LPS induzierten Gerinnungsstörungen durch PTX moderat unterdrückt werden können [122]. Studien belegen die Wirksamkeit von PTX in verschiedenen Tiermodellen bei Schock, Infektion oder Inflammation. Außerdem verläuft die Lungenbeteiligung bei Sepsis milder unter dem Einfluss von PTX [75;76;111;119]. PTX ist in vitro assoziiert mit einer verminderten Neutrophilen-Funktion, verstärkt aber die Chemotaxis und verringert die Adhärenz an körperfremde Stoffe [32]. Bei einem in vitro Modell wurde die dosisabhängige Wirkung von PTX untersucht anhand von isolierten humanen PMNs, die mit FMLP stimuliert wurden und denen Pentoxifyllin in verschiedenen Dosierungen zugesetzt wurde. Es zeigte sich, dass niedrige PTX-Dosen Chemotaxis, Phagozytoserate und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion der aktivierten PMNs steigern, während höhere Dosen zu einer Hemmung der Leukozytenfunktion führen, also dosisabhängig inflammatorische und antiinflammatorische Wirkungen zu beobachten waren [22].

PTX als Phosphodiesterasehemmer erhöht das intrazelluläre cAMP. Die TNF- $\alpha$ -Bildung und damit auch die NO-Produktion werden dadurch vermindert [21]. In einer Studie über die Wirkung von PTX auf die Bakterienelimination zeigte sich eine verbesserte Streptokokken-Clearance beim septischen Tiermodell an frühgeborenen Kaninchen [59]. Eine andere Studie an Kaninchen zeigte allerdings eine verminderte Clearance-Funktion [61].

Eine Studie am septikämischen Ganztiermodell, bei der wie in der hier vorliegenden Arbeit Kaninchen E. coli intravenös verabreicht und dann die



Eliminationskinetik der Bakterien im Blut und die bakterielle Besiedelung der Organe gemessen wurde, untersuchte den Effekt von N-Acetylcystein (ACC), einem Radikalfänger, auf die bakterielle Clearance. Dabei wurden der „oxidative burst“ der PMNs gemessen. Die Freisetzung der Mediatoren wurde unter ACC unterdrückt. Es zeigte sich, dass eine beeinträchtigte Clearance der Bakterien aus dem Blut mit einer vermehrten Organbesiedelung einherging [5]. Eine andere Studie an Kaninchen beschäftigte sich mit der Frage, ob Norepinephrin, welches intensivmedizinisch zur Druckerhaltung eingesetzt wird, die Clearance der Bakterien aus dem Blut beeinflusst. Es zeigte sich, dass dosisabhängig die Clearance verbessert oder verschlechtert wird, d.h. niedrige Dosen von Norepinephrin verbesserten, höhere Dosen verschlechterten die Bakterienelimination aus dem Blut, die Organe wurden dementsprechend mehr oder weniger besiedelt [3].

In der vorliegenden Studie geht es um die Frage, inwieweit L-NAME und Pentoxifyllin die Bakterien-Clearance aus dem Blut beeinflussen können, ob eine veränderte Elimination der Mikroorganismen aus dem Blut und ein anderes Verteilungsmuster in den Organen feststellbar sind und die Phagozytose-Kapazität des RES durch diese Substanzen beeinträchtigt wird. Außerdem sollte untersucht werden, wie sich der arterielle Druck unter den verschiedenen Bedingungen ändert und ob dieser die Bakterienelimination beeinflusst.

## B. Material und Methodik

### 1. Versuchstiere:

Als Versuchstiere dienten 54 Kaninchen beiderlei Geschlechts (Bastarde aus Chinchilla und White New Zealand) mit einem Körpergewicht von 2600 - 3100 g, die von der Fa. Behringwerke AG, Marburg, geliefert wurden.

### 2. Präparation der Versuchstiere

Nach dem Einführen einer Venenverweilkanüle (Scalp-vein-set<sup>®</sup>) in die Ohrvene des Kaninchens wurden über diese 1000 I.E./kg KG Heparin-Natrium (Liquemin<sup>®</sup> 25000, Fa. Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) injiziert. Zur Narkoseeinleitung wurden Ketaminhydrochlorid (50 mg/kg KG; Ketanest<sup>®</sup>, Fa. Parke-Davis, Berlin) und Xylazinhydrochlorid (4 mg/kg KG; Rompun<sup>®</sup> 2%, Fa. Bayer, Leverkusen) jeweils zur Hälfte in die beidseitige Glutealmuskulatur verabreicht. Nach ausreichender Narkose und Relaxation wurde das Tier in Rückenlage auf einem beheizbaren (35°C) Präparationstisch (angeschlossen an eine Wärmepumpe, Gebr. Haake KG, Berlin) fixiert. Nach Lokalanästhesie der Kehlkopfregion mittels 5-10 ml Lidocain-HCl-Lösung subkutan (Xylocain<sup>®</sup> 2%, Astra Chemicals GmbH, Wedel) erfolgte die Freipräparation und Anschlingung der Trachea. Eine Beatmungskanüle wurde nach der Tracheotomie eingesetzt und durch eine Ligatur gesichert. Die Beatmung erfolgte durch eine Starlingpumpe ( Fa. Braun, Melsungen) mit einer Frequenz von 30/min und einem Atemzugvolumen von 30 ml. Beatmet wurde mit Raumluft, bedarfsweise mit Zusatz von Sauerstoff, so dass nach einer Steady-State-Phase ein PaO<sub>2</sub> von 100 mm Hg als Ausgangswert erreicht wurde.

Anschließend wurden die V. jugularis interna freigelegt, eine Venenverweilkanüle (Fa. Braun, Melsungen) eingelegt und durch eine Ligatur gesichert. Die Narkose wurde über einen Perfusor (Fa. Braun, Melsungen) mittels kontinuierlicher Infusion von 0,1 mg/kg/min Ketanest und 0,015 mg/kg/min Xylazinhydrochlorid in den Jugulariskatheter

aufrechterhalten. Zur kontinuierlichen Kontrolle des arteriellen Drucks und zur Entnahme von Blutproben erfolgte dann die Kanülierung der A. carotis externa mit einem PVC-Katheter (I.D. 1,4 mm), ebenfalls mit zwei Ligaturen gesichert. An den Katheter waren zwei Drei-Wege-Hähne (Fa. Braun, Melsungen) angeschlossen sowie ein Druckaufnehmer, der mit einem Verstärker (Fa. Hellige, Freiburg) und einem Schreiber (Servomed, Fa. Hellige, Freiburg) gekoppelt war.

Zusätzlich zur basalen Flüssigkeitszufuhr von 3-4 ml/kg/h wurde das entnommene Blutvolumen isovolämisch durch sterile Kochsalzlösung ersetzt.

### 3. Monitoring:

Nach Beendigung der Präparation wurde der arterielle Druck über die oben beschriebene Apparatur kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet. Intermittierend wurden Blutproben für Messungen von pH, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub>, Sauerstoffsättigung und Leukozytenzählung entnommen und mittels eines Acid-Base-Laboratory (ABL 330, Fa. Radiometer GmbH, Stuttgart) gemessen. Durch Regelung von Beatmungsfrequenz und Atemzugvolumen sowie bei Bedarf der Zumischung von Sauerstoff wurde in der Steady-State-Phase ein PaO<sub>2</sub> von 100 mm Hg bzw. 40 mm Hg bei Hypoxämieversuchen eingestellt.

### 4. Bakterieninokulation:

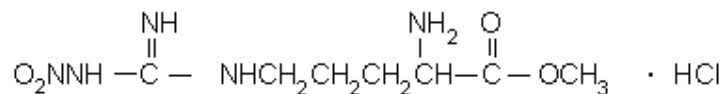
Zur Erzeugung einer Bakteriämie wurde ein serumresistenter nicht-hämolisierender Stamm von Escherichia coli eingesetzt, der aus dem Blut eines septikämischen Patienten isoliert worden war. Eine nähere Bestimmung des E. coli-Stammes wurde nicht durchgeführt. Es liegen keine Informationen zu Pathogenität und Virulenz vor. Nach 10 h Kultivierung bei 37°C auf Blut-Agar-Platten wurden die Kolonien in einer CASO-Bouillon (Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon) auf dem Wirbelmischer homogenisiert und durch serielle Dilution auf eine Konzentration von  $1,3 \times 10^8$  koloniebildenden Einheiten (colony forming units, CFU) eingestellt. Die Bakteriensuspension wurde in Eppendorfhütchen bei -70° C bis zur

Verwendung tiefgefroren. Vitalität und Konzentration der Bakterien wurden durch Kulturen überprüft. In vorhergehenden experimentellen Arbeiten wurden verschiedene Konzentrationen der E. coli-Suspension ausgetestet, mit dem Ziel, eine gute Pathogenität zu gewährleisten, ohne dass das Tier vor Ablauf des Experiments zu Schaden kommt. Dabei wurde die Einstellung der Suspension auf  $1,3 \times 10^8$  CFU optimiert .

## 5. Substanzen

### 5.1. N $\omega$ -Nitro-L-Arginin Methyl Ester

N $\omega$ -Nitro-L-Arginin Methyl Ester (L-NAME, Art.Nr. N 5751) wurde von der Firma Sigma GmbH, 82041 Deisenhofen, bezogen.

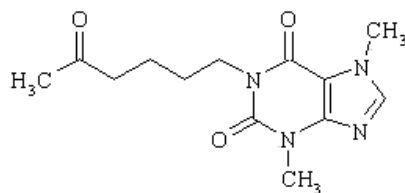


#### *Strukturformel L-NAME*

L-NAME ist ein irreversibler Inhibitor der konstitutiven NO-Synthase (cNOS) und ein reversibler Inhibitor der induzierbaren NO-Synthase (iNOS). Die Substanz wurde in Konzentrationen von 7,5 mg/kg KG und 15 mg/kg KG eingesetzt.

### 5.2. Pentoxifyllin

Pentoxifyllin (3,7-Dimethyl-1(5-Oxahexyl)-Xanthin; Trental<sup>®</sup>) wurde von der Firma Albert-Roussel Pharma GmbH, 65001 Wiesbaden, bezogen.



#### *Strukturformel Pentoxifyllin*

Das Xanthin-Derivat Pentoxifyllin ist ein Phosphodiesterase-Inhibitor. Seine Wirkung entfaltet die Substanz kurz nach der Applikation. Studien zeigten, dass die Substanz wirkungsvoll die Bildung inflammatorisch wirksamer Zytokine hemmen kann [21] und die Migration und mikrobiozide Funktion der Leukozyten beeinflusst [22]. Die Substanz wurde in der vorliegenden Studie in einer Konzentration von 20 mg/kg KG eingesetzt. Diese schon in anderen Studien eingesetzte Dosierung [58; 60] zeigte keinen wesentlichen Abfall des MAD bei einer guten Hemmung von TNF- $\alpha$  und IL-6.

## 6. Leukozytenzählung

Zur Bestimmung der Leukozytenzahl wurde von der entnommenen Probe Blut in eine Leuko-Pipette bis zur Marke 1 aufgezogen und Türks-Lösung (Merck, Art.Nr. 9277) bis zur Marke 11 angesaugt. Nach kräftigem Schütteln der Pipette für 3 Minuten wurden die Leukozyten unter dem Mikroskop in der Neubauer-Zählkammer (Gesamtvolumen = 0,4 ml) ausgezählt. Der Mittelwert errechnete sich wie folgt:

$$\text{Leukozyten}/\mu\text{l Blut} = n \times 25$$

## 7. Versuche am septikämischen Ganztiermodell

### 7.1. Kontrollgruppe (n = 9)

Nach einer Steady-State-Phase von 30 Minuten wurde die auf Zimmertemperatur erwärmte E. coli-Suspension ( $1,3 \times 10^8$  CFU) über den V. jugularis-Katheter injiziert. Für die Kulturen wurde aus dem Carotis-Katheter aseptisch Blut in Abständen von 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 Minuten und danach alle 30 Minuten entnommen. Blutgase und Leukozytenzahl wurden alle 30 Minuten bestimmt.

3 Stunden nach der Bakterieninjektion wurden die Tiere mittels einer Überdosis der Rompun-Ketanest-Lösung getötet.

Unter sterilen Bedingungen wurden Gewebeproben von Lunge, Leber, Milz und Niere für die mikrobiologische Bestimmung der bakteriellen Besiedelung der Organe entnommen.

Das Verfahren ab der E. coli-Injektion bis zur Organentnahme war in allen Experimentalgruppen identisch.

### 7.2. Kontrollgruppe Hypoxämie (n = 10)

Die Kontrollgruppe bestand aus 10 Versuchstieren unter Hypoxämie ohne Einsatz von Pentoxifyllin.

Durch Regulation von Atemzugvolumen und Beatmungsfrequenz wurde in der Steady-State-Phase ein PaO<sub>2</sub> von 40 mm Hg eingestellt und über die gesamten ersten 60 Minuten nach E.coli-Injektion konstant gehalten. Nach 60 Minuten wurde ein PaO<sub>2</sub> von 100 mm Hg eingestellt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie oben beschrieben.

### 7.3. Pentoxifyllin-Gruppe (n = 12)

Nach der Steady-State-Phase von 30 Minuten wurde über den Jugulariskatheter 20 mg/kg KG Pentoxifyllin langsam über 5 Minuten injiziert. Dabei kam es zu einem durchschnittlichen RR-Abfall von 10 mm Hg. 15 Minuten später erfolgte die Injektion der E.coli-Suspension ( $1,3 \times 10^8$  CFU), ebenfalls über den Jugulariskatheter. Das weitere Verfahren war wie oben beschrieben.

### 7.4. Pentoxifyllin-Hypoxämie-Gruppe (n = 8)

Durch Regelung von Atemzugvolumen und Atemfrequenz wurde ein PaO<sub>2</sub> von 40 mm Hg eingestellt. Nach einer Steady-State-Periode von 15 Minuten erfolgte die Gabe von 20 mg/kg KG Pentoxifyllin langsam über 5 Minuten über den Jugulariskatheter. 15 Minuten später wurden E. coli injiziert. Das weitere Verfahren war mit der Kontrollgruppe identisch.

#### 7.5. L-NAME-Gruppe 7,5 mg/kg KG (n = 9)

Nach 30 Minuten Steady-State-Phase wurden 7,5 mg/kg KG L-NAME über den Jugulariskatheter injiziert. Kurz nach L-NAME-Gabe kam es zu einem deutlichen Druckanstieg von durchschnittlich 25 mm Hg. Dieser Effekt hielt durchschnittlich 2 h an. 15 Minuten später erfolgte über den selben Zugang die Injektion von E. coli ( $1,3 \times 10^8$  CFU).

Das weitere Vorgehen entspricht dem oben beschriebenen.

#### 7.6. L-NAME-Gruppe 15 mg/kg KG (n = 5)

Das Procedere entspricht der L-NAME Gruppe 7,5 mg/kg KG mit höherer Dosierung. Auch hier kam es zu einem, wenn auch geringeren, mittleren Druckanstieg von 13 mm Hg.

#### 7.7. Quantitative Mikrobiologie

Sofort nach Entnahme wurden die Blut- und Gewebeproben eisgekühlt. Es folgten Verdünnungsreihen im Verhältnis 1:10 mit steriler Kochsalzlösung. Jeweils 100 µl einer Verdünnungsstufe (9 ml NaCl-Lösung 0,85% + 1 ml der nächsthöheren Konzentration) bzw. 50 µl des unverdünnten Blutes wurden auf CLED-Agar-Platten (Bromthymolblau-Lactose-Cystin-Agar) nach Sandys [23] aufgebracht.

Von den steril entnommenen Organproben wurden jeweils 1,5 g des Gewebes mit sterilem Seesand in einem Mörser homogenisiert und mit 5 ml steriler NaCl-Lösung 0,85% aufgeschwemmt. Es folgte wieder eine Verdünnungsreihe. 50 µl der Ausgangssuspension und jeweils 100 µl der Verdünnungen wurden auf CLED-Platten aufgebracht.

