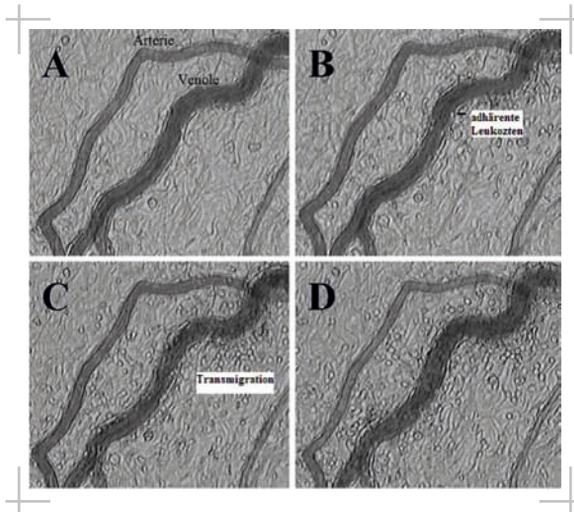


Intravitalmikroskopische Untersuchung zur
experimentellen therapeutischen Beeinflussung
einer Interleukin-2 induzierten Mikrozirkulationsstörung
am Mesenterium der Ratte durch
C1-Esterase-Inhibitor



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

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

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

1. Auflage 2015

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

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

**Intravitalmikroskopische Untersuchung zur experimentellen
therapeutischen Beeinflussung einer Interleukin-2 induzierten
Mikrozirkulationsstörung am Mesenterium der Ratte durch
C1-Esterase-Inhibitor**

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

Roland Fischer
aus Ostfildern

Gießen 2015

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. W. Seeger

Gutachter: Prof. Dr. Mayer

Gutachter: Prof. Dr. Preissner

Tag der Disputation: 11.05.2015

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung in die Thematik	1
2.	Einleitung	3
2.1	Pathophysiologie der systemischen Inflammation	3
2.1.1	Systemische Entzündung und Antiinflammation	3
2.1.1.1	Definition von Sepsis und SIRS	3
2.1.1.2	Antiinflammation	4
2.1.2	Inflammation durch Interleukin 2	5
2.1.2.1	Humanes und rekombinantes Interleukin 2	5
2.1.2.2	Therapeutischer Einsatz von rekombinatem Interleukin 2	6
2.1.2.3	Capillary-leak-syndrom	6
2.1.3	Die Rolle der Leukozyten und Thrombozyten bei der Inflammation	7
2.1.3.1	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten	7
2.1.3.2	Die Rolle der Thrombozyten bei der Inflammation	9
2.1.4	Entzündungsmediatoren und Mediatorsysteme	10
2.1.4.1	Proinflammatorische Zytokine	11
2.1.4.1.1	Interleukin 1, 2 und 6	12
2.1.4.2	Antiinflammatorische Zytokine	16
2.1.4.3	Komplementsystem bei der Inflammation	17
2.1.4.3.1	Aktivierung u. Regulation des Komplementsystems	19
2.1.4.3.1.1	Klassischer-Weg	19
2.1.4.3.1.2	Lektin-Weg	20
2.1.4.3.1.3	Alternativer Weg	20
2.1.4.3.2	Membranangriffskomplex	22
2.1.4.3.3	Anaphylatoxine	23
2.1.4.3.4	Komplementsystem u. systemische Inflammation	24
2.1.4.3.5	Komplementprodukte und Mikrozirkulation	25
2.1.4.3.6	Interaktion zwischen Komplement u. Koagulation	27
2.1.4.4	Hämostasesystem	28
2.1.4.4.1	Plasmatisches Gerinnungssystem	28
2.1.4.4.2	Fibrinolyse-System	30
2.1.4.4.3	Regulation des Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systems	31
2.1.4.4.4	Plasmatische Gerinnung und Inflammation	32

2.1.4.4.5	Hämostasekontrolle durch das Endothel und Inflammation	32
2.1.4.5	Kallikrein-Kininsystem	35
2.1.4.5.2	Regulation des Kininonaseaktivität	36
2.1.4.5.4	Kinine und Inflammation	36
2.1.5	Makro- und Mikrozirkulation bei der systemischen Inflammation	37
2.1.5.1	Makrozirkulation	37
2.1.5.2	Physiologie der Mikrozirkulation	38
2.1.5.3	Mikrozirkulation und Inflammation	38
2.1.5.4	Endotheldysfunktion	40
2.1.5.5	Endothel-Thrombozyten-Interaktion	42
2.1.5.6	Leukozyten-Endothel-Interaktion	42
2.1.5.7	Endothel-Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion	46
2.2	C1 Esterase Inhibitor	47
2.2.1	Biochemie C1 Esterase Inhibitor	47
2.2.2	Hereditäres Angioödem	48
2.2.3	Aktivität von C1 Esterase Inhibitor	49
2.2.3.1	Proteaseinhibition	50
2.2.3.2	Interaktion mit der extrazellulären Matrix	51
2.2.3.3	Interaktion mit Zellen	51
2.2.3.4	Interaktion mit Endotoxin	51
2.2.4	Substitution von C1-INH bei systemischer Inflammation	52
3.	Ziele und Fragestellungen der Arbeit	55
4.	Material und Methoden	57
4.1	Material	57
4.2	Methoden	60
4.2.1	Gruppeneinteilung und Versuchsprotokoll	60
4.2.1.1	Versuchsgruppen und Infusionsplan	60
4.2.2	Versuchsdurchführung	61
4.2.2.1	Dosierung und Umgang mit den Substanzen	61
4.2.2.2	Vorbehandlung	61
4.2.2.3	Narkose des Versuchstieres	62
4.2.2.4	Präparation des Versuchstieres	62
4.2.2.5	Vorbereitung des Versuchstieres	64
4.2.3	Durchgeführte Messungen und Untersuchungen	64

4.2.4	Intravitalmikroskopie und Videodokumentation	64
4.2.4.1	Phasenkontrastmikroskopie.....	65
4.2.4.2	Videodokumentation	65
4.2.5	Auswertung der Videoaufzeichnung.....	65
4.2.5.1	Messung des Blutgefäßdurchmessers.....	66
4.2.5.2	Quantitative Messung der Leukozytenadhäsion	66
4.2.5.3	Perfusion postkapillärer Venolen	66
4.2.6	Datenverarbeitung und Statistik.....	67
4.2.6.1	Leukozytenadhäsion.....	67
4.2.6.2	Gefäßperfusion	67
4.2.6.3	Blutdruck und Rektaltemperatur	67
4.2.6.4	Interleukin 6.....	67
4.2.6.5	Statistik.....	68
5.	Ergebnisse	70
5.1	Lichtmikroskopie.....	70
5.2	Leukozytenadhäsion.....	71
5.3	Perfusion postkapillärer Venolen	75
5.4	Blutdruck.....	77
5.5	Interleukin 6 Serumspiegel.....	78
6.	Diskussion.....	80
6.1	Intravitalmikroskopie.....	81
6.2	Modell einer rIL-2 induzierten tierexperimentellen Sepsis.....	82
6.3	Interpretation der Ergebnisse	83
6.3.1	Kontrollgruppe.....	83
6.3.2	rIL-2 Gruppe.....	84
6.3.3	Vorbehandlung mit C1-Esterase-Inhibitor	86
6.4	Schlussfolgerung.....	88
7.	Zusammenfassung.....	91
8.	Summary.....	93
9.	Anhang.....	95
9.1	Literaturverzeichnis.....	95
9.2	Abkürzungen.....	108
9.3	Abbildungen.....	110
9.4	Tabellen.....	111

9.5	Danksagung.....	112
9.6	Lebenslauf.....	113
9.7	Ehrenwörtliche Erklärung.....	114

1. Einführung in die Thematik

Eine lokale Entzündungsreaktion dient der Heilung des Organismus und kann bei Verlust der lokalen Kontrolle in eine systemische inflammatorische Reaktion übergehen. Mögliche Folge ist ein lebensbedrohliches Krankheitsbild mit multiplen Organdysfunktionen (*multiple organ dysfunction syndrome*: MODS) und Multiorganversagen (*multiple organ failure*: MOF) [McGill et al. 1998]. Diese akute Entzündungsreaktion kann sowohl steril im Rahmen eines systemic inflammatory response syndrome (SIRS) ablaufen (infolge massiver Gewebeschädigung wie nach Verbrennungen, Traumen, ausgedehnten Operationen oder Gewebehypoxie wie bei Herzinsuffizienz), als auch infektiös, was als Sepsis bezeichnet wird [Höflich und Volk 2002]. Trotz verbesserter supportiver sowie antibiotischer Therapie variiert die Mortalitätsrate von 40% bei unkomplizierter Sepsis/SIRS bis 80% bei Multiorganandysfunktionen und septischem Schock [Patterson und Webster 2000]. Eine systemische Entzündungsreaktion wird des Weiteren als Nebenwirkung der Immunotherapie bei Krebspatienten mit Interleukin 2 (IL-2) beobachtet. Dies wird als Capillary leak syndrome (CLS) bezeichnet [Baluna und Vitetta 1997]. Nach heutiger Vorstellung ist der inflammatorisch bedingte Mikrozirkulationsschaden die Ursache für ein Multiorganversagen. Unter Inflammation versteht man die Aktivierung von zirkulierenden Zellen (Leukozyten), des Endothels, der Leber und die Induktion einer neuroendokrinen Stressreaktion durch verschiedene Mediatoren [Johnson und Mayers 2001]. Die mikrovaskuläre Strombahn bildet die Kulisse für komplexe Interaktionen zwischen Gefäßwand (Endothel), zirkulierenden Zellen (Entzündungszellen) und plasmatischen Faktoren (Mediatoren). Entscheidend für das Schicksal des Gesamtorganismus ist die Größe der Ausdehnung des entzündlich veränderten Gefäßgebietes. Die Ausbreitung der Entzündung wird von der Intensität des Reizes und durch die Effizienz physiologischer Regulationsmechanismen beeinflusst. Zu einer überschießenden Entzündungsreaktion kann es durch ein Missverhältnis zwischen Verbrauch und Neubildung körpereigener Regulatorproteine der Mediatorsysteme im Sinne eines relativen oder absoluten Mangels kommen. Es entsteht ein zusätzlicher Schaden, der die physiologische Funktion einer Entzündung, nämlich die Eliminierung der Noxe und die anschließende Wundheilung, ad absurdum führt. [Leithäuser und Matthias 1997]. Ein Ansatz zur therapeutischen Intervention der Hyperinflammation stellen anti-inflammatorischen Mediatoren der Mediatorsysteme dar. Die Substitution von polyvalenten Proteinaseinhibitoren wie C1-Esterease-Inhibitor (C1-INH) ist ein vielversprechender Ansatz der aktuellen klinischen Forschung. Die Ergebnisse tierexperimenteller Untersuchungen und Patientenstudien weisen

die Substitution polyvalenter Proteaseinhibitoren als mögliches Therapiekonzept aus. [Eisele et. al 1998; Nielsen 1998; Caliezi et al. 2000; Mc Gilvray und Roststein 1998].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels Intravitalmikroskopie der Einfluss einer Substitution von C1-Esterase-Inhibitor auf den inflammatorischen Mikrozirkulationsschaden anhand von Ratten untersucht. Die systemische Entzündungsreaktion wurde mit rekombinantem Interleukin 2 (Aldesleukin) ausgelöst. Folgen Abbildung zeigt die Mediator- und Kaskadensysteme der systemischen Inflammation und die möglichen Angriffspunkte des C1-Esterase-Inhibitors.

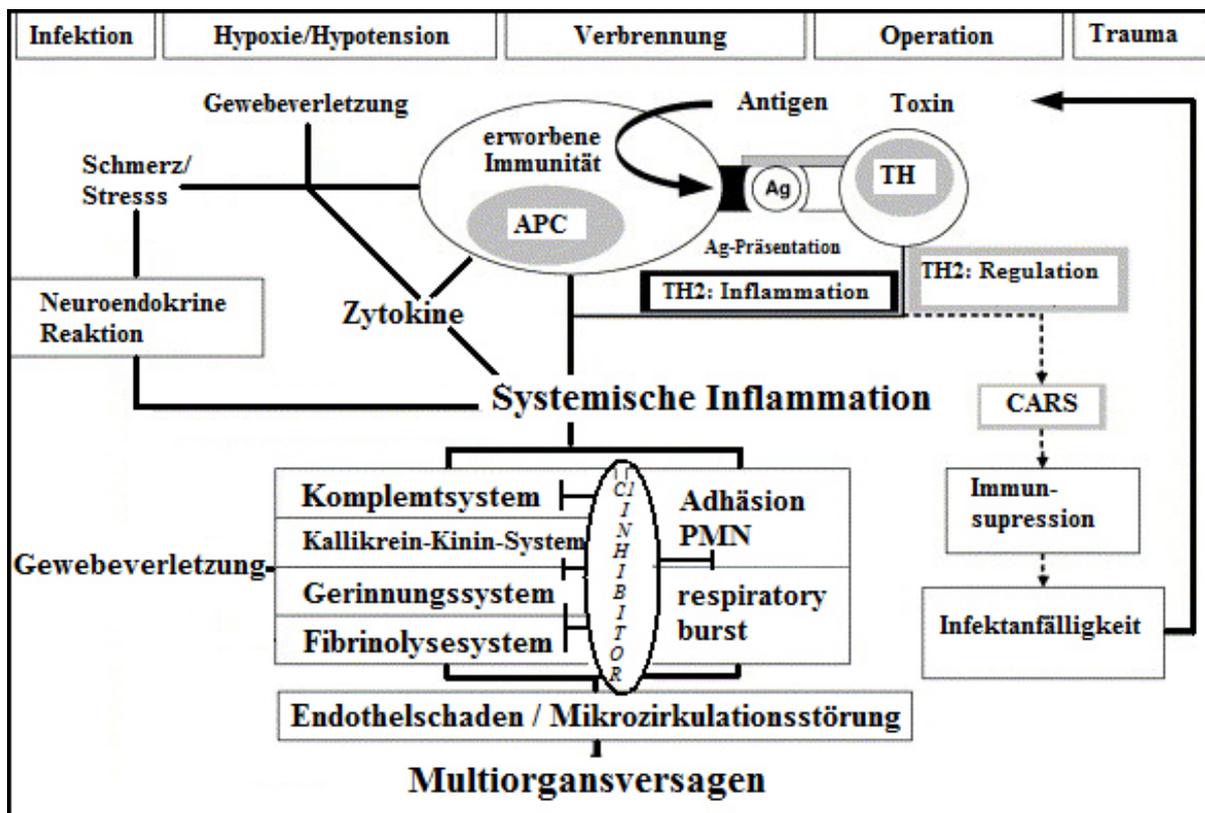


Abbildung 1: Mechanismen der systemischen Inflammation und Inhibition durch C1-Esterase-Inhibitor

2.

Einleitung

2.1 Pathophysiologie der systemischen Inflammation

Die Inflammation stellt einen Heilungsmechanismus des Körpers dar. Unter physiologischen Bedingungen ist die Entzündungsreaktion auf ein begrenztes Areal eingeschränkt und dient der Eradikation von infiziertem Gewebe. Obwohl die Inflammation der Heilung dient, ist sie destruktiv für die unmittelbare Umgebung [McGill et al. 1998].

Das Verhältnis von Stimulus, Mediatoren, Effektoren und Inhibitoren zueinander bestimmt den Nettoeffekt einer Entzündung für den Organismus. Die Aktivierung biologischer zellulärer und humoraler Mediatoren- und Kaskadensysteme (Leukozyten, Zytokine, Komplement-, Kontakt-, Gerinnungs-, Fibrinolyse- und Kallikrein-Kininsystem) ist die Grundlage für eine erfolgreiche Abwehr schädigender Einflüsse auf den Organismus. Die Reaktionsprodukte aus aktivierten Kaskadensystemen interagieren mit den Komponenten und proinflammatorischen Produkten der zellulären Abwehr. Diese Systeme unterliegen normalerweise einem selbstregulierenden Gleichgewicht durch korrespondierende antiinflammatorische Mediatoren [Leithäuser und Matthias 1997; Johnson und Mayers 2001]. Eine Schlüsselrolle in der Regulierung von Reaktionsprodukten übernehmen verschiedene Proteinaseinhibitoren wie zum Beispiel C1-Esterase-Inhibitor. Bei der Sepsis/SIRS kommt es zu einer exzessiven Freisetzung von Entzündungsmediatoren mit einer ebenso ausgeprägten Aktivierung von Entzündungszellen, welche das Inhibitorpotential des Organismus überfordern. Es kommt zu einem relativen oder absoluten Mangel an Regulatorproteinen und damit zu einem Verlust der Kontrolle über den Entzündungsprozess mit einer zusätzlichen Schädigung des Organismus [Davis et al. 2008].

2.1.1 Systemische Entzündung und Antiinflammation

2.1.1.1 Definition von Sepsis und SIRS

Die Sepsis ist eine generalisierte Entzündungsreaktion in Folge einer Infektion mit einem Mikroorganismus (Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten). Das SIRS beschreibt eine systemische Entzündung ohne nachweisbares infektiöses Agens, ausgelöst durch Gewebeschäden (z.B. Verbrennung, Trauma, ausgedehnte Operationen). Diagnostische Parameter sind in charakteristischer Weise verändert und haben im Rahmen der „Consensus

Conference“ zur Definition dieser Krankheitsbilder geführt (siehe Tabelle 1) [Members of ACCP 1992]. Wesentliche Folge der Hyperinflammation ist eine Störung von Makro- und Mikrozirkulation mit möglicher Entwicklung multipler Organdysfunktionen und Multiorganversagen.

Bezeichnung	Definition
SIRS (2 Kriterien müssen erfüllt sein)	Körpertemperatur: $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$ Herzfrequenz: $>90/\text{min.}$ Atemfrequenz: $>20/\text{min.}$ oder $\text{PaCO}_2 <32 \text{ mmHg}$ Leukozytose: $> 12.000/\text{mm}^3$ oder $< 4.000/\text{mm}^3$ oder $>10\%$ unreife Neutrophile
SEPSIS	SIRS mit nachgewiesenem infektiösem Auslöser
Schwere Sepsis	Sepsis mit Organdysfunktion, Hypotension und/oder Hypoperfusion
Septischer Schock	Schwere Sepsis ohne Ansprechen auf Volumengabe und positiv inotropen Substanzen. Einteilung in hyper- und hypodynamische Phase

Tabelle 1: Definition von Sepsis und SIRS [Members of ACCP 1992].

2.1.1.2

Antiinflammation

Wie in jedem biologischen System unterliegt auch die Entzündungsantwort einer negativen Gegenregulation zur Abschwächung oder Beendigung dieses Prozesses. Nach bisherigem Wissen wirken dabei auf lokaler Ebene verschiedene Mechanismen zusammen. Proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ induzieren die Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10. Die Phagozytose von apoptotischen Zellen, die im Rahmen des Gewebeuntergangs im Entzündungsgebiet entstehen, wirkt hemmend auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine. Außerdem wirken im Gewebe entstehende Immunkomplexe hemmend auf die proinflammatorischen Eigenschaften von phagozytierenden Zellen. Darüber hinaus induzieren Zytokine (z.B. $\text{TNF-}\alpha$, IL- 1β) im ZNS eine systemische Stressreaktion, die ebenfalls zur Hemmung proinflammatorischer Prozesse, sowohl direkt als auch indirekt, durch Induktion antiinflammatorischer Mediatoren wie IL-10 führt.

Eine durch ein generalisiertes Entzündungsgeschehen ausgelöste systemische Antiinflammation wird als CARS (*kompensatorisches antiinfektiöses Response Syndrome*)

bezeichnet. Wenn beide Zustände gleichzeitig nachweisbar sind, liegt das Bild eines gemischten antagonistischen Response Syndrome vor (MARS). Eine systemische Hypoinflammation begünstigt das Auftreten unkontrollierter und opportunistischer Infektionen. Bei einer ausgeprägten systemischen Antiinflammation kann die Einschränkung der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr zu unkontrollierten Infektionen mit Gewebeschädigung bis hin zum Tode führen [Höflich und Volk 2002].

2.1.2 Inflammation durch Interleukin 2

Dieser Arbeit liegt die intravitalmikroskopische Untersuchung der Mikrozirkulation an postkapillären Venolen des Mesenteriums der Ratte bei generalisierter inflammatorischer Reaktion durch Stimulierung mit rekombinantem Interleukin 2 (rIL-2) zugrunde.

2.1.2.1 Humanes und rekombinantes Interleukin 2

Interleukin 2 ist ein Glykoprotein von 15.000 Dalton (133 Aminosäuren), welches von aktivierten T-Lymphozyten nach Antigenstimulation produziert und freigesetzt wird [Smith 1998; Taniguchi et al. 1983]. Neben einer gesteigerten Proliferation von natürlichen Killerzellen (*NK-Zellen*) werden T-Zellen zum Wachstum, zur klonalen Expansion und zur Zytokinproduktion (z.B. Interleukin 1, TNF, Interferon (INF)- γ) angeregt [Hefeneider et al. 1983]. Zudem wird die Differenzierung von LAK (*lymphocyte-activated killer cells*) induziert [Grimm et al. 1983] (Wirkmechanismus von IL-2 siehe „Zytokine“, Seite 12). Aldesleukin (Proleukin©) ist ein rekombinantes IL-2, welches gentechnisch aus E.coli K12 hergestellt wird. Es hat eine äquivalente biologische Aktivität wie humanes IL-2, angegeben in internationalen Einheiten (I.E.) [Doyle et al. 1985; Rosenberg et al. 1984].

Das natürliche IL-2 Protein beinhaltet drei Zysteinreste, lokalisiert an Aminosäureposition 58, 105 und 125. Diese können über verschiedene Disulfidbrücken zahlreiche Konfigurationen annehmen, von denen nur eine biologisch aktiv ist. Der Austausch von Serin für das Zystein an Position 125 führt zu einem rekombinanten Interleukin ([Ser]IL-2), welches nur eine Disulfidbrücke bilden kann und somit erhöhte Stabilität aufweist [Wang et al. 1984].

Rekombinantes IL-2 wurde in den letzten Jahren gezielt in der Tumorthherapie zur Verstärkung der unspezifischen Immunität eingesetzt [Clement et al. 2009]. Dabei werden Tumorzellen durch Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen, LAK oder NK-Zellen gezielt destruiert. Bislang wird rIL-2 in der Tumorthherapie des Nierenzellkarzinoms, maligner Melanome und Non-Hodkin-Lymphome verwendet. Darüber hinaus wird rIL-2 vielfach in Kombination mit anderen Immunotherapeutika (v.a. IFN- α) und/oder mit Chemotherapeutika im Rahmen kontrollierter Studien eingesetzt [Rosenberg et al. 1985; West et al. 1987]. Die klinische Applikation von IL-2 ist jedoch durch die Induktion dosisabhängiger Toxizität in normalem Gewebe beschränkt. Es können zahlreiche systemische Nebenwirkungen auftreten. Bei intravenöser Gabe treten häufiger als bei subkutaner Applikation dosisabhängige grippeähnliche Allgemeinbeschwerden wie Fieber, Schüttelfrost, Arthralgien, Myalgien und Cephalien auf, wie sie auch nach Gabe von Interferon zu beobachten sind. Zu den spezifischen IL-2 Nebenwirkungen zählen Hypotonie, Oligurie, Thrombozytopenie, Granulozytopenie, Anämie und Herzrhythmusstörungen [Lee et al. 1988; West et al. 1987]. Am bedrohlichsten ist eine leukozytäre Infiltration von Organen mit der Entwicklung multipler Organdysfunktionen, sowie das capillary-leak-syndrome (syn. *vascular-leak-syndrome* (VLS)) [Siegel und Puri 1991].

Die dosisabhängige Toxizität von IL-2 kann nach Applikation zu einer erhöhten kapillären Permeabilität führen, es resultiert das CLS [Rosenberg et al. 1987]. Kennzeichnend dafür sind Extravasation von Flüssigkeit und Proteinen in das Gewebe mit interstitiellem Ödem, verminderter Perfusion der Mikrozirkulation und verschiedene Ausprägungen von Organschäden. Klinische Symptome sind erhöhtes Körpergewicht durch generalisierte Ödeme und Aszitis, pulmonale, cardiovaskuläre und hepatische Insuffizienz, therapierefraktäre Vasodilatation und Organdysfunktionen bis hin zum Organversagen.

Das CLS wird auch nach Applikation von INF- α , Immunotoxinen, Granulocyte-Makrophage Colonie Stimulating Factors (*GM-CSF*), diverser Chemotherapeutika und bei Patienten mit T-Zell-Lymphomen, Sepsis, Traumata, Operationen und Verbrennungen beobachtet. Ursache für die Ausbildung eines CLS nach IL-2 Applikation sind Modifikationen des vaskulären Endothels mit morphologischen Veränderungen der Endothelzell-Monolayer,

Leukozytenadhäsion an das Endothel, sowie Leukozyten-Extravasation und Infiltration des Interstitiums. Diese Veränderungen deuten auf eine Involvierung von Zell/Zell und Zell/Matrix Interaktionen und eine inflammatorische Reaktion [Baluna und Vitetta 1997]. Eine wichtige Rolle spielen dabei sekundär induzierte Zytokine, das Komplement- und Kallikrein-Kininsystem, das Gerinnungssystem, Arachidonsäuremetabolite und zellvermittelte Schäden der Endothelzellen durch direkte Lyse oder durch reaktive freie Sauerstoffradikale und Proteasen [Siegel und Puri 1991; Parkinson 1988].

Der Grad der Aktivierung neutrophiler Granulozyten und des Komplementsystems korreliert hochgradig mit der Dosis von rIL2. Dies korreliert wiederum signifikant mit dem Grad der Hypotension und dem Ausmaß des CLS. Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und des Komplementsystems scheint eine Schlüsselrolle in der Entwicklung eines CLS zu spielen. Die Toxizität von IL-2 ähnelt sehr stark dem Bild einer Sepsis/SIRS. [Baars et al. 1992]. Dieser Arbeit liegt ein SIRS-Modell durch die intravenöse Applikation von rIL-2 mit konsekutiver systemischer Inflammation zugrunde.

2.1.3 Die Rolle der Leukozyten und Thrombozyten bei der Inflammation

Die Zellen der Mikrozirkulation (Leukozyten, Endothelzellen, Thrombozyten) liegen in unterschiedlichen Stadien der Aktivierung vor. Zelluläre Aktivierung ist eine physiologische Antwort, welche der Eliminierung pathogener Keime und der Wundheilung dient [Mazzoni und Schmid-Schönbein 1996]. Die Interaktion aktivierter Entzündungszellen mit dem mikrovaskulären Endothel bewirkt direkt oder indirekt durch die Freisetzung verschiedener Mediatoren bzw. toxischer Metabolite einen Gewebeschaden. Insbesondere die Leukozytenadhäsion wird im Rahmen einer systemischen Inflammation als wichtiger Faktor bei der Entstehung der Mikrozirkulationsstörung und Organ-Dysfunktion angesehen [Bone 1992; Simms 1995]. Die Thrombozyten unterstützen die Aktivierung, Rekrutierung, Adhäsion und Transmigration von Leukozyten in inflammatorischem Gewebe [Wagner und Burger 2003].

2.1.3.1 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN's) sind phagozytierende Zellen, welche in das Zielgewebe auswandern und proinflammatorische Substanzen produzieren, mit dem Ziel Mikroorganismen zu eliminieren [Schmedly et al. 1986]. Sie sind die Schlüsselzellen bei

hyperinflammatorischen Prozessen wie Sepsis/SIRS, ARDS (*Adult respiratory distress syndrome*) und MOF [Vedder et al. 1989]. Die Reaktivität von neutrophilen Granulozyten wird durch zahlreiche Zytokine moduliert, insbesondere IL-1, IL-8 und TNF α . Weitere Aktivatoren sind Leukotriene (z.B. LTB₄), PAF (*platelet activating factor*), opsonierte Bakterien, Komplementprodukte (z.B. C3a, C5a), Endotoxin, Faktor XIIa und Kallikrein [Mazzoni und Schmid-Schönbein 1996]. Da neutrophile Granulozyten selbst Entzündungsmediatoren produzieren (z.B. IL-1, IL-8, Arachidonsäure-metabolite), sind sie auch in der Lage sich autokrin zu aktivieren [Marie et al. 1998]. Aktivierte PMN`s exprimieren eine erhöhte Anzahl an Adhäsionsmolekülen, wodurch eine Interaktion zwischen PMN`s (CD11b/CD18) und Endothelzellen (ICAM-1) ermöglicht wird [Ward und Mark 1989]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Mikrozirkulation in Ratten bei systemischer Inflammation durch rIL-2 identifizierten die adhärennten Leukozyten als polymorphkernige Zellen [Edwards et al. 1992]. Die Wechselwirkung mit dem vaskulären Endothel verläuft in drei Stufen: „Rollen“, Aktivierung/Adhäsion und Migration (siehe Leukozyten-Endothel Interaktion, S.42). Die feste Adhäsion am Endothel über CD11b/CD18 – ICAM-1 Interaktion ist Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Gewebeschädigung [Carlos und Harlan 1994, Rainger et al. 1994]. Die Gewebeschädigung entsteht durch die leukozytäre Degranulation von Proteasen (z.B. Elastase, Kathepsin G, Kollagenase), welche Strukturproteine degradieren, sowie durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (O₂⁻, H₂O₂, OH⁻). Diese im eigentlichen Sinne mikrobiell zytotoxischen Produkte unterliegen unter physiologischen Bedingungen gewebeeigener Kompensationsmechanismen, welche bei einer übermäßigen Aktivierung der PMN`s im Rahmen einer systemischen Inflammation versagen [Patterson und Webster 2000]. Nach Transmigration und Phagozytose gehen die PMN`s zugrunde. Die Apoptose ist ein wichtiger Prozess in der Beendigung einer normalen Inflammation [Haslett 1992]. Dennoch können Zerfallsprodukte und Teile unvollständig phagozytierten Materials Ausgangspunkt weiterer entzündlicher Prozesse und Gewebeschädigung sein [Gemsa 1997]. Eine Verzögerung der Apoptose kann zu einer anhaltenden Hyperinflammation führen [Jimenez 1997]. Folge der Freisetzung toxischer Metabolite ist die Schädigung endothelialer und subendothelialer Strukturen durch die Zerstörung der extrazellulären Matrix, Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Blutviskosität sowie die Lyse von Endothelzellen. Außerdem führt die Störung der Mikrozirkulation durch eine mechanische Verlegung der vaskulären Strombahn zum Gewebeschaden. Die Akkumulation von PMN`s über entzündlich verändertem Gewebe führt zu einer Reduktion des Gefäßdurchmessers und einem Anstieg des peripheren Widerstandes. Die resultierende

Abnahme des Perfusionsdruckes im nachgeschalteten Kapillarbett erschwert die leukozytäre Passage und reduziert den regionalen Blutfluss bis hin zur Stase [Mazzoni und Schmid-Schönbein 1996, Harlan 1987].

2.1.3.2 Die Rolle der Thrombozyten bei der Inflammation

Die Thrombozyten sind zelluläre Effektoren der Blutgerinnung und ein wichtiges Brückenglied zwischen Entzündungs-, Thrombose-, und Arterioskleroseprozessen. Sie sezernieren eine Vielzahl potenter inflammatorischer Substanzen wie Adhäsionsproteine, Wachstumsfaktoren, Chemokine, zytokinähnliche Faktoren, sowie Gerinnungs- und Fibrinolysefaktoren. Dadurch verändern sich chemotaktische, adhäsive und proteolytische Eigenschaften der Endothelzellen, wodurch die Chemotaxis, Adhäsion und Transmigration von Leukozyten an entzündlich veränderten Gefäßarealen gefördert wird. Des Weiteren werden biologische Faktoren wie Zellproliferation, Überleben und die Koagulation beeinflusst. Die Plättchenadhäsion am Endothel bewirkt durch transzelluläre Kommunikation über lösliche Mediatoren eine Inflammation des Endothels [Siegel-Axel et al. 2006]. Nach Expression von P-Selectin und von Willebrand factor (*vWF*) durch Translokation der Speichergranula (Weibel-Palade-bodies) auf aktiviertem Endothel kommt es zum Anheften („thetering“), gefolgt vom Rollen („rolling“) der Thrombozyten über die korrespondierenden Rezeptoren PSGL-1 (*p-selectin glykoprotein ligand-1*) und Glykoprotein GPIb α . Nachfolgend wird die feste Adhäsion über β 3-Integrine vermittelt. Die Thrombozytenaktivierung erfolgt anschließend durch Proteine der extrazellulären Matrix (*vWF*, Kollagen) mit konsekutiver Thrombusformation und Amplifikation durch autokrine Aktivierung, beispielsweise durch Freisetzung von ADP und Thromboxan A₂. Eine direkte Aktivierung wird über proinflammatorische Mediatoren wie PAF (*platelet-activating-factor*) vermittelt [Wagner und Burger 2003]. Während des Adhäsions- und Aktivierungsprozesses werden zahlreiche inflammatorische und mitogene Substanzen sezerniert. Chemokine wie RANTES (*regulated upon activation normal T cells expresses and secreted*) können an das aktivierte Endothel binden und eine P-Selectin vermittelte Rekrutierung von Monozyten induzieren. Plättchenfaktor 4 (*PF4*) agiert als Chemoattractant für Monozyten und fördert die Differenzierung zu Makrophagen. Interleukin 1 β aus thrombozytären Mikrovesikeln führt zu einer Aktivierung von Endothelzellen mit massiv gesteigerter Leukozytenadhärenz [Weyrich et al. 2003]. Die aktivierten und adhärenenten Thrombozyten bilden über P-Selectin und den leukozytären Rezeptor PSGL1 einen

Thrombozyten-Leukozyten Komplex. Die P-Selectin/PSGL-1 Rezeptorinteraktion stimuliert die monozytäre Zytokinfreisetzung (TNF α , MCP-1 (*monocyten-chemoattractant-protein-1*), IL8) und unterhält und verstärkt den inflammatorischen Prozess. Des weiteren kommt es zu einer leukozytären Integrin-Aktivierung mit nachfolgender Stabilisierung der Leukozyten-Thrombozyten Interaktion und Transmigration der Leukozyten [Wagner und Paul 2009]. Die Blutplättchen unterstützen somit die Aktivierung, Rekrutierung, Adhäsion und Transmigration von Leukozyten in inflammatorischem Gewebe und vermitteln Leukozyten-Leukozyten und Endothel-Leukozyten Interaktion [Wagner und Burger 2003].