Die inokulierten Platten wurden 24 h bei 37°C inkubiert und danach die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Die endgültigen bakteriellen Konzentrationen wurden dann auf Kolonien/ml Blut bzw. als Kolonien/g Gewebe umgerechnet.

## 8. Statistik

Erfasst wurden die Werte mit Excel von Microsoft.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows Version 6.13. Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der CFU-Werte wurden mit Hilfe des parameterfreien „Kruskal-Wallis-Tests“ beurteilt. Unterschiede im Verlauf der arteriellen Drücke, pH-Werte und CO<sub>2</sub>-Messungen wurden mit Hilfe der 2-faktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen getestet. Berechnet wurden Mittelwert und Standardabweichung für normalverteilte Daten (arterieller Druck, pH-Werte, CO<sub>2</sub>-Werte, Leukozyten) sowie Median, Minimum und Maximum für die Organbesiedelungswerte (CFU). Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt als Balkendiagramme oder Verlaufskurven der Mittelwerte bei normalverteilten Werten und der Mediane bei nichtnormalverteilten Werten.

## 9. Zeitraum der Experimente

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde über einen Zeitraum vom 29.05.1996 bis 24.04.1998 durchgeführt.



## C. Ergebnisse

Als Kontrollgruppe dienten 9 Kaninchen, die auf einen PaO<sub>2</sub> von 100 mm Hg eingestellt und dann mit  $1,3 \times 10^8$  CFU E. coli inokuliert wurden. Diese Gruppe wurde sowohl für die Versuche mit L-NAME als auch mit Pentoxifyllin als Referenz betrachtet. Eine zweite Gruppe bestand aus 8 Kaninchen, die auf einen PaO<sub>2</sub> von 40 mm Hg eingestellt, mit der gleichen Menge E. coli infiziert und für die Hypoxämieversuche unter Pentoxifyllin als Kontrolle eingesetzt wurden.

1. Clearance von intravenös zugeführten Escherichia coli aus dem Blut und ihre Organverteilung ohne additive Substanzen unter PaO<sub>2</sub> = 100 mm Hg nach Inokulation mit  $1,3 \times 10^8$  CFU:

In allen Gruppen wurden vor der Injektion der Bakterien sterile Blutkulturen gefunden. Nach 40 Minuten zeigte sich eine vollständige Clearance der E. coli aus dem Blut.

Von allen Organen wurden in der Leber mit Abstand die höchsten Bakterienzahlen gefunden (1424,0 CFU/g Gewebe; es wurde hier, wie bei den anderen Angaben bei Gewebekulturen, der Median verwandt, da keine Normalverteilung vorliegt). Minimal wurden 225 und maximal 30000 CFU/g Gewebe gezählt. In der Milz fanden sich minimal 7, maximal 1390 CFU/g Gewebe (Median 278 CFU/g Gewebe), in der Lunge minimal 12, maximal 248 CFU/g Gewebe (Median 58 CFU/g). Die Niere war gering besiedelt mit minimal 0 und maximal 8 CFU/g Gewebe (Median 2 CFU/g).

2. Beeinflussung der Clearance und Organverteilung von E. coli unter L-NAME

- 2.1. Clearance aus dem peripheren Blut

In insgesamt 14 Versuchen wurde den Tieren der NO-Synthasen-Hemmstoff L-NAME i.v. injiziert. Bei 5 Versuchen wurde die Dosis 15 mg/kg KG L-NAME, bei weiteren 9 Versuchen 7,5 mg/kg KG L-NAME gewählt und 30 Minuten vor den Bakterien appliziert.

Nach 60 Minuten zeigten sich in der Regel keine Bakterien mehr in den gewonnenen Blutkulturen (s. Abb. 1). Eine signifikante Verzögerung der Clearance zeigte sich unter L-NAME 15 mg/kg KG in der 40. und 50. Minute ( $p < 0,02$ ). Hier waren in der Kultur  $2 \pm 2$  CFU/100  $\mu$ l Blut nachweisbar. Für die Konzentration von 7,5 mg/kg KG L-NAME war kein statistisch relevanter Unterschied zur Kontrolle zu verifizieren.

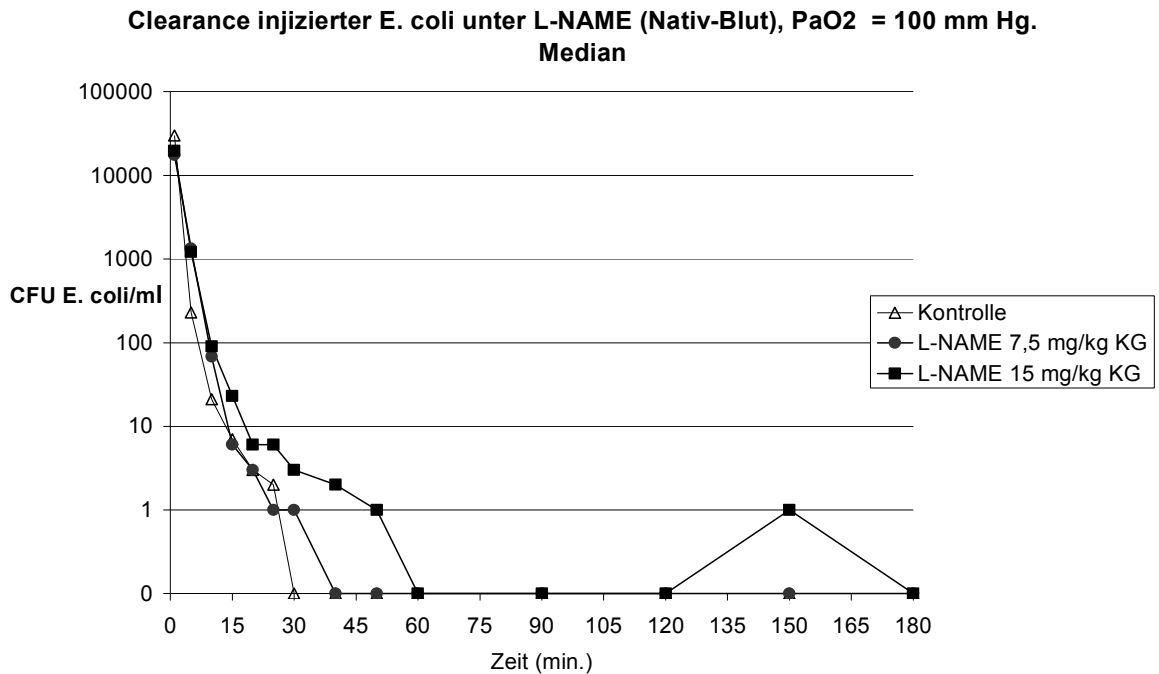


Abb. 1: Clearance unter L-NAME im Nativblut bei PaO<sub>2</sub> = 100 mm Hg. Dargestellt ist der Median. Zeitpunkt 0 entspricht der Injektion der E. coli

## 2.2 Organverteilung:

In den Organen (s. Abb. 2) kam es unter 15 mg/kg KG L-NAME zu einer verstärkten Besiedelung durch E. coli. In der Leber wurden 1772 CFU/g Gewebe gezählt (minimal 225 CFU/g, maximal 4850 CFU/g). Die Lunge zeigte vergleichsweise wenig Kolonien mit einem Median von 172 CFU/g (minimal 12 CFU/g, maximal 220 CFU/g). In der Niere lag der Median bei 8 CFU/g (minimal 5 CFU/g, maximal 26 CFU/g). In der Milz wurde eine geringere Koloniezahl bei der L-NAME-Dosierung von 15 mg/kg KG (Median 278 CFU/g Gewebe, minimal 94 CFU/g, maximal 38500 CFU/g) gegenüber

der Kontrolle mit Median 278 CFU/g Gewebe (minimal 7 CFU/g, maximal 1390 CFU/g) gefunden.

Bei 7,5 mg/kg KG L-NAME zeigte sich eine tendenziell verringerte Besiedelung in allen Organen, hier besonders ausgeprägt wieder bei der Milz (Median 114 CFU/g Gewebe; min. 16 CFU/g, max. 324 CFU/g versus Median 278 CFU/g in der Kontrollgruppe, hier minimal 7 CFU/g, maximal 1390 CFU/g).

Die Ergebnisse sind tendenziell und statistisch nicht signifikant.

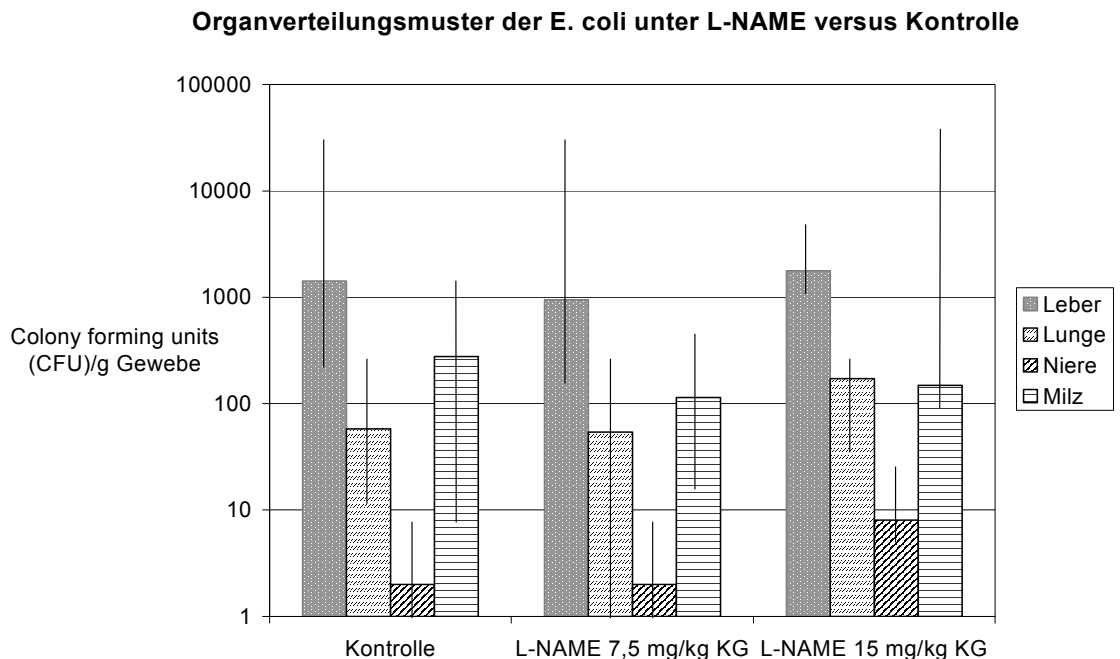


Abb. 2: Organverteilungsmuster der E. coli unter L-NAME versus Kontrolle. Dargestellt sind der Median und Maximum sowie Minimum der Daten

### 2.3. Verhalten des arteriellen Mitteldruckes nach Injektion von E. coli unter L-NAME

Die Applikation von L-NAME erfolgte 30 Minuten vor Injektion der E. coli. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich Unterschiede bezüglich des arteriellen Drucks: Nach Applikation der Bakterien kam es insbesondere unter 15 mg/kg KG L-NAME zu maximalen Druckerhöhungen bis 120 mm Hg. Im Mittel zeigte sich ein Druckerhöhung um  $30 \pm 28$  mm Hg in den ersten Sekunden. Direkt im

Anschluss daran kam es zu einem massiven Druckabfall, im Mittel um  $33 \pm 8$  mm Hg, bis auf Extremwerte von minimal 15 mm Hg systolisch. Dies machte kurzzeitig eine kardiale Reanimation von 3 Versuchstieren erforderlich. Danach kam es zu einer Drucksteigerung in der Kontrollgruppe mit einem  $30 \pm 24$  mm Hg höheren MAP. Dieser Effekt war bei L-NAME in der Dosierung 15 mg/kg KG signifikant ( $p < 0,001$ ), s. Abb. 3.

Im Intervall von der 5. bis zur 40. Minute kam es unter L-NAME 15 mg/kg zu einem stärkeren Druckabfall um  $11 \pm 23$  mm Hg im Vergleich zur Gruppe mit 7,5 mg/kg L-NAME ( $p < 0,05$ ). Im weiteren Verlauf sanken die arteriellen Mitteldrücke bei allen Versuchstieren, am ausgeprägtesten bei der Gruppe mit der höchsten L-NAME-Dosierung.

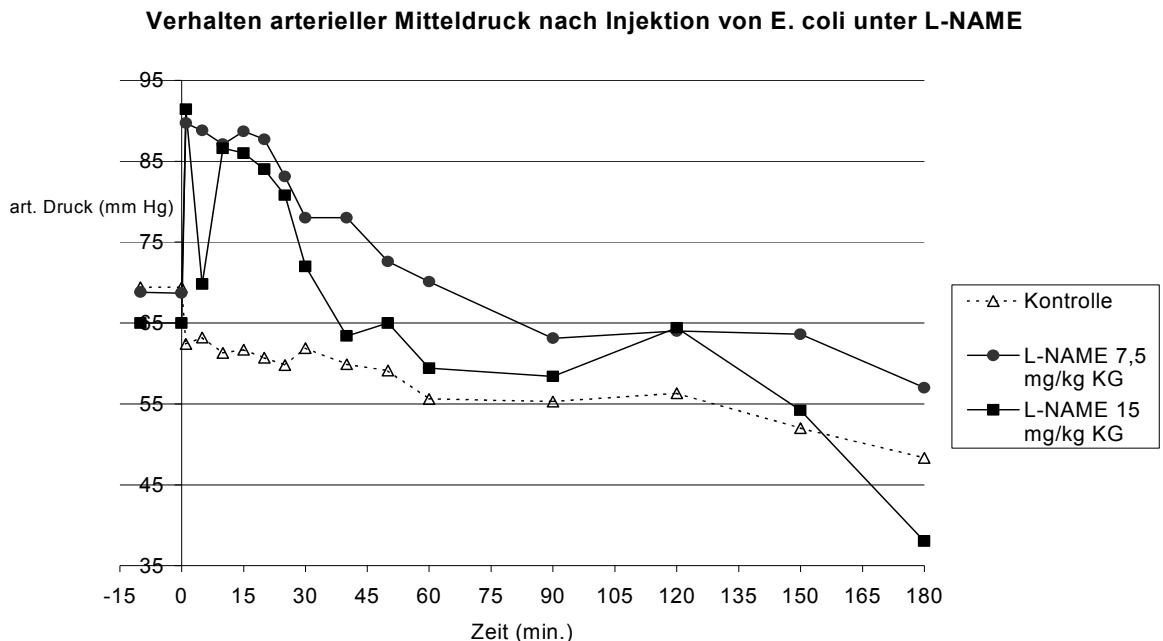


Abb. 3: Verhalten des arteriellen Mitteldrucks nach Injektion von E. coli unter L-NAME. Zeitpunkt 0 entspricht der Injektion der E. coli

#### 2.4. Beeinflussung des PaCO<sub>2</sub> nach Injektion von E. coli unter L-NAME:

Im Rahmen der Blutgasanalysen wurde der zeitliche Verlauf des PaCO<sub>2</sub> bestimmt (s. Abb. 4). Signifikant ( $p < 0,05$ ) kommt es bei einer Konzentration von 15 mg/kg KG L-NAME um die 30. Minute zu einem Abfall von 45 mm Hg auf im Mittel  $38,3 \pm 11,2$  mm Hg, um dann in der 60. Minute von 45 mm Hg

auf  $51,4 \pm 13,3$  mm Hg anzusteigen. Der Anstieg des PaCO<sub>2</sub> ist tendenziell in der 60. Minute auch für die Gruppe mit der niedrigeren Konzentration feststellbar (von 45 mm Hg auf  $46,6 \pm 7,9$  mm Hg), ein Abfall ist jedoch hier wie auch bei der Kontrollgruppe nicht so stark zu sehen. Eine Erklärung dürfte in dem massiven Druckabfall mit konsekutiver Minderperfusion der Lunge und damit verminderter Elimination des PaCO<sub>2</sub> in den ersten 30 Minuten liegen. Danach kommt es zu einer Normalisierung der Druckverhältnisse und zu einer Hyperperfusion.

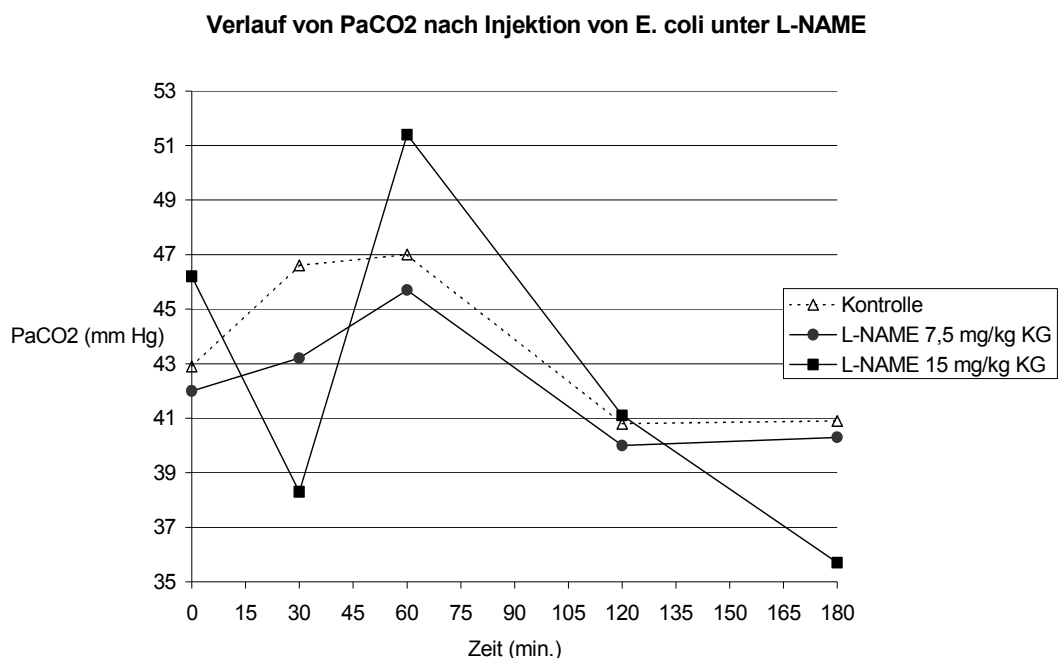


Abb. 4: Verlauf von PaCO<sub>2</sub> nach Injektion von E. coli unter L-NAME. Zeitpunkt 0 entspricht der Injektion der E. coli

## 2.5. Beeinflussung des pH-Wertes nach Injektion von E. coli durch L-NAME:

Im Verlauf des PaCO<sub>2</sub>-Abfalls kam es um die 30. Minute bei der L-NAME-Konzentration von 15 mg/kg KG zu einem pH-Anstieg von 7,43 auf  $7,48 \pm 0,07$  mit anschließendem Abfall auf  $7,34 \pm 0,05$  um die 60. Minute ( $p < 0,002$ ). In der niedrigeren L-NAME-Konzentration kam es nicht zu signifikanten

Effekten (s. Abb. 5), jedoch um die 60. Minute ebenfalls zu einem pH-Abfall von 7,43 auf im Mittel  $7,38 \pm 0,04$ .

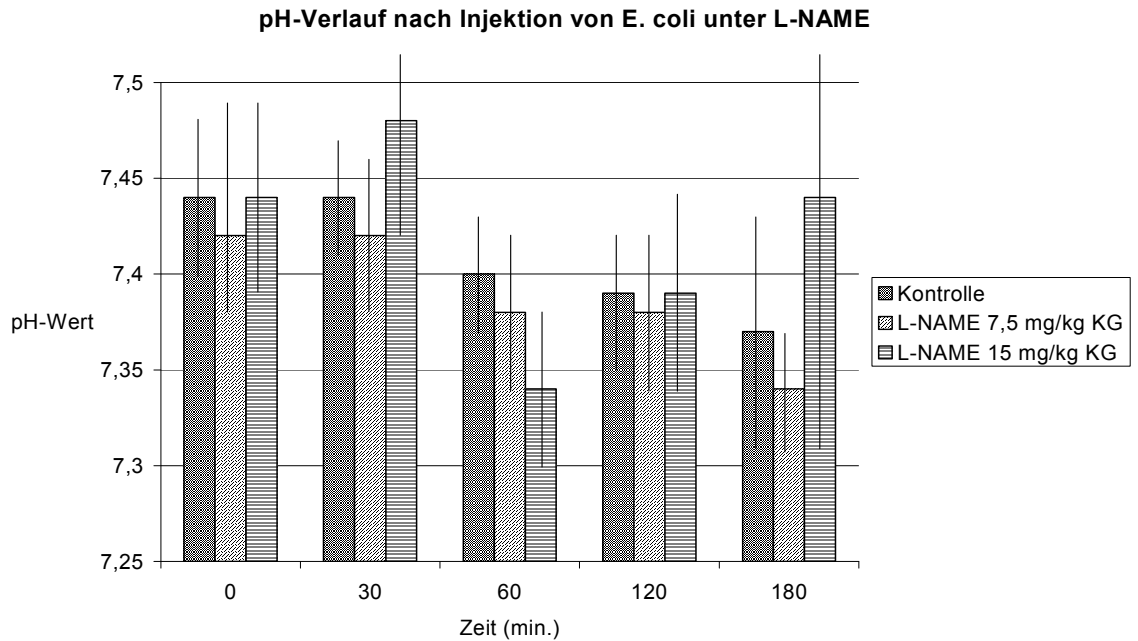


Abb. 5: pH-Verlauf nach Injektion von E. coli unter L-NAME im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung(SD)

## 2.6. Leukozytenzählung

Es wurden jeweils zu den Zeitpunkten 0, 60, 120, 180 Minuten nach Injektion der E. coli Leukozyten gezählt und diese grafisch dargestellt (s. Abb. 6). Dabei ergaben sich zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Die Leukozytenzahlen verhielten sich einer Sepsis entsprechend und fielen im Versuchsverlauf kontinuierlich ab. Angegeben ist jeweils der Mittelwert der Leukozyten/ $\mu\text{l}$  vom Zeitpunkt 0 bis 180. Minute post inj.: Kontrollgruppe:  $5887,57 \pm 1100$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$  zum Zeitpunkt 0 auf  $1682 \pm 712$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$  zum Zeitpunkt 180. Minute. Unter L-NAME 15 mg/kg KG fielen die Leukozyten von  $5075 \pm 143$  / $\mu\text{l}$  zum Zeitpunkt 0 auf  $1662 \pm 256$  / $\mu\text{l}$  zum Zeitpunkt 180. Minute. Unter L-NAME 7,5 mg/kg KG zum Zeitpunkt 0:  $5250 \pm 456$  / $\mu\text{l}$  fielen die Leukozyten zum Zeitpunkt 180. Minute auf  $1981 \pm 538$  / $\mu\text{l}$ .

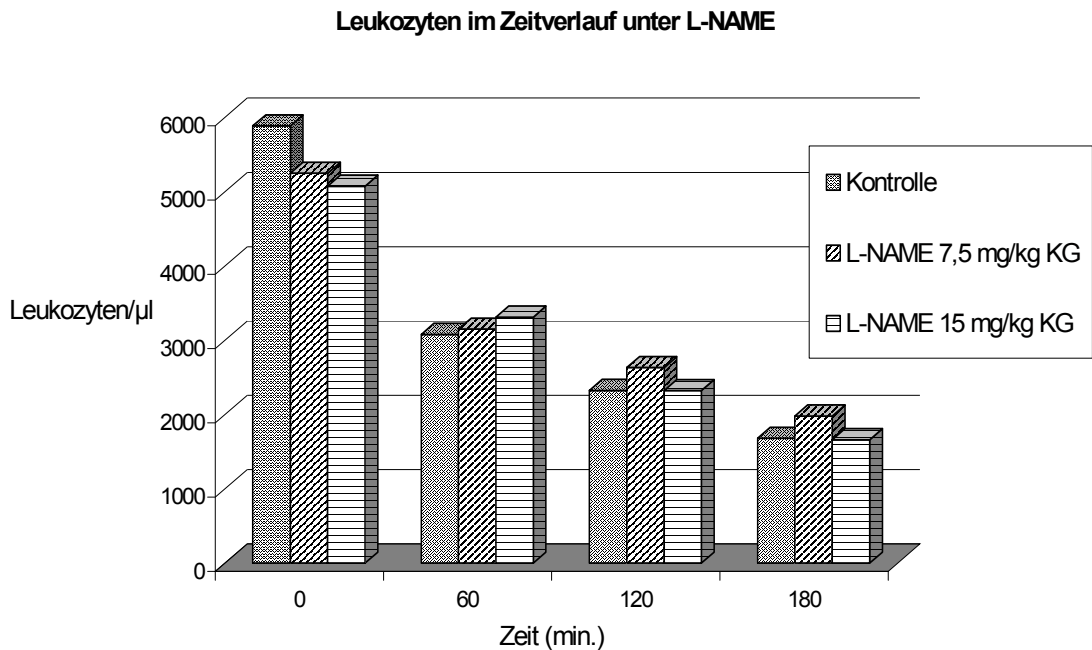


Abb. 6: Leukozyten im Zeitverlauf unter L-NAME. Angegeben sind die Mittelwerte. Zeitpunkt 0 entspricht der Injektion der *E. coli*

### 3. Beeinflussung der Clearance und Organverteilung von *E. coli* durch Pentoxifyllin

#### 3.1. Clearance aus dem peripheren Blut

Insgesamt 12 Tiere erhielten eine Dosis von 20 mg/kg KG Pentoxifyllin i.v. 15 Minuten vor Gabe der *E. coli* Suspension. 30 Minuten nach Inokulation war eine komplette Clearance des Blutes erfolgt. Die PTX-Gruppe und Kontrollgruppe unterschieden sich nicht. (s. Abb. 7)

Clearance nach Injektion von E. coli unter Pentoxifyllin 20 mg/kg KG bei PaO<sub>2</sub> = 100 mm Hg

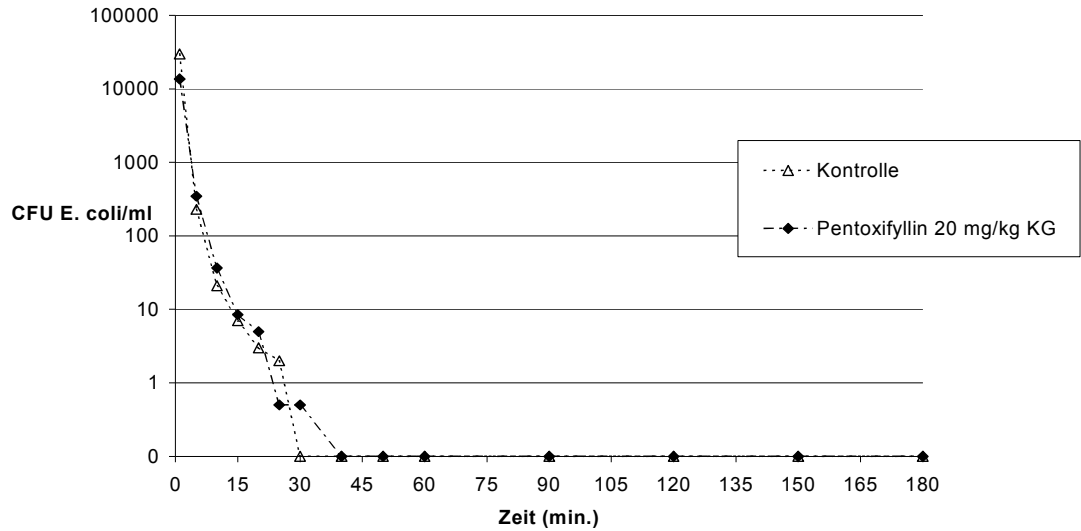


Abb. 7: Clearance nach Injektion von E. coli unter Pentoxifyllin 20 mg/kg Körpergewicht bei PaO<sub>2</sub> = 100 mm Hg

### 3.2. Organverteilung (s. Abb. 8):

Unterschiede in der Clearance zwischen mit Pentoxifyllin vorbehandelten und unbehandelten Kaninchen ergaben sich hinsichtlich der Organverteilung nicht.

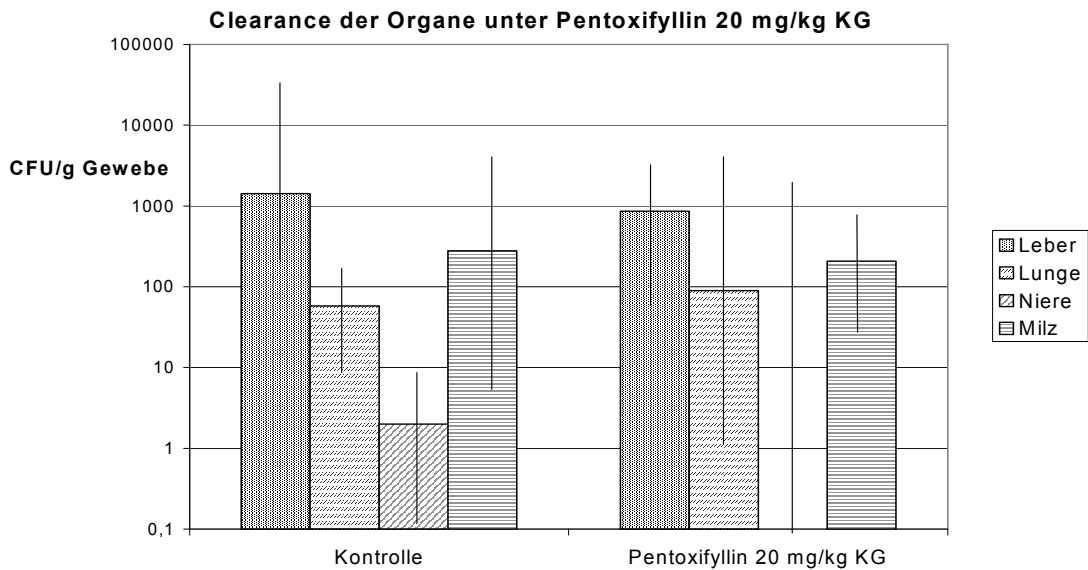


Abb. 8: Clearance der Organe unter Pentoxifyllin 20 mg/kg Körpergewicht bei PaO<sub>2</sub> = 100 mm Hg. Dargestellt ist jeweils der Median mit Minimum und Maximum



### 3.3. Verhalten des arteriellen Mitteldrucks nach Injektion von E. coli

Auch der arterielle Druck zeigte statistisch keine Unterschiede (s. Abb. 9). Unter Pentoxifyllin fiel der arterielle Mitteldruck nach Injektion der Bakterien von einem mittleren Ausgangswert von 73 mm Hg um  $20 \pm 3$  mm Hg ab. Auch in der Kontroll-Gruppe ohne Gabe von PTX zeigte sich ein arterieller Druckabfall nach Injektion der Bakterien von 68 mm Hg um  $16 \pm 10$  mm Hg. Im Verlauf zeigte sich das Pentoxifyllin-Versuchsmodell jedoch druckstabiler als das Kontrollmodell. Dort lag der MAP im Mittel um  $5 \pm 4$  mm Hg höher als in der Kontrollgruppe (s. Abb. 9). Statistisch sind die Ergebnisse allerdings auch hier nicht signifikant.