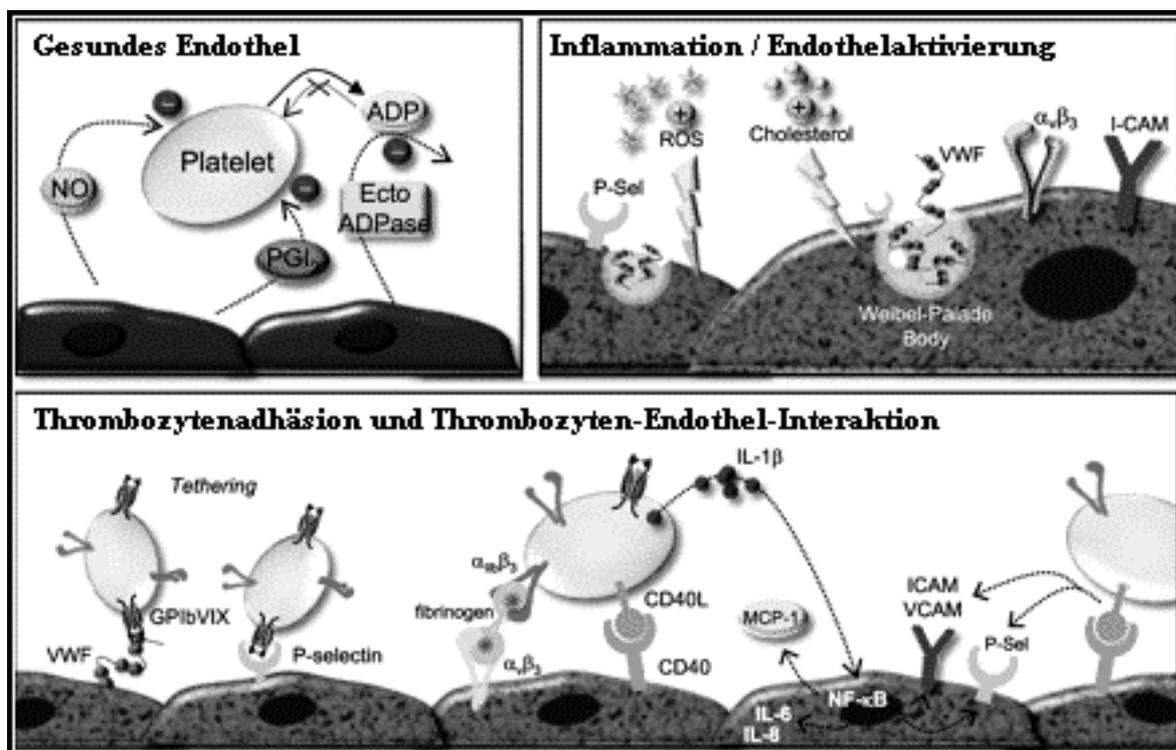


Abbildung 2: Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion (modifiziert nach Kaplan und Jackson 2011)

2.1.4 Entzündungsmediatoren und Mediatorsysteme

Unter physiologischen Bedingungen steuern die Kaskadensysteme und die pro- und antiinflammatorischen Mediatoren einen geregelten Entzündungsablauf. Im Rahmen einer systemischen Inflammation kann dieses Gleichgewicht der Kontrolle entzogen sein und den Organismus durch Gewebeschädigung, Organdysfunktion und Apoptose schädigen. Externe Stimuli, wie eine schwere Infektion, Verbrennung, Trauma oder Haemorrhagie, können die

Abwehrzellen aktivieren und eine systemische inflammatorische Reaktion durch die Freisetzung von Zytokinen (Interleukine, $TNF\alpha$, MIF (*macrophage migratory inhibitor factor*), HMGB-1 (*high-mobility group box-1 protein*)) und weiteren Mediatoren (Komplement- und Gerinnungsfaktoren, Eicosanoide, PAF, NO) entfesseln [Jean-Baptiste 2007]. Die folgende Abbildung zeigt die Produktion inflammatorischer Mediatoren nach entsprechendem Stimulus und die darauf folgenden klinischen Pathologika in Abhängigkeit von der Zeit.

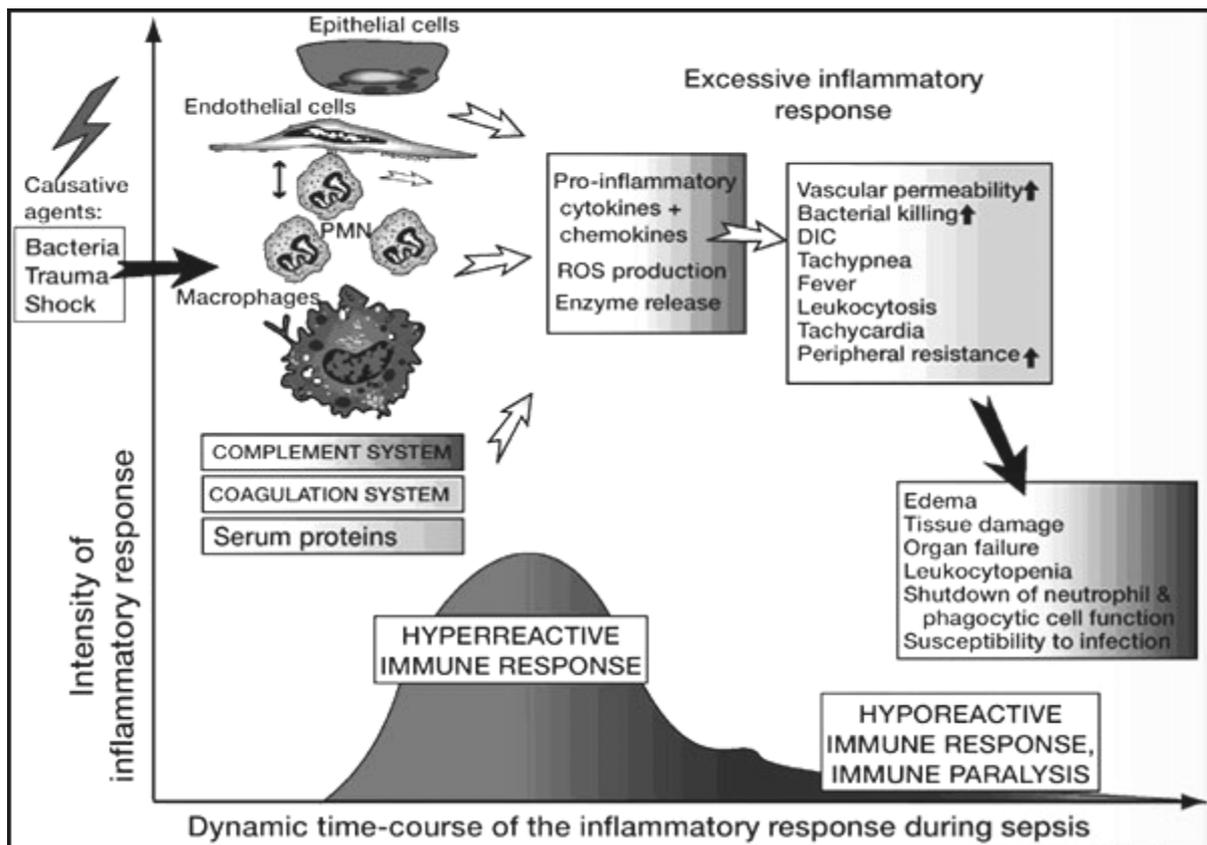


Abbildung 3: Exzessive Produktion inflammatorischer Mediatoren (modifiziert nach Riedemann et al. 2003)

2.1.4.1 Proinflammatorische Zytokine

Eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems ist die Produktion und Freisetzung von Zytokinen. Zytokine sind niedermolekulare Proteine. Sie werden nicht gespeichert, sondern unmittelbar während der Aktivierung der inflammatorischen Kaskaden von Abwehrzellen wie Makrophagen und Monozyten synthetisiert und freigesetzt. Nach der Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren bewirken sie eine Aktivierung,

Differenzierung und Proliferation von Zellen des Immunsystems. Eine wesentliche Funktion ist es, die Immunantwort zu den Ort der Infektion und der Verletzung zu lenken und die Wundheilung zu fördern. Die meisten Zytokine besitzen eine pleiotrope Aktivität und zeigen multifunktionale Effekte auf eine Vielzahl von Zielzellen. Die Zytokine können entsprechend ihrer prädominanten pro- oder antiinflammatorischen Eigenschaften in zwei Gruppen unterteilt werden [Johnston 2009]. Die exzessive Freisetzung proinflammatorischer Zytokinen kann für den Organismus gefährlicher sein, als der eigentliche Stimulus der Initiation einer Immunantwort. Bei einer Überwindung der normalen Regulation der Immunantwort durch Versagen der endogenen antiinflammatorischen Mediatoren resultiert eine unkontrollierte, überschießende Immunantwort. Aus einer exzessiven systemischen Inflammation kann eine Beeinträchtigung verschiedener Organsysteme bis hin zum Organversagen und Tod resultieren. [Matsuda 2006].

2.1.4.1.1 Interleukine 1, 2 und 6

Interleukin 1 ist der Prototyp eines „Alarm“-Zytokins und koordiniert die Frühphase der Inflammation. Aktuell sind 11 Mitglieder der Interleukin 1 Molekülfamilie inklusive des IL-1-Rezeptor-Antagonist-Moleküles identifiziert (IL-1Ra). IL-1 β wird von Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und dendritischen Zellen als Antwort auf mikrobielle Toxine, proinflammatorische Produkte von aktivierten Lymphozyten, sowie Komplement- und Gerinnungsfaktoren sezerniert. Die Aktivierung von IL-1 β erfolgt durch den zytosolischen Proteinkomplex Inflammasome neutrophiler Granulozyten und Makrophagen, welcher durch die Aktivierung von Caspase-1 das IL-1 β in die aktive Form überführt. Die Freisetzung von IL-1 β induziert eine Steigerung der eigenen Freisetzung im Sinne einer positiven Rückkopplung und führt in Abhängigkeit der Zielzelle zu einer Sekretion von TNF, NO-Synthase, COX-2, Prostaglandin E₂, NO, IL-6 und Typ-2-Phospholipase A. IL-1 teilt mit TNF und IL-6 die Eigenschaft T-Zellen und B-Zellen zu stimulieren, die Zellteilung zu verstärken und die Genexpression zu initiieren oder zu unterdrücken. IL-1 β hat die stärkste fieberinduzierende Potenz aller bekannten pyogenen Moleküle. In einer wachsenden Anzahl von Erkrankungen scheint ein Ungleichgewicht von IL-1 und IL-1Ra den Schweregrad der Erkrankung zu beeinflussen [Goldbach-Mansky et al. 2009; Dinarello 1991]. Die Sekretion von IL-1 führt zu Fieber, Hypotension, Vigilanzminderung, Neutrophilie oder dosisabhängig zu einer Neutropenie. Eine Konzentration von IL-1 und TNF α , die einzeln keine signifikante hämodynamische Beeinflussung verursachen, führt im Tiermodell bei gemeinsamer

Applikation zu einer Hypotension bis hin zum Schock. Des Weiteren haben IL-1 und TNF α einen negativ inotropen Effekt auf kardiale Monozyten [Jean-Baptiste 2007]. Der Synergismus von IL-1 und TNF α fördert die Aktivierung und Interaktion von PMN`s und Endothelzellen. Dies führt zu einer Adhäsion von PMN`s an das aktivierte Endothel und zu einer Transmigration der PMN`s in das umliegende Gewebe mit konsekutiver Gewebedestruktion [Dinarello 2000].

Interleukin 2 wurde 1976 von Morgan et al. durch ein Zellkultursystem, in dem die Vorstufen von T-Lymphozyten zum Wachstum angeregt und die Differenzierung zu reifen T-Lymphozyten induziert wurde, als „T-cell-growth-factor“ entdeckt. Interleukin 2 wird in erster Linie durch antigenaktivierte T-Helferzellen produziert und stimuliert autokrin die antigenspezifische klonale Expansion durch Proliferation und antiapoptotische Mechanismen, sowie die Differenzierung in CD4+ und CD8+-Zellen. Die Produktion und Sekretion weiterer Zytokine und Chemokine wird verstärkt [Liao et al. 2013]. Der IL-2 Sekretion folgt sehr schnell die Expression eines hochaffinen IL-2 Rezeptors, welcher die selektive Expansion der Effektor-T-Zellpopulation vermittelt. Der IL-2-Rezeptor (IL-2R) besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten ($\alpha/\beta/\gamma$). Die IL-2R α -Untereinheit erhöht die Affinität des Rezeptors für IL-2 und ist spezifisch für IL-2, eine Signalweiterleitung ist jedoch nur an die β - und γ -Untereinheiten gekoppelt. Neben dem Effekt auf T-Zellen beeinflusst IL-2 zahlreiche weitere Zellen des Immunsystems. IL-2 ist ein Wachstumsfaktor für natürliche Killerzellen und erhöht die zytotoxische Aktivität. Auch bei B-Lymphozyten induziert IL-2 Reifungsprozesse und steigert die Antikörperproduktion. Neben den proinflammatorischen Eigenschaften zeigt IL-2 eine Sensibilisierung der T-Lymphozyten für den aktivierungsinduzierten Zelltod. Eine fehlende kontinuierliche Antigenstimulation, Zytokinprivation und IL-2 vermittelte proapoptotische Mechanismen führen zum Zelltod aktivierter T-Lymphozyten. Diese negative Rückkopplungsschleife scheint durch die Herunterregulierung und Beendigung der Immunantwort potentieller Autoimmunität durch autoreaktive T-Lymphozyten entgegenzuwirken. IL-2 spielt somit eine entscheidende Rolle in der Regulation von Immunreaktionen und deren Homöostase [Gaffen et al. 2000].

Die tierexperimentelle intravenöse Verabreichung von IL-2 führt dosisabhängig zu einer signifikanten Toxizität, vergleichbar mit den Veränderungen eines septischen Schocks. IL-2 führt zu einer erhöhten mikrovaskulären Permeabilität, Vasodilatation und Dysfunktion der Mikrozirkulation. Der pathophysiologische Hintergrund liegt dabei in einer sekundär induzierten Produktion von Zytokinen und Arachidonsäuremetaboliten, dem

defizienter Mäuse gezeigt werden, dass IL-6 sowohl bei sterilem Gewebeschaden, als auch bei infektiöser Gewebeschädigung eine entscheidende Rolle in der Akut-Phase-Reaktion, der Aktivierung von B-Zellen und T-Zellen, sowie in der Modulation der Hämatopoese und des Gerinnungssystems einnimmt [Bluethmann et al. 1994]. Das Komplementsystem hat einen direkten Einfluss auf die Stimulation und Expression von IL-6. Das Anaphylatoxin C5a induziert sehr potent die IL-6 Synthese, C3a erhöht die IL-6 Freisetzung, da es als Kostimulator des Lipopolysaccharid Signalweges fungiert. Damit trägt die Vernetzung von Komplement und IL-6 zu einer Regulierung der Immunantwort und Inflammation bei [Fischer et al. 1999]. In der Zytokinkaskade gehört das IL-6 nach IL-1 und TNF α dem „distalen“ Schenkel an. Der Höchstwert wird im Tiermodell erst einige Stunden nach dem Auslösen einer systemischen Inflammation erreicht. In vitro supprimiert IL-6 die Produktion von IL-1 β und TNF α . Der IL-6 Plasmaspiegel in der Sepsis scheint direkt von der Produktion von IL-1 β und TNF α abhängig zu sein. Im Tierexperiment kann durch die Injektion von IL-6 kein sepsisähnliches Krankheitsbild generiert werden. Die aktuelle Forschung zeigt einen Zusammenhang von IL-6 und dem Gewebeödem durch vaskuläre Leackage in der Sepsis. Zelladhäsionsmoleküle wie vascular-endothelial (VE) Cadherin bilden durch die Verbindung benachbarter Endothelzellen Zell/Zell-Adhäsionen. IL-6 und der durch aktivierte PMN's gebildete lösliche Rezeptor sIL-6R interagieren nach Komplexbildung mit den vaskulären Endothelzellen. Dies führt zu einer Phosphorylierung und Endozytose von VE-Cadherin. Daraus resultiert ein Zusammenbruch der endothelialen Barrierefunktion mit konsekutivem Gewebeödem und verringerter Gewebeoxygenierung [Krüttgen und Rose-John 2012]. Der IL-6 Plasmaspiegel ist in der Sepsis ein valider Indikator der Aktivierung der Zytokinkaskade und korreliert mit der Schwere der Erkrankung. IL-6 ist ein prädiktiver Marker für das Ausmaß der Organdysfunktion und den Tod [Blackwell et al. 1996]. IL-6 begrenzt die Akkumulation neutrophiler Granulozyten im entzündeten Gewebe und fördert die Lymphozytenrekrutierung, was einen Übergang der angeborenen Immunantwort zu der erworbenen Immunantwort markiert. Dieser Mechanismus wird des Weiteren durch eine effiziente Aktivierung der Apoptose leukozytärer Zellen durch IL-6 unterstützt. Auf aktivierte Lymphozyten wirkt IL-6 hingegen antiapoptotisch. IL-6 kommt zusammenfassend eine Schlüsselrolle als ausgleichender Faktor pro- und antiinflammatorischer Mechanismen der erfolgreichen Immunantwort zu [Jones 2005].

Alle anti-inflammatorischen Zytokine werden im Rahmen der systemischen Inflammation in großer Menge produziert um einer für den Organismus ungünstigen, exzessiven und überschießenden Hyperinflammation entgegenzuwirken. Eine gemeinsame Eigenschaft der anti-inflammatorischen Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-13, löslicher-TNF α -Rezeptor, IL-1-Ra, und TGF- β ist die Hemmung der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Eine exazerbierte Freisetzung der anti-inflammatorischen Zytokine in Sepsis trägt zu einer Immundefizienz bei, welche bei diesen Patienten häufig beobachtet wird. Die fragile Balance zwischen negativem und positivem Feedback auf die inflammatorischen Mediatoren moduliert den Zellschaden und beeinflusst den klinischen Ausgang [Cavaillon 2003; Dinarello 1997]. Tabelle 4 fasst die pro- und antiinflammatorischen Mediatoren zusammen.

Mediator	Wirkung
<u>Proinflammatorische Mediatoren</u>	
TNF α	Fieber, Hypotension, Schock, Aktivierung von PMN und Endothelzellen
IL-1	Fieber, Hypotension, Anorexie, Vigilanzminderung Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen
IL-6	Akut-phase-Proteinproduktion, T-Zell und B-Zell Proliferation
IL-8	Chemotaxis PMN und T-Zellen
HMGB-1	Sepsis-like-Syndrom, Hypotension, Schock
MIF	Steigerung der TNF α und TLR4 Expression
NO	Relaxation glatter Muskulatur, Zytotoxizität
PAF	Histaminfreisetzung aus Thrombozyten, Aktivierung von Thrombozyten und Endothelzellen
C3a-C5a	Histaminfreisetzung, gesteigerte Kapillarpermeabilität, Vasodilatation
PGE2, PGI2	Vasodilatation
TXA2	Erhöhte pulmonale Resistance
LTC4, LTD4, LTE4	Gesteigerte pulmonale Kapillarpermeabilität Bronchospasmus

<u>Antiinflammatorische Mediatoren</u>	
IL-10	Unterdrückung von INF, IL-1 und Makrophagenaktivität
PGI2	Herunterregulierung von TNF α
Löslicher TNF α Rezeptor	Blockade von TNF α -Rezeptoren
IL-1 Rezeptorantagonist	Kompetitive Bindung an IL-1 Rezeptoren Blockade der IL-1 Aktivität
Hitzeschockproteine	Negativer Feedback der NF κ B-Aktivierung Inhibition von TNF α und IL-1
Phosphatasen	Dephosphorylierung von cytoplasmatischen Substraten Reduktion der NF κ B-abhängigen TNF α Produktion Deaktivierung von Leukozyten und Endothelzellen
Cortisol	Inhibition von NF κ B, Hemmung der Produktion von TNF α , IL-1, IL-6, Eicosanoide, NO und Freisetzung von Hitzeschockproteinen

Tabelle 2: Pro- und antiinflammatorische Mediatoren

2.1.4.3 Komplementsystem bei der Inflammation

Das Komplementsystem ist wesentlicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems und spielt bei der unspezifischen körpereigenen Abwehr eine bedeutende Rolle. Es besteht aus über 30 Plasmaproteinen und Rezeptoren, welche über eine enzymatische Kaskade durch eine Vielzahl von Protein-Protein Interaktionen agiert. Das Komplementsystem stellt ein proinflammatorisches System dar, welches über mehrere Wege aktiviert werden kann: der durch spontane Aktivierung getriggerte alternative Weg, der vorwiegend antikörperabhängige klassische Weg und der Lektin-Weg, der über Kohlenhydratreste auf Oberflächen vermittelt wird. Neben den etablierten drei Wegen zeigt die aktuelle Forschung eine Interaktion des Gerinnungssystems mit dem Komplementsystem. Die potente Serinprotease Thrombin und die Gerinnungsfaktoren FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, sowie Plasmin sind in der Lage das Komplementsystem durch Spaltung der Komplementfaktoren C3 und C5 zu aktivieren [Oikonomopoulou et al. 2012]. Eine weitere Möglichkeit der Komplementaktivierung bieten Makrophagen und PMN's. Diese phagozytierenden Zellen können über eine zellgebundene Serinprotease C5 in das biologisch aktive C5a spalten [Ehrthaller et al. 2011]. Auch Zytokine wie IL-2 und IL-6 können über die Induktion einer hepatischen CRP-Synthese und

die Bindung des CRP an Phosphocholine geschädigter Zellmembranen das Komplementsystem aktivieren [Haeney 1998].

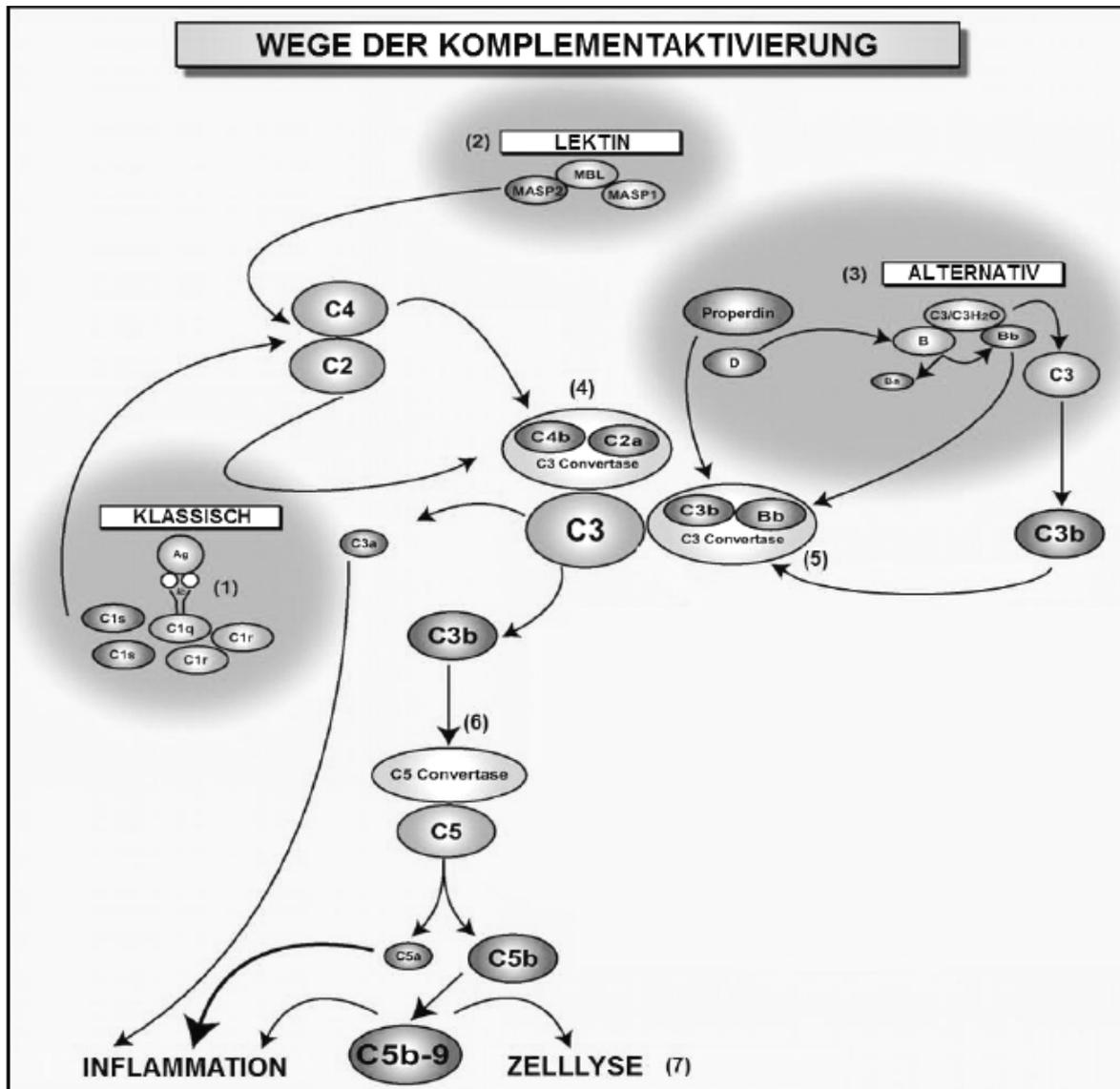


Abbildung 5: Komplementaktivierung (modifiziert nach Markiewski und Lambris 2007)
 1: klassischer Weg, 2: Lektin-Weg, 3: alternativer Weg, 4: Bildung der C3-Konvertase des klassischen und des Lektin-Weges, 5: Bildung der C3-Konvertase des alternativen Weges, 6: Bildung der C5-Konvertase, 7: Zellyse durch Bildung des MAC C5b-9. Ag: Antigen, MASP: MBL-assoziierte Serinprotease, MBL: Mannose-Bindungslektin, D: Faktor D, B: Faktor B, Ba und Bb: Spaltprodukte von Faktor B.

Das Komplementsystem verbindet das angeborene und erworbene Immunsystem durch Opsonierung eindringender Mikroorganismen, Verstärkung der Antikörperwirkung, Lyse fremdartiger Zellen, Beseitigung apoptotischer Zellen und Stimulation der Chemotaxis. Eine

systemische Inflammation wie die Sepsis/SIRS geht mit einer exzessiven Aktivierung des Komplementsystems einher [De Jong et al. 2010]. Die wesentliche biologische Wirkung des Komplementsystems beruht auf der Opsonierung von Mikroorganismen vermittelt durch die Spaltprodukte von C3 und C4, der Rekrutierung und Aktivierung inflammatorischer Abwehrzellen durch die proteolytisch freigesetzten Anaphylatoxine C3a und C5a, der direkten Elimination von Mikroorganismen mittels Phagozytose über Komplementrezeptoren und Zellyse als Resultat der Formation des Membranangriffskomplexes C5b-9 (*membrane attack complex*, MAC), sowie der Anpassung der erworbenen Immunität durch die Stimulation von B-Zellen und T-Zellen [Oikonomopoulou et al. 2012].

2.1.4.3.1 Aktivierung und Regulation des Komplementsystems

Die Komplementaktivierung läuft über die Aktivierung der C3 Komponente, gefolgt von der Aktivierung der Angriffssequenz in zwei Phasen ab. Der entscheidende Schritt ist die Spaltung von C3 durch das komplementassoziierte Enzym C3-Konvertase. Dadurch entsteht das Hauptfragment C3b, welches sich an Immunkomplexe anheftet und deren Adhärenz an Rezeptoren von phagozytierenden Zellen fördert und somit den biologischen Effekt der Komplementaktivierung verstärkt [Haeney 1998].

2.1.4.3.1.1 Klassischer-Weg

Die erste Komponente in der Sequenz des klassischen Weges ist C1, ein durch Kalziumionen zusammengehaltener Makromolekülkomplex aus den drei Untereinheiten C1q, C1r und C1s. C1 wird durch Antigen-Antikörperkomplexe der Immunglobulinklassen IgG und IgM aktiviert. Die Reaktion von IgM oder IgG mit ihren Antigenen bewirkt eine Konformationsänderung der Fc Region, wodurch die Bindungsstelle für C1q freigelegt wird. Dies führt zu einer Aktivierung der Untereinheiten C1r und C1s (C1-Esterase). Die nun generierte Enzymaktivität für die Komplementproteine C4 und C2 spaltet diese in zwei Fragmente. C2 bindet an C4b und formiert die Prokonvertase, welche durch die Spaltung von C2 durch C1s aktiviert wird. C2a beinhaltet die proteolytische Stelle der C3 Konvertase (C4b2a) des klassischen Weges. C4b2a ist ein instabiles Enzym mit einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden. Die C3 Konvertase spaltet C3 in C3a und C3b, es entsteht die C5-Konvertase (C4b2a3b), welche die Bildung des Membranangriffskomplexes einleitet [Haeney 1998].

Der klassische Weg wird durch mehrere Mechanismen kontrolliert. Einige aktivierte Komplementkomponenten sind von Natur aus instabil. Wenn das nächste Protein der Kaskade nicht unmittelbar verfügbar ist, verfällt das aktivierte Protein. Bestimmte Proteine der Zellmembran, wie zum Beispiel DAF (*decay accelerating factor*), ein Glykoprotein auf humanen Erythrozyten, destabilisieren C4b2a [Haeney 1998].

Die wesentliche Kontrolle erfolgt durch den C1-Esterase-Inhibitor. Während der Komplexformierung dissoziiert C1-INH die Komponenten C1r und C1s von dem aktivierten C1 Makromolekül. Eine spontane Aktivierung von C1 wird durch C1-INH über eine reversible Interaktion mit den Zymogenen C1r und C1s unterdrückt. C1-INH ist der einzige Plasmaproteaseinhibitor, welcher die Aktivierung des klassischen Komplementweges reguliert [Davis et al. 2008].

2.1.4.3.1.2

Lektin-Weg

Der Lektin-Weg wird durch die Bindung des Mannosebindungslektin (MBL) an endständige Zuckergruppen, wie Mannose, Fucose oder N-Acetylglucosamin auf Mikroorganismen initiiert. MBL aktiviert konsekutiv durch Bildung eines Multienzymkomplexes mit der Mannose-Bindungslektin assoziierten Serinproteasen (MASP) die Proteine des Komplementsystems in der selben Kaskade wie im klassischen Weg [Walport 2001b]. C1-Esterase-Inhibitor reguliert die Aktivierung des Lektin-Weges durch die Inaktivierung von MASP2. Das α 2-Makroglobulin ist ebenfalls in der Lage MASP2 zu inaktivieren [Davis et al. 2008].

2.1.4.3.1.3

Alternativer Weg

Die zentrale Reaktion des alternativen Weges ist die antikörperunabhängige Bildung einer C3-Konvertase. Die unmittelbare Abwehr von eindringenden Mikroorganismen unter Abwesenheit spezifischer Antikörper hängt entscheidend von dem alternativen Weg des Komplementsystems ab. Praktisch fortwährend liegt im Serum aktiviertes C3 (C3(H₂O)) vor, welches durch spontane Hydrolyse von C3 entsteht [Walport 2001a]. Dieses C3(H₂O) hat C3b ähnliche Eigenschaften und bindet an Faktor B, welcher wiederum durch Faktor D gespalten wird. Faktor D zirkuliert im Plasma in aktivierter Form, kann jedoch nur auf C3b gebundenen Faktor B wirken. Somit ist die Aktivität von Faktor D strikt von der Verfügbarkeit von C3b abhängig. Die Interaktion des Faktors D mit Faktor B produziert eine

instabile C3-Konvertase C3(H₂O)Bb. Nachfolgende kommt es zu einer Spaltung von C3 in C3a und C3b. Es formiert sich eine authentische C3-Konvertase (C3bBb). Diese wird durch Bindung des Faktors P stabilisiert. Die stabile und effektive C3-Konvertase (C3bBbP) spaltet nun explosionsartig C3. Schließlich kommt es zur Bildung der C5-Konvertase C3bBbC3b durch Anlagerung eines weiteren C3b-Moleküls an die C3-Konvertase. Die Komplementkomponente C5 wird zu C5b und dem starken Anaphylatoxin C5a gespalten. C5b lagert sich an die Membranoberfläche an und initiiert die Bildung des Membranangriffskomplexes. C3b hat als Produkt der enzymatischen Aktivierung der C3-Konvertase selbst die Eigenschaft die C3-Konvertase des alternativen Weges zu regulieren. Dies etabliert eine kontinuierlich zirkulierende positive Rückkopplung. Ohne jegliche Kontrolle würde C3 bis zum völligen Verbrauch gespalten werden. Obwohl der alternative Weg unter Abwesenheit von Antikörpern aktiviert wird, verstärkt der IgG Antikörper die Aktivierung durch eine Förderung der Bindung von C3b und Faktor B auf die Oberfläche der zu aktivierenden Proteine. C3b ist durch die Antikörperbindung resistent für den regulatorischen Effekt der Faktoren H und I.

Die Kontrollproteine des alternativen Weges sind Faktor H und Faktor I. In Anwesenheit von Faktor H katalysiert die Serinprotease Faktor I die Spaltung der α -Kette von C3b und C4b. Dies führt zu einer dauerhaften Inaktivierung [Haeney 1998]. Der C1-Esterase-Inhibitor ist ebenfalls in der Lage durch einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus die Aktivierung des alternativen Weges zu unterdrücken. Eine Elimination von C1-INH aus dem Blutplasma führt zu einer deutlich verstärkten Aktivierung des alternativen Weges. Der Mechanismus scheint durch eine Hemmung der Bindung von Faktor B an C3b durch Interaktion von C3b mit C1-INH bedingt zu sein. Die Bindung von C3b an C1-INH ist jedoch nicht von der Aktivität der Proteaseinhibition abhängig [Jiang et al. 2001].

Die nachfolgende Abbildung fasst die löslichen und membrangebundenen Regulatoren und die verschiedenen Angriffsebenen des C1-INH im Komplementsystems zusammen.

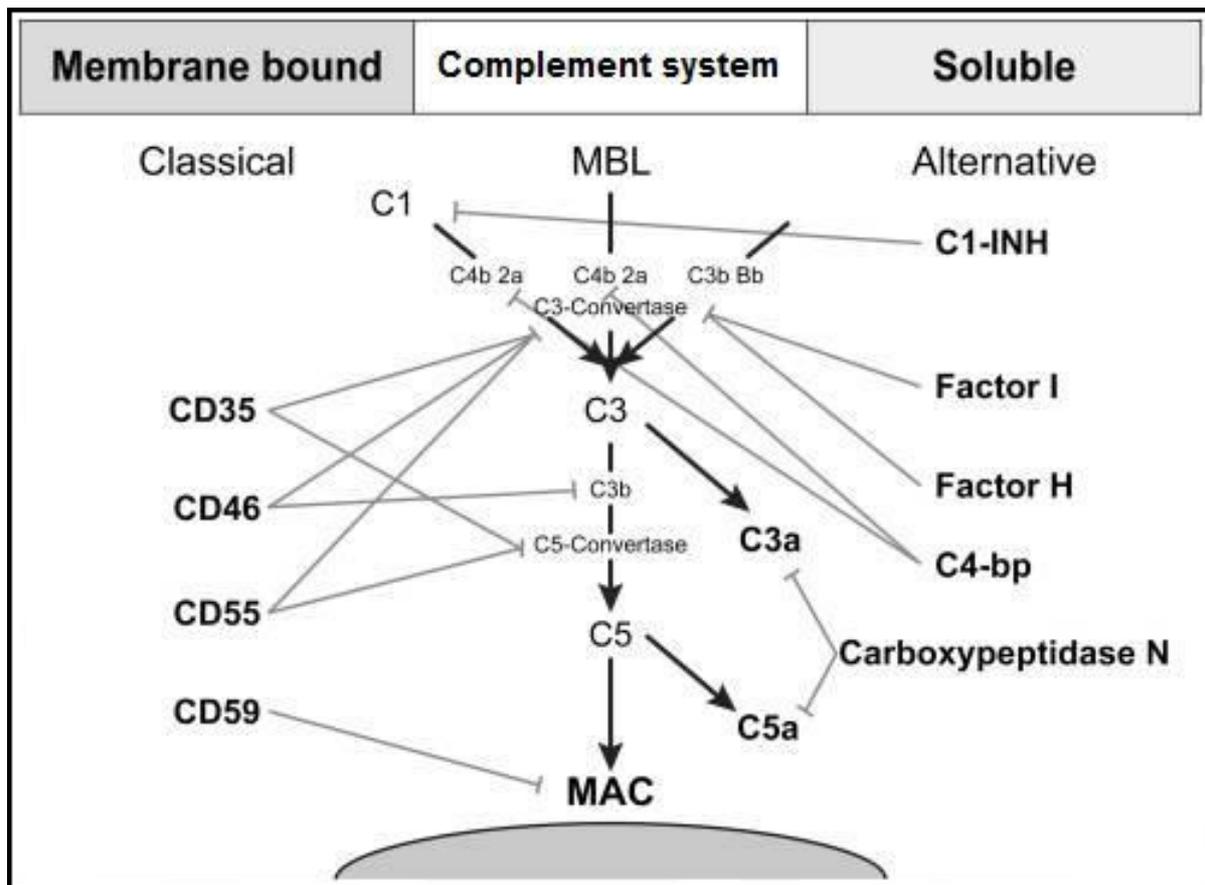


Abbildung 6: Membrangebundene und lösliche Komplementregulatoren und die verschiedenen Angriffsebenen von C1-INH (modifiziert nach Ehrnthaller et al. 2011)

CD35 (*complement receptor 1 (CR1)*): fördert den Zerfall der C3/C5 Konvertase u. Kofaktor für factor I; CD46 (*membrane cofactor protein (MCP)*): Kofaktor für Faktor I; CD55 (*decay accelerating factor (DAF)*): Spaltung von C4b2a; CD59 (Protectin): Inhibition der Interaktion der C8 α -Unterkette and C9; C4-bp: hemmt die proteolytische Spaltung der α -Kette von C4b durch Faktor I in einem Komplex mit Protein S; Carboxypeptidase N: inaktiviert Anaphylatoxin.

2.1.4.3.2

Membranangriffskomplex

Der Endpunkt der Komplementkaskade ist der Membranangriffskomplex (syn. terminaler Komplementkomplex (TCC)). Das an die Zielzelle gebundene C5b verbindet sich mit C6 zu einem hydrophilen Komplex. Durch die Anlagerung von C7 kommt es zu einer Konformationsänderung mit dem Resultat einer stabilen Verbindung. Die nachfolgende Anheftung von C8 mit der Bindekomponente C8b induziert die Penetration von C8a-g in die Membran der Lipiddoppelschicht der Zielzelle. Der finale Schritt der Bildung einer stabilen

transmembranösen Pore mit einem Durchmesser von 10 Angström ist die Bindung von 10-15 C9 Proteinen, welche abschließend eine zylindrische Struktur bilden. Der MAC führt durch einen Fluss von Ionen, kleinen Molekülen und Wasser entlang des Konzentrationsgradienten zu einem osmotischen Ungleichgewicht. Daraus resultiert die osmotische Lyse der Zielzelle [Dalmaso et al. 1989].

2.1.4.3.3 Anaphylatoxine

Die Anaphylatoxine C3a und C5a sind sehr potente inflammatorische Mediatoren mit einem weiten biologischen Spektrum. C3a und C5a induzieren eine Chemotaxis und Extravasation von Leukozyten, eine Vasodilatation, eine erhöhte Gefäßpermeabilität in der Mikrozirkulation und eine Kontraktion glatter Muskelzellen. In Makrophagen, PMN's und eosinophilen Granulozyten triggern C3a und C5a den „respiratory burst“. Basophile und eosinophile Granulozyten reagieren auf eine Stimulation mit den Anaphylotoxinen mit einer Histaminfreisetzung. Bei eosinophilen Granulozyten regulieren C3a und C5a die Produktion des eosinophilen kationischen Proteins, ihre Adhäsion an Endothelzellen, sowie die Migration. C3a fördert die Synthese von IL-6 und TNF- α durch B-Zellen und Monozyten. C5a ist ein starkes Chemoattraktant für Makrophagen, PMNs, aktivierte B-Zellen und T-Zellen, basophile Granulozyten und Mastzellen. Des weiteren fördern die Anaphylatoxine die Adhäsion und Transmigration von PMN's [Klos et al. 2009].

In der Sepsis kommt es zu einer exzessiven Bildung von C5a. Aktiviertes C5a kann zu einer Immunparalyse, Multiorgandysfunktion und Beeinträchtigung der Gerinnung führen. Auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass C5a effektiv mit Zellen interagiert und ihre Apoptoserate moduliert. Interessanterweise sind die Effekte auf den programmierten Zelltod abhängig von der Zellart. So zeigen Thymozyten und Nebennierenzellen unter dem Einfluss von C5a eine gesteigerte Apoptoserate, wohingegen C5a bei neutrophile Granulozyten die Apoptose deutlich verringert. [Ehrnthaller et al. 2011].

C5a hat des weiteren die Eigenschaft eine Genexpression und Synthese von TNF- α und IL1 β bei Monozyten und Makrophagen zu bewirken. Diese Zytokine spielen bei der systemischen Inflammation durch ihre Eigenschaft das Endothel und die Leukozyten zu aktivieren eine bedeutende Rolle. Die wechselseitige Interaktion zwischen dem Komplementsystem und den Zytokinen begünstigt eine überschießende und anhaltende Inflammation. [Markiewski et al. 2007]. Bei einer adäquaten Immunantwort mit niedrigen und lokal begrenzten Konzentrationen von Anaphylatoxinen sind diese durch eine Regulierung der Abtötung von Mikroorganismen protektiv. Bei exzessiver Produktion der Anaphylatoxine im Rahmen einer

überschießenden Immunantwort kann C5a zu einer Immunparalyse der PMN`s führen. Dies schützt vor einer Aktivierung von MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinases* (MAPKs)), welche für die Chemotaxis, Phagozytose und den „respiratory burst“ notwendig sind. Die in dieser Weise getriggerte Immunparalyse führt zu einem Verlust der angeborenen Immunantwort mit fatalem Ausgang für den Organismus. [Ward 2009].

Die Anaphylatoxine binden an drei Rezeptoren, welche der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G-protein-coupled receptors* (GPCR)) zuzuordnen ist. Dazu gehören der C3a Rezeptor (C3aR), der C5a Rezeptor (C5aR) und der C5a Rezeptor-like2 (C5L2). Die Rezeptoren können auf zahlreichen leukozytären Zellen nachgewiesen werden. Die biologische Wirkung der Anaphylatoxine wird zum Großteil über diese Rezeptoren vermittelt. Zahlreiche Zytokine fördern die Expression der Anaphylatoxin-Rezeptoren [Klos et al. 2009]. Die nachfolgende Abbildung veranschaulicht die vielseitigen Einflüsse der Anaphylatoxine auf die Inflammation.

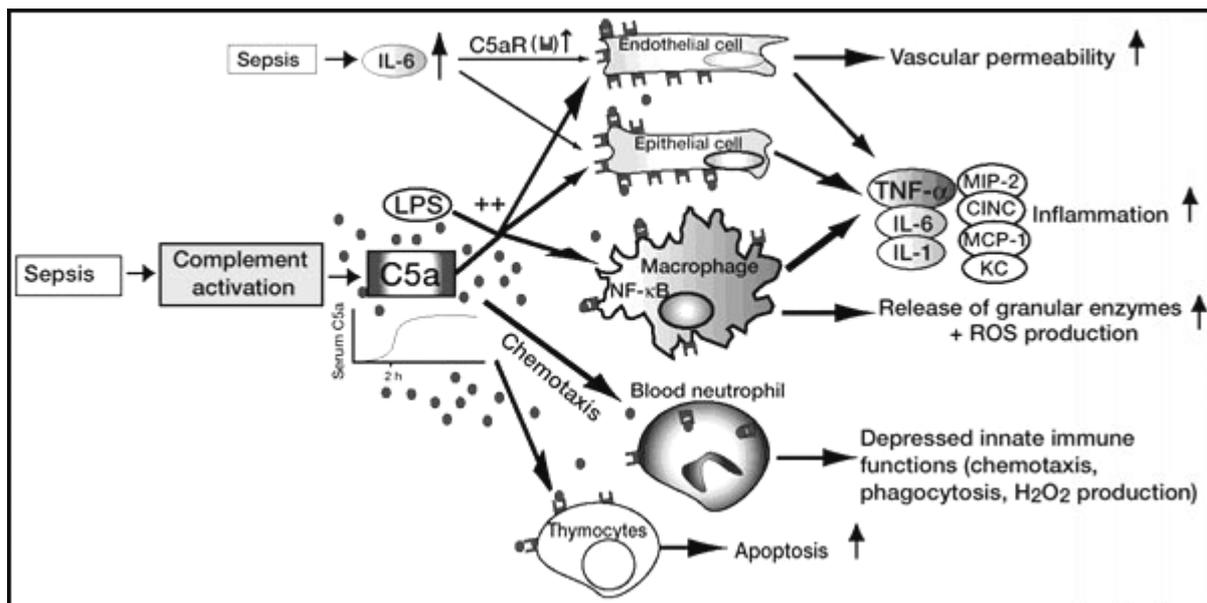


Abbildung 7: Einfluss der Anaphylatoxine auf die Inflammation (modifiziert nach Riedemann et al. 2003)

2.1.4.3.4 Komplement und systemische Inflammation

Die aktivierten Komplementkomponenten des Plasmas und des interstitiellen Raumes sind an nahezu allen Phasen der Regulation einer akuten inflammatorischen Antwort beteiligt. Dies beinhaltet Veränderungen des Blutflusses, der Vasomotorik und des Gefäßdurchmessers, einer erhöhten vaskulären Permeabilität, Chemotaxis und Extravasation von Leukozyten.

[Ehrnthaller et al. 2011]. Die Komplementaktivierung führt zu einer Freisetzung weiterer inflammatorischer Mediatoren wie TNF- α und IL1 β . Dies führt zu einer Synthese von endothelialen Adhäsionsmolekülen, Wachstumsfaktoren, Eicosanoide, Stickoxyden, proteolytischen Enzymen, weiterer Zytokin- und Chemokinproduktion, sowie zu einer Synthese von Enzymen die mit dem Matrix-Remodelling assoziiert sind. Es kommt zu einer erhöhten Thrombogenität auf den Endothelzellen, sowie zu einer Aggregation und Aktivierung von PMN's, was zu einer Sensibilisierung gegenüber weiteren proinflammatorischen Mediatoren führt. Diese Mechanismen münden letztendlich in einem Gewebeschaden [Fischer et al. 1999]. Geschädigte Zellen setzen eine Vielzahl konstitutiver Proteine frei. Dazu gehören Hitzeschockproteine, der Transkriptionsfaktor HMGB1 und mitochondriale Peptide, welche die für Prokaryonten charakteristische N-Formylgruppe tragen. Hitzeschockproteine können das Komplementsystem sowohl abhängig, als auch unabhängig von Antikörpern aktivieren, so dass auch bei einem aseptischen Gewebeschaden die Komplementkaskade in Gang gesetzt werden kann. Ein inflammatorischer Gewebeschaden verstärkt letztendlich deutlich die Immunantwort und kann in einen circulus vitiosus münden. Die Anaphylotoxine scheinen eine kausale Rolle in der Pathogenese der Sepsis zu spielen [Markiewski et al. 2007].

2.1.4.3.5 Komplementprodukte, Mikrozirkulation und Leukozyteninteraktion

Die Komplementsystem getriggerte Freisetzung von vasoaktiven Substanzen aus Mastzellen und PMN's, wie zum Beispiel Histamin, Prostaglandine, Kinine und Serotonin, bewirken eine Vasodilatation und Veränderung des Blutflusses. Der Endothelzellschaden führt zu einer erhöhten Permeabilität der Endothelbarriere durch strukturelle und funktionelle Veränderungen. Es entstehen Lücken im Endothelverband der Venolen, eine Reorganisation des endothelialen Zytoskelettes, erhöhte Transzytose entlang des endothelialen Zytoplasmas, und ein Leukozyten vermittelter Endothelzellschaden. Die vaskulären Veränderungen fördern die Ausbildung und Akkumulation eines inflammatorischen Exsudates im Bereich der Entzündung mit Mediatoren und Leukozyten [Bacon 2005].

Die Bildung und Freisetzung der Mediatoren die zu dieser Endothelalteration führen werden teilweise durch die Anaphylotoxine reguliert. Eine erhöhte Gefäßpermeabilität und verlangsamter Blutfluss ermöglichen die Extravasation der Leukozyten in den interstitiellen Raum. Entscheidend dafür ist die Hochregulierung endothelial und leukozytär exprimierter Adhäsionsmoleküle, welche eine Interaktion zwischen diesen Zellen ermöglicht. Dies bewirkt

das „Rollen“, die Adhäsion und letztendlich die Transmigration der Leukozyten durch die Zellbarriere. Albrecht et al. konnte mittels C5a stimulierten Endothelzellen aus der humanen Nabelvene eine Hochregulierung der Gene für E-selectin, intracelluläres Adhäsionsmolekül-1 und IL-6 nachweisen. C5a ist ein Aktivator der Adhäsion und Transmigration neutrophiler Granulozyten [Albrecht 2004].

Die Transmigration wird durch chemotaktische Mediatoren entlang ihres Konzentrationsgefälles gesteuert. Die Anaphylatoxine sind etablierte chemotaktische Faktoren, die eine Leukozytenmigration über die korrespondierenden Rezeptoren der inflammatorischen Zellen direkt vermitteln. Eine weitere Eigenschaft der Anaphylatoxine ist es die Produktion anderer chemotaktischen Substanzen wie Eicosanoide und Chemokine herbeizuführen. C5a und C3a stimulieren die Produktion der Chemokine Monocyte-Chemoattractant-Protein-1, Macrophagen-Inflammatory-Protein 2, RANTES und IL-8. Auf Endothelzellen angelagertes C3b agiert als Ligand für das Adhäsionsmolekül Integrin CD11b/CD18. Der terminale Komplementkomplex aktiviert den endothelialen Transkriptionsfaktor NF- κ B. Dadurch wird die Transkription von Adhäsionsmolekülen wie vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), sowie E- und P-Selectinen gesteigert. Der terminale Komplementkomplex stimuliert auch die Aktivierung von Thrombozyten und bewirkt eine Thrombozyten-Leukozyten Agglomeration. Des weiteren beeinflusst der terminale Komplementkomplex den Gefäßtonus durch eine Hemmung der Freisetzung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) [Markiewski et al. 2007].

Apoptotische und nekrotische Zellen sind bekannte Aktivatoren des Komplementsystems und einige Komplementkomponenten fördern die Clearance des abgestorbenen Zellmaterials durch Phagozytose. Komplement spielt auch bei der Aufrechterhaltung der Löslichkeit und des Abbaues zirkulierender Immunkomplexe eine Rolle. Dadurch wird die Ablagerung von Antigen-Antikörperkomplexen im Gewebe verhindert [Walport 2004b].

In vielen klinischen Konditionen mündet die Komplementaktivierung bei fehlender Kontrolle einer inflammatorischen Antwort in eine für den Organismus gefährliche Gewebeschädigung. Dies stellt einen interessanten Ansatz der Immunmodulation bei der systemischen Inflammation durch therapeutische Beeinflussung des Komplementsystems dar [Markiewski et al. 2007].

Traditionell werden das Komplementsystem und das Gerinnungssystem als separate proteolytische Kaskadensysteme beschrieben. Die Systeme stehen jedoch in wechselseitiger Beziehung, die ein komplexes Netzwerk mit gemeinsamen strukturellen Charakteristika und ähnlichen Aktivierungsstimuli bilden [Rittirsch et al. 2009].

Beide Systeme dienen der angeborenen Immunität. Die Anwesenheit von fremden oder alterierten Zelloberflächen ist notwendig um das Kaskadensystem zu initiieren. Die wichtigste Verbindung zwischen dem Komplement- und dem Gerinnungssystem ist die Interaktion der Komponenten beider Systeme. Die Proteinasen des Gerinnungssystems sind potente Aktivatoren der Komplementkaskade. [Oikonomopoulou et al. 2012].

Das aktivierte Gerinnungssystem prädisponiert bei der Sepsis zu Thrombosen und disseminierter intravasaler Gerinnung (*disseminated intravascular coagulation (DIC)*), was wiederum eine exzessive inflammatorische Antwort und Komplementaktivierung verstärkt [Esmon 2004].

Der Gerinnungsfaktor XIIIa ist in der Lage die Komplementkomponente C1 des klassischen Weges zu aktivieren. Thrombin fungiert als C3 unabhängige C5-Konvertase. Dies zeigt, dass C5a und der Membranangriffskomplex unabhängig von der vorgeschalteten Komplementkaskade gebildet werden können. Genauso wie Thrombin können Kallikrein und Plasmin die Komplementkomponente C3 unmittelbar spalten. Das Komplementsystem verstärkt die Gerinnungsaktivität durch eine Modifikation der Phospholipidmembran, durch eine Aktivierung der Thrombozyten und durch eine Induktion der Expression des Gewebefaktors (tissue factor (TF)) und des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (plasminogen-activator inhibitor (PAI)) durch Leukozyten. Die Protease MASP2 des Lektin-Weges kann die Gerinnung durch eine Spaltung von Prothrombin zu aktivem Thrombin aktivieren. Darüber hinaus kann das Komplementsystem das Gerinnungssystem durch proinflammatorische Mediatoren wie TNF, IL-6 und HMGB1 beeinflussen. In einer indirekten negativen Rückkopplung inaktiviert der Thrombin-aktivierte-Fibrinolyse-Inhibitor TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) die Komplementkomponenten C3a und C5a [Rittirsch et al. 2009].

Das Komplement-, Gerinnungs- und Fibrinolyse-System sind durch direkte Interaktionen der Serinproteasen eng miteinander verbunden. Im Rahmen einer systemischen Inflammation ist diese Interaktion von besonderer Bedeutung, da eine unkontrollierte Aktivierung ein wichtiger Bestandteil in der Pathogenese der Sepsis ist [Oikonomopoulou et al. 2012].

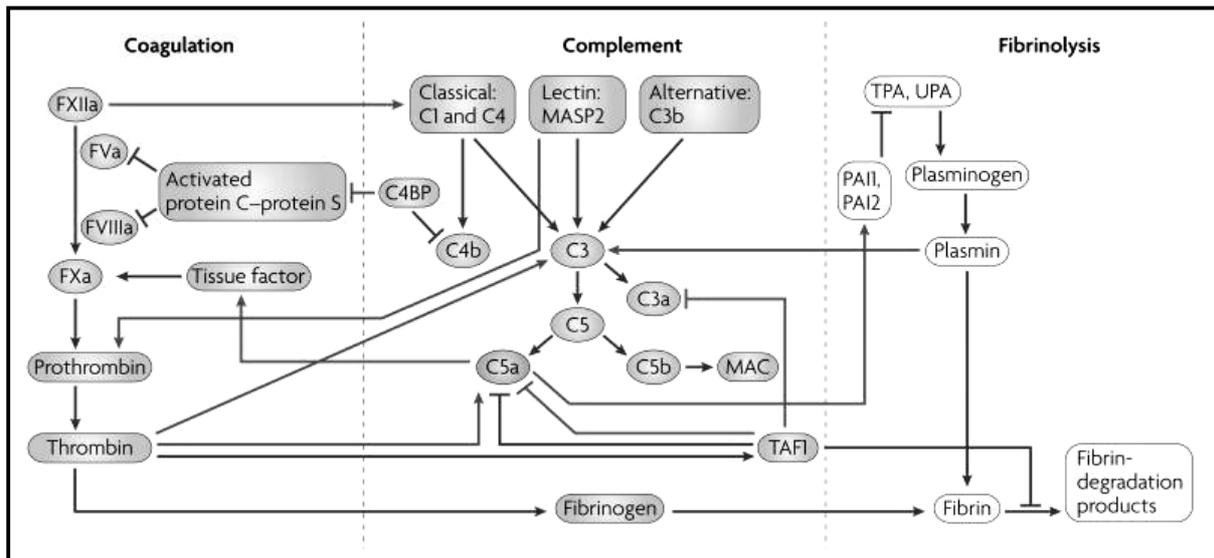


Abbildung 8: Bidirektionale Interaktion zwischen Komplement-, Gerinnungs- und Fibrinolyse-System (modifiziert nach Rittirsch et al. 2008)

2.1.4.4 Hämostasesystem

Die Bildung von Thromben und deren Auflösung kommt durch eine komplexe Interaktion zwischen der Gefäßwand und den zellulären, sowie löslichen Gerinnungs- und Fibrinolysefaktoren des Blutes zustande. Das Hämostase- und Fibrinolyse-System sind an der Aufrechterhaltung der Fließeigenschaften des Blutes und der Integrität der Endothelzellbarriere beteiligt. Die Produkte des aktivierten Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systems spielen in der Genese und Unterhaltung von Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle [Matthias 1987].

2.1.4.4.1 Plasmatisches Gerinnungssystem

Die Blutgerinnung ist das Ergebnis der Aktivierung von zwei verschiedenen Systemen, der kontaktabhängigen intrinsischen und der Gewebefaktor abhängigen extrinsischen Gerinnungskaskade. Das extrinsische System wird nach Freisetzung des TF durch Gewebeverletzung und Komplexbildung mit Faktor VII zu TF/VIIa initiiert. Es resultiert die proteolytische Spaltung des Faktor X zu aktiviertem Faktor Xa [Matthias 1987].

Das intrinsische System wird durch Kontakt von Faktor XII mit negativ geladenen anionischen Oberflächen wie Phospholipide und Glykosaminoglykane aktiviert. Dies führt zu

einer Prekallikreinaktivierung und proteolytischen Spaltung durch FXIIa in Kallikrein, welches wiederum Faktor XII im Vergleich zu der Autoaktivierung eintausendfach schneller aktiviert. Darüber hinaus wird die Aktivierung und Amplifikation dieses Systems durch den Kofaktor HMWK (*high molecular weight kininogen*) forciert. Die Kontaktaktivierung bewirkt neben der intrinsischen Gerinnungsaktivierung eine Komplementaktivierung, Bradykininfreisetzung, Fibrinolyse und Granulozytenaktivierung. Eine akute Inflammation führt zu einer systemischen Aktivierung des Gerinnungssystems [Schmaier et al. 1999].

Zwischen dem extrinsischen und intrinsischen System sind zahlreiche Querverbindungen bekannt. So kann zum Beispiel der Komplex TF/VIIa auch durch den Faktor IX aktiviert werden und der Faktor VII durch die Faktoren Xa, XIa, XIIa und Thrombin. Die Abbildung 9 fasst die einzelnen Bestandteile der Gerinnungskaskaden zusammen.

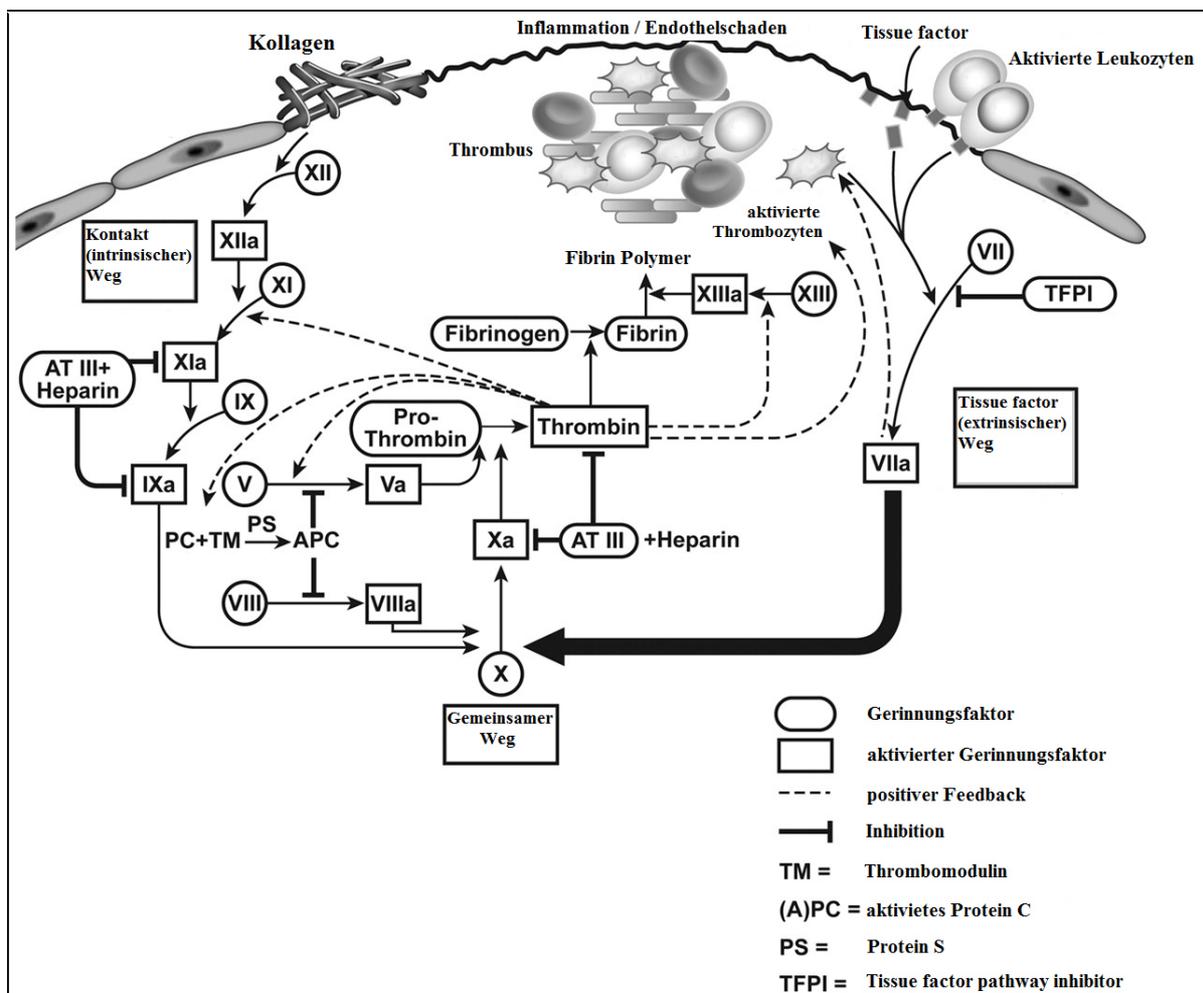


Abbildung 9: Gerinnungssystem

Beide Systeme münden in der Freisetzung von aktiviertem Faktor X, was letztendlich zu einer proteolytische Aktivierung und Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin führt. Dies wandelt Fibrinogen in Fibrin um und es resultiert die Formation eines Fibrin vernetzten Gerinnsels. Viele der Komponenten des Gerinnungs- und Fibrinolysesystems dienen als Ligand um pro- und antiinflammatorische Eigenschaften auf Zellen über G-Proteingekoppelte Rezeptore und Proteinase-aktivierte-Rezeptoren (proteinase-activated receptors (PARs)) zu vermitteln. So aktiviert beispielsweise Thrombin PAR1 mit nachfolgender Induktion einer Inflammation. Plasmin kann eine chemotaktische Antwort von Monozyten und Makrophagen triggern [Oikonomopoulou et al. 2012].

2.1.4.4.2 Fibrinolysesystem

Der Gerinnung wirkt die Fibrinolyse mit verschiedenen Enzymkaskaden entgegen. Die zentrale Schlüsselkomponente des Fibrinolysesystems ist das Plasminogen, das Zymogen der Serinprotease Plasmin. Das Plasmin wird durch zwei weitere Serinproteasen, dem Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tissue plasminogen activator (tPA)) und dem Urokinase-Plasminogen-Aktivator (urokinase plasminogen activator (uPA)) generiert. Das Gerinnungs- und Fibrinolysesystem kann als Bindeglied zwischen mechanischer Information (Fibrinablagerung, Blutgerinnsel) eines Gewebeschadens und biochemischer Signalweiterleitung mit Triggerung der Immunantwort angesehen werden. [Oikonomopoulou et al. 2012].

2.1.4.4.3 Regulation des Gerinnungs- und Fibrinolysesystems

Das Gerinnungssystem wird durch die drei antikoagulatorischen Hauptproteine TF pathway inhibitor (TFPI), Antithrombin and aktiviertes Protein C (APC) reguliert. Der TFPI ist eine von Endothelzelle gebildeter Proteaseinhibitor, welcher Faktor VIIa durch die Bindung an TF inhibiert. Antithrombin hemmt den Faktor Xa, Thrombin und Faktor IXa, sowie an TF gebundenen Faktor VIIa. Protein C wird durch die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin zu APC aktiviert. Aktiviertes Protein C komplexiert mit dem Kofaktor Protein S und inaktiviert die Faktoren Va und VIIIa. Damit schützt APC vor der prokoagulatorische Aktivität der Faktoren Xa und IXa. Das Fibrinolysesystem wird durch die Hemmung von Plasminogen durch den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) reguliert. Bei systemischer Inflammation ist die Fibrinolyse gesteigert. Erhöhte PAI-1 Spiegel gehen

bei der Sepsis mit einer schlechten Prognose einher. [De Jong 2010] C1-INH reguliert neben dem Komplementsystem auch die Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems durch die Inhibition des Plasminogenaktivators Kallikrein und der Gerinnungsfaktoren XIa und XIIa. Bei der Kontrolle des Fibrinolyse-Systems spielt C1-INH durch eine Hemmung des PAI unter physiologischen Bedingungen eine untergeordnete Rolle. Bei hoher Konzentration zirkulierendem tPA Spiegel wurde jedoch eine erhöhte t-PA-C1-INH-Komplexbildung beschrieben [Caliezi et al. 2000].

2.1.4.4.4 Plasmatische Gerinnung und Inflammation

Eine systemische Inflammation führt immer zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems und einer Hemmung der antikoagulatorischen Mechanismen und der Fibrinolyse. Die Komponenten des Gerinnungssystems können ihrerseits Einfluss auf die Inflammation nehmen und eine überschießende Immunantwort begünstigen [Schouten et al. 2008]. Eine massive Aktivierung der Gerinnungskaskade in der Sepsis kann zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) führen. In der initialen Phase kommt es durch die Thrombinaktivierung zu einer Hyperkoagulabilität mit intra- und extravasalen Fibrinablagerung, gefolgt von einer Hypokoagulabilität durch den Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und einer Dysfunktion der Thrombozyten. In der Spätphase der DIC führt die mikrovaskuläre Fibrinablagerung zu einer Mikrozirkulationsstörung mit konsekutivem multiplen Organversagen [Abraham 2000].

Thrombin, Protein C, TF, Aktivatoren und Inhibitoren der Fibrinolyse, protease-activated-receptors (PARs) und die Endothelaktivierung spielen bei der bidirektionalen Interaktion von Gerinnung und Inflammation eine wesentliche Rolle [Schouten et al. 2008]. Thrombin induziert die Produktion von Monocyte-chemotactic protein-1 (MCP-1), IL-6 und IL-8 durch Epithelzellen, Fibroblasten und mononukleären Zellen. Des Weiteren induziert Thrombin die Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und das Anaphylatoxin C5a [Johnson 1998].

Aktiviertes Protein C hat durch die Inhibition der monozytären Expression von TF und TNF- α , der NF- κ B-Translokation und der TNF- α induzierte Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen antiinflammatorische Eigenschaften. Durch Verbrauch, proteolytischen Abbau und zytokininduzierter Herunterregulierung von Thrombomodulin kann ein niedriger APC-Plasmalevel somit indirekt pro-inflammatorisch wirken [Schouten et al. 2008].

TF fördert die Inflammation durch eine verstärkte intravaskuläre Fibrinablagerung, eine erhöhte Bildung von proinflammatorischen Fibrinfragmenten und durch die Bildung von FVIIa, FXa und Thrombin, was eine Aktivierung der protease-activated-receptors (PARs) zur Folge hat [Mackman 2009].

Der Rezeptor des Urokinase Plasminogen Aktivators (uPAR) vermittelt eine Leukozytenadhäsion an die Gefäßwand/extrazelluläre Matrixkomponenten und erhöht das migratorische Potential, sowie die Gewebeinvasion [Schouten et al. 2008].

Der wichtigste Mechanismus durch den Gerinnungskomponenten die Inflammation beeinflussen, ist ihre Bindung an protease-activated-receptors (PAR`s). Es wurden 4 Typen (PAR1-4) identifiziert, welche auf Endothelzellen, mononukleären Zellen, Thrombozyten und glatten Muskelzellen lokalisiert sind. Eine besondere Eigenschaft der PAR`s ist, dass sie nach Spaltung durch einen aktivierten Gerinnungsfaktor als eigener Ligand dienen. PAR 1, 3 und 4 sind Thrombinrezeptoren, PAR-2 wird durch den TF/VIIa-Komplex, FXa und Trypsin aktiviert. Die PAR`s induzieren die Produktion zahlreicher proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-1, TNF- α) und führen zu einer Aktivierung von Makrophagen mit nachfolgender Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und Expression von Adhäsionsmolekülen [Levi et al. 2008].