**Verhalten arterieller Mitteldruck nach Injektion von E. coli unter PTX 20 mg/kg KG vs. Kontrolle**

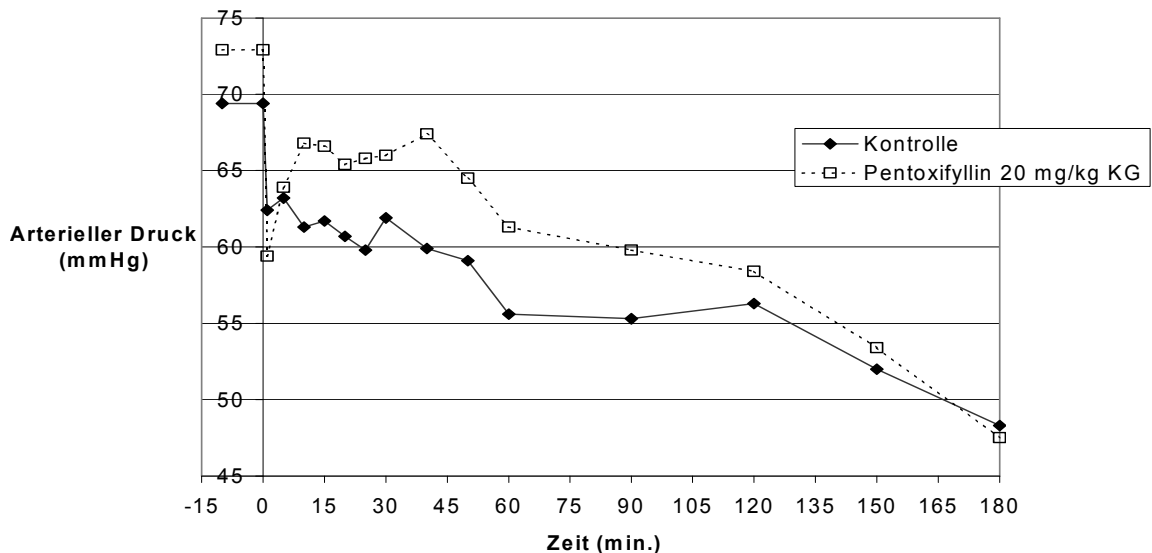


Abb. 9: Verhalten arterieller Mitteldruck nach Injektion von E. coli unter Pentoxifyllin 20 mg/kg Körpergewicht im Vergleich zur Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte. Zeitpunkt 0 entspricht der Injektion der E. coli

### 3.4. Verhalten der Clearance im Blut bei Hypoxämie $\text{PaO}_2 = 40 \text{ mm Hg}$ und Pentoxifyllin 20 mg/kg KG:

In einer Versuchsreihe mit 10 Tieren wurde vor Injektion der *E. coli*-Suspension eine steady-state-Phase mit einem  $\text{PaO}_2$  von 40 mm Hg eingestellt. Danach wurden den Tieren  $1,3 \times 10^8$  CFU *E. coli* intravenös injiziert. Hier zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Eliminationskinetik (s. Abb. 10).

In weiteren 8 Versuchen wurde den hypoxämischen Tieren vor Applikation der *E. coli* Pentoxifyllin in einer Dosierung von 20 mg/kg KG zugeführt.

Es ergaben sich keine statistisch relevanten Änderungen der Kinetik sowohl hinsichtlich der Kontrollgruppe als auch der Hypoxämiegruppe (s. Abb. 10).

Nach 40 Minuten war eine vollständige Clearance der *E. coli* im peripheren Blut erreicht. Hier konnte kein Effekt von PTX nachgewiesen werden.

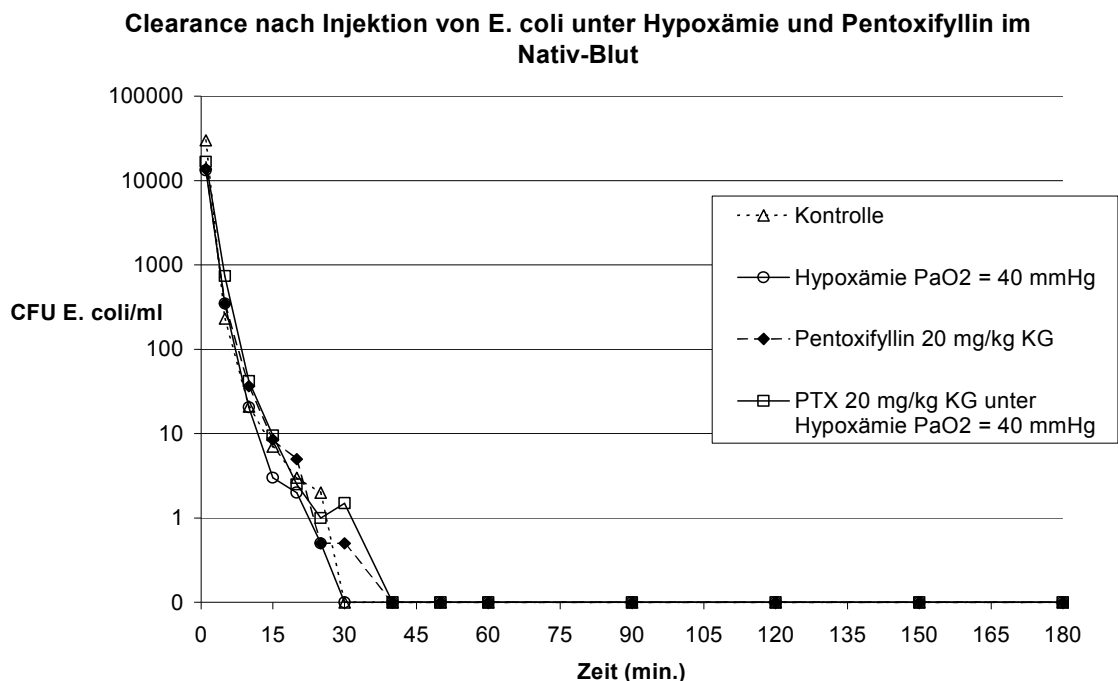


Abb. 10: Clearance nach Injektion von *E. coli* unter Hypoxämie  $\text{PaO}_2 = 40 \text{ mm Hg}$  und Pentoxifyllin 20 mg/kg KG im Nativblut. Dargestellt ist der Median. Zeitpunkt 0 entspricht der Injektion der Bakterien

### 3.5. Organverteilung nach Injektion von E. coli unter Hypoxämie und Pentoxifyllin 20 mg/kg KG:

Zwischen den einzelnen Gruppen bestand kein Unterschied hinsichtlich der bakteriellen Besiedelung der Organe. In der Leber wurden in der Hypoxämiegruppe minimal 36 und maximal 9800 CFU/g Gewebe gezählt (Median 850 CFU/g Gewebe). Hypoxämie- und PTX-Gruppe zeigten minimal 350 und maximal 4020 CFU/g (Median 825 CFU/g). Im Vergleich wurden in der Kontrolle minimal 225 und maximal 30000 CFU/g Gewebe (Median 1424) ausgezählt (s. Abb. 11).

Die Unterschiede zwischen Kontrollgruppe, Hypoxämie-Gruppe und PTX + Hypoxämie-Gruppe waren in Milz und Niere noch weniger ausgeprägt. Lediglich die Lunge zeigte eine stärkere Persistenz der Bakterien unter Hypoxämie mit minimal 12 CFU/g, maximal 248 CFU/g (Median 58 CFU/g) im Vergleich zur Kontrolle. Diese Änderungen waren aber nicht statistisch signifikant.

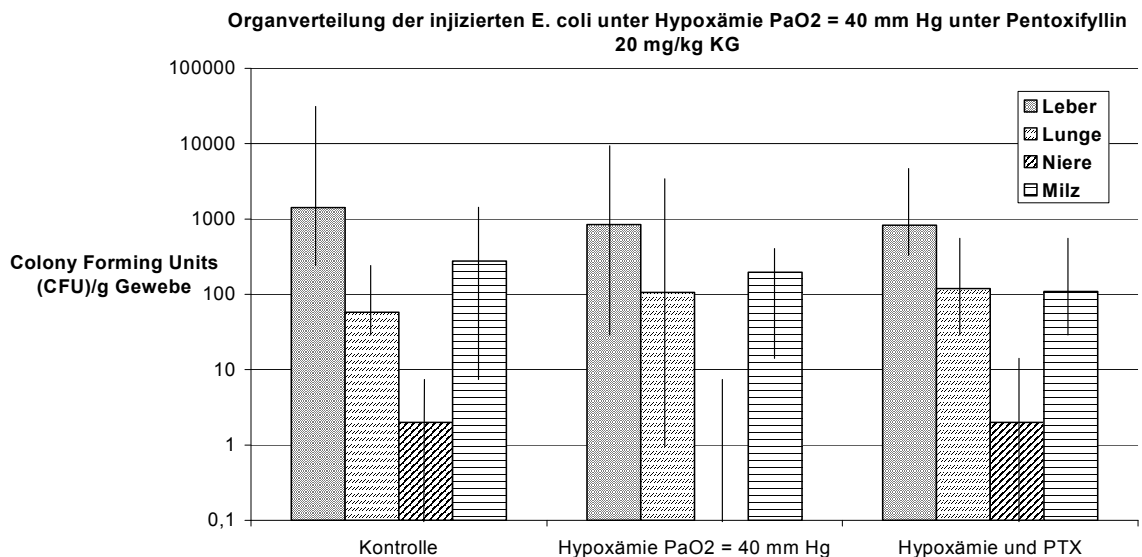


Abb. 11: Organverteilung der injizierten E. coli unter Pentoxifyllin 20 mg/kg Körpergewicht und Hypoxämie PaO<sub>2</sub> = 40 mm Hg. Dargestellt sind Median, Minimum und Maximum

3.6. Verhalten von arteriellem Mitteldruck nach Injektion von E. coli unter Hypoxämie und PTX + Hypoxämie im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 12):

Unter Hypoxämie und Pentoxifyllin kommt es um die 40. Minute post inj. zu einem deutlichen Blutdruckabfall von 59 mm Hg um  $23 \pm 13$  mm Hg ( $p < 0,05$ ). Danach kommt es zu einer Druckstabilisierung. Der Druckverlauf verhält sich im Weiteren wie die Vergleichskurven von Kontrolle und Hypoxämie.

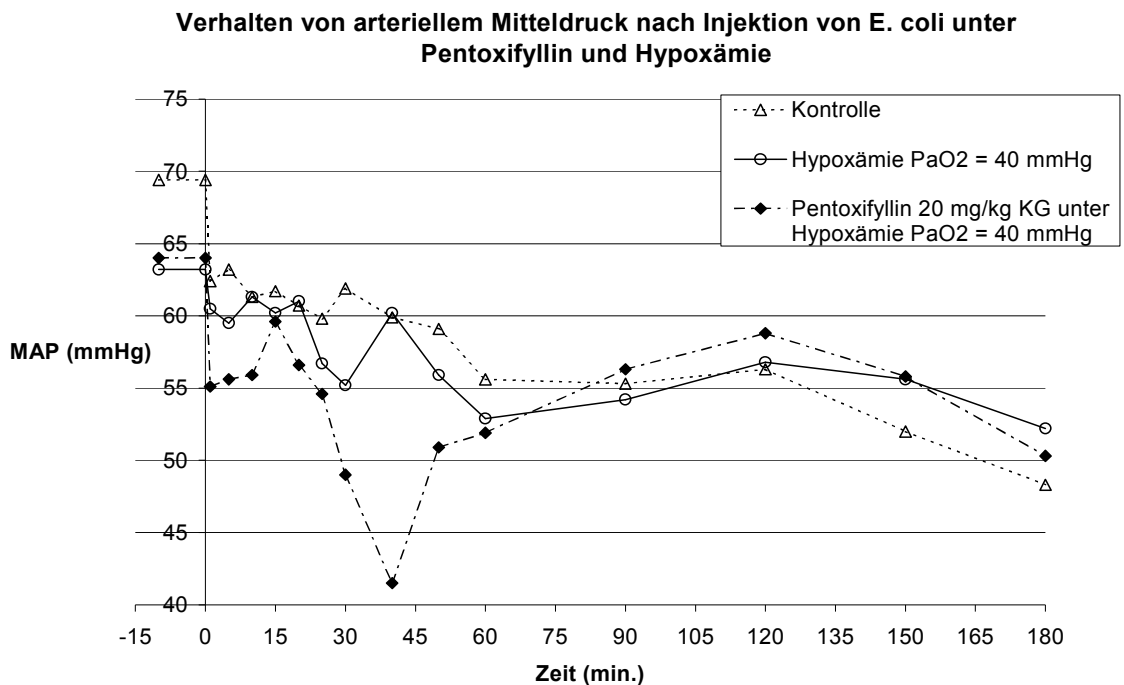


Abb. 12: Verhalten von arteriellem Mitteldruck nach Injektion von E. coli unter Pentoxifyllin und Hypoxämie PaO<sub>2</sub> = 40 mm Hg

3.7. Verhalten des PaCO<sub>2</sub> nach Injektion von E. coli (s. Abb. 13):

Unter Hypoxämie wurden höhere PaCO<sub>2</sub>-Konzentrationen gemessen als unter Normoxämie, im Mittel wurde eine Erhöhung um  $8 \pm 7$  mm Hg von 44 mm Hg. Pentoxifyllin hatte auf die CO<sub>2</sub>-Elimination unter Hypoxämie keinen

messbaren Einfluss. Wie zu erwarten, lagen die  $\text{CO}_2$ -Werte bei Hypoxämie höher als unter Normoxämie.

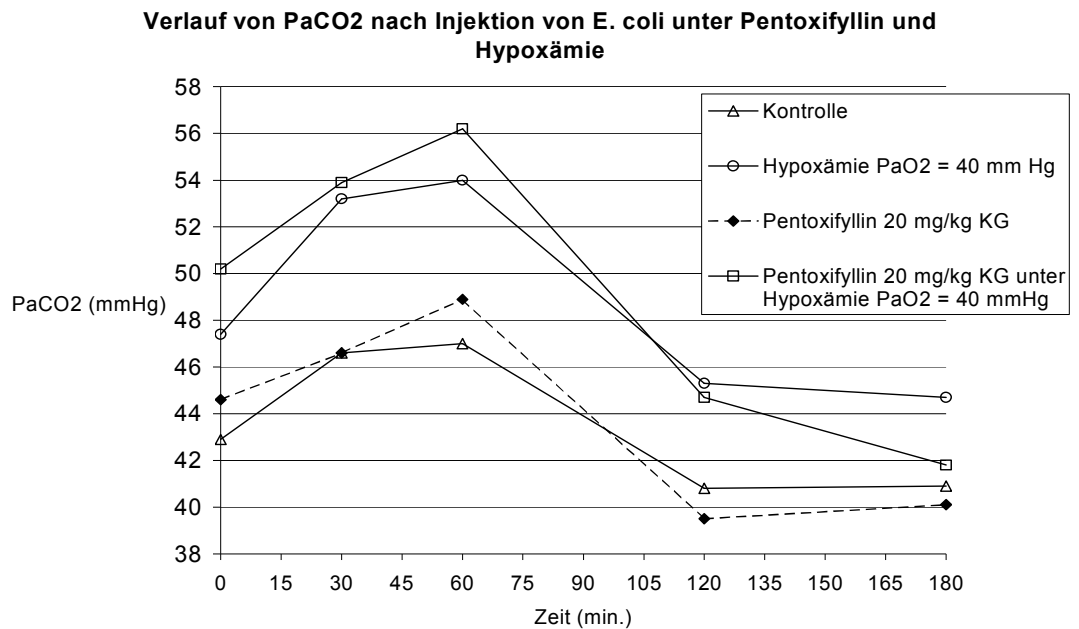


Abb. 13: Verlauf von  $\text{PaCO}_2$  nach Injektion von *E. coli* unter Pentoxifyllin und Hypoxämie  $\text{PaO}_2 = 40 \text{ mm Hg}$ . Zeitpunkt 0 entspricht der Injektion der *E. coli*

### 3.8. Verhalten des pH-Wertes nach Injektion von *E. coli* unter PTX und Hypoxämie

Der pH-Wert sank erwartungsgemäß auch unter Pentoxifyllin bei Hypoxämie ab (s. Abb. 14). Ein Unterschied zwischen Kontrollgruppe und PTX-Hypoxämiegruppe war hinsichtlich der Kinetik nicht zu verifizieren.