2.1.4.4.5 Hämostasekontrolle durch das Endothel und Inflammation

Eine effektive Immunantwort, deren Bestandteil auch die Gerinnungskaskade ist, hängt nicht nur von der dazugehörigen Aktivierung, Regulation und Funktion der Abwehrzellen, sondern auch von der Verteilung und dem Rückhalt der Mediatoren und Effektorzellen in der Mikroumgebung des Gewebes und der Interaktion der verschiedenen Zelltypen ab. Diese Aktivitäten werden durch die Endothelzelle durch die Gestaltung eines speziellen mikrozirkulatorischen Netzwerkes vermittelt. Die Endothelzellen sind hierbei in die Gerinnung, Inflammation, angeborene und erworbene Immunität und Angiogenese stark vernetzt [Danese et al. 2007]. Folgende Abbildung illustriert die komplexe Interaktion der mikrovaskulären Endothelzelle

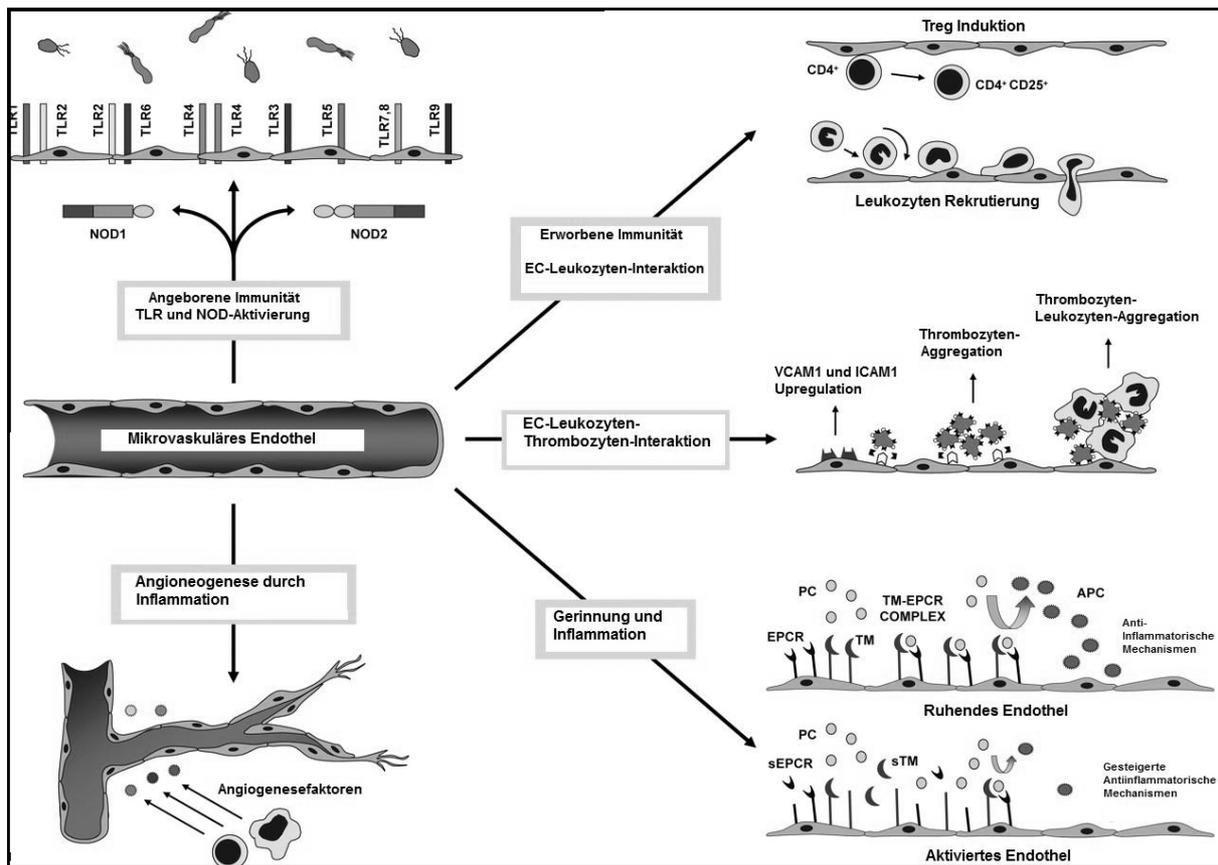


Abbildung 10: Interaktion der Endothelzelle mit der Gerinnung, Inflammation, angeborenen und erworbenen Immunität (modifiziert nach Danese et al. 2007)

Die Endothelzellen spielen in physiologischen Prozessen wie der Blutzufuhr, Nährstoffversorgung, metabolischer Hämostase und Lenkung der Immunzellen, sowie pathologischen Prozessen wie der Inflammation eine Schlüsselrolle. Die Inflammation kann als vaskuläre Antwort auf eine Endothelzellaktivierung mit erhöhter Permeabilität, Leukozytenadhäsion und prokoagulatorischer Aktivität angesehen werden. Unter physiologischen Bedingungen präsentiert die Endothelzelle eine antithrombotische und antiinflammatorische Oberfläche [Danese et al. 2008]. Diese Eigenschaft beruht auf einer aktiven Regulation pro- und antikoagulatorischer Mechanismen, insbesondere durch das antikoagulatorische Protein-C-System. Dieses besteht aus dem auf Endothelzellen exprimierten Thrombomodulin, dem endothelialen Protein-C-Rezeptor (EPCR) und dem systemisch zirkulierenden Protein C. Im Rahmen einer systemischen Inflammation ist der aktive TM/ERCR/PC-Komplex und damit die antiinflammatorische Aktivität deutlich vermindert [Esmon 2006]. Die Inflammation induziert in der Endothelzelle eine Hochregulierung des tissue factor (TF) mit nachfolgender Thrombozyten- und

Gerinnungsaktivierung. Der potente Thrombininhibitor Antithrombin III bindet an spezifische Heparansulfate der Proteoglykane der Glycocalyx der Endothelzelle. Das mikrovaskuläre Endothel ist ein komplexes Bindeglied zwischen der Blutgerinnung und der Inflammation. Die aktivierten Endothelzellen exprimieren Adhäsionsmoleküle wie ICAM, VCAM, E-Selectin und von Willebrand Faktor mit konsekutiver Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion. Eine überschießende Aktivierung des mikrovaskulären Endothels im Rahmen einer Sepsis kann durch eine Endotheldysregulation und Thrombozyten-Leukozyten Interaktion zu einem Endothelzellschaden und Störung der Mikrozirkulation führen [van Hinsbergh 2012]. Tabelle 5 fasst die wesentlichen Mechanismen der Kontrolle der Hämostase durch die Endothelzelle zusammen.

<p><u>Gerinnungskontrolle</u></p> <p>Bindung von Antithrombin III</p> <p>Expression von Thrombomodulin (TM) und Protein C Aktivierung</p> <p>Expression des endothelialen Protein C Rezeptors (EPCR)</p> <p>Freisetzung des tissue factor pathway inhibitor (TFPI)</p>
<p><u>Kontrolle der Thrombozytenadhäsion und Aktivierung</u></p> <p>Produktion und Freisetzung von Willebrand Fraktor (vWF)</p> <p>Spaltung des ultra-large VWF durch ADAMTS 13</p> <p>Elektische Abstoßung durch negativ geladene Heparansulfate</p> <p>Freisetzung von NO und PGI₂/PGE₂ – Reduktion der Thrombozytenaktivierung</p>
<p><u>Fibrinolyse</u></p> <p>Synthese und Freisetzung von Gewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA)</p> <p>Induktion des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors 1 (PAI-1)</p> <p>Pericelluläre Proteolyse während der Zellmigration/Matrixinvasion/Fibrinolyse durch UPA/UPAR und membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP)</p>
<p><u>Desintegration von Thrombozyten</u></p> <p>Oxidative Thrombozytenfragmentation durch Spaltung von ADAMTS18 durch Thrombin</p>
<p><u>Vasoregulation</u></p> <p>Konstriktion als erste Abwehr gegen akute Blutung</p> <p>Dilatation mit dem Versuch einen Thrombus zu einem kleineren Areal zu transportieren</p>

Tabelle 5: Kontrolle der Hämostase durch die Endothelzelle

Das Kallikrein-Kinin-System beschreibt ein enzymatisches Kaskadensystem, welches nach Triggerung über das Plasma-Kallikrein-System (Kontaktsystem) und das Gewebe Kallikrein-System in die Produktion von aktiven Kininen mündet.

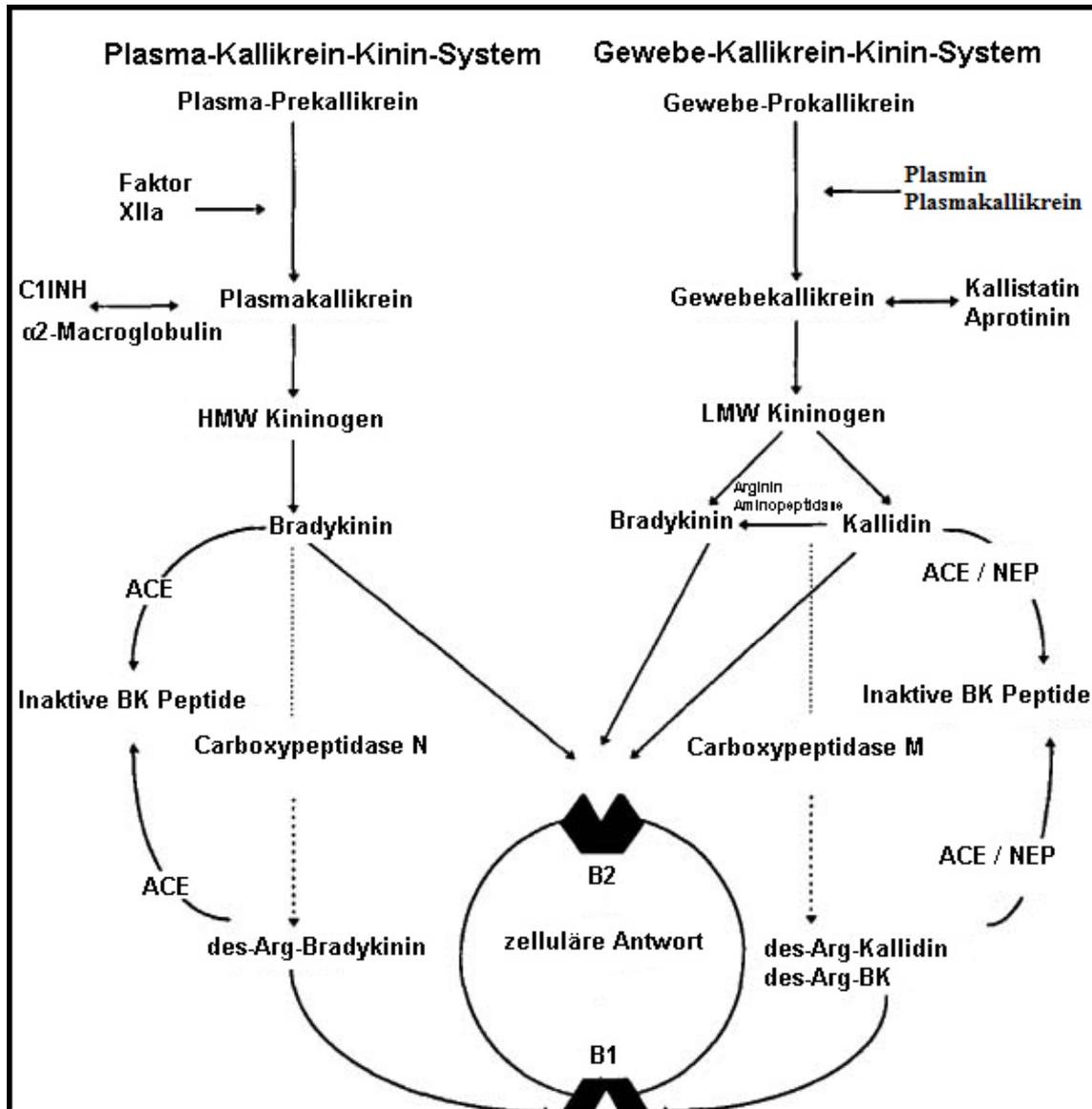


Abbildung 11: Plasma- und Gewebe-Kallikrein-Kinin-System

Zu den aktiven Kininen gehören Bradykinin, Kallidin (lys-Bradykinin), und des-Arg-Bradykinin. Das System beinhaltet die Vorstufen der Kinine, Kininogen, Gewebekallikrein und Plasmakallikrein. Das multifunktionale Kininogen gehört der alpha-2 Globulin Fraktion an und liegt in zwei Formen vor, dem high-molecular-weight kininogen (HMWK) und dem low-molecular-weight kininogen (LMWK) [Ueno und Oh-ishi 2003]. Die pharmakologisch

aktiven Kinine haben eine proinflammatorische und eine kardio-/nephroprotektive Wirkung. Diese wird nicht nur über Kinine und die korrespondierende Rezeptoren B1 und B2, sondern auch über ihre Vorstufen, Aktivatoren, Metalloproteinasen und Antiproteasen, welche die Aktivität einschränken, vermittelt. Das Kallikrein-Kinin-System steht mit dem Gerinnungssystem, dem Komplementsystem und dem Renin-Angiotensin-System in enger Beziehung. Die biologische proinflammatorische Wirkung dieses Multiproteinsystems beinhaltet eine mikrovaskuläre Permeabilitätssteigerung und Hypotension durch Endothelzellaktivierung, Kontraktion von glatten Muskelzellen und inflammatorischer Schmerz. Des Weiteren zeigt die aktuelle Forschung, dass die aktiven Proteine dieses Systems auch antikoagulatorische, profibrinolytische, antiadhäsive und Protease-inhibitorische Eigenschaften aufweisen. [Moreau et al. 2005].

2.1.4.5.1 Regulation der Kininogenaseaktivität

Die Kontaktaktivierung wird durch die Proteaseinhibitoren C1-INH, Antithrombin III, α 2-Makroglobulin, α 1-Protease-Inhibitor, sowie α 2-Antiplasmin reguliert. C1-INH ist durch die Beeinflussung der Aktivität von FXIIa und Kallikrein der wichtigste Regulator des Kontaktsystems. Zusammen mit dem α 2-Makroglobulin macht C1-INH mehr als 90% der Kallikrein-Inhibition aus. Der Mechanismus der Regulierung des Gewebekallikrein ist weitestgehend unbekannt. Kallistatin und Aprotinin sind Beispiele von Serinproteaseinhibitoren mit inhibitorischer Potenz von Gewebekallikrein. Die Kinine werden durch zinkabhängige Metalloproteinasen wie Angiotensin I-converting enzyme (ACE) Aminopeptidase P und Carboxypeptidase M und N metabolisiert [Moreau 2005].

2.1.4.5.2 Kinine und Inflammation

Die Kontaktaktivierung ist ein wichtiger Mediator in der Genese der systemischen Inflammation. Eine fehlende Regulierung des Systems kann zu Komplikationen der Sepsis wie Hypotension, DIC, Mikrozirkulationsstörung oder multiplen Organversagen führen. Die Kontaktaktivierung von Faktor XII und Prekallikrein in der Sepsis führt zu einer raschen Reaktion mit Ausbildung eines FXIIa-C1-INH und Kallikrein-C1-INH-Komplexes. Die Abnahme des C1-INH-Spiegels kann in einer unkontrollierten Kontaktaktivierung münden [Colman und Schmaier 1997]. In der Sepsis können deutlich erhöhte Bradykinin-Spiegel beobachtet werden. Eine systemische Inflammation geht mit einer Hochregulierung der

Kinin-Rezeptoren einher. Dies führt zu einer gesteigerten Sensibilität von inflammatorischen Zellen. Bradykinin initiiert die Freisetzung von tPA, NO und PGI₂ aus Endothelzellen. Dies führt zu einer Vasodilatation und zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität mit Ödembildung. Bradykinin ist für viele leukozytäre Effekte, wie der Freisetzung von Zytokinen, Leukotrienen, Prostaglandinen und reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich [Sharma und AL-Sherif 2006].

2.1.5 Makro- und Mikrozirkulation bei der systemischen Inflammation

Die Aufgabe des Kreislaufes ist die Versorgung des Organismus mit Substraten und die Elimination von Metaboliten. Das Kreislaufsystem kann in Makro- und Mikrozirkulation unterteilt werden, wobei Veränderungen beider Systeme sich gegenseitig beeinflussen. Eine Dysfunktion peripherer Gefäße und der myokardialen Pumpfunktion, sowie eine Umverteilung des Blutflusses sind die Eckpfeiler des im Rahmen einer systemischen Inflammation auftretenden Schocks [Thijs et al. 1990]. Um in einer Schocksituation die Gewebeversorgung aufrecht zu erhalten, werden zahlreiche Kompensationsmechanismen aktiviert. Dies führt, getriggert durch die Mikrozirkulation, zunächst zu einer Rekrutierung der Gefäßversorgung der für den Organismus wichtigen Organe mit konsekutiv verminderter Perfusion und erhöhter Permeabilität der Endstrombahn. Wenn die Hypoperfusion nicht zeitabhängig invertiert wird, droht ein Multiorganversagen mit sehr hoher Mortalität. Dies verdeutlicht den Nutzen einer ausgeprägten Volumensubstitution als Basistherapie eines septischen Schocks [Spronk et al. 2004]. Die mikrovaskuläre Strombahn bildet die Kulisse für die sehr komplexe Interaktion zwischen Gefäßwand, zirkulierenden Zellen und plasmatischen Mediatoren im Rahmen einer systemischen Inflammation. Die Größe der Ausdehnung des entzündlich veränderten Gefäßareal einer überschießenden Inflammation und die endogenen antiinflammatorischen Kompensationsmechanismen sind bestimmend für das Schicksal des Gesamtorganismus [Leithäuser und Matthias 1997].

2.1.5.1 Makrozirkulation

Zunächst kommt es in der hyperdynamischen Phase eines septischen Schocks zu einer Erniedrigung des peripheren Gefäßwiderstand und reflektorisch zu einer erhöhten kardialen Auswurfleistung durch Steigerung der Herzfrequenz. Die systemische Entzündungsreaktion führt zu einer Umverteilung des Blutflusses durch Rückverteilung des Blutvolumens in die venösen Kapazitätsgefäße mit entsprechender kardialer Vorlastsenkung. Außerdem sind eine

Embolisation kleiner Gefäße, Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität mit nachfolgender Hämokonzentration und eine Eröffnung arterio-venöser Shunts an der pathologischen Umverteilung der peripheren Zirkulation und einer Erniedrigung des systemischen Gefäßwiderstandes beteiligt. Eine weitere Progredienz führt zu einer Verschlechterung der kardialen Auswurfleistung und mündet in der hypodynamen Phase des Schocks. Dies ist Grundlage für die Organminderversorgung und das daraus potentiell resultierende Multiorganversagen [Thijs et al. 1990].

2.1.5.2 Physiologie der Mikrozirkulation

Die physiologische Funktion der Mikrozirkulation ist die Grundvoraussetzung für eine adäquate Gewebeoxygenierung und Organfunktion. Ihre Aufgabe ist der Transport von Sauerstoff und Nährstoffen zu den Gewebezellen, die Sicherstellung einer adäquaten immunologischen Tätigkeit und im Falle einer Erkrankung der Transport von therapeutischen endogenen Substanzen zu den Zielzellen. Die Mikrozirkulation umfasst die kleinsten Blutgefäße mit einem Durchmesser kleiner 100µm. Hier findet die Sauerstoffabgabe an das Gewebe statt. Die vaskuläre Mikrozirkulation beinhaltet die Arteriolen, Kapillaren und postkapillären Venolen. Die Hauptzelltypen, welche die Mikrozirkulation beinhaltet, ist das mikrovaskuläre Endothel, glatte Muskelzellen der Arteriolen, Erythrozyten und Leukozyten. Die lokalen Plasmakomponenten des Blutes sind ebenfalls Bestandteil der Mikrozirkulation. Die Struktur und Aufgabe der Mikrozirkulation ist sehr heterogen und hängt von den verschiedenen Organsystemen ab [Ince 2005].

Die Kontrollmechanismen der mikrovaskulären Perfusion sind myogen (Belastung und Stress), metabolisch (O₂, CO₂, Laktat, Wasserstoffionen) und neurohumeral. Die Endothelzellen spielen in der Regulation der Mikrozirkulation eine zentrale Rolle. Durch die Wahrnehmung metabolischer Substanzen und Mediatoren wird der Tonus der arteriolen glatten Muskelzellen und die kapilläre Rekrutierung gesteuert [Vallet 2004].

2.1.5.3 Mikrozirkulation und Inflammation

Im Rahmen einer systemischen Inflammation sind die drei Elemente des mikrozirkulatorischen Netzwerkes kompromittiert. Es besteht eine Hyporesponsivität gegenüber pharmakologisch wirksamen Vasokonstriktoren und Vasodilatoren, eine reduzierte Anzahl perfundierter Kapillaren und eine venöse Obstruktion durch die

Sequestration von aktivierten und deformierten neutrophilen Granulozyten [Vallet 2004]. Dies führt zu einer Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes gegenüber dem venösen System, was als Sauerstofflücke bezeichnet wird, und Ausdruck der Schwere des Ausmaßes funktioneller Shunts ist. Insbesondere bei der Sepsis können diese Veränderungen beobachtet werden [Ince 2005].

Die Erythrozyten setzen vasoaktives ATP, Nitrosothiole und NO in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdruckgradienten und mechanischer Deformität frei. Diese erythrozytäre Sensorik führt zu einer Konformitätsänderung des Hämoglobinmoleküls und signalisiert der Mikrovaskulatur eine Dilatation. Somit sind die Erythrozyten in die Mikrozirkulation als Lieferant und Sensor von Sauerstoff eingebunden [Sprague 1998].

Der Endothelzellschaden verstärkt die Aktivierung der Komplement- und Gerinnungskaskade mit Fibrinablagerungen, Formation von Mikrothromben und gesteigerter Rekrutierung von Leukozyten. Die heterogenen inflammatorisch bedingten Prozesse münden in einer Gewebhypoxie und mitochondrialen Dysfunktion. Die Alteration des Blutflusses und der Oxygenierung konnten in zahlreichen Sepsismodellen nachgewiesen werden [Matsuda 2007].

Das Stickoxyd-System ist eine zentrale Komponente der vaskulären Autoregulation. NO reguliert den Gefäßwiderstand, die Blutrheologie, die Interaktion zwischen zellulären Blutbestandteilen und der Gefäßwand, sowie das Blutvolumen. Somit ist NO als Modulator mikrovaskulärer Integrität anzusehen. Darüber hinaus fungiert NO als Neurotransmitter, und Antioxidant. Die induzierte endotheliale NO-Synthase produziert große Mengen NO. Initial schützt dies die mikrovaskuläre Hämodynamik und verbessert den Sauerstofftransport. Jedoch trägt die NO induzierte Hypotension zur Vasoplegie des septischen Schocks, der myokardialen Dysfunktion, der Leberschädigung und der vaskulären und intestinalen Hyperpermeabilität entscheidend bei [Titheradge 1999].

Aktivierte Leukozyten bilden reaktive Sauerstoffspezies, welche die mikrozirkulatorischen Strukturen, zelluläre Interaktionen und die physiologische Blutgerinnung direkt schädigen. Inflammatorische Mediatoren modifizieren die Barrierefunktion der Mikrozirkulation durch Destruktion von Zellverbindungen. Dies führt zu einem Gewebeödem und weiterem Sauerstoffdefizit [Ince 2005]. Die Inflammation und Alteration der Mikrozirkulation führt durch eine Aktivierung der plasmatischen Kaskadensysteme und Leukozytenaktivierung zu einer Fibrinablagerung, Erythrozytendeformität, Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten, Endothelzellschwellung, reduzierten Perfusionsdruck und Mikrothromben. Der Endpunkt des Mikrozirkulationsschadens ist die

Stase des Blutflusses mit Nekrose des umliegenden Gewebes. Der wichtigste Mechanismus scheint hierbei die Leukozytenadhäsion an das Endothel zu sein [Bateman 2003].

In letzter Konsequenz führt der unbehandelte Mikrozirkulationsschaden zu einem Sauerstoff- und Substratmangel und dem daraus resultierenden Organversagen. Entscheidend für diesen deletären Verlauf ist das Missverhältnis von Verbrauch und Neubildung körpereigener Regulatorproteine der Mediatorensysteme im Sinne eines relativen oder absoluten Mangels. Unter diesem Gesichtspunkt erscheint die pharmakologische Beeinflussung der Mechanismen des Mikrozirkulationsschadens ein kausaler Ansatz in der Therapie der systemischen Inflammation zu sein. Eine antiinflammatorische Therapie mit CI-INH zeigt in vielen Sepsismodellen eine Verbesserung des Mikrozirkulationsschadens und damit eine Verbesserung der Prognose [Davis et al. 2008]. .



Abbildung 12: Einflüsse auf die Mikrozirkulation in der Sepsis

2.1.5.4

Endotheldysfunktion

Der Endothelzelle kommt bei der Regulation der Entzündungsreaktion durch ihre strategisch bedeutsame Lage an der Grenze zwischen Gewebe und dem Blut mit seinen zellulären und plasmatischen Bestandteilen eine zentrale Rolle zu. Das Endothel ist bei jeder lokalen oder

systemischen Entzündung mit einbezogen. Die Zellschädigung und der Verlust der regulativen und seperierenden Eigenschaften mag Anfang oder Endpunkt eines circulus vitiosus der Mikrozirkulationsstörung sein [Leithäuser und Matthias 1997].

Gefäßtonus: Die Endothelzellen produzieren vasoaktive Substanzen zu denen das vasodilatatorisch wirksame NO und Prostazyklin, sowie das vasokonstriktorisch wirksame Endothelin, Thromboxan A2 und PAF gehören. Dominierend ist bei der Inflammation die Endothel vermittelte Vasodiltataion. Dafür sind mehrere Mechanismen verantwortlich: entzündlich bedingte Veränderungen der endothelialen Oberflächenrezeptoren, Alteration der Expression von endothelialer NO-Synthase, vermehrte NO Freisetzung und ein verminderter Abbau von NO [Wanecek et al. 2000].

Vaskuläre Hyperpermeabilität: Bei einem intakten Gefäß bildet das Endothel eine semipermeable Barriere. Im Rahmen des septischen Schocks bricht die Barrierefunktion mit der Folge einer gesteigerten Permeabilität zusammen. Der Verlust von Flüssigkeit in den extravaskulären Raum verstärkt die Mediator induzierte Hypotension und führt zu einem lebensgefährlichen Ödem in der Lunge, Niere und Gehirn. Im Tierversuch konnte die Permeabilitätsstörung insbesondere durch das Zytokin IL-2, TNF- α und Thrombin verursacht werden [Tirupathi et al. 2001].

Gerinnung und Fibrinolyse: Normalerweise vermittelt die Endothelzelle antikoagulatorische und antithrombotische Eigenschaften. Im Rahmen einer Inflammation kommt es zu einer prokoagulatorischen und supprimierten fibrinolytischen Aktivität. Die Expression von Adhäsionsmolekülen führt zu einer Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion (siehe Kapitel Hämostasekontrolle durch das Endothel, S.39).

Apoptose der Endothelzelle: Unter physiologischen Umständen ist nur ein sehr geringer Prozentsatz (<0,1%) der Endothelzellen apoptotisch. Durch in vivo Tiermodelle konnte eine LPS induzierte Endothelzellapoptose nachgewiesen werden. Die Evidenz des Endothelzellschadens und der Apoptose stammt jedoch vorwiegend aus postmortalen Biopsien von Patienten, die an einer Sepsis verstarben. Bei septischen Patienten kann ein Anstieg zirkulierender Endothelzellen nachgewiesen werden. Das Ausmaß zirkulierender Endothelzellen in der Sepsis korreliert negativ mit dem Überleben. Möglicherweise spielt hierbei die verstärkte Aktivierung von Caspase-3, eine zentrale Effektorprotease der Apoptose, eine wesentliche Rolle [Hattori et al. 2010].

Thrombozyten zirkulieren normalerweise ohne Kontakt zu dem vaskulären Endothel. Durch die Aktivierung der Endothelzellen treten die Thrombozyten mit dem Endothel in Interaktion und die Thrombozytenadhäsion verstärkt durch die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren die Inflammation. Die Thrombozytenadhäsion an das Endothel erfolgt durch die molekulare Paarbildungen von P-Selectin-Glycoprotein-Ligand-1/P-Selectin, GPIIb α /von Willebrand Faktor, GPIIb α /P-Selectin und GPIIb/IIIaFibrinogen/ICAM-1 [Tailor et al. 2005]. Aktivierte Thrombozyten produzieren große Mengen von proinflammatorischen Mediatoren und führen so zu einer wechselseitigen Beeinflussung der Endothelzellen und der Leukozyten. Die Thrombozyten werden wiederum durch die Endothelzellen durch die Bindung endothelialer proinflammatorischer Substanzen auf den korrespondierenden Rezeptoren der Thrombozytenoberfläche aktiviert. Die Mediatoren der Thrombozyten werden nach Aktivierung sehr rasch freigesetzt. Dazu gehören Histamin, Serotonin, Thromboxan A₂, PAF, PGE₂, PGD₂, TGF α , PDGF, IL-1 und Chemokine wie RANTES, MCP-3 und MIP-1. Einige dieser Substanzen kontrollieren den Gefäßtonus und die Permeabilität. Des Weiteren setzen Thrombozyten Heparanase frei, was zu einer Degradation der extrazellulären Matrix und einer Förderung der Leukozytenextravasation führt [Weyrich und Zimmerman 2004]. Außerdem produzieren Thrombozyten Substanzen die das erworbene Immunsystem direkt beeinflussen. So führt das lösliche CD40L durch eine Bindung an CD40 auf der Endothelzellmembran zu einer Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen, Chemokinsekretion, Leukozytenrekrutierung und Induktion des tissue factor mit folgender Aktivierung der Blutgerinnung [Henn et al. 1998].

Die charakteristischen Schritte, durch die Leukozyten vom Blut zu einer Entzündung gelangen, wird durch exogene und endogene Stimuli vermittelt. Die Extravasation wird in einem Paradigma der Rekrutierung inflammatorischer Zellen in drei wesentliche Schritte zusammengefasst: Rollen, Aktivierung/Adhäsion und Transmigration [Langer und Chavakis 2009].

Adhäsionsmoleküle: Die Leukozyten-Endothel Adhäsionsmoleküle könne in drei Familien eingruppiert werden. Selectine gehören zu einer Familie von drei Kohlenhydrat erkennenden Molekülen, von denen E-Selectin auf aktivierten Endothelzellen, P-Selectin auf

Thrombozyten und Endothelzellen und L-Selectin auf Leukozyten exprimiert wird. Mehrere Studien zur Antikörperblockade von Selektinen zeigte die Beteiligung von Selektinen an Rollen der Leukozyten. Die Liganden der Selektine sind Glykoproteine mit glykosylierten Kohlenhydraten [Vestweber 1992]. Integrine sind Heterodimere die eine Alpha- und eine Betakette tragen. Sie können multiple Liganden wie Proteine der extrazellulären Matrix, Glykoproteine der Zelloberfläche, Komplementfaktoren und lösliche Komponenten des Gerinnungs- und Fibrinolyse systems erkennen. Leukozyten exprimieren Integrine der $\beta 2$ -Familie (CD11/CD18). Integrine benötigen eine Konformationsänderung um die vollen adhäsiven Eigenschaften zu erfahren [Hynes 1992]. Die wesentlichen Integrinliganden der Leukozytenadhäsion sind die interzellulären Adäsionsmoleküle ICAM 1-5, das vaskuläre Adhäsionsmolekül VCAM-1, wie auch die junctionalen Adäsionsmoleküle (JAM's) auf Endothelzellen [Ley 2007]. Ein weiterer wichtiger Adhäsionsrezeptor der Leukozytenrekrutierung ist das Thrombozyten-Endothelzell-Adhäsionsmolekül PECAM-1 [Muller 2003].

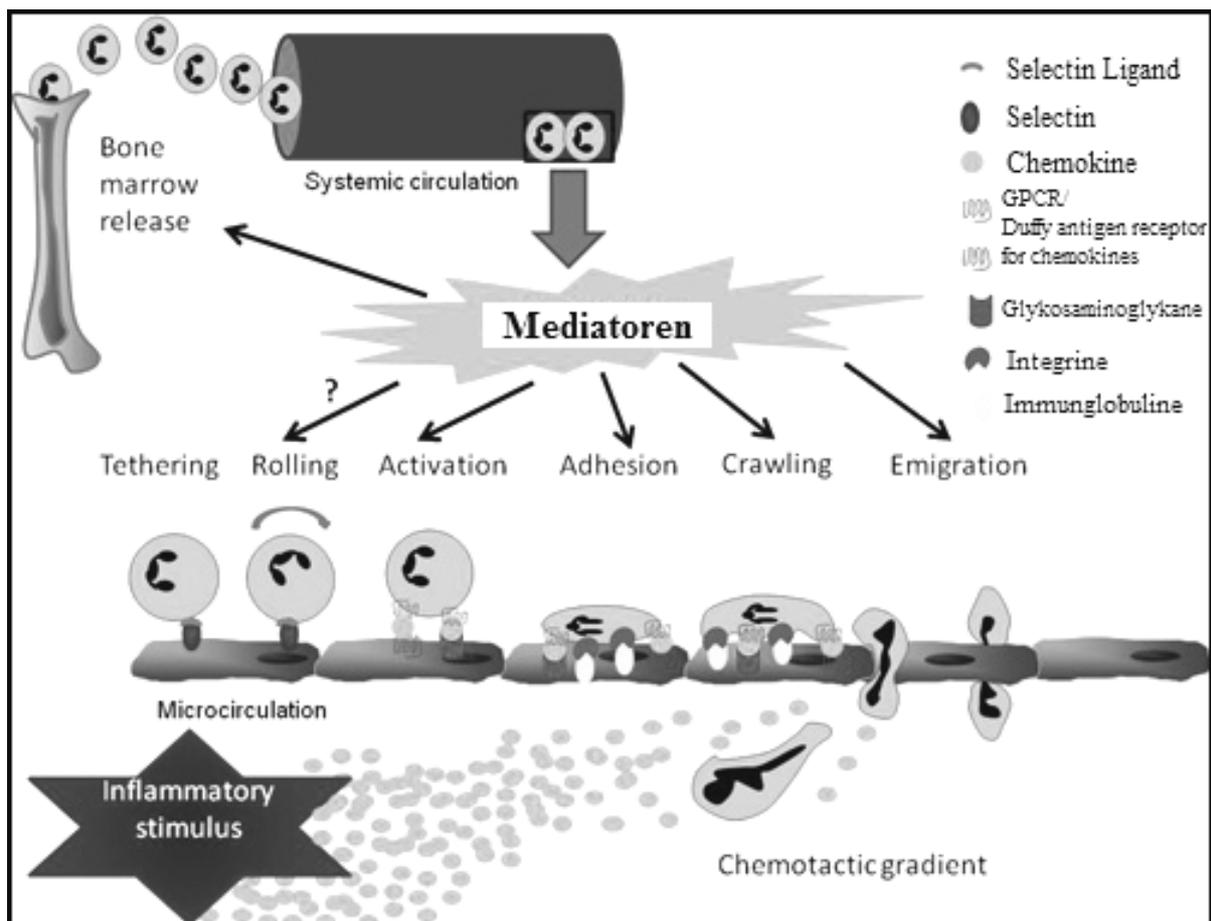


Abbildung 13: Rekrutierung neutrophiler Granulozyten (modifiziert nach Sanz und Kubes 2012)

Anhaftung der Leukozyten: Die Anhaftung („tethering“) der Leukozyten ist definiert als Änderung der Position der Leukozyten im Blutgefäß weg vom zentralen Blutfluss hin zu der Nähe der Endothelzelloberfläche [Langer und Chavakis 2009]. Dies ist ein aktiver Prozess, bei dem die Zellrezeptoren die Liganden der Gefäßoberfläche für eine ausreichend lange Zeit kontaktieren müssen. Die Anhaftung ist das Ergebnis einer Bindung zwischen Zelle und Oberfläche, welche proportional zur Dichte der Rezeptoren und Liganden, wie auch der Kontaktfläche gemäß dem Massenwirkungsgesetz ist [Zhu et al. 2008]. Während dieses ersten Schrittes initiieren die auf der Endothelzelle präsentierten Selectine und Chemokine den Signalweg der Neutrophilen Granulozyten zur Regulation der Integrinbindung [Zarbock und Ley 2009]. Das Rollen beinhaltet die Bildung neuer Bindungen an der „Stirnseite“ der Zelle und die Dissoziation der präexistenten Bindung an der „Hinterkante“ der Zellen. Bei dem konzeptionellen Schema des Prozesses des Rollens und der Fluss-unterstützten Adäsion nimmt die Geschwindigkeit des Rollens bei erhöhtem Blutfluss unter optimalem Scherstress ab, so dass die Zellen zeitlich schneller Rollen, als der Fluss ansteigt. Dies lässt sich durch eine Vergrößerung des Kontaktareals der Zelloberfläche durch Scherstress induzierten mechanischen Druck auf die zirkulierende Zelle erklären. Demnach nimmt die Bindefähigkeit für eine deformierbare Zelle zu, jedoch nicht für eine fixierte oder rigide Zelle [Zhu et al. 2008]. Die Integrine transferieren Signale von der extrazellulären Domäne in die Zelle und bahnen über die Zellaktivierung die feste Adhäsion sowie die Initiierung der immunologischen Fähigkeiten der Leukozyten wie die Zytokinproduktion und den „respiratory burst“ [Ginsberg 2005]. Der wichtigste Ligand der Selectine ist PSGL-1, welcher an P-Selectin und E-Selectin binden kann. Die PSGL-1 Bindung auf PMN's durch P-Selectin und E-Selectin kann eine Aktivierung der Integrine bewirken, so dass eine Verbindung zwischen dem Rollen und der nachfolgenden Integrin vermittelten festen Adhäsion besteht. [Langer und Chavakis 2009].

Aktivierung und Adhäsion: Während des Rollens können die Leukozyten durch den Kontakt mit der luminalen Endothelzelloberfläche die dort gebundenen Chemokine detektieren. Die Produktion und die Sekretion von Chemokinen wird durch inflammatorische Mediatoren drastisch gesteigert. Durch entzündliches Gewebe sezernierte Chemokine können durch das Endothel geschleust werden. Auf der Endotheloberfläche werden die Chemokine durch Glykosaminoglykane (GAG's) und Heparansulfate (HA) immobilisiert. [Rot und von Andrian 2004]. Durch eine Interaktion mit den G-Protein gekoppelten Chemokinrezeptoren auf Leukozyten wird eine intrazelluläre Signalkaskade induziert. Diese führt zu einer „inside-out“ Aktivierung der Integrine. Die aktivierten Integrine binden mit einer hohen Affinität an die

korrespondierenden endothelialen Rezeptoren ICAM-1 und VCAM-1 mit nachfolgender fester Adhäsion der Leukozyten und einer Formänderung mit Pseudopodienbildung entlang der Endotheloberfläche. Damit wird der Prozess der Transmigration eingeleitet [Sanz und Kubes 2012]. Die neutrophilen Granulozyten breiten sich über die biologische Oberfläche aus und setzen die Komponenten ihrer Granula frei. Dies beinhaltet Peroxidasen und hydrolytische Enzyme. Während der Degranulation fusioniert die Membran der Granula mit der cytoplasmatischen Membran. Dadurch nimmt die Rezeptordichte zu und die Zellen intensivieren ihre Interaktion mit der Umgebung. Die Adhäsion der PMN's verstärkt die Fähigkeit der Phagozytose von Mikroorganismen und leitet eine Signalkaskade ein, welche die Apoptose reguliert [Zarbock und Ley 2008].

Transmigration: Nach der festen Adhäsion rollen sich die PMN's intraluminal aktiv ab, um die optimale Stelle einer transendothelialen Migration zu finden. Während die initiale Adhäsion von dem beta2-Integrin (LFA-1(α L β 2)) abhängt, wird das „crawling“ durch das Integrin Mac-1 (α M β 2) vermittelt. Die Transmigration erfolgt in erster Linie über die Verbindung der Plasmamembranen („junctions“) der Endothelzellen. [Sumagin und Sarelius 2010]. Die extravaskulär lokalisierten Chemokine führen zu einem direkten abrollen der PMN's und beschleunigen ihre Rekrutierung. Die Emigration der PMN's folgt einem chemotaktischen Gradienten entlang der aufsteigenden Konzentration selektiv und directional. Die molekularen Mechanismen der Transmigration umfassen PECAM-1, JAM, CD99 (MIC-2), ESAM (endothelial cellselective adhesion molecule), ICAM und Integrine. Die Emigration kann entweder parazellulär durch die Endothelzellverbindungen, oder transzellulär direkt durch den Körper einer intakten Endothelzelle erfolgen. Die Transmigration durch die Basalmembran erfolgt durch proteolytische Spaltung extrazellulärer Matrixkomponenten [Ley et al. 2007].

Inhibition der Leukozytenadhäsion: Im Gegensatz zu den zahlreichen identifizierten Adhäsionsrezeptoren der Leukozyten-Endothelinteraktion ist über die direkte endogene Inhibitoren der Leukozytenadhäsion sehr wenig bekannt. Die Inhibitoren gehören den Regulationsmechanismen der inflammatorischen Mediatorsysteme an, die eine überschießende Inflammation und Immunaktivierung verhindern sollen. Ein bekannter endogener Inhibitor der Leukozytenadhäsion ist Del-1 (developmental endothelial locus-1). Del-1 ist ein durch Endothelzellen sezerniertes Glykoprotein, welches mit den Proteoglykanen der extrazellulären Matrix der Zelloberfläche assoziiert ist und mit der beta2-Integrin LFA-1 abhängigen Leukozytenadhäsion interferiert. In vivo führt eine Del-1

Defizienz zu einem merklichen Anstieg der Leukozytenadhäsion. Lösliches ICAM-5 wurde auch als Inhibitor des LFA-1 beschrieben [Choi et al. 2008]. In vivo hemmt C1 INH das Rollen und die Transmigration der Leukozyten durch eine Leukozyten-Selectin-Interaktion mittels Bindung an P- and E-Selectine [Cai und Davis 2003].

2.1.5.7 Endothel-Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion

Entzündlich alterierte Mikrovaskulatur rekrutiert Leukozyten durch einen Thrombozyten abhängigen Mechanismus, gleichzeitig ist die Thrombozytenrekrutierung abhängig von den Leukozyten. Wenn neutrophile Granulozyten mit dem Blutfluss auf eine Endothelzellschicht treffen, auf welcher mit Thrombin aktivierte Thrombozyten adhären sind, bilden die Thrombozyten eine Brücke zu dem mikrovaskulären Endothel und verstärken die Leukozytenadhäsion [Kirton und Nash 2000]. In einem in vivo Ischämie-Reperfusion-Modell zur Beobachtung der Abhängigkeit der Leukozytenadhäsion von Thrombozyten in postkapillären Venolen zeigte sich, dass antileukozytäre Strategien zu einer signifikante Reduktion der Thrombozytenrekrutierung führen [Cooper et al. 2000]. Leukozyten abhängige Thrombozytenadhäsion beinhaltet P-Selectin auf Thrombozyten und Endothelzellen und eine CD18-ICAM-1 Interaktion. Adhärenente Thrombozyten ebnet folglich das Rollen und die feste Adhäsion der Leukozyten durch den leukozytär exprimierten P-Selectin Glykoprotein-Liganden-1 und thrombozytär exprimiertes P-Selectin. Weitere Mechanismen, die die proinflammatorische und immunmodulatorische Endothelzell-Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion vermitteln, hängen von Chemokinen und dem CD40/CD40L-Weg ab [Tailor et al. 2005].

2.2

C1-Esterase-Inhibitor

Bei der Sepsis kommt es zu einer Aktivierung des Komplement-, Gerinnungs-, Fibrinolyse- und Kallikrein-Kininsystem. C1-INH inaktiviert zahlreiche Proteasen der plasmatischen Kaskadensysteme und interagiert mit Komponenten der extrazellulären Matrix, der Komplementkomponente C3, Endothelzellen, Leukozyten und Endotoxin. C1-INH wird bei der systemischen Inflammation proteolytisch inaktiviert. Die Zunahme von inaktiviertem C1-Inhibitor korreliert mit der Mortalität der Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock. Die Substitution von C1-INH im Rahmen einer systemischen Inflammation ist von pathophysiologischen Überlegungen her ein überzeugendes Konzept und zeigt in tierexperimentellen und klinischen Studien vielversprechende Ergebnisse mit einer Verbesserung der Prognose bei einer überschießenden Inflammation.

2.2.1

Biochemie C1-Esterase-Inhibitor

C1-Esterase-Inhibitor ist ein Akut-Phase-Protein und gehört aufgrund der Struktur und des Inhibitormechanismus zu der Superfamilie der Serin-Protease-Inhibitoren (Serpine). C1-INH ist eine singuläre Polypeptidkette, die aus einer Serpindomäne nahe dem C-terminalen Ende, einer Protease erkennenden Region und einer schweren glykosilierten amino-terminalen Domäne besteht. Letztere Domäne spielt bei der Proteaseinhibition keine Rolle und die Entfernung führt zu keiner Beeinflussung der Protease inhibierenden Aktivität [Coutinho et al. 1994]. Die physiologische Plasmakonzentration beträgt etwa 240mg/l, was einer Einheit pro Milliliter (U/ml) entspricht. C1INH wird in der Leber synthetisiert, die biologische Halbwertszeit beträgt 64 Stunden. Die Inaktivierung von Proteasen läuft in zwei Schritten ab. Zuerst wird der Zielprotease innerhalb des aktiven Zentrums eine Peptidylverbindung präsentiert, welche die Substratspezifität der Zielprotease imitiert. Die Spaltung der Peptidylbindung triggert eine Konformationsänderung und führt zu einer irreversiblen kovalenten Bindung zwischen dem Inhibitor und der Protease. Die aktuelle Forschung zeigt, dass C1-INH unabhängig von der Proteaseaktivität eine wichtige biologische Rolle als antiinflammatorisches Protein spielt. C1-INH kann an der nicht Serpin Domäne des amino-terminalen Endes Lipopolysaccharide und E/P-Selectin binden [Cicardi et al. 2005]. Die zirkulierenden C1-INH/Protease-Komplexe werden wahrscheinlich durch Serpin-spezifische Rezeptoren der Leber eliminiert. Des Weiteren werden die Protease-Serpin Komplexe durch neutrophile Granulozyten und Monozyten phagozytiert [Wouters 2008]. Unter

physiologischen Umständen beträgt die Abbaurate des Plasmapools von C1INH 2,5% pro Stunde, was eine Halbwertszeit von 28 Stunden ergibt. C1-INH wird durch proteolytische Spaltung durch die von PMN's freigesetzte Elastase inaktiviert. Auch bakterielle Elastasen und Proteinasen können C1-INH spalten. Im Rahmen inflammatorischer Prozesse spielen auch Plasmin und Thrombin bei der Inaktivierung von C1-INH eine Rolle. Demnach könnte die lokale C1-INH Inaktivierung vorwiegend von entzündlich verändertem Gewebe abhängig sein und somit zu einer erhöhten lokalen Komplementaktivierung und Verstärkung einer pathologisch gesteigerten Proteolyse in inflammatorischem Gewebe beitragen [Caliezi et al. 2000]. Bei Patienten mit einer Sepsis finden sich erhöhte Spiegel von inaktiviertem C1-INH. Das Ausmaß der Inaktivierung von C1-INH korreliert mit der Entwicklung fataler Komplikationen der Sepsis. Patienten mit septischem Schock zeigen eine um 20% verminderte C1-INH Aktivität, obwohl C1-INH als Akut-Phase-Protein um das zwei bis dreifache ansteigen könnte. Die erhöhten Plasmaspiegel der C1-Inhibitorkomplexe und des proteolytisch abgebauten C1-INH korrelieren mit der Mortalität von Sepsis-Patienten [Nuijens 1989]. C1-INH ist in Europa zur Behandlung des hereditären Angioödems zugelassen.

2.2.2 Hereditäres Angioödem

Die Ursache des hereditären Angioödems ist ein verminderter Plasmapiegel von funktionell aktivem C1-INH (HAE Typ I, 85%) oder ein normaler/erhöhter Plasmaspiegel mit dysfunktionalem C1-INH (HAE Typ II, 15%). Bei dem seltenen HAE Typ III liegt eine Mutation des Faktors XII oder ein nicht identifizierter Gendefekt bei normalem C1-INH Spiegel und einer normalen C1-INH Aktivität vor. Der mediane Spiegel des funktionsfähigen C1-INH liegt bei Patienten mit HAE bei etwa 20% im Vergleich zu gesunden Individuen. Das hereditäre Angioödem wird autosomal dominant vererbt, so dass bei heterozygot erkrankten Patienten ein C1-INH Spiegel von 50% zu erwarten wäre. Durch die verminderte C1INH-Aktivität kommt es zu einer unkontrollierten Aktivierung von Proteasen, aus der eine weitere Abnahme des C1-INH Plasmaspiegels resultiert. Der C1-INH Mangel führt zu einer exzessiven Autoaktivierung des klassischen Weges des Komplementsystems und des Kallikrein-Kinin-Systems. Es entstehen anaphylaktische, chemotaktische und vasoaktive Peptide (insb. Bradykinin). Dies führt letztendlich zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität und massiven Ödembildung, welche jedes Organ betreffen kann. Insbesondere die Ödembildung der oberen Atemwege kann für die Patienten fatal sein. In der Akuttherapie

werden bei abdominalen Schmerzen und bei Beteiligung der oberen Atemwege 500-1500 I.E. C1-INH infundiert. Mehrere klinische Studien weisen dies als effektive und sichere Therapie aus [Gompels et al. 2005].

2.2.3 Aktivität von C1-Esterase-Inhibitor

C1-INH inaktiviert Proteasen des Komplementsystems (C1r, C1s und MASP2), des Kontaktsystems (FXII, Kallikrein), der intrinsischen Gerinnung (FXI) und des Fibrinolyse systems (Plasmin, PAI). C1-INH interagiert des weiteren mit Komponenten der extrazellulären Matrix, der Komplementkomponente C3, Endothelzellen, Leukozyten und Endotoxin. Tabelle 6 fasst die biologische Aktivität von C1-INH zusammen.

<u>Proteaseinhibition</u>	
Komplementsystem	C1r, C1s, MASP2
Kallikrein-Kinin-System	Plasmakallikrein Faktor XII
Gerinnungssystem	Faktor XI, Thrombin
Fibrinolyse system	Plasmin, tissue plasminogen activator
<u>Interaktion mit endogenen Proteinen</u>	
Komplementsystem	C3b
Extrazelluläre Matrix	Typ IV Kollagen, Laminin, Entactin, Fibrin
<u>Interaktion mit Zellen</u>	
Zirkulierende Zellen	Neutrophile Granulozyten, Makrophagen
Vaskuläre Zellen	Endothelzellen (P und E-Selectin)
<u>Interaktion mit infektiösem Agens</u>	
Endotoxin	Escherichia coli 011:B4, 0127:B5, 055:B5, K-235, Salmonella typhimurium, Salmonella minnesota, Salmonella typhosa
Bakterien	Bordetella pertussis, E. coli, Serratia marcescens
Parasiten	Plasmodium falciparum

Tabelle 6: Biologische Aktivität von C1-Esterase-Inhibitor

C1-INH ist der einzige Plasmaprotease-Inhibitor, der den klassischen Weg des Komplementsystems durch Inaktivierung von C1r und C1s kontrolliert. Der Lektin-Weg des Komplementsystems wird durch eine Hemmung von MASP2 reguliert. Auch die Inhibition der Aktivierung des Lektin-Weges und des alternativen Weges wird durch C1-INH beeinflusst. C1-INH ist durch die Inaktivierung von aktiviertem Plasma-Kallikrein, Faktor XIIa und Faktor XIa der primäre Regulator des Kontaktsystems. C1-INH inaktiviert zahlreiche weitere Proteasen wie Plasmin und tPA. Die Details wurden bereits in den vorherigen Kapiteln erläutert. Die folgende Abbildung fasst die Inhibition der plasmatischen Kaskadensystemen durch C1-INH zusammen.

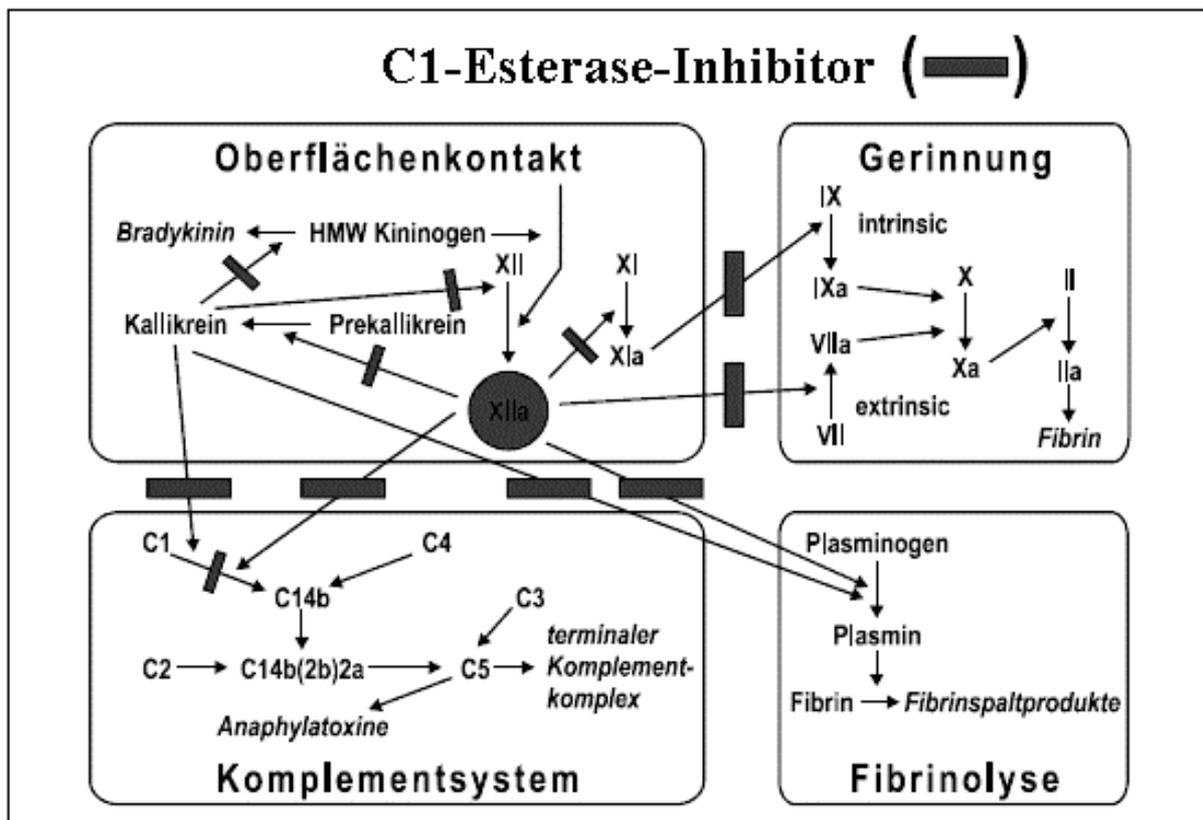


Abbildung 14: Inhibition der plasmatischen Kaskadensysteme durch C1-INH

2.2.3.2

Interaktion mit der extrazellulären Matrix

C1-INH inhibiert die Aktivierung des alternativen Weges des Komplementsystems durch eine reversible Bindung von C3b. Dies beeinträchtigt die C3b/FaktorB-Interaktion und ist von der Proteaseaktivität unabhängig [Jiang et al.2001]. C1-INH bindet an Komponenten der extrazellulären Matrix. Dies beinhaltet Typ IV Kollagen, Laminin und Entactin. Die biologische Bedeutung dieser Interaktion ist noch nicht klar. Es wird vermutet, dass die Interaktion mit der extrazellulären Matrix zu einem Konzentrationsanstieg von C1-INH auf der extravaskulären Seite der Inflammation führt und daraus eine bessere Kontrolle des Komplement- und Kontaktsystems resultiert. Eine Immobilisierung von Fibrin wird durch eine Quervernetzung von C1-INH mit der Gewebstransglutaminase bewirkt [Patston et al. 1997].

2.2.3.3

Interaktion mit Zellen

Eine wichtiger antiinflammatorischer Mechanismus ist die Inhibition der Leukozyten-Endothelzell-Adhäsion durch eine Bindung von C1-INH an P- und E-Selectine auf der Oberfläche von Endothelzellen. Eine Vielzahl der Selectin-Liganden bindet über das auf Zelloberflächen und Plasmaproteinen exprimierte Sialyl-Lewisx-Tetrasachharid. C1-INH exprimiert das Sialyl-Lewisx-Tetrasachharid und bindet darüber an E- und P-Selectine mit konsekutiver Inhibition des Rollens und der Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten an das vaskuläre Endothel [Cai und Davis 2003].

C1-INH bindet unabhängig von der Aktivität der Proteaseinhibition an neutrophile Granulozyten. Die biologische Rolle dieser Interaktion ist bisher nicht geklärt. In vitro verstärkt C1-INH die Phagozytose und das „killing“ von Bakterien durch PMN`s [Liu et al. 2007]. Die Aktivierung von PMN`s in der Sepsis korreliert mit der schwere der Organdysfunktionen. Zeerleder et al. zeigten, dass die Applikation von C1-INH bei Patienten mit einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock die Aktivierung von PMN`s verringert [Zeerleder et al. 2003].

2.2.3.4

Interaktion mit Endotoxin

Aktiver und inaktiver C1-INH verhindert eine lokale und systemische Endotoxin induzierte Veränderung der vaskulären Permeabilität. C1-INH interagiert mit Endotoxin und blockiert

die Endotoxin vermittelte TNF- α Expression. Das Lipopolysachharid ist Bestandteil der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien. LPS bindet im Blut an das LPS-Bindeprotein, welches LPS zu CD14 auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen transferiert. Der LPS/CD14-Komplex initiiert einen intrazellulären Signalweg durch die Bindung an den Toll-like-Rezeptor 4. Die Bindung von LPS durch C1-INH verhindert die Interaktion von LPS mit dem korrespondierenden Rezeptor und spielt somit eine Rolle bei der Protektion des Organismus vor einem Endotoxin-Schock. Andererseits verstärkt C1-INH eine LPS induzierte Chemotaxis von PMN's und unterstützt damit das angeborene Immunsystem gegen die Abwehr bakterieller Infektionen [Davis et al. 2007].

2.2.4 Substitution von C1-INH bei systemischer Inflammation

Bei einer systemischen Inflammation kommt es zu einer Aktivierung des Komplement-, Gerinnungs-, Fibrinolyse- und Kallikrein-Kininsystem. Des weiteren werden inflammatorische Zellen aktiviert. Die Aktivierung der plasmatischen Kaskadensysteme und der Leukozyten ist assoziiert mit einem Multiorganversagen und trägt zur hohen Mortalität der schweren Sepsis und des septischen Schocks bei. Auf Grund der Pathophysiologie der Sepsis und der multiplen Angriffspunkte von C1-INH innerhalb der Kaskadensysteme, sowie der Interaktion mit Komponenten der extrazellulären Matrix, Endothelzellen, Leukozyten und infektiösem Agens ist eine antiinflammatorische Therapie mit C1-INH ein kausaler Ansatz in der Therapie der systemischen Inflammation.

Die Behandlung mit C1INH verbessert in zahlreichen Tiermodellen inflammatorischer Erkrankungen, wie zum Beispiel Gram-negativer bakterielle Sepsis, Endotoxinschock, IL-2 induziertem CLS, hyperakuter Transplantatabstoßung und Ischämie-Reperfusionsschaden die Prognose. In klinischen Studien zeigte eine C1-INH Substitution bei Patienten mit einer Sepsis eine Abschwächung der Komplement- und Kontaktaktivierung, eine verringerte Aktivierung von PMN's, eine Verbesserung der Hämodynamik, sowie fehlende Präparat bedingte Nebenwirkungen. Igonin et. al konnten in einer im März des Jahres 2012 publizierten randomisierten kontrollierten Studie erstmals eine verbesserte Überlebensrate bei septischen Patienten durch eine Hochdosis C1-INH Substitution nachweisen [Igonin et al. 2012].

Die folgenden Tabellen fassen die Evidenz der C1-INH-Substitution im Rahmen einer Inflammation in tierexperimentellen und in klinischen Studien zusammen.

Kondition	Tiermodell	Ziel	Ergebnis	Autor
Sepsis	Ratte	Einfluss von C1-INH auf die Mikrozirkulation und die Leukozyten-Endothel-Interaktion in der Leber	Reduktion der Leukozyten-Adhärenz an die Endothelzellen post-sinuidaler Venolen. Reduktion der Mikrozirkulationsstörung durch C1-INH.	Croner et al. 2004
Sepsis	Maus	Einfluss auf das Überleben	C1-INH blockiert abhängig vom LPS-Bindeprotein die Bindung von LPS und supprimiert LPS induzierte TNF- α mRNA Expression. C1-INH schützt vor letaler Endotoxinämie.	Liu et al. 2004
Sepsis	Maus	Einfluss auf das Überleben	C1-INH verstärkt die Aktivität von PMN's im Blut und Peritonealexsudat. Das Überleben verbessert sich durch C1-INH Applikation.	Liu et al. 2007
Sepsis	Pavian	Effekt von C1-INH auf eine physiologische und inflammatorische Antwort	C1-INH reduziert den Abfall des Plasmalevels von Faktor XII und Prekallikrein, verhindert den systemischen Anstieg von C4b/a und reduziert die Freisetzung zahlreicher Zytokine.	Jansen et al. 1998
Sepsis	Ratte	Effekt auf die intestinale Kapillardichte, Leukozytenadhäsion und Plasmaextravasation im Mesenterium	C1-INH reduziert die Leukozytenadhäsion in submucosalen Venolen, und die Plasmaextravasation in das Mesenterium. C1-INH verringert die Mikrozirkulationsstörung.	Lehmann et al. 2004
Thermische Verletzung	Schwein	Effekt auf CLS und inflammatorische Gewebedestruktion	C1-INH reduziert die Komplementaktivierung und verbessert den klinischen Ausgang.	Radke et al. 2000
Sepsis	Ratte	Effekt auf die Mikrozirkulation postkapillärer Venolen des Mesenteriums	C1-INH reduziert die Leukozytenadhäsion, die vaskuläre Permeabilitätsstörung und verbessert die Mikrozirkulation.	Lendeman et al. 2000
Ischämie-Reperfusion	Maus	Rolle und Mechanismus von C1-INH in der Linderung intestinaler Verletzung	C1-INH reduziert intestinale Gewebeerletzung, schwächt die Leukozyteninfiltration ab und verbessert das Überleben.	Lu et al. 2008
Xenotransplantation	Schwein	Effekt auf hyperakute Abstoßung	C1-INH inhibiert die Komplement- und Kontaktaktivierung. Reduktion der Leukozyten- und Thrombozytenaktivierung. Verbesserung des Überlebens.	Fiane et al. 1999
Sepsis	Kaninchen	Effekt auf kardiorespiratorische Parameter und die Gerinnung	Stabilisierung des mittleren arteriellen Drucks, erhöhte zentralvenöse Sauerstoffsättigung, reduzierte Fibrinablagerung in der Mikrozirkulation.	Scherer et al. 1996
Sepsis	Ratte	Effekt auf arterielle und Gewebeoxygenierung der jejunalen Mukosa	Abschwächung einer verminderten arteriellen Oxygenierung. Kein Effekt auf die Gewebeoxygenierung.	Schmidt et al. 1999
Sepsis	Maus C3/C4 defizient	Effekt auf das Komplementsystem und das Überleben	Geringere Sensitivität auf Endotoxin, verbessertes Überleben.	Fischer et al. 1997

Tabelle 7: Tierexperimentelle Studien zur C1-Esterase-Inhibitor-Substitution

Kondition	Studien- typ	Ziel	Ergebnis	Autor
Sepsis	Fallbericht 5 Patienten	Effekt auf den Spiegel funktionalem C1-INH	Verringerung der Vasopressoren. Keine Nebenwirkungen. Kein Todesfall.	Hack et al. 1992
Capillary-leak-syndrom	Fallbericht 6 Patienten	Effekt auf Kontakt- und Komplementsystem	Abschwächung der Aktivierung von Komplement- und Kontakt-system. Keine Nebenwirkungen.	Hack et al. 1993
Capillary-leak-syndrom	Komparativ 15 Patienten	Effizienz, Mortalität	Normalisierung von C5a und C4d, signifikante geringere Mortalität.	Nürnberger et al. 1997
Capillary-leak-syndrom	Open-label 29 Patienten	Beeinflussung CLS nach Operation am offenen Herzen	Verbesserung der Hämodynamik, respiratorischer und Laborparameter.	Stieh et al. 1996
Ischämie-Reperfusion	Open-label 22 Patienten	Effekt C1-INH 48h-Dauerinfusion nach Myokardinfarkt	Verringerung der Komplement-aktivierung, keine Nebenwirkungen, Verringerung der Gewebeverletzung.	de Zwaan et al. 2002
Sepsis	Doppel-blind randomisiert 40 Patienten	Effizienz und Sicherheit von C1-INH	Verbesserung der Organfunktion (ins. Niere), kein Effekt auf die Mortalität.	Caliezi Et al. 2002
Sepsis	Doppel-blind randomisiert 40 Patienten	PMN-Aktivierung, Organdysfunktion,	Reduktion der Komplement-aktivierung, milder Effekt auf Organdysfunktion.	Zeerlander et al. 2003
Ischämie-Reperfusion	Doppel-blind randomisiert 80 Patienten	Kardioprotektiver Effekt auf STEMI/CABG	Verbesserung des arteriellen Drucks, cariac index und Verringerung des Infarktareas.	Fattuch Et al. 2007
Sepsis	Open-label 20 Patienten	Effizienz und Sicherheit von C1-INH	Inhibition der Komplement-aktivierung und Verringerung der Mortalität	Lazareva und Ingonin 2009
Experimentell Endotoxin-ämie am Menschen	Doppel-blind Placebo-kontrolliert 20 Patienten	Immunmodulatorische Eigenschaften	Antiinflammatorischer Effekt auch ohne Komplementaktivierung	Dorresteijn Et al. 2010
Sepsis	Open-label randomisier 61 Patienten	Antiinflammatorischer Effekt, Überleben	Herunterregulierung der systemischen Inflammation durch Hochdosis C1-INH, Verbesserung des Überlebens	Ingonin et al. 2012

Tabelle 8: Klinische Studien zur C1-Esterase-Inhibitor-Substitution

3. Ziele und Fragestellungen der Arbeit

3.1 Ziele der Arbeit

Folgende Ziele wurden für die vorliegende wissenschaftliche Arbeit formuliert:

- A) Intravitalmikroskopische Untersuchung der Auswirkung einer systemischen Applikation von rekombinalem Interleukin 2 auf die Mikrozirkulation im Mesenterium der Ratte.

- B) Intravitalmikroskopische Untersuchung der Auswirkung einer C1-Esterase-Inhibitor Substitution auf die Mikrozirkulationsstörung am Mesenterium der Ratte vermittelt durch rekombinantes Interleukin 2.

3.2 Fragestellungen der Arbeit

Um den Mikrozirkulationsschaden durch die systemische Applikation von rIL2 und die Auswirkung einer Vorbehandlung mit C1-INH beurteilen zu können, mussten zunächst Daten gewonnen werden, mit denen die Behandlungsgruppen verglichen werden konnten. Daher wurde die mesenteriale Mikrozirkulation der Ratte zunächst unter „physiologischen Bedingungen“ untersucht und diese Daten als Referenz für die Behandlungseinflüsse obiger Substanzen verwendet.

Folgende Fragen wurden formuliert:

- A) Welche Auswirkung hat die systemische Applikation von rIL2
 - auf die mesenteriale Mikrozirkulation der Ratte quantifiziert durch die Leukozytenadhärenz an das Endothel?
 - auf die mesenteriale Mikrozirkulation der Ratte quantifiziert durch die Perfusion postkapillärer Venolen?
 - auf den systemischen Blutdruck?
 - auf die Plasmakonzentration von Interleukin 6?

B) Anhand folgender Fragen wird die Beeinflussung der rIL2 induzierten mesenterialen Mikrozirkulationsstörung der Ratte durch Vorbehandlung mit C1-INH untersucht:

1. Vermindert C1-INH signifikant die durch rIL2 hervorgerufene Adhärenz von Leukozyten an das Endothel postkapillärer Venolen?
2. Verbessert C1-INH die Mikrozirkulation gemessen an der Perfusion postkapillärer Venolen?
3. Hat die Applikation von C1-INH einen Einfluss auf den systemischen Blutdruck als bedeutender hämodynamischer Parameter?
4. Hat C1-INH einen Einfluss auf die am Versuchende gemessene Interleukin 6 Plasmakonzentration?

4. Material und Methoden

4.1 Material

Materialien (in alphabetischer Reihenfolge):

Arterienklemme, rostfrei, 140mm, Hammacher
Becherglas „Duran“, 5 Liter, Schott
Handschuhe Latex Examination Gloves, powder free, Ansell Medical
Kanüle Luer 26G x ½ (0,45 x 12), Terumo Neolus
Klebeband „Leukosilk“, Beiersdorf AG
Ligaturenfaden Vicryl (Sutapak) 3/0, 3 x 45 cm, violett, geflochten, Polyglactin 910
LötKolben R 539205, 230 V, 50 Hz, 100 W, Lux
LötKolbenspitze, Galvanokauter Art. 235 V, Meyer & Kerstin Medizintechnik
Nahtmaterial, resorbierbar, Ethicon
Pinzette, Mikro-Präparier-, Wironit, gebogen, spitz, 105 mm, HWC 115-10, Hammacher
Pinzette, Mikroskopier-, Wironit, gebogen, stumpf, 105 mm, HWC 071-10, Hammacher
Pinzette, Stahl 18-8, poliert, spitz, gebogen, 145 mm, Keller
Reaktionsgefäße, Eppendorf 3810, 1,5 ml, Eppendorf-Nettler-Hinz GmbH
Schere, Wironit, gebogen, spitz-stumpf, rostfrei, 130mm, HWB 041-13, Hammacher
Schere, Wironit, gerade, spitz, rostfrei, 115 mm, HWB 002-11, Hammacher
Schere, Mikro-Präparier-, gerade, nichtrostend, 90 mm, HSB 504-10, Hammacher
Schere, Mikro- , gerade, nichtrostend, 80 mm (Vanas), HSB 534-08, Hammacher
Spritzen, Injekt Luer Lock, 2 ml, 5 ml, 20 ml, Braun Melsungen AG
Spritze, Injekt F Luer Lock, Tuberkulin, 1 ml, Braun Melsungen AG
Stickstoffbehälter 35 HC, 35 Liter, Union Carbide
Waage „Sartorius 2357“, SartoriusZelletten, 4 x 4 cm, No. 13 350, Firma Lohmann

Kathetersystem bestehend aus:

Mikroschlauch, Micro-Tubing aus PE, 0,58/0,96 mm, Neolab
Verbindungsstück: Silikonschlauch, transparent, 0,5 x 2,5 mm, Deutsch & Neumann
Anschlussstück: Kanüle Luer 18G x 1 1/2“, 1.2 x 40, Terumo Neolus
Verschlusskonus: Verschlusskonus Combi rot, Braun Melsungen AG

Infusionssystem (Nummer 1) bestehend aus:

Org. Perfusorleitung Typ N, Länge 150 cm, Luer Lock, Art. Nr. 872296-D, Braun
Melsungen AG

Perfusorspritze 25 ml, Org. Perfusorspritze Nr. 08728798, Braun Melsungen AG

Perfusor, Typ VI TYP 871222-0 Nr. 09438, Braun Melsungen AG

Infusionssystem (Nummer 2) bestehend aus:

Perfusorleitung, siehe oben

Perfusorspritze, Perfusion Plastipac, 50 ml, Becton Dickinson

Perfusor, Typ Secura 871702-8, Nr. 3047, Braun Melsungen AG

Infusionssystem (Nummer 3) bestehend aus:

Haward Syringe Pump 22, FMI GmbH

Perfusorspritze, Injekt-F Luer Lock, 1 ml, Braun Melsungen AG

Geräte und Apparate (in alphabetischer Reihenfolge):

Druckmonitor Hewlett Packard Nr. 78342A, Hewlett Packard

Drucknehmer „Combitrans Monitoring-Set“ Model II, Art.-Nr. 05201675, Braun
Melsungen AG

Plexiglasplatte mit eingelassenem Objektträger

Rasierapparat „Precise Family“ Model Nummer 2559, WIK

Warmwasserumlaufpumpe Julabo V, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach

Wasserbehälter Julabo F-10, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach

Zentrifuge Rotixa RP, Hettich

Mikroskop: alles Carl Zeiss GmbH

Mikroskopstativ Axiovert 135 mit integriertem 5-fach Revolver

Mikroskoptisch 100/135, heizbar

Temperaturregler TRZ 3700

Objektführer 85 x 130 mm

Träger für Durchlichtbeleuchtung, schwenkbar

Lampengehäuse HAL mit Kollektor, Rückspiegel, Lampenfassung und Wärmeschutzfilter

Halogenlampe 12 V, 100 W

Objektiv LD „Archoplan“ 40 x /0,60 Korr. PH

LD Kondensator 0,55 H, PH 1, 2, DIC mit Irisblende

DIC Prisma 0,3-0,4/0,55

Reflektorschieber 3 FL

Filterkombination 487910-0000

Binokularer Phototubus mit Schiebepisma 45° / 20 mit Strahleneinteilung 70/30

Kamera, Videokamera 3 CCD, Modell DXC-930P, Seriennummer 13904, Sony
Videorecorder AG-7350, Panasonic
RS-232-Interface
Video Colour Monitor, MT-H 1480, Panasonic
Video Kassetten VHS E240 HQ, Fuji

Computer:

PC Pentium 75 MHZ, PCI
Monitor MS 1585P, Seriennummer UI20127
Bildverarbeitungskarte Matrox IP-8/AT/2MC, Seriennummer 08221

Versuchstiere:

CD-Ratten, männlich, Gewicht: 300–450 g, Charles River

Medikamente / Reagenzien (in alphabetischer Reihenfolge):

Aldesleukin (Proleukin®), Charge EI00D30/3, Chiron GmbH
C1-Esterase-Inhibitor Berinert P®, Charge 0686211, Behringwerke AG
Ethrane® (Enfluran), Charge 83461TF, Abbott GmbH
Infusionslösung, Isotone Kochsalzlösung 0,9%ig, Braun Melsungen AG
Natriumcitrat 3,13%ig, Charge 8342A95, Braun Melsungen AG
Paraffine, dünnflüssig, Charge K29108374, Merck
Pentobarbitalnatrium (Narcofen®), Charge 101050, Merial
Ethylcarbammat (Urethane®), EC-Nr. 200-123-1, Charge 10K1644, Sigma

Plasmabestimmungen:

Rat Interleukin 6 Immunoassay Kit, Catalog KRC 0061, Biosource International,
Camarillo, California, USA

4.2

Methoden

4.2.1

Gruppeneinteilung und Versuchsprotokoll

Für die intravitalmikroskopische Untersuchung der Leukozytenadhäsion an das Endothel postkapillärer Venolen wurden drei Untersuchungsgruppen definiert. Diese bestehen aus einer Kontrollgruppe, einer Interleukin-2-Gruppe und einer Interleukin-2-Gruppe mit Vorbehandlung durch C1-Esterase-Inhibitor.