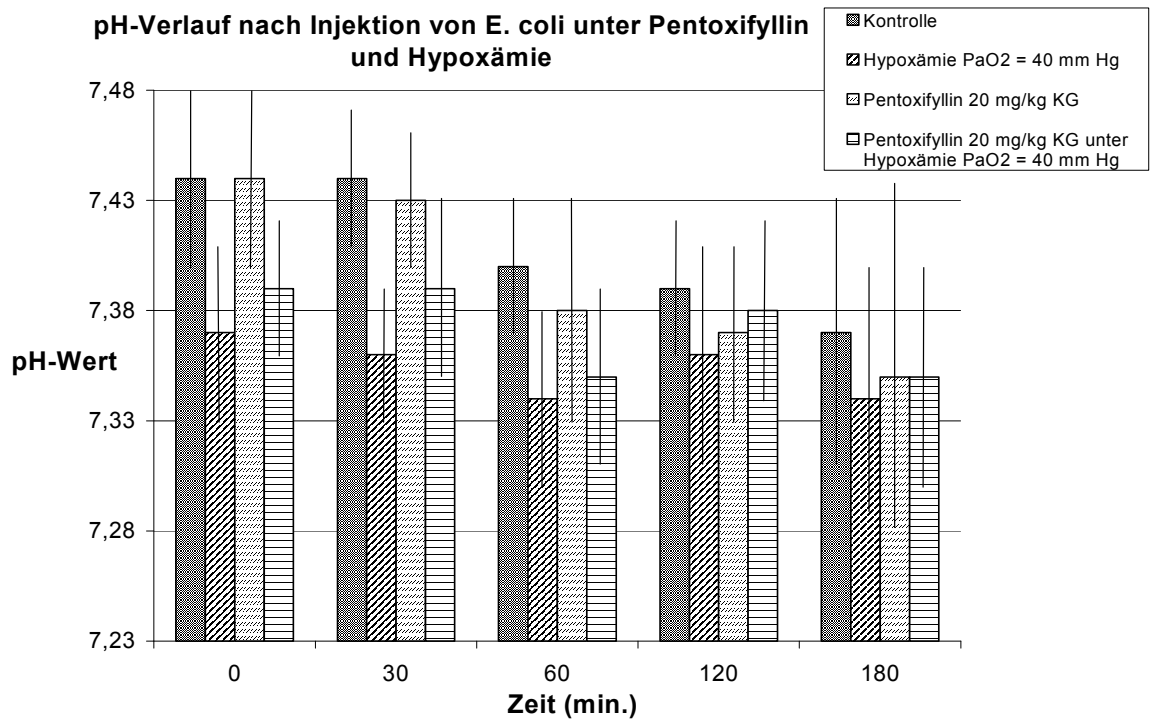


Abb. 14: pH-Verlauf nach Injektion von E. coli unter Pentoxifyllin und Hypoxämie PaO<sub>2</sub> = 40 mm Hg. Dargestellt sind Mittelwerte sowie Standardabweichung (SE).

## D. Diskussion

Alle Versuchsansätze der vorliegenden Studie hatten das gemeinsame Ziel festzustellen, ob und wie die Clearance und Organverteilung intravenös applizierter E. coli unter Normoxämie und Hypoxämie durch Vorbehandlung mit L-NAME und Pentoxifyllin verändert werden. Anhand der Verteilungsmuster der Bakterienbesiedelung in den Organen sowie der Clearance-Rate der Mikroorganismen aus dem Blut sollte für beide Substanzen untersucht werden, ob sich eine Verbesserung oder eine Hemmung der Bakterienelimination nachweisen lassen. Die Untersuchungen erfolgten am septikämischen Ganztiermodell.

Es zeigte sich, dass die Clearance der Mikroorganismen aus dem Blut unter L-NAME bei einer Dosierung von 15 mg/kg KG eindeutig verzögert war. Einen Einfluss auf die Besiedelung der Organe hatte die Substanz nicht. Außerdem konnte eine deutliche Zunahme des arteriellen Mitteldrucks gezeigt werden. Zwischen den Tieren der Pentoxifyllin-Gruppe und der Kontrollgruppe ergaben sich weder in der Besiedelung der Organe noch in der Blut-Clearance signifikante Unterschiede.

Die Versorgung des heutigen Patienten durch verbesserte Flüssigkeitssubstitution, Antibiotika und Wundbehandlung haben weniger Todesfälle zur Folge, die durch primär hämodynamische Probleme oder Wundkomplikationen verursacht sind. Allerdings trug und trägt die Sepsis bis heute als Hauptverursacher Morbidität und Mortalität von kritisch erkrankten Patienten bei [68;69;70;71]. Schwere Verletzungen und eine durch Krankheit verursachte Immunsuppression machen Patienten anfällig für Infektionen, die bis zum ARDS und Multiorganversagen gehen können [24;81]. Im Blick auf therapeutische Strategien wurden viele Anstrengungen unternommen, die zugrundeliegenden Mechanismen dieser komplexen Materie aufzuklären und Behandlungskonzepte zu entwickeln.

Der Pathomechanismus des septischen Schocks besteht in der Induktion inflammatorisch/antiinflammatorisch wirksamer Zytokine und Mediatoren, die sich unkontrolliert und selbstverstärkend im Körper ausbreiten [10]. Endotoxin, ein Lipopolysaccharid aus der Bakterienwand von E. coli, wird

spontan und bei Lyse der Mikroorganismen freigesetzt. Es aktiviert Neutrophile zur Produktion von Sauerstoffradikalen, dem sogenannten „oxidative burst“. Endotoxin induziert in Makrophagen die Bildung von TNF- $\alpha$  und weiteren Interleukinen, die wiederum in Neutrophilen die Freisetzung bzw. Produktion von Elastase, Superoxid-Ionen und Wasserstoffperoxid induzieren. Außerdem wird die Bildung von plättchenaktivierendem Faktor (PAF) und Thromboxan A<sub>2</sub>, wichtigen Mediatoren bei der Gerinnung, von TNF- $\alpha$  angeregt. Die Komplementaktivierung über C<sub>3A</sub> und C<sub>5A</sub>, den sogenannten Anaphylatoxinen, wird ebenso durch Endotoxin und Bakterien verursacht [2;10;77]. TNF- $\alpha$  und IL-1 erhöhen die NO-Produktion in Makrophagen und Endothel [47;52;48]. Dies führt zu Relaxation der Gefäßwände und damit zum Absinken des Blutdrucks.

Was physiologisch im Rahmen lokaler Reaktionen sinnvoll ist, ist bei der systemischen Überstimulation der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), einem Enzym zur Produktion von NO im Endothel, von lang anhaltender Hypotension und Störungen der Durchblutung gefolgt. Insbesondere ist der Verlust des Gefäßtonus bei der hyperdynamen Form der Sepsis charakteristisch [56;48]. Walker und Kollegen zeigten eine massive Perfusionsabnahme nach Blockade der NO-Synthase durch L-NAME [50]. NO scheint außerdem noch direkt bei der bakteriellen Translokation bei hämorrhagischem Schock eine Rolle zu spielen: Mit dem NO-Synthase-Hemmstoff L-NAME vorbehandelte Ratten zeigten eine geringere bakterielle Translokation und eine höhere Überlebenszeit als nicht behandelte Ratten [110;109].

Unter physiologischen Bedingungen dienen diese Reaktionen der Elimination von Bakterien durch Phagozytose und Vernichtung mittels Sauerstoffradikalen und Proteasen. Pathologische Bedingungen wie die Sepsis aktivieren PMNs und damit die Freisetzung von Mediatoren in solch einem Ausmaß, dass die Abwehrmaßnahmen des Körpers schwere Gewebeschäden verursachen. Pathophysiologisch wird eine „Ganzkörperentzündung“ (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) ausgelöst mit den Folgen des ARDS und des Multiorganversagens [8;11;13]. Hinzu kommt die Blockade des RES durch anfallende



Gewebstrümmer und Koagulationsprodukte, die die Klärfunktion des RES übersteigen und keine ausreichende Bakterienelimination mehr zulassen [14].

Um diese pathologischen Entwicklungen zu beherrschen, wurden in den letzten Jahren verschiedene Strategien entworfen, um Substanzen zu finden, die eine Hemmung der inflammatorischen Reaktion zur Folge haben. Dazu zählen der NO-Synthasen-Hemmstoff L-NAME und das Xanthin-Derivat Pentoxifyllin.

Das Ziel der hier vorliegenden Studie war die Erforschung der Auswirkungen dieser Substanzen auf die bakterielle Clearance im Blut und die bakterielle Besiedelung im Gewebe.

Um eine quantitative bakterielle Analyse in diesem Tiermodell zu ermöglichen, wurde eine definierte Anzahl E. coli intravenös injiziert. Sie simulieren eine bakterielle Translokation aus verschiedenen Kompartimenten wie Darm, Urogenitaltrakt, Kathetern oder infizierten Wunden. Im Anschluss wurden die Eliminationskinetik und die Organverteilung ermittelt.

Der Druckanstieg nach Applikation von L-NAME, der auch in dieser Arbeit beschrieben wurde, beruht laut einer Arbeit von Robertson [39] auf der Hemmung der iNOS und cNOS. Je höher die Dosierung, desto stärker die Inhibition, desto geringer der systemische Druckabfall. Allerdings geht mit der Konstriktion der Gefäße eine Verminderung des nachfolgenden Strombettes einher mit Schäden insbesondere in der Leber. Generell ist bei Gabe von NOS-Inhibitoren eine Zunahme des systemischen Widerstandes festzustellen [39;40;42]. Eine Konstriktion der Lungengefäße zeigte sich auch bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen. Nach Applikation der E. coli Suspension an die mit L-NAME in der höheren Dosierung vorbehandelten Kaninchen zeigte sich bei drei Versuchstieren ein transitorischer Kreislaufzusammenbruch mit notwendig werdender kardialer Reanimation, höchstwahrscheinlich durch eine starke Zunahme des pulmonalarteriellen Gefäßwiderstandes bedingt.

Ochoa et al. zeigten eine Relation zwischen NO-Bildung und MAD in septischen Patienten: Je höher der NO-Spiegel, desto niedriger der systemische Gefäßwiderstand [49]. Li und Mitarbeiter stellten eine durch

iNOS induzierte massive Bildung von NO in Lungen septischer Ratten fest. L-NAME stellte die verminderte Vasoreaktivität wieder her [51]. Dieser Effekt konnte in dieser Arbeit nachvollzogen werden.

Gray und Kollegen fanden heraus, dass die durch LPS verursachte verminderte Ansprechbarkeit der Gefäße auf Noradrenalin durch L-NMMA, einem anderen NOS-Inhibitor, gesteigert wurde und es zu einem signifikanten Anstieg des arteriellen Mitteldruckes kam. Bei L-NAME war sogar eine 30-fach bessere Wirksamkeit festzustellen. Die Herzauswurfraction wurde allerdings durch L-NAME verkleinert. [55;78;79] Diese Wirkung konnte auch in diesem Modell beobachtet werden, da es direkt nach Gabe hoher L-NAME-Konzentrationen kurzfristig zu einem systemischen Blutdruckabfall kam. Dies ist vermutlich, wie oben beschrieben, durch die Konstriktion der Lungengefäße und damit einem verminderten Rückstrom von Blut aus der Lunge mit verminderter Herzaufwurfleistung bedingt. Nava et al. zeigten einen dosisabhängigen Benefit einer Behandlung mit L-NMMA. Niedrige Dosen von 3 mg/kg KG erzielten keine nennenswerte arterielle Drucksteigerung. Bei 300 mg/kg KG war die Drucksteigerung groß, aber die Tiere überlebten nicht. Die mittlere Dosierung von 30 mg/kg KG erzielte die besten Überlebensraten bei einer Steigerung des Systemdruckes. Erklärt wird dies bei hohen Dosierungen mit der Hemmung nicht nur der iNOS, sondern auch der cNOS, die für den Basaltonus der Gefäße zuständig ist. Damit fehlt das für die „Basaldilatation“ notwendige NO mit der Folge einer massiven systemischen Drucksteigerung ohne Möglichkeit für den Organismus, die Hypertonie zu regeln, da die cNOS inhibiert ist [53]. Andere Arbeiten zeigen, dass L-NAME die antiadhäsive Wirkung von NO aufhebt [45] und den pulmonalen Widerstand erhöht [39;44]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte schon mit einer Dosierung von 7,5 mg/kg KG L-NAME eine deutliche Erhöhung des MAD erzielt werden. Bei der höheren Dosierung kam es bei drei Tieren zu den oben beschriebenen Komplikationen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass bei einzelnen Tieren schon bei 15 mg/kg KG L-NAME die cNOS total gehemmt wird und damit eine starke Konstriktion des pulmonalen Gefäßbettes eine Perfusion verhindert. Anzunehmen wäre auch eine Reaktion des pulmonalen Gefäßbettes auf E. coli-Einschwemmung durch einen nicht geklärten

Pathomechanismus. Bei der Dosierung von 7,5 mg/kg KG wurde dieser Effekt nicht beobachtet.

Bei schwerer Hypoxämie und Endotoxinämie kommt es im Gegensatz zu leichter Hypoxämie zu einer starken Vasodilatation des pulmonalen Gefäßbettes. Diese konnte durch Vorbehandlung in einem Tiermodell mit Schafslungen durch L-NAME aufgehoben werden [113]. Eine andere Versuchsgruppe injizierte Ratten LPS, um eine Expression der iNOS zu erreichen, die Kontrollgruppe wurde mit Kochsalzlösung behandelt. Dann wurden kleine pulmonale Gefäßringe entnommen und mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  vorkontrahiert. Bei schwerer Hypoxie wurde bei der Kontrollgruppe durch die Entfernung des Endothels oder durch Präinkubation mit L-NAME die Konstriktion der Arterien komplett aufgehoben. Bei LPS-vorbehandelten Ratten war es bei schwerer Hypoxie irrelevant, ob das Endothel vorhanden oder entfernt war: Die Gefäßringe kontrahierten sich. Dieser Effekt konnte durch L-NAME stark unterdrückt werden. Die milde Hypoxie hatte keine Zunahme des Vaskulartonus zur Folge. Die Autoren schlossen daraus, dass  $\text{O}_2$  als Substrat vorhanden sein muss, um NO zu bilden. Dies ist bei schwerer Sepsis mit Hypoxie eben nicht der Fall, und es kommt zu massiver Vasokonstriktion des pulmonalen Gefäßbettes [112]. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass die Vasodilatation des Koronargefäßbettes unter Hypoxie komplett von endotheliale NO abhängig ist [121].

Nach L-NAME-Applikation sind in der Lunge vermehrt Neutrophile nachzuweisen. L-NAME hemmt auch die mitochondriale Atmung in Makrophagen [41]. In dieser Arbeit konnte kein Effekt von L-NAME auf die Gesamtzahl der Leukozyten im peripheren Blut im Versuchsverlauf beobachtet werden.

In der hier vorgelegten Arbeit zeigte sich eine signifikante Verminderung der Clearance von E. coli aus dem Blut nach Applikation von 15 mg/kg KG L-NAME in der 40. und 50. Minute. In der Kontrollgruppe waren die Blutproben schon steril, während hier noch Bakterien nachzuweisen waren. Auch der systemische Widerstand, repräsentiert durch den arteriell gemessenen Druck, war bei der L-NAME supplementierten Gruppe höher als in der Kontrollgruppe. Eine verstärkte Organbesiedelung konnte nicht nachgewiesen werden. Die Einschränkung der RES-Funktion konnte hier

ebenso wie bei Fukatso et al. nicht nachgewiesen werden [34]. Die verzögerte Clearance bei der Gruppe der Tiere mit 15 mg/kg KG L-NAME um die 40. und 50. Minute könnte durch eine anfängliche Perfusionsverschlechterung des Organismus, bedingt durch die Hemmung der cNOS, verursacht sein. Das zeigt auch das erhöhte PaCO<sub>2</sub> um die 30. Minute, was für eine Minderperfusion der Lunge bei suffizienter Ventilation spricht. Eine Beeinträchtigung der Zirkulation verhindert die Ausschwemmung von Bakterien aus verschiedenen Kompartimenten ins Blut und entzieht sie damit dem RES. Dieses selbst ist, wie in den zitierten Arbeiten auch bestätigt, nicht beeinträchtigt.