4.2.1.1

Versuchsgruppen und Infusionsplan

Zeit	Versuchsgruppe	Kontrolle	Interleukin 2 (Aldesleukin)	C1-Esterase-Inhibitor
	Tierzahl	n = 5	n = 5	n = 5
- 80 min.	Beginn der Präparation			
- 75 min.	Katheterisierung der V. Jugularis	0,3 ml/h NaCl über 255 min.	0,3 ml/h NaCl über 75 min.	0,3 ml/h NaCl über 75 min.
- 70 min.	1. Entnahme von 0,5 ml Blut	0,5 ml NaCl als Bolus	0,5 ml NaCl als Bolus	0,5 ml NaCl als Bolus
- 20 min.				500 I.E./kgKG C1-Inh. über 10 min.
0 min.	Beginn der Videoaufnahme		6 mio. I.E./kg Aldesleukin über 80 min.	6 mio. I.E./kg Aldesleukin über 80 min.
80 min.			0,3 ml/h NaCl über 100 min.	0,3 ml/h NaCl über 100 min.
180 min.	2. Entnahme von 0,5 ml Blut			
180 min.	Versuchende	0,5 ml Nembutal	0,5 ml Nembutal	0,5 ml Nembutal

Tabelle 9: Versuchsgruppen und Infusionsschema

Nach Katheterisierung der V. jugularis (t = - 75 min.) erhielten die Tiere aller Untersuchungsgruppen eine kontinuierliche Volumensubstitution (0,3 ml/h) mit physiologischer Kochsalzlösung und weitere 0,5 ml als Bolus im Anschluss an die Blutentnahme. Der Kontrollgruppe wurden keine weiteren Substanzen zugeführt. Alle anderen Versuchsgruppen erhielten nach Beginn der Videoaufnahme (t = 0) 6.000.000 I.E./kgKG rIL-2 über 80 Minuten. Die Tiere der Behandlungsgruppe bekamen zusätzlich in Form einer Kurzinfusion über 10 Minuten 500 I.E./kgKG C1-Esterase-Inhibitor verabreicht. Im Rahmen der Vorbehandlung begann dies 20 Minuten (t = - 20 min.) vor dem Start der rIL-2-Infusion. Für alle Versuchsgruppen wurde ein Beobachtungszeitraum von 180 Minuten festgelegt. Unmittelbar nach Versuche wurden die Tiere mit 0,5 ml Nembutal getötet.

4.2.2 Versuchsdurchführung

4.2.2.1 Dosierung und Umgang mit den Substanzen

Die verwendeten Substanzen wurden folgendermaßen hergestellt und in den beschriebenen Dosierungen verabreicht:

Urethan 30%: In 417 ml physiologischer Kochsalzlösung wurden 125 g Ethylcarbamat gelöst und in einer Dosierung von 6 ml/kgKG intramuskulär injiziert.

Heparin: Zur Spülung des Drucknehmers sowie des Carotis-Katheters wurden 50 µl Liquemin (250 I.E. Heparin) auf 20 ml NaCl zugegeben.

rIL2: 52,5 mg Trockensubstanz (18.000.000 I.E.) wurden in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und anschließend in Eppendorf-Cups zu jeweils 150 µl bei -18°C eingefroren. Die Dosierung lag bei 6.000.000 I.E. /kgKG, gelöst in 0,4 ml NaCl .

C1-Esterase-Inhibitor: Vor dem jeweiligen Versuch wurden 500 I.E. Inhibitor in 5 ml NaCl gelöst. Die Dosierung lag bei 5 ml /kgKG, entsprechend 500 I.E. /kgKG.

4.2.2.2 Vorbehandlung

Die Tierexperimente wurden nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der zuständigen Tierschutzkommission genehmigt (Regierungspräsidium Giessen Az.: II 25.3-19c20-15(1), GI20/10 Nr. 49/99). Die Versuchstiere wurden in einem klimatisierten Raum artgerecht in einem rostfreien Stahlkäfig gehalten und erhielten das übliche Laborfutter.

4.2.2.3

Narkose des Versuchstieres

Um einen schonenden Umgang mit dem Versuchstier zu erreichen und physischen Stress weitestgehend zu vermeiden, wurde eine Vorbetäubung mit dem schnell wirkenden Gasnarkotikum Enfluran durchgeführt. Dazu wurde das Tier in einem Becherglas 1 ml verdampftem Enfluran ausgesetzt. Nach 1 – 2 Minuten war das Tier narkotisiert, so dass es gewogen und die erforderliche Dosis des Narkotikums Urethan (6ml /kgKG) intramuskulär zu jeweils zwei Depots in beide Oberschenkel appliziert werden konnte. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde nach 30 – 40 Minuten erzielt und anhand des erloschenen Kornealreflexes überprüft.

4.2.2.4

Präparation des Versuchstieres

Hals:

Zunächst wurde der Hals sowie das linksseitige Abdomen rasiert und das Tier zur Präparation auf einer 37°C warmen Wärmeplatte fixiert. Durch stumpfe Präparation wurde am Vorderrand des rechten M. sternocleidomastoideus die V. jugularis aufgesucht und mit zwei Ligaturfäden umschlungen, wobei zunächst der kraniale Faden zur Fixation verknötet wurde. Nach Vasotomie der Vene und Einführen des beschriebenen Kathetersystems wurde auch die kaudale Ligatur zugezogen und beide zur Sicherung miteinander verknötet. Der Katheter wurde an das Infusionssystem Nummer 1 angeschlossen, um eine kontinuierliche Volumensubstitution zu gewährleisten (0,3 ml / h) und Flüssigkeitsverluste auszugleichen. Anschließend folgte die stumpfe Darstellung der A. carotis medial der Jugularvene. Der N. vagus, welcher unmittelbar der A. carotis anliegt, musste vorsichtig von der Arterie getrennt werden, um Irritationen zu vermeiden. Nach Katheterisierung der Arterie entsprechend dem Vorgehen bei der Vene wurden 0,5 ml Blut entnommen, durch einen Bolus von 0,5 ml NaCl ausgeglichen und der Carotiskatheter an den heparinisierten Drucknehmer angeschlossen. Die mit Natriumcitrat versetzte Blutprobe wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup bei 4°C und 3070 Umdrehungen / Minute über 15 Minuten zentrifugiert, das Plasma in flüssigem Stickstoff gefroren und bei – 80°C gelagert.

Alle Tiere wurden zur Unterstützung der erhaltenen Spontanatmung tracheotomiert und mit einem ca. 3 cm langen Silikonschlauch intubiert, welcher durch eine Ligatur um die Trachea mit innenliegendem Tubus fixiert wurde.

Abdomen:

Die Laparotomie wurde zur unmittelbaren Blutstillung mit einem Thermokauter durchgeführt. Der Schnitt erfolgte 1 cm lateral der Linea alba, vom Rippenbogen ausgehend nach kaudal in die Leistenregion verlaufend. Das Tier wurde auf der Plexiglasplatte in Linksseitenlage fixiert und sofort wieder mit dieser auf die Wärmeplatte verbracht. Das Zökum mit anhängender Schlinge des terminalen Ileums wurden unter leichtem Zug aus dem Abdomen hervorgeholt und auf der Plexiglasplatte am Rand des eingelassenen Objektträgers abgelegt. Der Dünndarmabschnitt mit dem aufgespannten Mesenterium wurde nun so auf dem Objektträger platziert, dass sich ein gut vaskularisiertes Areal des Mesenteriums auf dem Objektträger faltenfrei absenkte, indem dieses mit 37°C warmen Paraffinöl benetzt wurde. Das Paraffinöl schützt das Mesenterium vor äußeren Einflüssen und stellt bei der Mikroskopie kein optisches Hindernis dar. Der Bereich außerhalb des für die Videodokumentation wichtigen Areals wurde mit in physiologischer Kochsalzlösung getränktem Zellstoff und Latex bedeckt, um ihn vor Austrocknung zu schützen. Die Plexiglasplatte mit aufliegendem Versuchstier konnte nun auf den vorgewärmten Mikroskoptisch überführt werden.

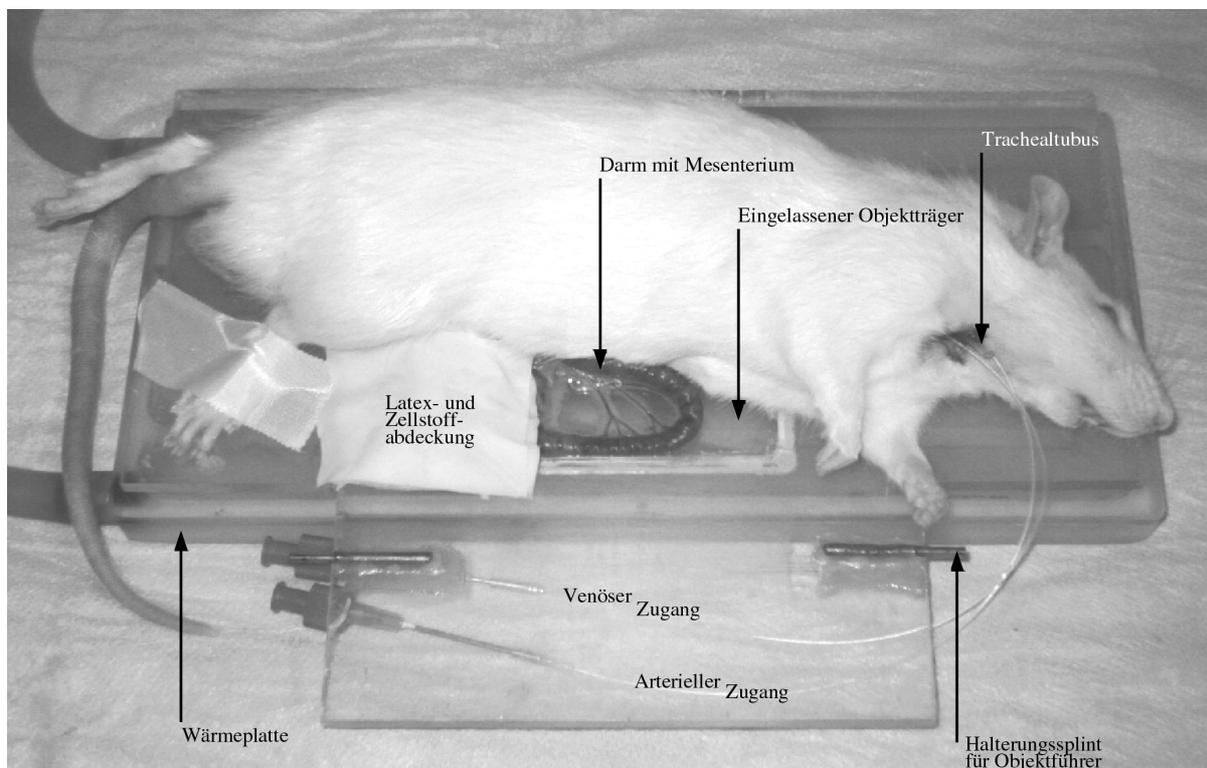


Abbildung 15: Präparierte Ratte mit ausgelagertem Darm

Der Drucknehmer für den arteriellen Blutdruck wurde an den Monitor angeschlossen und der Jugularvenenkatheter an das Infusionssystem Nummer 2 angeschlossen, um die Volumenzufuhr kontinuierlich fortzuführen. In das Rektum der Ratte wurde eine Temperatursonde eingeführt. Vor dem Versuchsbeginn musste eine Äquilibrationsphase von 45 Minuten eingehalten werden, da das Präparationstrauma Einfluss auf die Mikrozirkulation hat und sich nach diesem Zeitraum wieder annähernd normale Verhältnisse in den perfundierten Arealen einstellen konnte. Die Applikation der Substanzen in den Untersuchungsgruppen erfolgte nach dem Infusionsschema (siehe Tabelle 9, Seite 68) über das Infusionssystem Nummer 3.

4.2.3 Durchgeführte Messungen und Untersuchungen

Mikroskopie: Mittels Phasenkontrastmikroskopie wurde in der Mikrozirkulation im Bereich der postkapillären Venolen die Leukozytenadhäsion und der Blutfluss untersucht. Die Dokumentation und Auswertung erfolgte computergestützt über Videobänder.

Körpertemperatur: Da die Mikrozirkulation wesentlich von der Temperatur beeinflusst wird, wurde während eines jeden Versuches die Körperkerntemperatur gemessen und im Abstand von 20 Minuten protokolliert. Die Temperatur des ausgelagerten Darms wurde über den auf 37°C geheizten Mikroskoptisch konstant gehalten.

Blutdruck: Der arterielle systolische und diastolische Blutdruck wurde über den mit dem Katheter in der A. carotis verbundenen Drucknehmer und einem Monitorsystem kontinuierlich gemessen. Die Protokollierung erfolgte alle 20 Minuten.

Blutprobe / Interleukin 6: Aus dem Carotiskatheter wurde nach Kanülierung und am Versuchende jeweils eine Blutprobe von 0,5 ml entnommen und das schockgefrorene Plasma bei – 80°C gelagert. In den Plasmaproben wurde mit einem IL-6 Immunoassay für Ratten das Interleukin 6 quantitativ bestimmt.

4.2.4 Intravitalmikroskopie und Videodokumentation

Die Intravitalmikroskopie stellt ein etabliertes in vivo Verfahren zur Untersuchung der Mikrozirkulation dar. Das dünne und transparente Rattenmesenterium ist zur Beurteilung der

Leukozytenadhäsion und des Blutflusses in postkapillären Venolen besonders geeignet [Menger et al. 1999].

4.2.4.1 Phasenkontrastmikroskopie

Vor Beginn der Videoaufzeichnung wurde das ausgelagerte Mesenterium auf eine ausreichende Anzahl perfundierter Gefäße, präparatorische Artefakte (z.B. Lufteinschlüsse) und Gewebeschäden (z.B. Blutungen, Einrisse) mittels Übersichtsvergrößerung (x50) untersucht. Bei ungenügendem Gefäßreichtum, sistierendem Blutfluss oder bei Schädigung des Mesenteriums wurde der Versuch abgebrochen. Über einen Zeitraum von drei Stunden wurden bei 400-facher Vergrößerung 3–8 postkapilläre Venolen mit einem Durchmesser von 18 – 45µm im Mikroskopierfeld eingestellt und jeweils für eine Minute aufgezeichnet. Im Abstand von 20 Minuten wurde dieser Vorgang wiederholt, wobei der Feintrieb des Objektführers eine wiederholbare und exakte Einstellung der Venolen ermöglichte. Pro Gefäß wurden somit zehn Messungen durchgeführt. Unmittelbar nach jedem Untersuchungsgang wurde die Beleuchtung des Mikroskops ausgeschaltet, um die Wärmebelastung des Mesenteriums möglichst gering zu halten.

4.2.4.2 Videodokumentation

Die Videoaufzeichnung erfolgte über eine im Strahlengang des Mikroskopes befindliche 3CCD Videokamera. Das Ausgangssignal der Kamera war mit dem Videorekorder verbunden, der die eingestellten Gefäßareale in Echtzeit aufnahm. Der Videorekorder war über ein RS 232 Interface mit dem PC verbunden und über diesen steuerbar. Auf einem zwischengeschalteten Farbmonitor erfolgte die Betrachtung und spätere Auswertung der Mikrozirkulation. Eine Digitalisierung der Videobänder in Echtzeit bei einer Auflösung von 512 x 512 Bildpunkten mit 256 Graustufen wurde durch die Bildverarbeitungskarte mit einer Speicherkapazität von 2 MByte ermöglicht.

4.2.5 Auswertung der Videoaufzeichnung

Für die digitale Auswertung der auf Video aufgezeichneten Untersuchungen wurde das in der Mikrozirkulationsforschung validierte Bildanalyzesystem „Cap-Image“ von Herrn Dr. Dipl. Ing. Zeintl (Ingenieurbüro Heidelberg) verwendet.

4.2.5.1

Messung des Blutgefäßdurchmessers

Zur Bestimmung des Gefäßdurchmessers wurde zunächst das Videobildanalyzesystem „Cap-Image“ auf die unterschiedlichen Vergrößerungen des Mikroskops kalibriert. Eine Neubauer-Zählkammer mit definierten Kantenlängen diente hierfür als Referenzmaß. In jeder der aufgezeichneten postkapillären Venolen erfolgte zu Beginn der Auswertung eine Messung des Gefäßdurchmessers und eine Markierung eines 70 µm langen Gefäßabschnitts.

4.2.5.2

Quantitative Messung der Leukozytenadhäsion

Auf einer 70 µm langen Gefäßstrecke einer postkapillären Venole wurden alle wandadhärenten Leukozyten, welche bei erhaltener Gefäßperfusion über einen Zeitraum von mindestens 30 Sekunden ortsständig blieben, gezählt. Hierzu wurde jeder Gefäßabschnitt anhand von zwei Videobildern nach der „frame by frame“ Methode im Abstand von 30 Sekunden analysiert. Diese Messung wurde innerhalb des aufgezeichneten Beobachtungszeitraumes von drei Stunden alle 20 Minuten wiederholt. Bei Gefäßen, in denen der Blutfluss während des Versuches zum Erliegen kam, wurden die adhärennten Leukozyten bis zum Eintritt der Stase gezählt und entsprechend bewertet. Ab dem Zeitpunkt der sistierenden Perfusion erfolgte keine weitere Messung. Das Fehlen eines Messwertes im Verlauf des Experimentes wurde statistisch berücksichtigt.

4.2.5.3

Perfusion postkapillärer Venolen

Die Blutflussgeschwindigkeit der Blutsäule in einem Gefäß kann mit Cap-Image durch Korrelationsberechnung der Verschiebung ihres Grauwertprofiles zwischen zwei Halbbildern gemessen werden. Da bei 400facher Vergrößerung diese Verschiebung innerhalb von 0,2 Sekunden (Zeitintervall zwischen 2 Vollbildern bei 50 Bildern/Sekunde) derart groß ist, konnte die Berechnung der Blutflussgeschwindigkeit nicht zuverlässig durchgeführt werden. Um die Perfusion des venösen Schenkels der Mikrozirkulation dennoch beurteilen zu können, erfolgte zeitgleich der Zählung wandadhärenter Leukozyten die Erfassung postkapillärer Venolen mit stagnierendem Fluss. Als Maß für die Gefäßperfusion einer Untersuchungsgruppe dient der Quotient „nicht perfundierte Venolen/beobachtete Venolen“ angegeben in Prozent.

4.2.6

Datenverarbeitung und Statistik

Die Dokumentation der Messwerte erfolgte mit einem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel). Die statistische Auswertung erfolgte durch Herrn Dr. Gerrit Eichner/ Mathematisches Institut der Justus-Liebig-Universität Giessen.

4.2.6.1

Leukozytenadhäsion

Die Angabe der Anzahl adhärenter Leukozyten erfolgt in Bezug zur inneren Gefäßoberfläche (Leukozyten pro Quadratmillimeter (Sticker/mm²)) für jeden Messzeitpunkt. Die Gefäßoberfläche einer jeden Venole wurde unter der Annahme eines zylindrischen Gefäßquerschnitts mittels des Durchmessers (d) und der Gefäßstreckenlänge (l) nach der Formel $2 \times \pi \times d/2 \times l$ berechnet.

4.2.6.2

Gefäßperfusion

Als Maß für die Gefäßperfusion dient der Quotient „nicht perfundierte Venolen/beobachtete Venolen“, angegeben in Prozent. Dafür wurden für jeden Messzeitpunkt die Gesamtzahl nicht perfundierter Venolen aller Versuchstiere einer Untersuchungsgruppe addiert und in Bezug zur Anzahl aller beobachteten Venolen dieser Gruppe gesetzt. Diese Daten sind in graphischer und tabellarischer Form dargestellt (siehe Tabelle 10, S. 75 und Abb. 18, S. 76).

4.2.6.3

Blutdruck und Rektaltemperatur

Für den mittleren arteriellen Blutdruck und wurde für jeden Messzeitpunkt der arithmetische Mittelwert einer Untersuchungsgruppe berechnet und in graphischer Form dargestellt (siehe Abb. 19, S. 77). Die Rektaltemperatur diente der Überwachung einer konstanten Körpertemperatur. Die Rektaltemperatur blieb in den einzelnen Versuchsgruppen mit einer maximalen Schwankung von 0,2°C konstant.

4.2.6.4

Interleukin 6

Aus den jeweils zu Beginn und Ende des Versuches gewonnenen Blutproben wurden die Interleukin-6-Plasmaspiegel bestimmt und der Mittelwert und die Standardabweichung für jede Versuchsgruppe errechnet. (siehe Tabelle 9, S. 78)

Die statistische Aufarbeitung der erhobenen Versuchsdaten der Leukozytenadhäsion verfolgte das Ziel,

- ein Modell herzuleiten, das den zeitlichen Verlauf der adhärenenten Leukozytendichte arithmetisch beschreibt,
- zu beurteilen, ob und wie die Behandlungen den eben genannten zeitlichen Stickerdichte-Verlauf beeinflussen (d. h., ob es zwischen den Behandlungen Unterschiede in der Abhängigkeit der Stickerdichte von der Zeit gibt),
- die inter-individuelle und die inter-vaskuläre Variabilität der zeitlichen Verläufe nach Berücksichtigung von Behandlungseffekten zu quantifizieren (d.h. innerhalb einer Behandlungsgruppe die zwischen den Gefäßen innerhalb eines Individuums und zwischen den Individuen beobachtbare Variabilität der zeitlichen Verläufe zu beziffern).

Statistische Methoden: Für die Analyse der Stickerdichte-Verläufe wurde ein (hierarchisches) lineares mixed-effects Modell (mit zwei Hierarchie-Levels) verwendet (siehe z. B. Brown und Prescott, 1999 [S. 18-25, S. 235-239]; Diggle, Liang und Zeger, 1995 [Abschnitt 5.2, insb. 5.2.4]). In ihm wurde einerseits der longitudinale Charakter der Daten berücksichtigt und andererseits, dass auf dem Level der Individuen zwischen den (als zufällige Stichprobe gezogenen) Individuen stochastische Variation im untersuchten Stickerdichte-Verhalten existieren kann und auf dem darunter liegenden Level der Gefäße zwischen den (ebenfalls zufällig ausgewählten) Gefäßen genauso. Dies würde in konventionellen fixed-effects Modellen nicht gesondert beachtet. Das erstellte mixed-effects Modell ist eine lineare Regression von Stickerdichte an Zeit und Behandlung mit

- fixed effects, die den mittleren zeitlichen Stickerdichte-Verlauf beschreiben und seine Abhängigkeit von den Behandlungen (= die Interaktion zwischen Zeit und Behandlung)
- random effects, die die hierarchische, nach Individuen und Gefäßen in Individuen „gruppierende Struktur“ der Longitudinaldaten abbilden, sowie die inter-individuelle und die inter-vaskuläre Variabilität in den Stickerdichte-Verläufen ermöglichen.

Die Methodik der mixed-effects Modelle gestattet es, systematische Unterschiede (= fixed effects) in den mittleren Stickerdichte-Verläufen zwischen den Behandlungen unter Beachtung der Verläufe-Variabilität aufgrund individueller und gefäßspezifischer Einflüsse (beides sind random effects) zu beurteilen. Die Verwendung von random effects führt

nämlich zu adäquaten Schätzern für die fixed effects (hier für Zeit, Behandlung sowie deren Interaktionen) und deren Standardfehler. Gleichzeitig dämpfen random effects den Einfluss extremer Beobachtungen (= „potenzielle Ausreißer“) auf die fixed effects.

Darüber hinaus können innerhalb der Behandlungsgruppen für jeden Zeitpunkt die inter-individuelle und die inter-vaskuläre Variabilität der Stickerdichte quantifiziert werden (und z.B. mit der intra-vaskulären Variabilität verglichen werden).

Statistik-Software und Literatur: S-PLUS 6.0 of the Data Analysis Products Division of MathSoft, Seattle, Washington/USA, with the “nlme”-library version 3.3.1 for mixed-effects models by Pinheiro and Bates, 2001.

Bemerkung: Die explorative Analyse der Longitudinaldaten legte zwar eine nicht-lineare Beziehung zwischen der Stickerdichte und der Zeit nahe, zeigte aber, dass Polynome niedrigen Grades in der Zeit (für die fixed und die random effects) eine ausreichende Approximation jener Beziehung innerhalb des betrachteten, dreistündigen Zeitraums bieten würden.

Die Daten der Gefäßperfusion wurden mit einer Cox Proportional Hazards Regression analysiert [Cox 1972]. (Funktion „coxph“ aus dem Package „survival [Therneau 2009], Version 2.35-8 in R, Version 2.12 [R Development Core Team 2010]).

Die Untersuchung der Daten des Blutdruckes und des Interleukin-6 Serumspiegels auf statistische Signifikanz erfolgte mit einer Varianzanalyse, sowie mit dem Tukey`s Honestly Significance Difference Test als post- hoc Test. Werte von $P < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

5.

Ergebnisse

5.1

Lichtmikroskopie

Die Leukozytenadhäsion an das Endothel postkapillärer Venolen und die Perfusion dieser Blutgefäße zur Beurteilung der Mikrozirkulation wurde mittels Durchlichtmikroskopie untersucht. Die folgenden Bilder zeigen exemplarisch die Adhärenz von aktivierten Leukozyten an das Endothel und die Transmigration der Leukozyten nach Applikation von rekombinantem Interleukin 2.

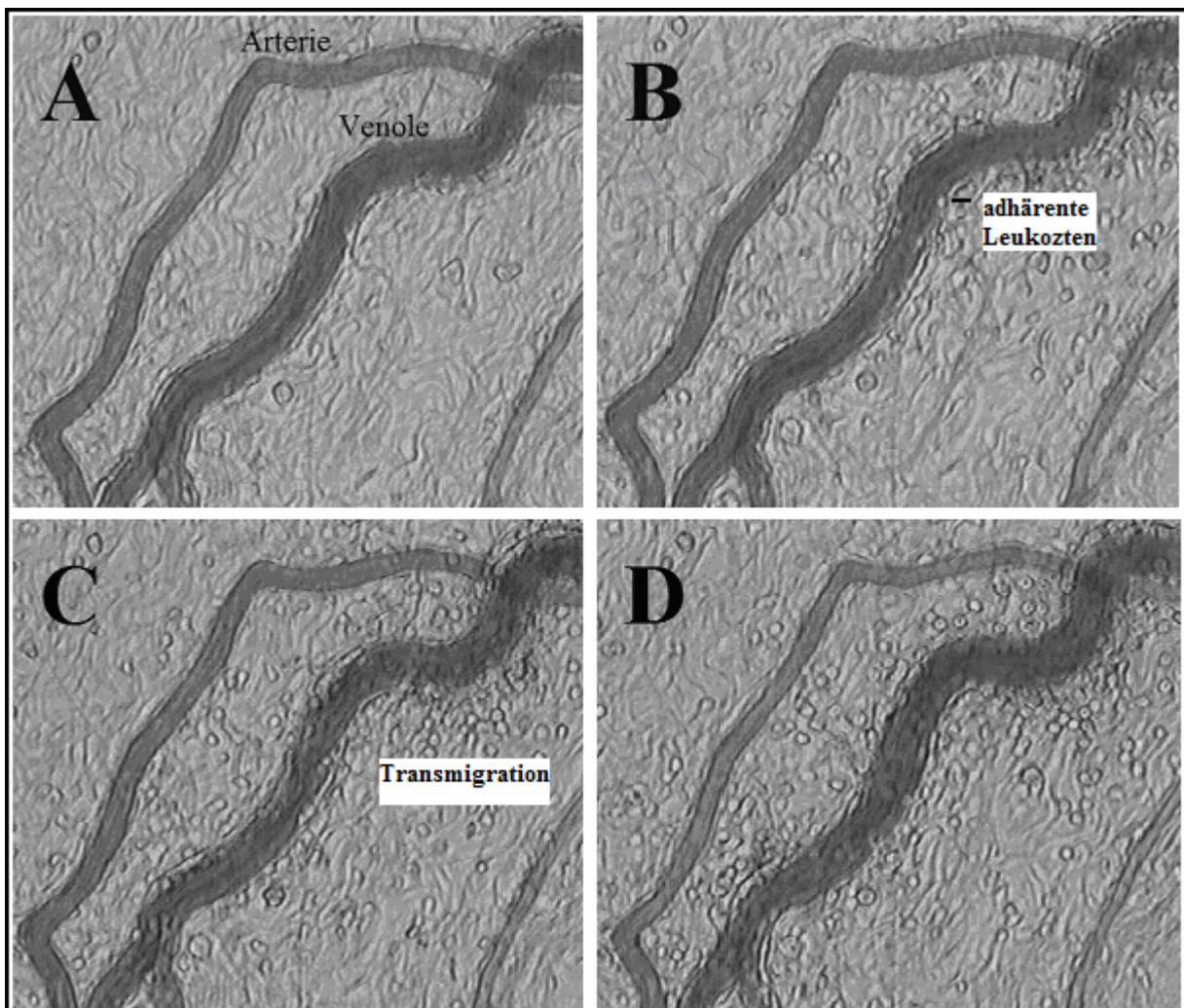


Abbildung 18: Exemplarische Darstellung einer postkapillären Venole der Versuchsgruppe rekombinantes Interleukin 2 (Applikation von 6mio. I.E./kgKG Aldesleukin über 80 Minuten ab Beginn des Versuches) bei 400facher Vergrößerung. A=0min., B= 60min., C=120min., D=180min..

Im Zeitverlauf über 3 Stunden zeigt sich eine deutliche Zunahme der adhärenenten Leukozyten bei erhaltenem Blutfluss. Des weiteren kommt es im Rahmen der Inflammation zu einer Transmigration der Leukozyten in das umliegende Gewebe. In der Kontrollgruppe und der Vorbehandlungsgruppe rIL2+C1 INH zeigte sich eine wesentlich geringere numerische Zunahme der adhärenenten Leukozyten.

5.2 Leukozytenadhäsion

Die Adhäsion von Leukozyten in postkapillären Venolen wurde als Maß ihrer Aktivierung quantifiziert und in der durchschnittlichen adhärenenten Leukozytendichte als Quotient „Leukozyten/mm²“ wiedergegeben (Abb. 5.1).

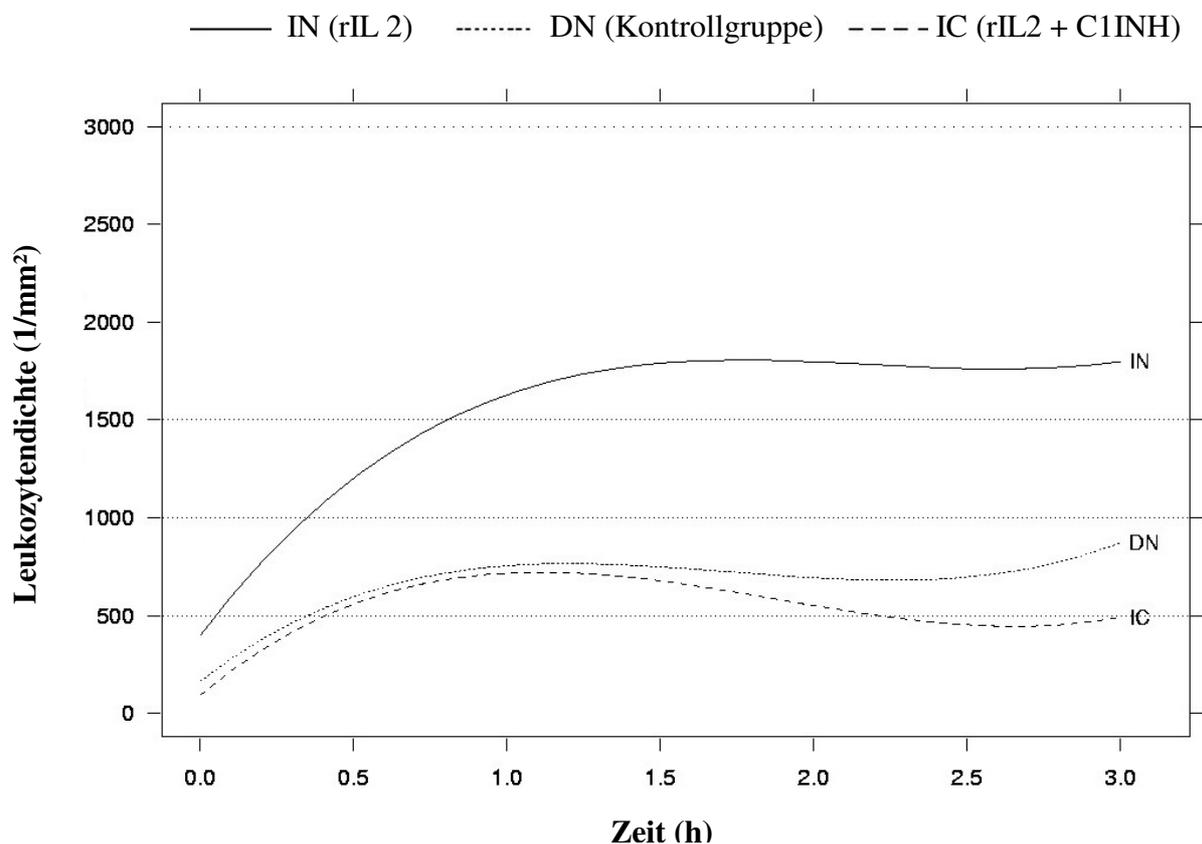


Abbildung 16: Durchschnittliche adhärenente Leukozytendichte pro mm² innerer Gefäßoberfläche über eine Strecke von 70µm. Vergleichstests: rIL2-Gruppe (IN), Kontrollgruppe (DN) und rIL2+C1-INH Vorbehandlungs-Gruppe (IC)

Die Versuchsgruppe mit Applikation von rekombinantem Interleukin 2 dient als Referenzgruppe für den Erfolg des Behandlungseinflusses durch C1-Esterase-Inhibitor in Bezug auf die Kontrollgruppe. Obige Abbildung zeigt einen deutlichen Unterschied im durchschnittlichen Verlauf der adhärenente Leukozytendichte in der Interleukin 2 Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe mit einem hochsignifikanten ($p=0.0029$) Behandlungseinfluss auf die lineare Komponente des mittleren Verlaufes der adhärenenten Leukozytendichte und einen signifikanten ($p=0.023$) Behandlungseinfluss auf seine quadratische Komponente.

Die drei Kurven der Versuchsgruppen zeigen zum Startzeitpunktes Null keinen signifikanten Unterschied ($p=0.1013$), so dass zu Beginn des Kurvenverlaufes kein wesentlicher statistischer Unterschied besteht.

Die Kontrollgruppe weist gegenüber der rIL2-Gruppe einen signifikant ($p=0.0015$) langsameren linearen Anstieg (Steigungsgrad/Stunde) der adhärenenten Leukozytendichte und eine geringere quadratische Dämpfung (quadratische Trendabweichung $p=0.0065$) auf. Die Gruppe mit C1-INH Vorbehandlung zeigt gegenüber der rIL2-Gruppe analog zur Kontrollgruppe einen signifikant ($p=0.0055$) langsameren linearen Anstieg der Leukozytendichte mit einem geringeren quadratischen Steigungsgrad ($p=0.0709$).

Betrachtet man die rIL2 Referenzgruppe, so zeigt sich ein hochsignifikanter ($p < 0.0001$) und numerisch starker, linearer Anstieg der mittleren adhärenenten Leukozytendichte, der zwar von einer hochsignifikanten ($p=0.0013$) quadratischen Komponente stark gebremst, aber von einem signifikanten ($p=0.0143$) kubischen Trend unterstützt wird, der schließlich dominiert. Insgesamt liefert dies einen starken anfänglichen Anstieg auf ein lokales Maximum, gefolgt von einem relativ flachen Plateau auf diesem Maximallevel mit folgendem leichten Abstieg auf ein lokales Minimum und einem schließlich dominierenden Wiederanstieg (dem typischen Verlauf einer kubischen Funktion).

In der Kontrollgruppe zeigt sich eine leichte Zunahme der adhärenenten Leukozyten mit einem relativ flachen Plateau über etwa 2 Stunden und einem Maximum am Versuchende. In Bezug auf die Interleukin 2 Gruppe besteht in der Kontrollgruppe ein hochsignifikanter ($p=0.0015$) geringerer linearer Anstieg und eine signifikante ($p=0.0065$) schwächere quadratische Dämpfung.

Die Gruppe Interleukin 2 + Vorbehandlung durch C1-Esterase-Inhibitor zeigt analog der Kontrollgruppe eine leichte Zunahme der adhärenen Leukozytendichte innerhalb der ersten Stunde mit konsekutiv leicht abnehmender Leukozytendichte und einem Wiederanstieg am Versuchende.

Vergleicht man die Versuchsgruppe alleiniger Interleukin 2 Applikation mit der Gruppe rIL2+C1 INH zeigt sich ähnlich der Kontrollgruppe ein hochsignifikant geringerer linearer Anstieg und eine signifikant ($p=0.00709$) schwächere quadratische Dämpfung in der rIL2+C1 INH Gruppe.

Des weiteren besteht zwischen den Versuchsgruppen ein hochsignifikanter Unterschied ($p<0.0001$) der intra-vaskulären Variabilität im Zeitverlauf der adhärenen Leukozytendichte (unter Berücksichtigung des Behandlungseffektes und zufälliger inter-individuelle und inter-vaskuläre Fluktuation), wobei sie sowohl in der Kontrollgruppe (Reduktion auf 63%, $p<0.0001$), als auch in der rIL2+C1 INH Gruppe (Reduktion auf 67%, $p<0.0001$) jeweils hochsignifikant kleiner ist als in der rIL2 Gruppe.

Die Kombination der Resultate der behandlungsspezifischen durchschnittlichen adhärenen Leukozytendichte mit entsprechendem Verlauf der stochastisch technischen Einflüsse (intra-individueller Variation), gefäßspezifischer Verläufe (inter-vaskuläre Variation) und individueller Verläufe (inter-individuelle „rattenspezifische“ Variation) lässt sich gesondert für jede Versuchsgruppe mit entsprechenden Hierarchie-Level spezifischen Standardabweichung graphisch darstellen (Abb. 17, S 73).

Die Analyse der zeitlichen Verläufe der adhärenen Leukozytendichte in einem hierarchischen Modell mit zwei Hierarchie-Leveln und drei unabhängigen Variabilitätsquellen erlaubt es innerhalb der Behandlungsgruppen für jeden Zeitpunkt die inter-individuelle (Covarianzmatrix Ψ , random rat effect vector) Variabilität des äußeren Levels und die inter-vaskuläre Variabilität (Covarianzmatrix Λ , random vessel effect vector) des inneren Level der adhärenen Leukozytendichte zu quantifizieren. Die dritte Variable stellt die intra-individuelle Variation im Sinne der stochastisch technischen Messfehler quantifiziert durch die Standardabweichung dar.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Eingrenzung der spezifischen Einflüsse der Variabilitätsquellen der einzelnen Versuchsgruppen durch die dazugehörige Standardabweichung.

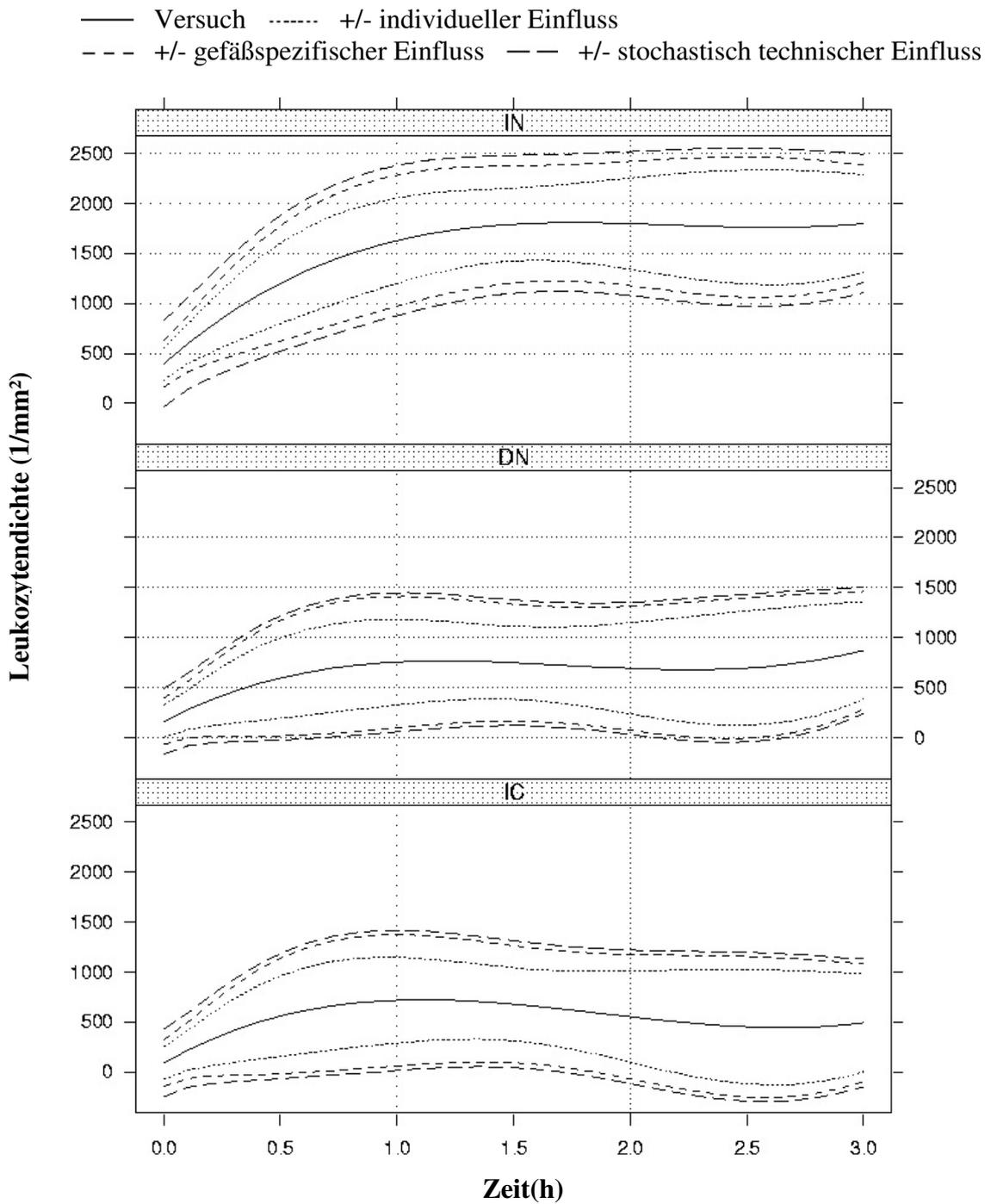


Abbildung 17: Behandlungsabhängige durchschnittliche „Grauzone“ im zeitlichen Verlauf durch Hierarchielevel-spezifischer punktwiser Eingrenzung durch die Standardabweichung (rIL2-Gruppe (IN), Kontrollgruppe (DN), rIL2+C1-INH Vorbehandlungs-Gruppe (IC))

Zusammenfassung

Die Behandlung mit Interleukin 2 induziert eine hochsignifikante Adhärenz von Leukozyten an postkapillären Venolen. Ein signifikanter Unterschied der adhärennten Leukozytendichte zwischen der Kontrollgruppe und der Interleukin 2 Referenzgruppe durch Vorbehandlung mit C1-Esterase-Inhibitor besteht nicht. Der Behandlungseinfluss der Vorbehandlung mit C1-Esterase-Inhibitor ergibt, analog der Kontrollgruppe, gegenüber der Gruppe mit alleiniger Applikation von Interleukin 2 eine hochsignifikante geringere adhärennte Leukozytendichte in postkapillären Venolen.

5.3 Perfusion postkapillärer Venolen

Zeit (h:min)		0:00	0:20	0:40	1:00	1:20	1:40	2:00	2:20	2:40	3:00
	Gruppe										
Anzahl der perfundierten Venolen gesamt	Kontrolle	29	29	29	29	29	28	28	28	28	28
	rIL2	30	30	30	30	29	28	26	26	25	25
	rIL2+C1 INH	32	32	32	32	31	31	31	31	31	31
Anzahl der Venolen in Stase in Prozent	Kontrolle	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3
	rIL2	0	0	0	0	3	7	13	13	17	17
	rIL2+C1 INH	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3

Tabelle 8: Absolutzahl perfundierter Venolen und prozentualer Anteil der Venolen mit Stase des Blutflusses

Als Maß für die Gefäßperfusion einer Untersuchungsgruppe dient der Quotient „nicht perfundierte Venolen/beobachtete Venolen“ angegeben in Prozent. Die Tierzahl beträgt für jede Untersuchungsgruppe n=5. Die Gesamtzahl der beobachteten postkapillären Venolen aller drei Versuchsgruppen beträgt n=91. Alle Tiere überlebten bis zum Versuchende. In der Kontrollgruppe (t=60min) und der Behandlungsgruppe rIL2+C1 INH (t=80min) sistierte bei jeweils einem Gefäß der Blutfluss. Am Versuchende sind in diesen beiden Gruppen jeweils noch 97% der Gefäße perfundiert. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen besteht nicht (p=0.95). Die rIL2 Gruppe zeigt ab 1:20 eine stetige Abnahme der perfundierten Gefäße. Mit Zunahme der adhärennten Leukozyten und dem damit verbundenen mechanischen intravasalen Hindernis für den Blutfluss ließ sich mit bloßem

Auge eine Abnahme der Blutflussgeschwindigkeit bei der rIL2 Gruppe sehen. Die visuell beobachtete Flussgeschwindigkeit in der Kontrollgruppe und rIL2+C1 INH war nahezu konstant. Dieses Phänomen ließ sich jedoch nicht quantifizieren (siehe Kapitel 4, S66).

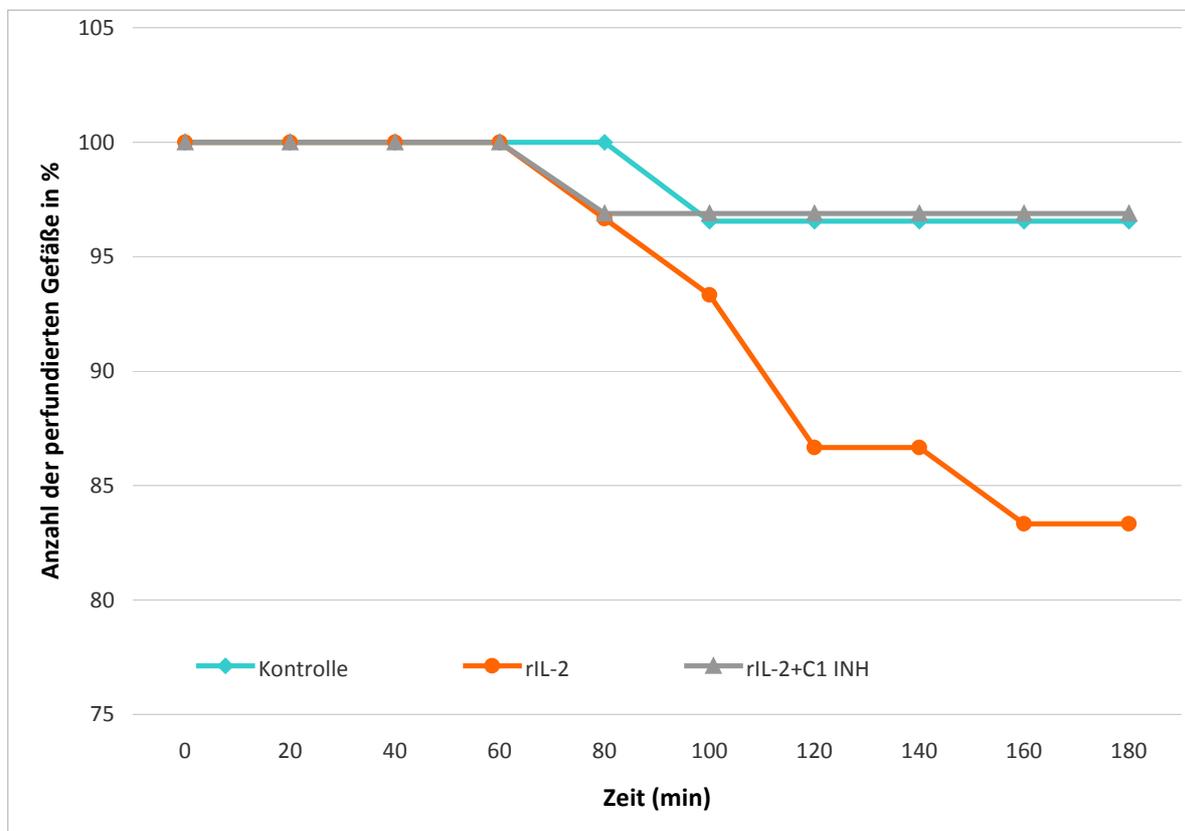


Abbildung 18: Prozentualer Anteil der durchflossenen Venolen an den beobachteten Venolen einer Versuchsgruppe als Maß der Perfusion des postkapillären Schenkels im Mesenterium der Ratte über drei Stunden.

Die Graphik der Abbildung 18 zeigt eine deutliche Abnahme der prozentualen Anzahl der perfundierten Gefäße der rIL2-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe und der Vorbehandlungsgruppe rIL2+C1 INH. Zu Beginn der zweiten Versuchsstunde sind in der rIL2-Gruppe 87% der Gefäße (26 von 30 Gefäßen) und am Ende des Versuches 83% der Gefäße (25 von 30 Gefäßen) perfundiert. In diesem Zeitraum sind in der Kontrollgruppe (28 von 29 Gefäßen) und in der Vorbehandlungsgruppe rIL2+C1 INH (31 von 32 Gefäßen) 97% der Gefäße perfundiert. Die Vorbehandlungsgruppe rIL2+C1-INH zeigt im Vergleich zu der IL2-Referenzgruppe eine Verminderung der rIL2 induzierten Abnahme der Gefäßperfusion. Statistische Signifikanz besteht nicht ($p=0.22$).

5.4

Blutdruck

Der arterielle systolische und diastolische Blutdruck wurde über die Arteria carotis invasiv gemessen. Die drei Versuchsgruppen zeigen in der ersten Versuchsstunde einen Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes, welcher im weiteren Verlauf deutlich abflacht und in der letzten Stunde zum Versuchsende hin nahezu konstant erscheint.

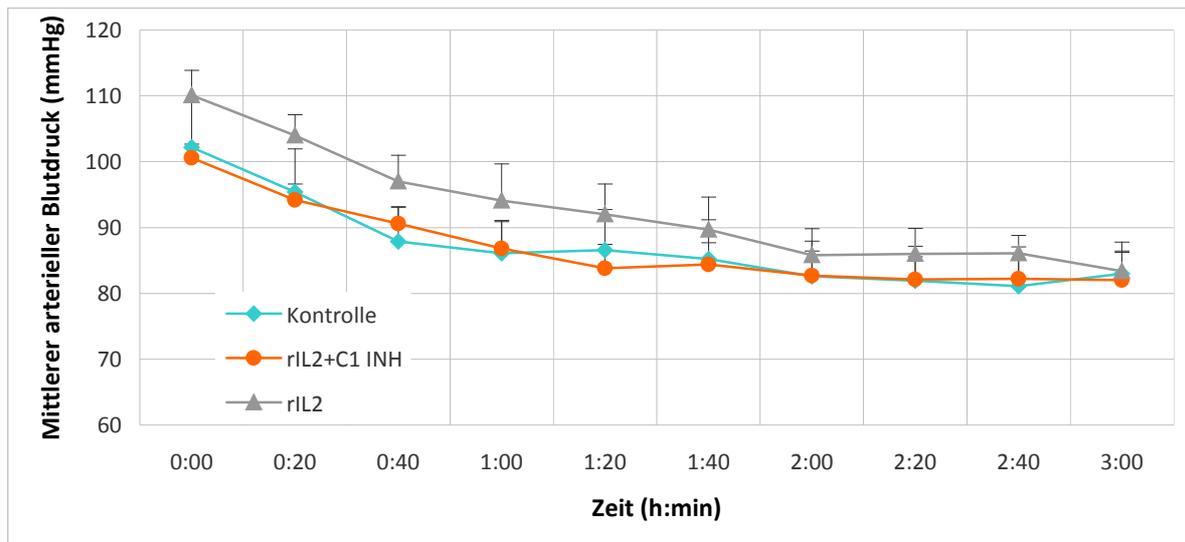


Abbildung 19: Mittlerer arterieller Blutdruck über 3 Stunden Versuchszeit

Der Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes über die Versuchszeit ist in der rIL2-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe und der Vorbehandlungsgruppe rIL2+C1 INH tendenziell ausgeprägter. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ergeben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

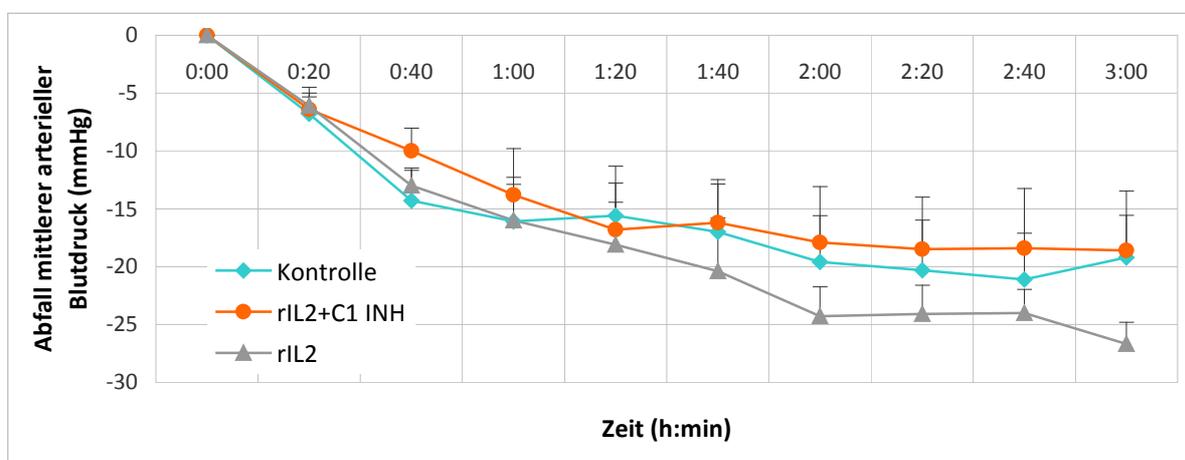


Abbildung 20: Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes über 3 Stunden Versuchszeit

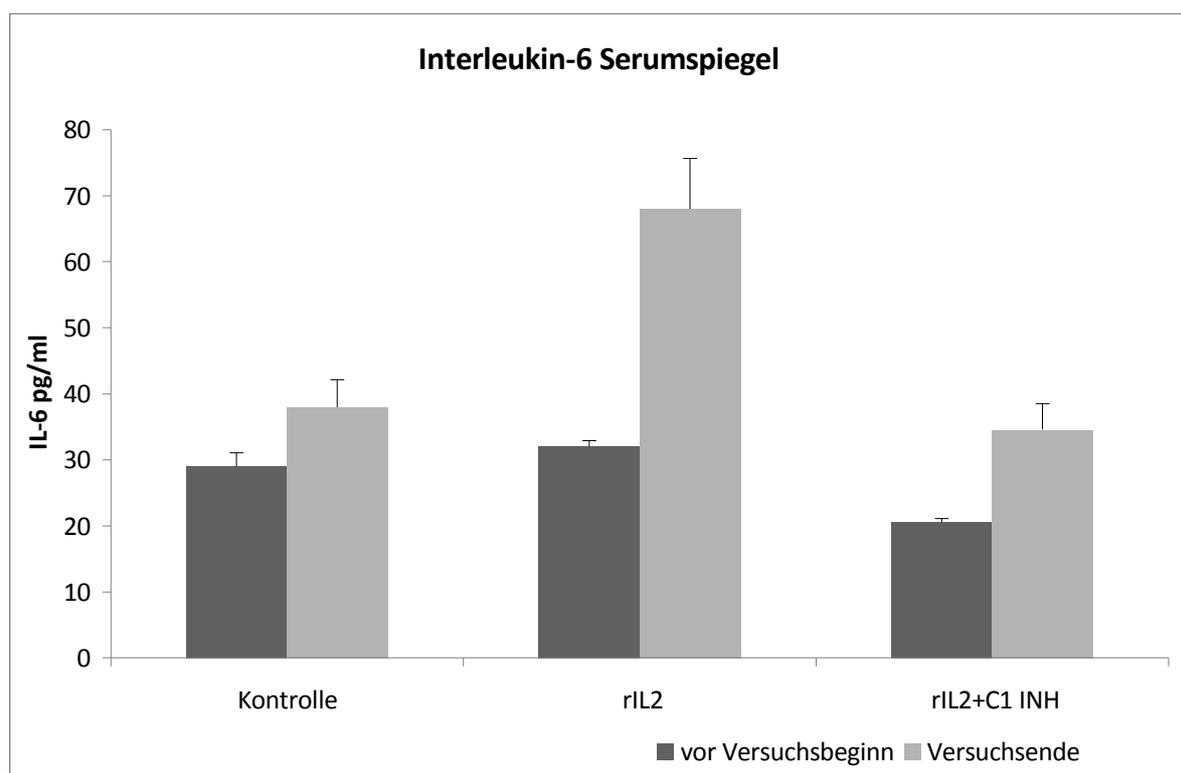


Abbildung 21: Interleukin 6 Serumspiegel vor Versuchsbeginn und am Versuchende

Die Abbildung 21 zeigt das arithmetische Mittel des Interleukin 6 Serumspiegels der drei Versuchsgruppe (je n=5) jeweils vor Versuchsbeginn und am Versuchende. Die Graphik verdeutlicht den Anstieg des Interleukin 6 Serumspiegels in der rIL2-Gruppe in Bezug zum Ausgangswert vor Versuchsbeginn. In der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe rIL2+C1 INH ist der Anstieg des Interleukin 6 Serumspiegels deutlich geringer ausgeprägt. Die Tabelle 11 fasst den Mittelwert und die mittlere Standardabweichung der einzelnen Versuchsgruppen zusammen.

Gruppe	Wert	Δ Interleukin 6 Serumspiegel (pg/ml)
Kontrolle	Mittelwert (+/-SD) Tierzahl	9,0 (2,3) n = 5
rIL2	Mittelwert (+/-SD) Tierzahl	36,0 (7,3) n = 5
rIL2+C1 INH	Mittelwert (+/-SD) Tierzahl	13,6 (3,6) n = 5

Tabelle 9: Interleukin 6 Serumspiegel Mittelwert und Standardabweichung

Der Mittelwert der Kontrollgruppe (9,0 pg/ml) ist wesentlich geringer im Vergleich zu dem Mittelwert der rIL2 Referenzgruppe (36,0pg/ml). Der durch rIL2 induzierte Anstieg des Interleukin 6 Serumspiegels ergibt im Vergleich der Kontrollgruppe zu der rIL2 Referenzgruppe einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0.05$). Die Kontrollgruppe zeigt gegenüber der Behandlungsgruppe rIL2+C1NH keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0.209$). Der Effekt der Vorbehandlung mittels C1-Esterase-Inhibitor in der rIL2+C1 INH Gruppe drückt sich gegenüber der rIL2 Referenzgruppe in einem statistisch signifikanten geringeren Anstieg des Interleukin 6 Serumspiegels aus (13,6pg/ml vs. 36,0pg/ml; $p < 0,05$).

6.

Diskussion

Die Sepsis ist eine Erkrankung mit zunehmender Inzidenz und nahezu unverändert hoher Letalität trotz beeindruckender Fortschritte im Bereich der Diagnostik sowie der kausalen und supportiven Therapie der systemischen Inflammation. Laut der Fachgesellschaft „Deutsche interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin“ (DIVI) erkranken aktuell jährlich 154.000 Menschen in Deutschland an einer Sepsis, 60.000 sterben daran. In der Sepsistherapie wird zwischen den kausalen antimikrobiellen und den operativ-interventionellen Maßnahmen zur Herdsanierung, den supportiven intensivmedizinischen, sowie den adjunktiven therapeutischen Ansätzen unterschieden. Adjunktive Therapieverfahren sind Maßnahmen, die zusätzlich und parallel zur Standardtherapie einer Erkrankung angewendet werden, wie zum Beispiel die Hydrocortisontherapie in der Sepsis. Es wurden bisher zahlreiche Substanzen zur Beeinflussung der Mikrozirkulationsstörung im Rahmen tierexperimenteller Sepsismodelle und klinischer Phase-2-Studien mit viel versprechenden Ergebnissen getestet. Diese erwiesen sich jedoch in Multicenterstudien mit großen Fallzahlen oftmals als wenig effektiv.

Bei einer systemischen Inflammation kommt es zu einer Aktivierung des Komplement-, Gerinnungs-, Fibrinolyse- und des Kallikrein-Kininsystems, sowie zu einer überschießenden Aktivierung von Leukozyten. Die Aktivierung der plasmatischen Kaskadensysteme und der Leukozyten ist assoziiert mit einem Multiorganversagen und trägt zur hohen Mortalität der schweren Sepsis und des septischen Schocks bei. Die Rolle der Entzündungszellen, inflammatorischer Mediatoren, plasmatischer Kaskadensysteme und der Mikrozirkulation in der Pathophysiologie der systemischen Inflammation wurde in der Einleitung umfassend erläutert. Auf Grund der Pathophysiologie der Sepsis und der multiplen Angriffspunkte von C1-Esterase-Inhibitor innerhalb der Kaskadensysteme, sowie der Interaktion mit Endothelzellen, Leukozyten, infektiösem Agens und Komponenten der extrazellulären Matrix ist eine antiinflammatorische Therapie mit C1-INH ein kausaler Ansatz in der Therapie der Mikrozirkulationsstörung. Die Leukozytenadhäsion an das mikrovaskuläre Endothel ist ein entscheidender Schritt in der Genese der Mikrozirkulationsstörung, welche als „Motor“ der Sepsis angesehen wird [Davis et al. 2008].

Eine Interleukin-2 induzierte systemische Inflammation ist dem klinischen Bild und den pathophysiologischen Prozessen einer Sepsis sehr ähnlich. Dieser Arbeit liegt eine durch

rekombinantes Interleukin-2 induzierte systemische Inflammation mit konsekutiver Mikrozirkulationsstörung zugrunde. Eine therapeutische Beeinflussung der Mikrozirkulationsstörung durch C1-INH wurde mittels Intravitalmikroskopie der Leukozytenadhäsion an postkapillären Venolen am Mesenterium der Ratte untersucht. Des Weiteren wurde die Gefäßperfusion quantifiziert, die Veränderungen des Blutdruckes evaluiert und der Interleukin-6 Serumspiegel vor Versuchsbeginn und am Versuchende bestimmt.

6.1 Intravitalmikroskopie

Die Intravitalmikroskopie stellt ein etabliertes in vivo Verfahren zur Untersuchung der Mikrozirkulation dar. Das dünne und transparente Mesenterium der Ratte ist zur Beurteilung der Leukozytenadhäsion und Transmigration, sowie des Blutflusses in postkapillären Venolen besonders geeignet [Menger et al. 1993]. Die intravitalmikroskopische Untersuchung der Leukozyten-Endothel-Interaktion postkapillärer Venolen im Mesenterium von Versuchstieren ist etabliert und wurde durch zahlreiche Arbeitsgruppen validiert [Galanzha et al. 2007, Mempel et al., 2004, Kubes und Keerfort 2001, Ley 1996, Menger et al. 1999].

Eine Limitation der Intravitalmikroskopie ist die potentielle Komplikation einer erhöhten Basisrate an rollenden Leukozyten durch das Trauma der operativen Manipulation. Die Auslagerung des Darmes aus der Bauchhöhle ist zwangsweise mit einer geringen Inflammation verbunden. Fiebig et al. berichteten bei einer intravitalmikroskopischen Untersuchung postkapillärer Venolen im Mesenterium des Kaninchens, dass unmittelbar nach der Darmauslagerung der Durchfluss rollender Leukozyten ansteigt und nach 30 Minuten wieder auf ein neues Gleichgewichtsebene abfällt [Fiebig et al 1991]. Asako et al. zeigten, dass eine äußerst vorsichtige Präparation von Ratten zu einem sehr geringen Anstieg der rollenden Leukozyten in postkapillären Venolen führt [Asako et al. 1994]. Eine weitere Einschränkung der Methodik der Intravitalmikroskopie ist die fehlende Möglichkeit der Differenzierung von adhärenenten Leukozyten. Edwards et. al konnten die adhärenenten Leukozyten in postkapillären Venolen und Kapillaren des Cremastermuskels der Ratte nach rIL2 Applikation elektronenmikroskopisch als PMN`s identifizieren [Edwards et al. 1992].

Nach sehr behutsamer Präparation und Auslagerung des Rattenmesenteriums wurde in dem vorliegenden Modell eine Stabilisierungsphase von 45 Minuten bis zu dem Beginn der

Mikroskopie festgelegt. Da die Mikrozirkulation von der Temperatur beeinflusst wird, wurde die Temperatur des ausgelagerten Darms durch den auf 37°C geheizten Mikroskopisch konstant gehalten. Das Mesenterium wurde mit 37°C warmen Paraffinöl benetzt und so vor äußeren Einflüssen geschützt. Außerdem wurde der Bereich außerhalb des für die Videodokumentation wichtigen Areals mit in Kochsalzlösung getränktem Zellstoff und Latex bedeckt, um ihn vor Austrocknung zu schützen. Die Phasenkontrastmikroskopie ist mit einer Wärmeentwicklung verbunden, so dass die Mikroskopierzeit möglichst kurz gehalten wurde um einen thermischen Einfluss zu vermeiden.

6.2 Modell einer rIL-2 induzierten tierexperimentellen Sepsis

Um die Einflüsse von C1-Esterase-Inhibitor auf die Mikrozirkulation der systemischen Inflammation evaluieren zu können, musste ein tierexperimentelles Sepsismodell etabliert werden. Es gibt eine Reihe von Modellen mit denen tierexperimentell ein sepsisähnliches Krankheitsbild generiert werden kann. Ein erregerbasiertes Modell ist die Bolusapplikation von lebenden oder toten Erregern, beziehungsweise Bakterienbestandteile wie das Endotoxin. Ein weiteres Modell ist die septische Peritonitis, wobei sich hierbei insbesondere die coekale Ligatur und Punction (CLP) etabliert hat. Mit dem Ischämie-Reperusionsmodell oder einer thermischen Gewebeschädigung kann ebenfalls eine systemische Inflammation herbeigeführt werden.

Bei der humanen immuntherapeutischen Anwendung von rekombinatem Interleukin-2 kann im Rahmen der rIL2-Toxizität das klinische Bild des „capillary-leak-syndrom“ auftreten. Dies ähnelt dem Bild eines septischen Schocks sehr stark und kann als humanes immuntherapeutisches und tierexperimentelles Sepsismodell betrachtet werden [Hack et al. 1993]. Streng genommen handelt es sich bei fehlendem infektiösem Agens um ein SIRS-Modell. In der Literatur werden jedoch auch die nicht infektiösen Modelle systemischer Inflammation als Sepsismodell deklariert. Die Injektion von rIL-2 führt dosisabhängig zu einer Aktivierung des Komplement-, Gerinnungs-, Fibrinolyse und des Kallikrein-Kininsystem. Die Plasmaspiegel einzelner Komponenten der Kaskadensysteme sind mit denen einer Sepsis vergleichbar [Baars et al. 1992]. IL-2 ist in vitro in der Lage PMN`s zu aktivieren und eine IL-1 β und TNF- α Produktion durch mononukleäre Zellen zu induzieren. Diese Zytokine spielen in der Pathogenese der Sepsis eine Schlüsselrolle [Caliezi et al. 2000, Hack et al. 1993]. Die IL-2 induzierte Organschädigung wird auf der Ebene des

postkapillären Endothels durch zwei wesentliche pathophysiologische Prozesse initiiert: der Entwicklung des „vascular leak syndrome“ und der transendothelialen Migration von Leukozyten mit konsekutiver Parenchyminfiltration. Die Leukozyten-Endothel-Interaktion spielt dabei eine entscheidende Rolle. IL-2 hat keinen direkten toxischen Effekt auf das Endothel, führt jedoch über eine Aktivierung der immunologischen Effektorzellen zu einer Endothelschädigung [Lentsch et al. 1999]. Das Modell einer Interleukin-2 induzierten systemischen Inflammation zur Objektivierung der Leukozyten-Endothel-Interaktion in der mikrovaskulären Strombahn wurde durch mehrere Arbeitsgruppen evaluiert. Edwards et al. zeigten in einer intravitalmikroskopischen Untersuchung am Musculus cremaster der Ratte eine Interleukin-2 induzierte Adhärenz neutrophilen Granulozyten an das mikrovaskuläre Endothel [Edwards et al. 1991]. Seiffge und Kremer konnten eine dosisabhängige Leukozytenadhäsion an das Endothel postkapillärer Venolen nach systemischer IL-2 Applikation darstellen [Seiffge und Krämer 1995]. Nakagawa et al. zeigten eine signifikante Zunahme der Leukozyten-Adhäsion an das hepatische sinusoidale Endothel nach intraperitonealer IL-2 Injektion [Nakagawa et al. 1996]. Lentsch et al. konnten eine akute Zunahme der Leukozytenadhärenz in der hepatischen Mikrozirkulation nach IL-2 Applikation zeigen [Lentsch et al. 1997]. In den letzten Jahren erfährt die Erforschung einer antiinflammatorische Therapie der Sepsis mit C1-INH wachsendes Interesse. In den Literaturdatenbanken finden sich hierzu tierexperimentelle und klinische Studien (siehe Kapitel 2.2.4, S52). Der Einfluss von C1-INH auf die Mikrozirkulation mit einem rIL2 basierten Sepsismodell wurde bis dato nicht publiziert.