Eine Arbeit von Gianotti zeigte, dass eine Arginin-supplementierte Diät das Überleben bei einer Peritonitis verbesserte durch die Modulation der bakteriellen Clearance über den Arginin-NO-Stoffwechselweg [80]. Wird nun durch einen NO-Hemmstoff die Anwesenheit dieser für die Elimination wichtigen Substanz unterdrückt, kann sich das in einer verminderten Elimination der Bakterien äußern.

Fukatsu und Mitarbeiter beobachteten nach Injektion von E. coli und L-NAME in die Peritonealhöhle von Mäusen eine verminderte Überlebenszeit der L-NAME-behandelten Mäuse. Außerdem war die Zahl vitaler Bakterien im Blut bei L-NAME-Gabe höher als bei den Kontrollen. Umgekehrt war bei den Kontrollgruppen eine stärkere Leberbesiedelung festzustellen im Gegensatz zu der L-NAME-Gruppe [34].

Engin et al. [101] beschäftigte sich mit der Auswirkung von L-NAME und Lipopolysacchariden auf die Leber und zeigte eine deutliche Schädigung des Leberparenchyms bei verminderter NO-Produktion.

Die Langzeitwirkungen auf Organe werden bei der hier vorliegenden Arbeit allerdings nicht untersucht.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Clearance der Bakterien aus dem Blut unter dem Einfluss von Pentoxifyllin. Im Hinblick auf die Eliminationskinetik scheint insbesondere der Einfluss von PTX auf das RES und die Zytokine und damit die inflammatorische Reaktion ausschlaggebend zu sein. Studien zeigten eine erhöhte Resistenz gegen

Sepsis oder Endotoxinämie in Ratten und Mäusen, neuere Studien zeigten diese Ergebnisse auch beim Menschen [82;83]. Schade et al. zeigten in einer Studie an Mäusen, dass PTX das Überleben beim Endotoxinschock von 50% auf 90% zu verbessern vermag [75]. Die Nierenfunktion ließ sich in einer anderen Arbeit mit PTX beim Nierenversagen bessern [94]. Akutes Lungenversagen wurde unter PTX-Infusion vermindert [76, 83, 90, 92]. Ursache der positiven Effekte von PTX ist unter anderem die Hemmung der Sauerstoffradikalenproduktion der PMNs, wie Bessler et al. in ihrer Studie an PMNs, die unter PTX-Einfluss eine verminderte Phagozytose für Latex-Partikel aufwiesen, gezeigt haben [29]. Josaki et al. wiesen eine vermehrte Akkumulation von Monozyten und anderen Leukozyten am Ort der Infektion, verstärkten Blutfluss zu retikuloendothelialen Organen wie der Leber und verstärkte Migration und bakterizide Aktivität der PMNs nach [22]. Im Vergleich zwischen septischen und nichtseptischen schwerkranken Patienten konnten Bacher et al. zeigen, dass PTX die Mikrozirkulation und damit die Sauerstoffversorgung des Gewebes bei septischen Patienten verbessert [86]. Den antiinflammatorischen Effekt von Pentoxifyllin zeigten Sullivan und Kollegen anhand des verminderten Effektes von Interleukin-1 und TNF auf neutrophile Granulozyten bei Zugabe von PTX [32]. In Makrophagen ist PTX in vitro in der Lage, die TNF- $\alpha$ -Produktion zu vermindern [30]. Die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche polymorphkerniger Neutrophiler und bei Endothelzellen wird durch PTX gehemmt [1;89], ebenso die Plättchen-Aggregation [28]. Einige Studien unterstützen die Hypothese, dass PTX Organschäden, die durch unkontrollierte Immunantwort ausgelöst werden, verhindern kann [90-94]. Als zugrundeliegender Mechanismus wird eine Erhöhung des intrazellulären cAMP durch Hemmung der Phosphodiesterase angenommen [29,108]. Erhöhtes cAMP ist assoziiert mit unterdrückter Neutrophilen-Funktion in vitro [22], da auch Adenosin-Gabe die Produktion von Sauerstoffradikalen und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hemmt [84].

Im Hinblick auf die positiven Effekte von PTX wurde in dieser Studie der Einfluss von PTX auf die Granulozytenfunktion, die bakterielle Clearance im Blut und die bakteriellen Verteilungsmuster in den Organen unter Normoxämie und Hypoxämie untersucht. In vorangegangenen Arbeiten [58;

60] wurde die Konzentration von 20 mg/kg KG als optimal für eine Hemmung von TNF- $\alpha$  und IL-6 ohne wesentlichen Abfall des MAD bestimmt. Da die Fragestellung lautete, ob ein Unterschied besteht zwischen Hypoxie und Normoxie bezüglich der Clearance der Bakterien aus dem Blut und der Organverteilung der Mikroorganismen, wurde anders als in der Reihe mit L-NAME nur eine einzige Konzentration ausgetestet.

Hypoxämie kommt bei fast allen septischen Komplikationen vor und wurde deshalb als pathophysiologisch relevant für klinische Beobachtungen im Tiermodell nachgestellt. Voruntersuchungen ergaben keine Translokation von Bakterien unter Einfluss von Pentoxifyllin [1].

In der hier vorgelegten Arbeit konnte kein Effekt von Pentoxifyllin auf die Elimination der Bakterien aus dem Blut und auf die Verteilung der Bakterien in den Organen festgestellt werden. Es kam weder zu einer Verbesserung der Clearance noch zu einer Verschlechterung der Eliminationskinetik. Das deckt sich mit Untersuchungen von Lundblad R. et al. [99], die keine Modifikation der Bakterienkonzentration nachweisen konnten, bei deren Untersuchungen es aber zu verminderter Endothelin-1-Ausschüttung kam. TNF- $\alpha$ , IL-6 und Lactat-Konzentrationen wurden reduziert [75]. Außerdem wurde das Überleben der Ratten mit Sepsis verlängert. Im Gegensatz dazu stehen Studien, die unter PTX eine höhere Endotoxin- und TNF- $\alpha$  -Konzentration beschreiben [61]. Eine Arbeit von Zenaide et al. [61] zeigte bei einer längeren Versuchsdauer über 36 h keinen Effekt von PTX auf die Clearance in Blut oder Organen, Herzleistung und Überlebensdauer der Versuchstiere hatten sich sogar verschlechtert. Louie A et al. [100] zeigten in einer neueren Studie, dass PTX die Produktion von TNF- $\alpha$  durch Endotoxin-stimulierte Makrophagen vermindert und das Überleben von Tieren bei bakterieller Sepsis verbessert [83,57,21,91,92]. Heller et al [11] konnten zeigen, dass es nach Applikation von PTX unter Hämorrhagie bei Endotoxinämie zu einer Reduktion der E. coli-Zahlen in den Organen kam und die Clearance aus dem Blut beschleunigt wurde (sie setzten eine Initialdosis von 30 mg/kg PTX ein, gefolgt von einer kontinuierlichen Infusion PTX 50 mg/kg/h). Porter et al [104] zeigten bei einer Dosis von 100 mg/kg KG PTX intraperitoneal bei Ratten eine komplette Unterdrückung der Phagozytosehemmung bei Sepsis mit LPS mit niedriger Dosierung von LPS

(100 µg/kg KG). Dosierte man das LPS als Sepsis-Agens höher (250 µg/kg), lässt sich mit PTX immer noch eine Verbesserung der Phagozytoseleistung des RES unter Sepsis nachweisen. Außerdem wurde die TNF- $\alpha$  Konzentration unter PTX bei Low-Dose LPS um 95%, bei High-Dose LPS um noch 90% gesenkt. Sie schlossen daraus, dass die Suppression von TNF- $\alpha$  durch PTX wirksam ist zur Verbesserung der Phagozytoseleistung bei Sepsis. Ein Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der absoluten Leukozytenzahl wurde in der hier vorgelegten Arbeit nicht gesehen.

In verschiedenen Arbeiten [8, 106] wurde gezeigt, dass Hypoxämie eine verminderte Clearance der Bakterien aus dem Blut induziert. In der vorliegenden Studie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Hypoxämie- und der Kontrollgruppe gezeigt werden, obwohl eine arterielle Sauerstoffsättigung von 40 mm Hg über eine Stunde konstant gehalten wurde. In der Literatur sind wenige Arbeiten, die sich mit dem Thema der Clearance unter Hypoxämie beschäftigen, so dass hier noch Forschungsbedarf besteht.

Die Gruppen mit PTX und PTX + Hypoxämie zeigen einen um die 40. Versuchsminute deutlich abgefallenen Mitteldruck, während im Vergleich zwischen Pentoxifyllin bei Normoxämie und der Kontrolle ein im Mittel um 5 mm Hg erhöhter arterieller Mitteldruck zu messen war (statistisch gesichert aber nur der Abfall um die 40. Minute:  $p < 0,02$ ). Auch andere Arbeiten zeigen, dass es bei Gabe von PTX zu einer Erweiterung des Kapillarsystems und damit zum Druckabfall kommt. Parker et al. zeigten in ihrer Arbeit an weißen Schweinen, denen 40% ihres Blutvolumens entfernt und eine Sepsis induziert wurde, dass PTX den systemischen und pulmonalarteriellen Widerstand senkte, jedoch keinen Einfluss auf TNF- $\alpha$  hatte [103]. Fabrice et al. schreiben in ihrer Arbeit PTX sogar einen deletären Effekt auf den arteriellen Mitteldruck bei der Sepsis zu [83].

Ein Effekt auf die Clearance in Organen und Blut unter PTX sowie den arteriellen Mitteldruck konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, vielleicht weil die Dosierung mit 20 mg/kg KG PTX zu niedrig lag. In anderen Arbeiten wird mit einer deutlich höheren Dosierung gearbeitet (50 mg/kg KG) [11; 75; 82, 105]. Allerdings wurden bisher nur Untersuchungen an normoxämischen Modellen durchgeführt, die den Effekt von PTX auf das

Überleben oder auf Mediatoren untersuchten. Eine Studie unter Hypoxämie mit PTX wurde noch nicht durchgeführt. Deswegen wurde die PTX-Standarddosis der bisherigen Versuche verwendet. Weitere Studien sollten erfolgen mit höheren PTX-Dosierungen.

Die hier vorgelegte Arbeit zeigt, dass es unter L-NAME 15 mg/kg KG zu einer deutlichen Verzögerung der Clearance der E. coli aus dem Blut und einer signifikanten Blutdrucksteigerung kommt, ohne dass die Organbesiedelung der Bakterien als Maß der Organclearance eingeschränkt wird. Niedrigere Dosierungen zeigen im Vergleich zu der Kontrollgruppe keinen Unterschied auf die Clearance, jedoch auch keine Verbesserung des Blutdrucks.

Unter Pentoxifyllin konnten zwischen allen Versuchsgruppen keine Unterschiede gesehen werden. Auch zwischen der Hypoxämie-Gruppe und der Hypoxämie-PTX-Gruppe konnte in dieser Dosierung kein Unterschied festgestellt werden.

Insgesamt sind in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse bei Anwendung von Pentoxifyllin und L-NAME beschrieben. Das liegt zum einen an unterschiedlichen Forschungsmodellen, zum anderen an teilweise zu geringen Fallzahlen, die nur eine eingeschränkte Aussage zulassen [107].

Vielleicht ist L-NAME in Zukunft ein wertvolles Medikament zur Steigerung des arteriellen Drucks bei Sepsis, ohne dass negative Auswirkungen auf die Eliminationskinetik bei den Mikroorganismen zu erwarten sind. Weiterer Forschungsbedarf ist zu Verifizierung der einzelnen Ergebnisse nötig.



## E. Zusammenfassung

Am septikämischen Ganztiermodell wurde die bakterielle Clearance aus dem Blut sowie die Unterschiede der Organverteilungsmuster der bakteriellen Besiedelung unter Einfluss von L-NAME und Pentoxifyllin untersucht. Außerdem wurden der arterielle Druck, PaCO<sub>2</sub> und pH-Wert sowie die Leukozytenzahlen untersucht.

Den narkotisierten Kaninchen wurde vor Injektion von  $1,3 \times 10^8$  CFU E. coli eine Dosis von 7,5 mg/kg KG oder 15 mg/kg KG L-NAME bzw. 20 mg/kg KG Pentoxifyllin intravenös injiziert. Bei der Gabe von Pentoxifyllin 20 mg/kg KG wurde auch die Clearance unter Hypoxämie mit einem PaO<sub>2</sub> von 40 mm Hg untersucht. Die auf Agar-Platten aufgebrauchten Blutproben und Verdünnungsreihen sowie Organhomogenisate wurden nach 24stündiger Bebrütung auf E. Coli-Kolonien untersucht und ausgezählt.

Die bakterielle Clearance aus dem Blut zeigte sich unter L-NAME in der 40. und 50. Minute signifikant verzögert ( $p < 0,05$  bzw.  $0,02$ ), außerdem wurde ein signifikanter Blutdruckanstieg nach Gabe von L-NAME gemessen, der sich über die ersten 30 Minuten mit einer  $30 \pm 24$  mm Hg höheren Amplitude im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte ( $p < 0,001$ ). Eine Beeinträchtigung der Eliminationskinetik der Bakterien aus den Organen wurde nicht beobachtet. Keine Unterschiede bezüglich der Clearance konnten festgestellt werden zwischen Kontrollgruppe und Pentoxifyllingruppe, zwischen der Kontrollgruppe und der Hypoxämiegruppe sowie der Hypoxämie-Pentoxifyllingruppe. Lediglich zwischen Kontrolle und Pentoxifyllingruppe zeigte sich ein im Versuchsverlauf um durchschnittlich  $5 \pm 4$  mm Hg höherer arterieller Mitteldruck bei der PTX-Gruppe, dies war jedoch statistisch nicht verifizierbar.

pH-Werte und Abfall der Leukozyten wichen in keinem Modell deutlich voneinander ab.

Die in diesem Modell festgestellte verzögerte Clearance unter L-NAME kann mit der verminderten Perfusion durch Hemmung der cNOS erklärt werden. Außerdem ist bekannt, dass durch L-NAME die Makrophagen einen Großteil ihrer mikrobiziden Fähigkeit einbüßen. Die im Vergleich zu den in der

Literatur eingesetzten niedrigen L-NAME-Dosen von 15 mg/kg KG haben hier keinen negativen Effekt auf die Organclearance gezeigt, sie haben jedoch eine offensichtliche arterielle Drucksteigerung zur Folge. In dieser Dosierung könnte L-NAME ein geeignetes Pharmakon zur Druckstabilisierung bei fulminanter Sepsis sein, ohne dass negative Effekte auf die Eliminationskinetik zu befürchten sind.

Pentoxifyllin zeigte in diesen Versuchen keinen Effekt. In den letzten Jahren ist mit deutlich höheren Medikamentendosen gearbeitet und ein positiver Effekt auf Phagozytose und Blutdruck unter Normoxämie beschrieben worden. Es gibt allerdings keine Arbeit, die diese Fragestellungen unter Hypoxämie untersuchen. Um zu klären, inwieweit PTX in höherer Dosierung unter Hypoxämie einen negativen Effekt auf die Clearance hat, müssen noch weitere Untersuchungen mit höheren PTX-Dosierungen durchgeführt werden.

## F. Summary

Bacterial clearance of blood and difference of bacterial colonisation influenced by L-NAME and pentoxifylline were examined in a reproducible animal model. Furthermore, mean arterial pressure, PaCO<sub>2</sub>, pH and leucocyte count were also determined.

The anaesthetized rabbits were injected intravenously with either 7,5 mg of L-NAME per kg body weight or 15 mg of L-NAME per kg body weight, others were injected with 20 mg of pentoxifylline per kg body weight before injection of  $1,3 \times 10^8$  CFU E. coli. After applying 20 mg of pentoxifylline per kg body weight, clearance under hypoxemia with PaO<sub>2</sub> of 40 mm Hg was examined. Blood samples, the dilution rows and organ tissue homogenisates were smeared on agar-plates. After 24h of culturing at 36°C, the colonies were counted.

Bacterial clearance in blood was significantly delayed between 40<sup>th</sup> and 50<sup>th</sup> minutes ( $p < 0,05$  and  $0,02$ ). A relevant increase of mean arterial pressure was determined after application of L-NAME which showed a higher amplitude from  $30 \pm 24$  mm Hg in the first 30 minutes compared to the control group ( $p < 0,001$ ). Elimination cinetics of bacteria in tissue was not impaired.

There was no difference in clearance between the control group, the pentoxifylline group and the hypoxemia-pentoxifylline group. A minimal higher mean of arterial pressure of  $5 \pm 4$  mm Hg was detected in the PTX-group. However, this was not statistically significant.

There were no differences in pH and loss of leucozytes in any group.

This model showed delayed clearance under the influence of L-NAME. It can be explained by hypoperfusion of tissue caused by inhibition of cNOS. It is well known that macrophages lose much of their microbicide ability under L-NAME. Compared with higher injected doses of L-NAME, as described in literature, the lower amount of 15 mg L-NAME per kg body weight showed no negative effect on tissue clearance, but an increase of mean arterial blood pressure. This dosage of 15 mg L-NAME/kg body weight could turn out to be

useful in order to restore MAP in fulminant sepsis without any negative side-effects on bacterial elimination kinetics.

Pentoxifylline showed no effects in these investigations. In recent years, distinctly higher doses medication have demonstrated a positive effect on phagocytosis and arterial blood pressure in normoxemia. Until now, no examinations have been done under hypoxemic conditions and PTX. Further studies are necessary to clarify to what extent a higher dosage of PTX under hypoxemia can have a negative effect on clearance.

## G. Literaturverzeichnis

1. Koch T, Neuhof H, Duncker HP, Stein A, Möschet B, Schönharting M, van Ackern K:  
Influence of a pentoxifylline-analogue on the granulocyte-mediated pulmonary mediator release and vascular reaction  
*Circ. Shock* 40: 83-91 (1993)
2. Koch T, Annuß C, Schiefer HG, van Ackern K, Neuhof H:  
Impaired bacterial Clearance after activation of the complement and coagulation systems  
*Shock* 7: 42-48 (1997)
3. Koch T, Heller S, van Ackern K, Schiefer HG, Neuhof H:  
Impairment of bacterial clearance induced by norepinephrine infusion in rabbits  
*Int. Care Med.* 22: 637-642 (1996)
4. Koch T, Duncker HP, Axt R, Schiefer HG, van Ackern K, Neuhof H:  
Alterations of bacterial clearance induced by endotoxin and tumor necrosis factor  
*Inf. Immun.* 61: 3143-3148 (1993)
5. Koch T, Heller S, Heißler S, Breil I, Schiefer HG, van Ackern K, Neuhof H:  
Effects of N-Acetylcysteine on bacterial clearance  
*Eur. J. Clin. Invest.* 26: 884-892 (1996)
6. Koch T:  
Origin and mediators involved in sepsis and the systemic inflammatory response syndrome  
*Kidney Int.* 53 Suppl. 64: 66-69 (1998)
7. Breil I, Koch T, Belz M, van Ackern K, Neuhof H:  
Effects of bradykinin, histamine and serotonin on pulmonary vascular resistance and permeability  
*Acta Phys. Scand.* 159: 189-198 (1997)

8. Koch T, Duncker HP, Axt R, Schiefer HG, van Ackern K, Neuhof H:  
Effects of hemorrhage, hypoxia, and intravascular coagulation on  
bacterial clearance and translocation  
*Crit. Care Med. 21: 1758-1764 (1993)*
9. Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, Gianotti L, Peck MD, Dunn DL,  
Pyles T, Childress CP, Ash SK:  
The Process of Microbial Translocation  
*Ann. Surg 212: 496-512 (1990)*
10. Santos AA, Wilmore DW:  
The systemic inflammatory response: Perspective of human  
endotoxemia  
*Shock 6: S50-S56 (1996)*
11. Heller S, Weber K, Heller A, Urbaschek R, Koch T:  
Pentoxifylline improves bacterial clearance during hemorrhage and  
endotoxemia  
*Crit. Care Med. 27: 756-763 (1999)*
12. Zeni F, Freeman B, Natanson C:  
Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: A  
reassessment.  
*Crit. Care Med. 25: 1095-1100 (1997)*
13. Welbourn CRB, Young Y:  
Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages  
and inflammatory mediators  
*Br. J. Surg. 79: 998-1003 (1992)*
14. Dal Nogare AR:  
Southwestern Internal Medicine Conference: Septic Shock  
*Am. J. Med. Sci. 302: 50-65 (1991)*
15. Zweifach BW, Benecerraf B, Thomas L:  
The relationship between the vascular manifestations of shock produced  
by endotoxin, trauma, and hemorrhage. II. The possible role of the  
reticuloendothelial system in resistance to each type of shock.  
*J. Exp. Med. 106: 403-414 (1957)*

16. Fine J, Ruthenberg S, Schweinburg FB:  
The role of the reticuloendothelial system in hemorrhagic shock  
*J. Exp. Med.* 110: 547-569 (1959)
17. Abraham E, Chang YH:  
Effects of hemorrhage on inflammatory response.  
*Arch. Surg.* 119: 1154-1157 (1987)
18. Deitch EA, Morrison J, Berg R, Specian RD:  
Effect of hemorrhagic shock on bacterial translocation, intestinal morphology, and intestinal permeability in conventional and antibiotic-decontaminated rats  
*Crit. Care Med.* 18: 529-536 (1990)
19. Deitch EA:  
Intestinal permeability is increased in burn patients shortly after injury  
*Surgery* 107: 411-416 (1990)
20. Penn RL, Maca RD, Berg RD:  
Increased translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of tumor-bearing mice  
*Inf. Immun.* 47: 793-798 (1985)
21. Marques LJ, Zheng L, Poulakis N, Guzman J, Costabel U:  
Pentoxifylline inhibits TNF- $\alpha$  production from human alveolar macrophages  
*Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159: 508-511 (1999)
22. Josaki K, Contrino J, Kristie J, Krause P, Kreutzer DL:  
Pentoxifylline-induced modulation of human leucocyte function *in vitro*  
*Am. J. Pathol.* 136: 623-630 (1990)
23. Sandys GH:  
A new method of preventing swarming of *Proteus* sp. with a description of a new medium suitable for use in routine laboratory practice  
*J. Med. Lab. Technol.* 17: 224-233 (1960)
24. Carrico CJ, Jonathan L, Meakins L, Marshall JC, Fry D, Maier RV:  
Multiple-Organ-Failure-Syndrome  
*Arch. Surg.* 121: 196-197 (1986)

25. Deitch EA, Berg R, Specian R:  
Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut:  
*Arch. Surg. 122: 185-190 (1987)*
26. Schröer RH:  
Antithrombotic potential of pentoxifylline, a hemorheologically active drug.  
*Angiology 36: 387-398 (1985)*
27. Dettelbach HR, Aviado DM:  
Clinical pharmacology of pentoxifylline with special reference to its  
hemorheologic effect for the treatment of intermittent claudication  
*J. Clin. Pharmacol. 25: 8-26 (1985)*
28. Nenci GG, Gresele P, Agnelli G, et al.:  
Effect of pentoxifylline on platelet aggregation  
*Pharmacotherapeutica 2: 532-538 (1981)*
29. Bessler H, Gilgal R, Djaldetti M, Zahavi I:  
Effect of pentoxifylline on the phagocytic activity, cAMP levels, and  
superoxide anion production by monocytes and polymorphnuclear cells  
*J. Leuk. Biol. 40: 747-754 (1986)*
30. Strieter RM, Remick DG, Ward PA, Spengler RN, Lynch JP III, Larrick J,  
Kunkel SL:  
Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor alpha  
production by pentoxifylline  
*Biochem. Biophys Res. Comm. 155: 1230-1236 (1988)*
31. Reynolds H:  
Pentoxifylline – More Evidence that it improves host defenses during  
sepsis  
*Crit Care Med. 27: 681-682 (1999)*
32. Sullivan GW, Carper HAT, Novick WJ, Mandell GL:  
Inhibition of the inflammatory action of Interleukin-1 and Tumor Necrosis  
Factor (Alpha) on neutrophil function by pentoxifylline  
*Inf. Immun. 56: 1722-1729 (1988)*
33. Rush BF, Sori AJ, Murphy TF, Smith S, Flanagan JJ, Machiedo GW:  
Endotoxemia and bacteremia during hemorrhagic shock  
*Arch. Surg. 207: 549-554 (1987)*



34. Fukatsu K, Saito H, Fukushima R, Inoue T, Lin MT, Inaba T, Muto T:  
Detrimental effects of a nitric oxide synthase inhibitor (N- $\omega$ -Nitro-L-Arginine-Methyl-Ester) in a murine sepsis model  
*Arch. Surg* 130: 410-414 (1995)
35. Deitch EA, McIntyre Bridges R:  
Effect of stress and trauma on bacterial translocation from the gut  
*J. Surg. Res.* 42: 536-542 (1987)
36. Palmer RMJ:  
The discovery of nitric oxide in the vessel wall  
*Arch. Surg.* 128: 396-401
37. Altura BM, Hershey SG:  
RES phagocytotic function in trauma and adaptation to experimental shock  
*Am. J. Physiol.* 215: 1414-1419 (1968)
38. Barnhart MI, Cress DC:  
Plasma clearance of products of fibrinolysis  
*Adv. Exp. Med. Biol.* 1: 492-502 (1967)
39. Robertson FM, Offner PJ, Ciceri DP, Becker WK, Pruitt BA:  
Detrimental hemodynamic effects of nitric oxide synthase inhibition in septic shock  
*Arch. Surg.* 129: 149-156 (1994)
40. Hinder F, Booke M, Traber LD, Matsumoto N, Nishida K, Rogers S, Traber DL:  
Nitric oxide synthase Inhibition during experimental sepsis improves renal excretory function in the presence of chronically increased atrial natriuretic peptide  
*Crit. Care Med.* 24: 131-136 (1996)
41. Minnard E, Shou J, Naama H, Cech A, Gallagher H, Daly JM:  
Inhibition of nitric oxide synthesis is detrimental during endotoxemia  
*Arch Surg* 129: 142-148 (1994)
42. Weitzberg E, Rudehill A, Modin A, Lundberg JM:  
Effect of combined nitric oxide inhalation and N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine infusion in porcine endotoxin shock  
*Crit. Care Med.* 23: 909-918 (1995)

43. Mishima S, Xu D, Lu Q, Deitch EA:  
Bacterial translocation is inhibited in inducible nitric oxide synthase knockout mice after endotoxin challenge but not in a model of bacterial overgrowth  
*Arch. Surg* 132: 1190-1195 (1997)
44. Lorente JA, Landin L, Renes E, De Pablo R, Jorge P, Rodena E, Liste D:  
Role of nitric oxide in the hemodynamic changes of sepsis  
*Crit. Care Med.* 21: 759-767 (1993)
45. Fukatsu K, Saitu H, Han I, Furukawa S, Hashiguchi Y, Lin MT, Matsuda T, Inaba T, Inoue T, Ikeda S, Yasuhara H, Muto T:  
Nitric oxide inhibition decreases neutrophil adhesion at the inflammatory site, while increasing adhesion in remote organs in peritonitis  
*J. Surg. Res.* 68: 79-86 (1997)
46. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S:  
Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor  
*Nature* 327: 524-526 (1987)
47. Petros A, Bennett D, Vallance P:  
Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock  
*Lancet* 338:1557-1558 (1991)
48. Johnson ML, Billiar TR:  
Roles of nitric oxide in surgical infection and sepsis  
*World J. Surg* 22: 187-196 (1998)
49. Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, Peitzman AB:  
Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis  
*Ann. Surg* 214: 621-626 (1991)
50. Walker TA, Curtis SE, King-VanVlack CE, Chapler CK, Vallet B, Cain SM:  
Effects of nitric oxide synthase inhibition on regional hemodynamics and oxygen transport in endotoxic dogs  
*Shock* 4: 415-420 (1995)

51. Li S, Fan SX, McKenna TM:  
Role of nitric oxide in sepsis-induced hyporeactivity in isolated rat lungs  
*Shock* 5: 122-129 (1996)
52. Kilbourn RG, Jumbran A, Gross SS, Griffith OW, Levi R, Adams J, Lodato RF:  
Reversal of endotoxin-mediated shock by N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis  
*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 172: 1132-1138 (1990)
53. Nava E, Palmer RM, Moncada S:  
Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: How much is beneficial?  
*Lancet* 338: 1555-1557 (1991)
54. Amber IJ, Hibbs JB, Jr., Taintor RR, Vavrin Z:  
Cytokines induce an L-Arginine-dependent effector system in nonmacrophage cells  
*J. Leuc. Biol.* 44: 58-65 (1988)
55. Gray GA, Schott C, Joulou-Schaeffler G, Fleming I, Parratt JR, Stoclet JC:  
The effect of inhibitors of the L-arginine/nitric oxide pathway on endotoxin-induced loss of vascular responsiveness in anaesthetized rats  
*Br. J. Pharmacol.* 103: 1218-1224 (1991)
56. Parratt JR:  
Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia  
*J. Antimicrob. Chemother.* 41 Suppl A: 31-39 (1998)
57. Boldt J, Müller M, Heesen M, Heyn S, Hempelmann G:  
Does long-term continuous administration of pentoxifylline affect platelet function in the critically ill patient?  
*Int. Care Med.* 22: 644-650 (1996)
58. Chung TW, O'Rear EA, Whitsett TL, Hinshaw LB, Smith MA:  
Survival Factors in a Canine Septic Shock Model  
*Circ. Shock* 33: 178-182 (1991)

59. Mah MP, Aeberhard EE, Gilliam MB, Sherman MP:  
Effects of pentoxifylline on *in vivo* leukocyte function and clearance of group B streptococci from preterm rabbit lungs  
*Crit. Care Med.* 21: 712-720 (1993)
60. Harada H, Ishizaka A, Yonemaru M, Mallik A, Hatherhill JR, Zheng H, Lilly CM, O'Hanley PT, Raffin TA:  
The effects of aminophylline and pentoxifylline on multiple organ damage after *Escherichia coli* sepsis  
*Am. Rev. Respir. Dis.* 140: 974-980 (1989)
61. Quezado ZMN, Hoffman WD, Banks SM, Danner RL, Eichacker PQ, Susla GM, Natanson C:  
Increasing doses of pentoxifylline as a continuous infusion in canine septic shock  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288: 107-113 (1999)
62. Nelson JL, Alexander JW, Mao J, Vohs T, Ogle CK:  
Effect of pentoxifylline on survival and intestinal cytokine messenger RNA transcription in a rat model of ongoing peritoneal sepsis  
*Crit. Care Med.* 27: 113-119 (1999)
63. Weikert LF, Bernard GR:  
Pharmacotherapie of sepsis  
*Clin. Chest Med.* 17: 289-305 (1996)
64. Gennari R, Alexander JW:  
Effects of hyperoxia on bacterial translocation and mortality during gut-derived sepsis  
*Arch. Surg.* 131: 57-62 (1996)
65. Katayama M, Xu D, Specian RD, Deitch EA:  
Role of bacterial adherence and the mucus barrier on bacterial translocation  
*Ann. Surg.* 225: 317-326 (1997)
66. Deitch EA, Haskel Y, Cruz N, Xu D, Kvietys PR:  
Caco-2 and IEC-18 intestinal epithel cells exert bactericidal activity through an oxidant-dependent pathway  
*Shock* 4: 345-350 (1995)

67. Spada M, Alessiani M, Fabbi M, Magnino S, Gelmetti D, Vaccarisi S, Rasemacher J, Costa A, Dionigi P, Zonta A:  
Bacterial translocation is enhanced in pig intestinal transplantation when the colon is included in the graft  
*Transplant. Proc.* 28: 2658-2659 (1996)
68. Puri VK, Vincent J-L:  
The pathophysiology of septic shock  
*Int. Surg* 67: 5-8 (1982)
69. Parillo JE:  
Pathogenetic mechanisms of septic shock  
*Crit. Care Med.* 328: 1471-1477 (1993)
70. Kierdorf H, Heintz B, Sieberth HG:  
Sepsis und Multiorganversagen  
*Int. Notfallbeh.* 17: 66-72 (1992)
71. Lundsgaard-Hansen P:  
Pathophysiologie und Therapie des septischen Schocks  
*Fortschr. Med.* 93: 469-532 (1975)
72. Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ:  
Multiple organ dysfunction score: A reliable descriptor of a complex clinical outcome  
*Crit. Care Med.* 23: 1638-1652 (1995)
73. Barnhart MI, Cress DC:  
Plasma clearance of products of fibrinolysis  
*Adv. Exp. Med. Biol.* 1: 492-502 (1967)
74. Ischiropoulos H, Zhou L, Beckman JS:  
Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide  
*Arch. Biochem. Biophys.* 298: 446 (1992)
75. Schade UF:  
Pentoxifylline increases survival in murine endotoxin shock and decreases formation of tumor necrosis factor  
*Circ. Shock* 31: 171-181 (1990)

76. Hoffmann H, Fritz H, Weis M, Aigner F, Ishizaka A, Raffin TA, Schildberg FW:  
Attenuation of endotoxin-induced acute lung injury by pentoxifylline and HWA 138  
*Circ. Shock 34 (1): 139 (Abstract), (1991)*
77. Bengtsson A:  
Cascade system activation in shock  
*Acta Anaesthesiol. Scand. 37 S98: 7-10 (1993)*
78. Hollenberg SM, Cunnion RE, Zimmerberg J:  
Nitric oxide synthase inhibition reverses arteriolar hyporesponsiveness to catecholamines in septic rats  
*Am. J. Physiol. 264: H660 (1993)*
79. Landin L, Lorente JA, Renes E, Canas P, Jorge P, Liste D:  
Inhibition of nitric oxide synthesis improves the vasoconstrictive effect of noradrenaline in sepsis  
*Chest 106: 250 (1994)*
80. Gianotti L, Alexander JW, Pyles T, Fukushima R:  
Arginine-supplemented diets improve survival in gut-derived sepsis and peritonitis by modulating bacterial clearance: the role of nitric oxide  
*Ann. Surg. 217: 644 (1993)*
81. Neuhof H:  
Actions and interactions of mediator systems and mediators in the pathogenesis of ARDS and multiorgan failure  
*Acta Anaesthesiol. Scand 95: 7-14 (1991)*
82. Niehörster M, Schönharting M, Wendel A:  
A novel xanthine derivative counteracting in vivo tumor necrosis factor a toxicity in mice  
*Circ. Shock 37: 270-273 (1992)*
83. Suter PM, Pittet JF, Masouye PH et al:  
Xanthine derivatives pentoxifylline and HWA 138 attenuate cardiocirculatory and pulmonary failure secondary to endotoxin in sheep  
*Circ. Shock 34: 140-141 (1991)*

83. Zeni F, Pain P, Vindimian M et al:  
Effects of Pentoxifylline on circulating concentrations and hemodynamics  
in patients with septic shock  
*Crit. Care Med. 24: 207-214 (1996)*
84. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN:  
Adenosine inhibits ischemia-reperfusion-induced leukocyte adherence  
and extravasation  
*Am. J. Physiol. 257: H1334-H1339 (1989)*
85. Porter JM, Cutler BS, Lee BY, Reich T, Reichle FA, Scogin JT,  
Strandness DE:  
Pentoxifylline efficacy in the treatment of intermittent claudication:  
Multicenter controlled double-blind trial with objective assessment of  
chronic occlusive arterial disease patients  
*Am. Heart J. 104: 66-72 (1982)*
86. Bacher A, Mayer N, Klimscha W, Oismüller C, Steltzer H, Hammerle A:  
Effects of pentoxifylline on hemodynamics and oxygenation in septic and  
nonseptic patients  
*Crit. Care Med. 25: 795-800 (1997)*
87. Jolou-Schaeffer G, Gray GA, Fleming I, Schott C, Parratt JR, Stoclet J-C:  
Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-  
arginine pathway  
*Am. J. Physiol. 259: H1038-H1043, (1990)*
88. Papazian L, Roch A, Bregeon F, Thirion X, Gaillat F, Saux P, Fulachier V,  
Jammes Y, Auffray J-P:  
Inhaled Nitric oxide and vasoconstrictors in acute respiratory distress  
syndrome  
*Am. J. Respir. Crit. Care Med. 160: 473-479 (1999)*
89. Neuner P, Klosner G, Pourmojib M et al.:  
Pentoxifylline in vivo and in vitro downregulates the expression of the  
intercellular adhesion molecule on monocytes  
*Immunology 90: 435-439 (1997)*

90. McDonald R:  
Pentoxifylline reduces injury to isolated lungs perfused with human neutrophils  
*Am. Rev. Respir. Dis.* 144: 1347-1350 (1991)
91. Williams JH, Heshmati S, Tamadon S, et al:  
Inhibition of alveolar macrophages by pentoxifylline.  
*Crit. Care Med.* 19: 1073-1078 (1991)
92. Lilly CM, Sandhu JS, Ishizaka A, et al:  
Pentoxifylline prevents tumor necrosis factor-induced lung injury  
*Am. Respir. Dis.* 139: 1361-1368 (1989)
93. Chalkiadakis GE, Kostakis A, Karayannacos PE, et al:  
Pentoxifylline in the treatment of experimental peritonitis in rats  
*Arch. Surg.* 120: 1141-1144 (1985)
94. Berens KL, Langston JD, Wasan KM, et al:  
Influence of Pentoxifylline and related analogues in endotoxemic renal failure  
*Circ. Shock* 34: 344-348 (1991)
95. Baumgartner JD, McCutchan JA, Van Melle G, Vogt M et al:  
Prevention of gram-negative shock and death in surgical patients by antibody to endotoxin core glycolipid  
*Lancet* : 59-63 (1985)
96. Morrison DC, Ryan JL:  
Bacterial Endotoxins and Host Immune Responses  
*Adv. Immun.* 28: 293-451 (1979)
97. Gibson RL, Berger JI, Redding GJ, Standaert TA, Mayock DE, Truog WE:  
Effect of nitric oxide synthase inhibition during group B streptococcal sepsis in neonatal piglets  
*Ped. Res.* 36: 776-783 (1994)



98. Helleyer PW, Wright B, Mallinckrodt C, Gaynor JS, Mama KR, Wagner AE:  
The effects of hyperoxia in the biosynthesis of cyclooxygenase products and haemodynamic response to nitric oxide synthase inhibition with L-NAME in endotoxemic pigs  
*J. vet. Pharmacol. Therap.* 21: 348-357 (1998)
99. Lundblad R, Ekstrøm P, Giercksky KE:  
Pentoxifylline improves survival and reduces tumor necrosis factor, interleukin-6, and endothelin-1 in fulminant intra-abdominal sepsis in rats  
*The off. J the shock Society, the European Shock Society, the Brazilian Shock Society, he inter Vol 3:* 210-5 (1995)
100. Louie A, Baltch AL, Franke MA, Ritz WJ, Smith RP, Singh JK, Gordon MA:  
Effect of Pentoxifylline on the course of systemic *Candida albica* infection in mice.  
*The J of antimicrobial chemotherapy Vol 37 (5):* 943-54 (1996)
101. Engin A, Kurukahvecioglu O, Bukan N, Dursun A:  
The effect of L-Arginine and NG-nitro-L-arginine methylester on lipopolysaccharide and lipoeichoic acid includes liver injury in the rat  
*Turkish journal of trauma & emergency surgery Vol 9(3):* 163-8 (2003)
102. Xu DZ, Lu Q, Deitch EA:  
Nitric oxide directly impairs intestinal barrier function  
*The off. J the shock Society, the European Shock Society, the Brazilian Shock Society, he inter Vol 17(2):* 139-45 (2002)
103. Parker SJ, Brown D, Kenward CE, Watkins PE:  
Pentoxifylline fails to improve organ dysfunction and survival when used in the resuscitation of a porcine model of haemorrhage and abdominal sepsis.  
*Resuscitation Vol 44(1):* 61-9 (2000)
104. Porter MH, Hrupka BJ, Alreuther G, Arnold M, Langhans W:  
Inhibition of TNF- $\alpha$  production contributes to the attenuation of LPS-induced hypophagia by pentoxifylline  
*Am. J of Physiology. Regulatory and comparative physiology Vol. 279 (6):* R2113-20 (2000)

105. Koo DJ, Yoo P, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH, Wang P  
 Mechanism of the beneficial effects of Pentoxifylline during sepsis: maintenance of adrenomedullin responsiveness and downregulation of proinflammatory cytokines  
*J. of Surg Res Vol 91 (1): 70-6 (2000)*
106. Harris GD, Johanson WG Jr, Pierce AK  
 Determinants of lung bacterial clearance in mice after acute hypoxia  
*Am Rev. of Resp. Disease Vol 116(4): 671-7 (1997)*
107. Howe LM  
 Novel agents in the therapy of endotoxic shock  
*Expert opinion on investigational drugs Vol 9 (6): 1363-72 (2000)*
108. Birg A, Spannagl M, Endres S, Fülle H.J., Machleidt W, Hoffmann H:  
 Effect of Xanthine Derivates on cAMP, TNF and catharsis B plasma levels in porcine endotoxin shock
109. Elftneriadis E, Kotzampassi K, Heliadis N, Herodotu A, Hatjopoulou E, Petridou E, Sarris K:  
 The implication of nitric oxide in the process of bacterial translocation  
*International Surgery Vol. 85(1): 23-6 (2000)*
110. Hua TC, Moochhala SM:  
 Role of nitric oxide in hemorrhagic shock-induced bacterial Translocation  
*J. of surgical research Vol 93 (2): 247-56 (2000)*
111. Yada-Lanqui MM, Coimbra R, Lancillotti C, Mimica I, Garcia C, Correia N Jr, Rocha e Silva M:  
 Hypertonic saline and pentoxifylline prevent lung injury and bacterial translocation after hemorrhagic shock.  
*Shock: The off. J the shock Society, the European Shock Society, the Brazilian Shock Society, he inter Vol 14 (6): 594-8 (2000)*
112. Terraz S, Baechtold F, Renard D, Barsi A et al:  
 Hypoxic contraction of small pulmonary arteries from normal and endotoxemic rats: fundamental role of NO  
*Am. Journal of physiology Vol 276 (4 Pt 2): H1207-14 (1999)*

113. Fischer SR; Deyo DJ, Bone HG, McGuire R, Traber DL:  
Nitric oxide synthase inhibition restores hypoxic pulmonary  
vasoconstriction in sepsis  
*Am. J. of resp. and critical care medicine; VOL: 156; p. 833-9 (1997)*
114. Edwin S. Van Amerfoort, Theo J. C. Van Berkel, Johan Kuiper:  
Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and  
septic shock  
*Clinical Microbiology Reviews Vol. 16 (7) No. 3: 379-414 (2003)*
115. Gordon R. Bernard, M.D., Jean-Louis Vincent, M.D., Ph.D., Pierre-  
Francois Laterre, M.D. et al, for The Recombinant  
Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis  
(PROWESS) Study Group:  
Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe  
sepsis  
*The New England Journal of Medicine Vol 344: 699-709 (2001)*
116. Richard S Hotchkiss, Irene E Karl:  
The pathophysiology and treatment of sepsis  
*New England Journal of Medicine Vol 348: 138-150 (2003)*
117. Docke WD, Randow F, Syrbe U, et al.  
Monocyte deactivation in sepsis patients: restoration by INF-gamma  
treatment  
*Nat. Med. 1997 3:678-81*
118. Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, et al.  
Intensive insulin therapy in critically ill patients.  
*New England Journal of medicine 2001; 345: 1359-67*
119. Michetti C, Coimbra R, Hoyt DB, et al.  
Pentoxifylline reduces acute lung injury in chronic endotoxemia  
*J Surg Res, 115 (1) : 92-99 (2003)*
120. Spohr F, Cornelissen AJ, Gebhard MM, et al.  
Role of endogenous nitric oxide (NO) in endotoxin-induced alteration of  
hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice  
*Am J Physiol. Heart Circ Physiol (doi:10/1152/ajpheart 2005)*

121. Lynch FM, Austin C., Heagerty AM, Izzard AS  
Adenosine and hypoxic dilation of rat coronary small arteries: roles of  
the ATP-sensitive potassium channel, endothelium and nitric oxide  
*Am J Physiol Heart Circ Physiol*, (): 0 2005
122. Cair R, Keskin E, Atalay B  
Effect of pentoxifylline on endotoxin-induced haemostatic disturbances  
in rabbits  
*Acta Vet Hung*, 53 (3): 325-35 2005

## H. Danksagungen

Besonderen Dank an Herrn Prof. H. Neuhof für die Überlassung des Themas, die Hilfsbereitschaft und die sehr gute persönliche Betreuung.

Herrn Prof. Schiefer danke ich für die Unterstützung und Beratung bezüglich des mikrobiologischen Teils der Arbeit.

Mein Dank gilt auch Frau Antje Weber ebenso wie Herrn Harald Michnacs für die hervorragende Unterstützung bei den Präparationen und organisatorischen Fragen.

Frau Ursula Gerhardt hat mir bei der Arbeit in der Mikrobiologie tatkräftig zur Seite gestanden. Vielen Dank auch ihr.

Danken möchte ich Frau Tiziana Wieth für die immer sehr freundliche redaktionelle Betreuung und der Hilfe bei Übersetzungen sowie Herrn Müller für seine Tipps bei der Literaturbeschaffung.

Bei Prof. Dr. J. Dudeck (ehem. Leiter Institut für Medizinische Informatik) sowie Herrn W. Pabst, Institut für Medizinische Informatik, bedanke ich mich für die Hilfestellung bei statistischen Fragestellungen.

## I. Lebenslauf

Name: Frank Eickmeier  
Geb.Datum: 08.09.1971  
Geburtsort: Bad Homburg vor der Höhe  
Fam. stand: verheiratet, zwei Kinder  
Eltern: Horst Eickmeier und Ingrid Eickmeier geb.  
Freischlad  
Wohnort: Sonnenbühl 10, 75249 Kieselbronn

Schulbildung: 1978 - 1982 Grundschule Gambach  
1982 – 1991 Weidigschule Butzbach / Gymnasium  
Abitur Juni 1991

Studium: 1993 – 1999 Studium der Humanmedizin an der  
Justus-Liebig-Universität in Gießen  
Ärztliche Prüfung (3. Abschnitt) am 11.05.1999

Famulaturen: Pädiatrie, Chirurgie, Innere Medizin, Anästhesie

Praktisches Jahr: Pädiatrie (Klinikum der JLU, Gießen)  
Innere Medizin (Kreiskrankenhaus Lich)  
Chirurgie (Akutspital Riggisberg, Schweiz)

Ärztliche Tätigkeit: Arzt im Praktikum in der Kinderkardiologie der  
Universitätskinderklinik der JLU Gießen bis 30.04.2001  
Seit 01.06.2001 klinische Tätigkeit in der Kinderklinik im  
Klinikum Pforzheim  
Seit 08.03.2006 Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin  
Fachkundenachweis Rettungsdienst 06/2003  
Zusatzbezeichnung Notfallmedizin 12/2004