6.3 Interpretation der Ergebnisse

Es wurden drei Untersuchungsgruppen definiert. Diese beinhalten eine Kontrollgruppe, eine rIL2-Gruppe und eine rIL2-Gruppe mit Vorbehandlung durch C1-Esterase-Inhibitor.

6.3.1 Kontrollgruppe

Um den Mikrozirkulationsschaden durch die systemische Applikation von rIL2 und die Auswirkung einer Vorbehandlung mit C1-INH beurteilen zu können, wurden zunächst Daten gewonnen, mit denen die Behandlungsgruppen verglichen werden konnten. Alle Tiere der Kontrollgruppe überlebten. Der mittlere arterielle Blutdruck zeigte in der ersten Versuchsstunde einen Abfall, welcher im weiteren Verlauf deutlich abflachte und in der

letzten Stunde zum Versuchende hin nahezu konstant blieb. Der Abfall des Blutdrucks ist auf die Narkose zurückzuführen. Das in Tierexperimenten häufig verwendete Anästhetikum Ethylcarbamat (Urethane) zeichnet sich durch eine lang anhaltende Narkose mit tiefer Analgesie und exzellenter Muskelrelaxation aus. Bei abdominalen Eingriffen muss das Präparat adäquat hoch dosiert werden. Dabei treten eine nur minimale Atemdepression und kardiale Depression auf. Durch eine Störung der zentralnervösen Regulation der Vasomotorik und ein vermindertes Ansprechen der glatten Gefäßmuskulatur auf Katecholamine, sowie der Relaxation der quergestreiften Muskulatur kommt es zu einer anhaltenden Hypotension [Fish et al. 2008].

In der Kontrollgruppe zeigt sich eine leichte Zunahme der adhärenenten Leukozyten mit einem relativ flachen Plateau über etwa 2 Stunden und einem Maximum am Versuchende. Zu Beginn der Versuche zeigte die Kontrollgruppe im Vergleich zu den Behandlungsgruppen keinen signifikanten Unterschied der Leukozytenadhärenz. Die Kontrollgruppe weist gegenüber der rIL2-Gruppe einen signifikant ($p=0.0015$) langsameren linearen Anstieg der adhärenenten Leukozytendichte auf. Der leichtgradige Anstieg der Leukozytenadhärenz ist Ausdruck der operativen Manipulation und spiegelt sich in den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen in ähnlichem Maß wieder [Seiffge und Krämer 1995, Lentsch et al. 1997].

Der Blutfluss sistierte in einem von insgesamt 29 Gefäßen. Am Versuchende waren noch 97% der Gefäße perfundiert. Der Perfusionsausfall des Gefäßes kann in einem in vivo Modell multifaktoriell bedingt sein. Ursache könnten beispielsweise eine mechanische Manipulation oder eine lokale Inflammation durch thermische Belastung sein. Die Perfusionsrate von 97% in der Kontrollgruppe am Ende des Versuches deuten auf eine minimale methodische Beeinträchtigung der Hämostase hin. Die Daten der Kontrollgruppe zeigen zusammenfassend eine nur geringfügige Störung der Mikrozirkulation durch das Versuchsmodell. Damit war die Voraussetzung für die Etablierung des Sepsismodells und die Evaluation eines Behandlungseinflusses durch die Vorbehandlung mit C1-INH gegeben.

6.3.2

rIL-2-Gruppe

Zu Beginn des Versuches erhielten die Tiere der rIL-2 Gruppe in Anlehnung an die publizierten Versuchsprotokolle 6.000.000 I.E./kgKG rekombinates Interleukin 2. Alle Tiere dieser Versuchsgruppe überlebten. Der mittleren arterielle Blutdruck zeigte einen

gleichartigen Verlauf wie in der Kontroll- und Vorbehandlungsgruppe mit anfänglichem Abfall und deutlicher Abflachung im weiteren Verlauf. Die Toxizität von IL-2 führt zu einer Abnahme des Gefäßtonus und steigert die vaskuläre Permeabilität, so dass eine stärkere hämodynamische Beeinträchtigung nach IL-2 Applikation zu erwarten ist [Siegel et al. 1992]. Die Arbeitsgruppe Edwards et al. berichteten über einen nicht signifikanten Abfall des Blutdruckes innerhalb von 2 Stunden Versuchszeit nach intravenöser Applikation von rIL2 bei Ratten [Edwards et al. 1992]. Nakagawa et al. zeigten keinen signifikanten Unterschied des mittleren arteriellen Blutdruckes zwischen einer rIL2-Gruppe und einer Kontrollgruppe bei Mäusen [Nakagawa et al. 1996]. Der intergrupale gleichartige Verlauf des Blutdruckes ohne statistisch signifikanten Unterschied zwischen der rIL2-, Kontroll- und Vorbehandlungsgruppe ist methodisch durch die deutliche Beeinflussung der Vasomotorik durch das Narkotikum zu erklären.

Die rIL2-Gruppe weist gegenüber der Kontrollgruppe einen hochsignifikanten ($p < 0.0001$) und numerisch starken Anstieg der mittleren adhärenenten Leukozytendichte auf. Lentsch et al. zeigten in einer intravitalmikroskopischen Untersuchung an postsinuidalen Venolen von Mäusen einen 20fach höheren Anstieg der adhärenenten Leukozyten nach rIL-2 Applikation im Vergleich zu der Kontrollgruppe [Lentsch et al. 1997]. Seiffge und Kremer berichteten über ein vergleichbares Ergebnis der Leukozytenadhäsion in postkapillären Venolen im Mesenteriums der Ratte nach rIL2 Injektion. Darüber hinaus wurden diese Daten mit einer LPS induzierten Leukozytenadhäsion verglichen. Dabei zeigte sich eine signifikante Korrelation der rIL2-Gruppe und der LPS-Gruppe [Seiffge und Kremer 1995].

Die rIL2-Gruppe dieser Arbeit zeigt ab 120 Minuten Versuchszeit eine stetige Abnahme der perfundierten Gefäße. Zu Beginn der zweiten Versuchsstunde waren noch 87% der Gefäße (26 von 30 Gefäßen) und am Ende des Versuches 83% der Gefäße (25 von 30 Gefäßen) perfundiert. Eine statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe besteht jedoch nicht. Die Arbeitsgruppe von Edwards et al. fanden keine signifikanten Unterschied des regionalen Blutflusses nach rIL2-Behandlung im Vergleich zu der Kontrollgruppe über einen Zeitraum von 2 Stunden [Edwards et al. 1992]. Lentsch et al. konnten 2 Stunden nach rIL2 Applikation einen signifikanten Abfall des Blutflusses postsinuidaler Venolen darstellen [Lentsch et al. 1997]. Nakagawa demonstrierte eine signifikante Abnahme des Blutflusses in postsinuidalen Venolen nach rIL2 Applikation [Nakagawa et al. 1996]. Die eigenen Ergebnisse der zunehmenden Anzahl der Perfusionsausfälle über die Zeit sind Ausdruck einer

Mikrozirkulationsstörung durch die Okklusion der mikrovaskulären Strombahn im Rahmen der Leukozytensequestration. Die nicht quantifizierte Geschwindigkeit des Blutflusses zeigte unter Betrachtung mit dem bloßen Auge jeweils eine deutliche Geschwindigkeitsabnahme bevor das Gefäß letztendlich eine Stase aufwies.

Der Interleukin 6 Serumspiegel steigt in der rIL2-Gruppe im Vergleich zum Ausgangswert deutlich an. Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) des IL-6 Mittelwertes der rIL2-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe (36pg/ml vs. 9pg/ml). Remick et al. konnten in einem CLP-Sepsismodell demonstrieren, dass der 6 Stunden nach dem initialem Trauma gemessene IL-6 Serumspiegel ein exakter prädiktiver Marker der Mortalität einer experimentellen Sepsis ist [Remick et al. 2012]. Die in dieser Arbeit gemessenen IL-6 Serumspiegel sind im Vergleich zu Arbeiten mit einer experimenteller Sepsis durch CLP oder Endotoxin, bei denen Werte von bis zu mehreren Tausend pg/ml wenige Stunden nach Versuchsbeginn demonstriert wurden, verhältnismäßig gering. Die Induktion einer IL-6 Produktion bei der systemischen Inflammation ist außerordentlich heterogen und wird insbesondere durch Lipopolysaccharid, TNF α und IL-1 stimuliert. Selberg et al. konnten in einer klinischen Studie zur Unterscheidung von Sepsis und SIRS zeigen, dass IL-6 bei der Sepsis einen deutlich höheren Plasmaspiegel als bei der SIRS (Median 382pg/ml vs. 98 pg/ml) aufweist. IL-6 ist ein verlässlicher Marker in der Diskriminierung zwischen infektiöser systemischer Inflammation und SIRS [Selberg et al. 2010]. Der in dieser Arbeit erhobene signifikant höhere Mittelwert des Anstieges des IL-6 Serumspiegels ist Ausdruck einer nicht infektiösen systemischen Inflammation (SIRS) durch rIL2.

6.3.3 Vorbehandlung mit C1-Esterase-Inhibitor

In der Vorbehandlungsgruppe wurde den Versuchstieren 20 Minuten vor Beginn der Intravitalmikroskopie 500 I.E./kgKG C1-INH als Kurzinfusion über 20 Minuten appliziert. Die Dosierung entspricht der Erfahrung anderer Arbeitsgruppen mit der Applikation von C1-INH bei einer tierexperimentellen systemischen Inflammation [Liu et al. 2003, Lendemans et al. 2000, Jansen et al. 1998]. Zu Beginn des Versuches wurden 6.000.000 I.E./kgKG rekombinates Interleukin 2 injiziert. Alle Versuchstiere überlebten. Der mittlere arterielle Blutdruck nimmt einen ähnlichen Verlauf wie in der Kontroll- und der rIL2-Gruppe. In der ersten Versuchsstunde kommt es zu einem Abfall, welcher im weiteren Verlauf deutlich

abflachte und in der letzten Stunde zum Versuchende hin nahezu konstant blieb. Ein statistisch signifikanter intergruppaler Unterschied besteht nicht.

Die Dichte der adhärenenten Leukozyten zeigt analog der Kontrollgruppe eine leichte Zunahme innerhalb der ersten Stunde mit konsekutiv leicht abnehmender Leukozytendichte und einem Wiederanstieg am Versuchende. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der C1-INH Vorbehandlungsgruppe besteht nicht. Nach Vorbehandlung mit C1-INH zeigt die adhärenente Leukozytendichte im Vergleich zu der Versuchsgruppe alleiniger rIL2 Applikation einen hochsignifikanten geringeren linearer Anstieg ($p=0.00709$). Lendemans et al. konnten in der intravitalmikroskopischen Untersuchung einer Endotoxin induzierten Mikrozirkulationsstörung am Mesenterium der Ratte eine Inhibition der Leukozytenadhärenenz durch eine C1-INH Vor- und Nachbehandlung auf das Niveau un behandelter Versuchstiere darstellen [Lendemans et al. 2000]. Lehmann et al. zeigten ein identisches Ergebnis mit der selben Methodik [Lehmann et al. 2004]. Croner et al. zeigten durch eine C1-INH Vorbehandlung von Ratten mit nachfolgender subletaler Endotoxinapplikation eine signifikante Abnahme der adhärenenten Leukozyten in postkapillären Venolen [Croner et al. 2004].

Bei der Gefäßperfusion sistierte analog zu der Kontrollgruppe in einem Gefäß der Blutfluss. Am Versuchende sind noch 97% der Gefäße perfundiert. Vergleicht man die Gefäßperfusion der rIL-2 Gruppe nach 3 Stunden Versuchszeit mit der C1-INH Vorbehandlungsgruppe (83% vs. 97% erhaltene Perfusion) besteht ein Unterschied von 14% der sich in Stase befindlichen Gefäße. Statistische Signifikanz besteht nicht ($p=0,22$). Lehmann et al. zeigte eine signifikante Abnahme der funktionellen Kapillardichte im Mesenterium der Ratte nach Endotoxinapplikation um 18,5%. Diese konnte durch eine C1-INH Vorbehandlung signifikant auf 9,5% gesenkt werden konnte [Lehmann et al. 2004]. Lendemans et al. konnten einen um 26% geringeren Perfusionsausfall postkapillärer Venolen durch Vorbehandlung mit C1-INH bei Ratten mit Endotoxinämie nachweisen [Lendemans et al. 2000]. Croner et al. zeigten in einem Endotoxinmodell an Ratten eine Verbesserung der Mikrozirkulationsstörung nach Vorbehandlung mit C1-INH [Croner et al. 2004]. Zusammenfassen kann die Mikrozirkulation durch eine antiinflammatorische Therapie mit C1-INH tendenziell verbessert werden.

Der Interleukin 6 Serumspiegel zeigt in dieser Arbeit einen statistisch signifikanten geringeren Anstieg durch Vorbehandlung mit C1-Esterase-Inhibitor gegenüber der rIL2-Gruppe (13,6pg/ml vs. 36,0pg/ml ($p<0.05$)). Der IL-6 Anstieg ist Ausdruck einer

systemischen Inflammation. Der IL-6 Plasmaspiegel ist ein prognostischer Biomarker für die Mortalität der SIRS und Sepsis [Krüttgen und Rose-John 2012]. Janssen et al. konnten in einem E.coli Sepsismodell durch C1-INH Vorbehandlung ebenfalls einen signifikant geringeren IL-6 Anstieg zeigen [Jansen et al. 1998]. Zeerlander et al. untersuchten die Aktivierung von PMN's in der Sepsis. Die klinische Studie ergab eine Reduktion der Aktivierung von PMN`s durch eine C1-INH Applikation. Ein Effekt auf den IL-6 Plasmaspiegel konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [Zeerlander et al. 2003].

6.4 Schlussfolgerung

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass rIL2 eine systemische Inflammation induziert. Dies führt zu einer signifikanten Zunahme der Leukozytenadhärenz an das Endothel postkapillärer Venolen und zu einer Störung der Hämostase der Mikrozirkulation. Durch die Vorbehandlung mit C1-INH kann die Leukozytenadhäsion signifikant auf das Niveau der Kontrollgruppe gesenkt werden. Der IL-6 Plasmaspiegel zeigt unter Vorbehandlung mit C1-INH einen signifikant geringeren Anstieg. C1-INH verbessert tendenziell die Perfusion der entzündlich veränderten mikrovaskulären Strombahn. Ein Einfluss auf den mittleren arteriellen Blutdruck konnte nicht dargestellt werden.

Bei der systemischen Inflammation kommt es zu einer Aktivierung des Komplement- und Kontaktsystems, der Gerinnungskaskade und der Leukozyten. Dies ist mit einem Multiorganversagen assoziiert und trägt zu der hohen Mortalität der schweren Sepsis und dem septischen Schock bei. C1-INH wird bei der systemischen Inflammation proteolytisch inaktiviert. Die Behandlung mit C1-INH verbessert in zahlreichen tierexperimentellen Modellen inflammatorischer Erkrankungen die Prognose [Davis et al. 2008, Zeerleder et al. 2003]. Die Aussagekraft dieser Arbeit unterliegt der Einschränkung, dass C1-INH bereits vor der Initialisierung einer systemischen Inflammation appliziert wurde. Die aktuelle Forschung hat das bestreben eine SIRS/Sepsis durch Biomarker möglichst frühzeitig zu erkennen, um eine adjunktive Therapie zielgerecht applizieren zu können.

C1-INH inaktiviert Proteasen des Komplementsystems (C1r, C1s und MASP2), des Kontaktsystems (FXII, Kallikrein), der intrinsischen Gerinnung (FXI) und des Fibrinolysesystems (Plasmin, PAI). C1-INH interagiert des weiteren mit Komponenten der extrazellulären Matrix, der Komplementkomponente C3, Endothelzellen, Leukozyten und

Endotoxin [Davis et al. 2008]. Das Komplementsystem hat einen direkten Einfluss auf die Stimulation und Expression von IL-6. Das Anaphylatoxine C5a induziert sehr potent die IL-6 Synthese [Fischer et al. 1999]. Riedemann et al. zeigten einen signifikant reduzierten IL-6 Serumspiegel durch blockierende Antikörper gegen den Komplementfaktor C5a in einem tierexperimentellen Sepsismodell [Riedemann et al. 2004]. Der wesentliche Mechanismus der Reduktion des Anstieges des IL-6 Plasmaspiegels scheint in einer Inhibition des Komplementsystems begründet zu sein.

Die Anaphylatoxine C3a und C5a rekrutieren und aktivieren inflammatorische Abwehrcellen und fördern die Extravasation von Leukozyten. Es resultiert eine Mikrozirkulationsstörung durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität und Vasodilatation [Klos et al. 2009]. Durch die Hemmung des Komplementsystems und die Bindung von C1-INH an P- und E-Selectine auf der Oberfläche von Endothelzellen supprimiert C1-INH die Leukozyten-Endothelzell-Adhäsion und die Transmigration durch das vaskuläre Endothel [Cai und Davis 2003]. Dieser antiinflammatorische Einfluss von C1-INH konnte in der vorliegenden Arbeit durch die signifikante Hemmung der Leukozytenadhäsion in den postkapillären Venolen dargestellt werden. Diese Ergebnisse werden von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt [Lehmann et al. 2004, Croner et al. 2004, Lendemans et al. 2000].

Die biologische proinflammatorische Wirkung des Kallikrein-Kinin-Systems beinhaltet eine mikrovaskuläre Permeabilitätserhöhung und Hypotension durch Endothelzellaktivierung [Moreau et al. 2005]. Das aktivierte Gerinnungssystem prädisponiert bei der systemischen Inflammation zu Thrombosen und disseminiert intravasaler Gerinnung, was wiederum eine exzessive inflammatorische Antwort und Komplementaktivierung verstärkt [Abraham 2000]. Die Inhibition der plasmatischen Kaskadensysteme und der Leukozytenaktivierung durch C1-INH verbessert die Störung der Mikrozirkulation. Diese Arbeit zeigt eine Verbesserung der Perfusion der entzündlich veränderten mikrovaskulären Strombahn durch C1-INH. Eine Förderung der Aufrechterhaltung der Hämostase durch eine C1-INH Substitution bei der systemischen Inflammation konnte auch durch weitere Arbeitsgruppen bestätigt werden [Lehmann et al. 2004, Croner et al. 2004, Lendemans et al. 2000].

Die diskutierten Daten zeigen, dass C1-INH ein facettenreiches antiinflammatorisches Protein ist. Die therapeutische Effektivität durch die proteaseinhibitorische Aktivität von C1-INH besteht zusammenfassend in einer Suppression der Bildung von Chemoatxinen, vasoaktiven

Mediatoren und Aktivatoren der neutrophilen Granulozyten der plasmatischen Kaskadensysteme. Die von der Proteaseaktivität unabhängigen antiinflammatorischen Eigenschaften beruhen auf der Inhibition der inflammatorischen Aktivität von Endotoxin, Verstärkung der Phagozytose und der Inhibition des Rollens der Leukozyten und die Transmigration durch das vaskuläre Endothel [Davis et al. 2010]. Durch die potente antiinflammatorischen Eigenschaften und das überzeugende Sicherheitsprofil ist die adjunktive C1-INH Substitution bei der systemischen Inflammation ein interessanter therapeutischer Ansatz. Igonin et. al konnten in einer randomisierten kontrollierten Studie erstmals eine verbesserte Überlebensrate bei septischen Patienten durch eine Hochdosis C1-INH Substitution nachweisen [Ingonin et al. 2012]. Kontrollierte Multicenter-Studien müssen die therapeutische Effizienz von C1-INH weiter evaluieren und darüber hinaus biologische Marker der Aktivität der plasmatischen Kaskadensysteme und der Leukozyten identifizieren, um Patienten mit einem tatsächlichen Nutzen einer C1-INH Therapie selektionieren zu können.

7.

Zusammenfassung

Bei der systemischen Inflammation kommt es zu einer Aktivierung des Komplement- und Kontaktsystems, der Gerinnungskaskade und der Leukozyten. Dies ist mit einem Multiorganversagen assoziiert und trägt zu der hohen Mortalität der schweren Sepsis und dem septischen Schock bei [Davis et al. 2008, Zeerleder et al. 2003]. C1-INH inaktiviert Proteasen des Komplementsystems (C1r, C1s und MASP2), des Kontaktsystems (FXII, Kallikrein) und der intrinsischen Gerinnung (FXI). C1-INH wird bei der systemischen Inflammation proteolytisch inaktiviert. Die Zunahme von inaktiviertem C1-Esterase-Inhibitor korreliert mit der Mortalität der Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock [Zeerleder et al. 1999]. C1-INH spielt bei der Regulation der vaskulären Permeabilität und der Inhibition der Inflammation eine wichtige Rolle. In zahlreichen tierexperimentellen Modellen mit systemischer Inflammation und Mikrozirkulationsstörung reduziert eine C1-INH Substitution die Mortalität. Die therapeutische Effektivität von C1-INH besteht in einer Suppression der Bildung von Chemoattractants, vasoaktiven Mediatoren und Aktivatoren der neutrophilen Granulozyten der plasmatischen Kaskadensysteme. Die von der Proteaseaktivität unabhängigen anti-inflammatorischen Eigenschaften beruhen auf der Inhibition der inflammatorischen Aktivität von Endotoxin, Verstärkung der Phagozytose und die Inhibition des Rollens der Leukozyten und die Transmigration durch das vaskuläre Endothel [Davis et al. 2010]. Die Leukozytenadhäsion an das mikrovaskuläre Endothel ist ein entscheidender Schritt in der Genese der Mikrozirkulationsstörung, welche als „Motor“ der Sepsis angesehen wird [Ince 2005].

Die immuntherapeutische Toxizität von Interleukin-2 kann eine systemische Inflammation mit dem klinischen Bild eines „capillary-leak-syndrom“ (CLS) induzieren. Die pathophysiologischen Prozesse sind denen einer Sepsis sehr ähnlich [Hack et al. 1993]. In dieser Arbeit wurde ein Sepsis-Modell durch rekombinantes Interleukin-2 etabliert und eine therapeutische Beeinflussung der Mikrozirkulationsstörung durch C1-INH mittels Intravitalmikroskopie postkapillärer Venolen am Mesenterium der Ratte untersucht.

Folgende Versuchsgruppen wurden definiert:

- Kontrollgruppe (NaCl 0,3ml/h)
- rIL2-Gruppe (6mio IE rIL2/kgKG)
- Vorbehandlungsgruppe (500IE C1-INH/kgKG 20 Minuten vor rIL2-Applikation).

Mit der Intravitalmikroskopie wurde über einen Zeitraum von 3 Stunden der prozentuale Anteil der durchflossenen postkapillären Venolen als Maß für die Gefäßperfusion bestimmt und die Anzahl wandadhärenter Leukozyten pro Flächeneinheit Endothel als Maß der Leukozyten- und Endothelaktivierung quantifiziert. Der IL-6 Serumspiegel wurde vor Versuchsbeginn und am Versuchende als Biomarker einer systemischen Inflammation bestimmt.

Ergebnisse:

- 1) Die systemische Applikation von rIL2 bewirkt im Vergleich zu der Kontrollgruppe einen hochsignifikanten Anstieg der mittleren adhärenen Leukozytendichte und eine statistisch nicht signifikante Abnahme der Perfusion postkapillärer Venolen.
- 2) Die Vorbehandlung mit C1-INH führt im Vergleich zu der Versuchsgruppe alleiniger rIL2 Applikation zu einem hochsignifikanten geringeren Anstieg der mittleren adhärenen Leukozytendichte und einer statistisch nicht signifikanten Zunahme der Perfusion postkapillärer Venolen.
- 3) Der IL-6 Plasmaspiegel zeigt nach Vorbehandlung mit C1-INH einen signifikant geringeren Anstieg im Vergleich zu der rIL2-Gruppe.

Eine Substitution von C1-INH inhibiert die Mikrozirkulationsstörung einer systemischen Inflammation in dem tierexperimentellen rIL2 induzierten Sepsismodell. Die Daten verdeutlichen die potenten anti-inflammatorischen Eigenschaften von C1-INH. Die Inhibition der Entzündungskaskaden, Mediatoren und Leukozytenaktivierung beruht auf der proteaseinhibitorischen Aktivität und einer Vielzahl davon unabhängiger Mechanismen. Durch die anti-inflammatorischen Eigenschaften und das überzeugende Sicherheitsprofil ist die adjunktive C1-INH Substitution bei der systemischen Inflammation ein interessanter therapeutischer Ansatz. Kontrollierte Multicenter-Studien müssen die therapeutische Effizienz von C1-INH weiter evaluieren und darüber hinaus biologische Marker der Aktivität der plasmatischen Kaskadensysteme und der Leukozyten identifizieren, um Patienten mit einem tatsächlichen Nutzen einer C1-INH Therapie selektionieren zu können.

7.

Summary

During systemic inflammation the complement system, the contact system, the coagulation cascade and leukocytes are activated. Activation of these plasmatic cascades und leukocytes contributes to the development of multiple organ failure and the high mortality rate of severe sepsis and septic shock [Davis et al. 2008, Zeerleder et al. 2003]. C1-INH is an main inhibitor of the classical pathway of the complement system (C1s and C1r, MASP2), of the contact activation system (factor XIIa and kallikrein) and of the intrinsic pathway of coagulation (factor XIa). During systemic inflammation, C1-INH is proteolytically inactivated. The increase of inactivated C1-INH in plasma correlates positively with mortality in septic patients. C1-INH substitution has been shown to reduce the mortality in experimental animals with severe sepsis or septic shock [Zeerleder et al. 1999]. C1-INH plays important roles in the regulation of vascular permeability and in the suppression of inflammation. The effectiveness of C1-INH attributes to its protease inhibition activity dependent properties to attenuate the generation of chemoattractants and vasoactive mediators as well as activators of neutrophils. C1-INH mediated activities that do not depend on protease inhibition contributes suppression of the activity of gram negative bacterial endotoxin, enhancement of phagocytosis, and suppression of leukocyte rolling and transmigration of leukocytes across the endothelium to sites of inflammation [Davis et al. 2010]. The leukocyte adhesion to the microvascular endothelium is a critical step in the genesis of microcirculatory disturbance, which is regarded as the "motor" of sepsis [Ince 2005].

Immunotherapy with Interleukin-2 can cause a systemic inflammation called “capillary-leak-syndrom” (CLS). The pathophysiological mechanisms are similar to those invoke during sepsis [Hack et al. 1993]. In this work an animal sepsis model was established by recombinant IL-2 to investigate therapeutic influence on microcirculatory disturbance by C1-INH examined by intravital microscopy in postcapillary venules of rat mesentery.

The experimental groups were defined:

- control group (NaCl 0,3ml/h)
- rIL2-Gruppe (6mio IE rIL2/kgBW)
- pre-treatment group (500IE C1-INH/kgBW 20 minutes before rIL2 application).

With intravital microscopy over a period of 3 hours, the percentage of postcapillary venules with normal and stopped blood flow was determined as a measure of vascular perfusion. The

number of adherent leukocytes per unit area of endothelium was quantified as a measure of the leukocyte and endothelial activation. The IL-6 serum levels were determined before and after the examination as a biomarker of systemic inflammation.

Results:

- 1) Systemic administration of rIL2 effected in comparison to the control group highly significant increase in mean adherent leukocyte density and a statistically not significant decrease in perfusion of postcapillary venules
- 2) Pre-treatment with C1-INH lead compared to the experimental group of sole rIL2 application to a highly significant less increase of mean adherent leukocyte density and a non-statistically significant increase in perfusion of postcapillary venules.
- 3) IL-6 plasma levels showed after treatment with C1-INH a significantly smaller increase compared to the rIL2 group

C1-INH substitution inhibits microcirculatory disturbance during rIL2 induced experimental systemic inflammation. The data illustrate that C1-INH has potent anti-inflammatory capacity. Protection from inflammatory diseases, sepsis and septic shock very likely is a result of a variety of mechanisms that may or may not depend on protease inhibition via covalent bonding. Owing to its potent anti-inflammatory properties and its convincing safety profile C1-INH is an attractive therapeutic protein and may be an adjunctive in the treatment of Sepsis and SIRS. Controlled multi-centre studies must be conducted to prove the beneficial effects of C1-INH and detect activation markers of the plasmatic cascade system and leukocyte activation to identify which patients will truly benefit.

9.

Anhang

9.1

Literaturverzeichnis

Abraham, E.: Coagulation abnormalities in acute lung injury and sepsis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 22:401–404, 2000

Ayala, A.; Hemdon, C. Lehman, D.; DeIVaso, C.M.; Chaudry I.H.: The induction of accelerated thymic programmed cell death during polymicrobial sepsis control by corticosteroid but not tumor necrosis factor. *Shock* 5:259, 1995

Albrecht, E.A.; Chinnaiyan, A.M.; Varambally, S.; Kumar-Sinha, C.; Barrette, T.R., Sarma, J.V.; Ward, P.A.: C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol* 164:849–859 2004

Asako, H.; Kurose, I.; Wolf, R.; DeFrees, S.; Zheng, Z.L.; Phillips, M.L.; Paulson J.C.; Granger, D.N: Role of H1 receptors and P-selectin in histamineinduced leukocyte rolling and adhesion in postcapillary venules. *J Clin Invest* 93:1508–1515, 1994.

Baars, J.W.; Hack, C.E.; Wagstaff, J.; Eerenberg-Belmer, A.J.M.; Wolbrik, G.J.: The activation of polymorphonuclear neutrophils and the complement system during immunotherapy with recombinant Interleukin-2. *Br J Cancer* 65, 96-101, 1992

Bacon, P.A.: Endothelial cell dysfunction in systemic vasculitis: new developments and therapeutic prospects. *Curr Opin Rheumatol* 17:49–55 2005

Baluna, R.; Vitetta, E.S.: Vaskular leak syndrome: a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology* 37:117-137, 1997

Bateman, R.; Sharpe, M.D.; Ellis, C.G.: Bench-to-bedside review: Microvascular dysfunction in sepsis – hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Critical Care* 7:359-373, 2003

Blackwell, T.S.; Christman, J.W.: Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* Jul;77(1):110-7, 1996

Bluethmann, H.; Rothe, J.; Schultze, N.; Tkachuk, M.; Koebel, P.: Establishment of the role of IL-6 and TNF receptor 1 using gene knockout mice. *J Leukoc Biol* Nov;56(5):565-70, 1994

Bone, R.C.; Inhibitors of complement and neutrophils: a critical evaluation of their role in the treatment of sepsis. *Crit Care Med* 20:891-898, 1992

Brower, M.S.; Harpel, P.C.: Proteolytic Cleavage and Inactivation of Plasmin-Inhibitor and C1-Inactivator by Human Polymorphnuclear Leucocyte Elastase. *The Journal of Biological Chemistry* 257:9849-9854, 1982

Brown, H.; Prescott R.: Applied mixed models in medicine. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, 1999

- Cai, S.; Davis, A.E.III: Complement regulatory protein C1 inhibitor binds to selectins and interferes with endothelial-leukocyte adhesion. *J Immunol* 171(9):4786-91, 2003
- Caliezi, C.; Wuillemin, W.A.; Zeerleder, S.; Redondo, M.; Eisele, B.; Hack, C.E.: C1-Esterase Inhibitor: An Anti-Inflammatory Agent and Its Potential Use in the Treatment of Diseases Others Than Hereditary Angioedema. *Pharmacol Rev* 52:91-112, 2000
- Caliezi, C.; Zeerleder, S.; Redondo, M.; Regli, B.; Rothen, H.U.; Zürcher-Zenklusen, R.; Rieben, R.; Devay, J.; Hack, C.E.; Lämmle, B.; Wuillemin, W.A.: C1-inhibitor in patients with severe sepsis and septic shock: beneficial effect on renal dysfunction. *Crit Care Med* 30:1722-1728, 2002
- Carlos, T.M.; Harlan, J.M.: Leucocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84:2068-2101, 1994
- Cavaillon, J.M. ; Adib-Conquy, M. ; Fitting, C. ; Adrie, C. ; Payen, D.: Cytokine Cascades in Sepsis. *Scand J Infect Dis* 35(9):535-44, 2003
- Choi E.Y., Chavakis, E. ; Czabanka, M.A. ; Langer, H.F. ; Fraemohs, L. ; Economopoulou, M. ; Kundu, R.K. ; Orlandi, A. ; et al. : Del-1, an endogenous leukocyte-endothelial adhesion inhibitor, limits inflammatory cell recruitment. *Science* 322:1101-4, 2008
- Cicardi, M.; Zingale, L.; Zanichelli, A.; Pappalardo, E.: C1 inhibitor: molecular and clinical aspects. *Semin Immun* 27:286-298, 2005
- Clement, J.M.; McDermott D.F.: The high-dose aldesleukin (IL-2) "select" trial: a trial designed to prospectively validate predictive models of response to high-dose IL-2 treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* Aug, 7(2) E7-9, 2009
- Colman R.W.; Schmaier, A.H.: Contact System: A Vascular Biology Modulator With Anticoagulant, Profibrinolytic, Antiadhesive, and Proinflammatory Attributes. *Blood* 90:3819-3843, 1997
- Cooper, D.; Russell, J.; Chitman, K.D.; Williams, M.C.; Wolf, R.E.; Granger, D.M.: Leukocyte dependence of platelet adhesion in postcapillary venules. *Am J Physiol* 286:1895-1900, 2000
- Coutinho, M. ; Aulak, K.S. ; Davis III A.E.: Functional analysis of the serpin domain of C1 inhibitor. *J Immunol* 153: 3648-3654, 1994
- Cox, D.R.: Regression Models and Life Tables (with Discussion). *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* 34:187-220, 1972
- Croner, R.S.; Lehmann, T.G.; Fallsehr, C.; Herfarth, C.; Klar, E.; Kirschfink, M.: C1-inhibitor reduces hepatic leukocyte-endothelial interaction and the expression of VCAM-1 in LPS-induced sepsis in the rat *Microvasc Res* 67:182-191, 2004
- Dalmasso, A.P.; Falk, R.J.; Raij, L.: The pathobiology of the terminal complement complexes. *Complement Inflamm* 6(1):36-48, 1989

- Danese, S.; Dejana, E.; Fiocchi, C.: Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J Immunol* 15;178(10):6017-22, 2007
- Davis, A.E. III.; Cai, S.; Liu, D.: C1 inhibitor: Biologic activities that are independent of protease inhibition. *Immunobiology* 212(4-5): 313–323, 2007
- Davis, A.E. III; Mejia, P.; Lu F.: Biological activities of C1 Inhibitor. *Mol Immunol.* 45(16):4057-63, 2008
- Davis, A.E. III; Lu F.; Mejia, P.: C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb Haemost Nov*;104(5):886-93, 2012
- De Jong, K.K.; van der Poll, T. ; Wierlings, W.J.: The Systemic Pro-Inflammatory Response in Sepsis. *J Innate Immun* 2:422–430, 2010
- de Zwaan, C.; Kleine, A.H.; Diris, J.H.; Glatz, J.F.; Wellens, H.J.; Strengers, P.F.; Tissing, M.; Hack, C.E.; van Diejen-Visser, M.P.; Hermens, W.T.: Continuous 48-h C1-inhibitor treatment, following reperfusion therapy, in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2002, 23:1670-1677.
- Dickneite, G.; Leithäuser, B.: Influence of Antithrombin III on Coagulation and Inflammation in Porcine Septic Shock. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1566-1572, 1999
- Diggle, P.J.; Liang, K.Y.; Zeger, L. *Analysis of Longitudinal Data*. Oxford University Press, Oxford, 1995
- Dinarello C.A.: Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* Apr 15;77(8):1627-52, 1991
- Dinarello C.A.: Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* Dec;112(6 Suppl):321S-329S, 1997
- Dinarello C.A.: Proinflammatory Cytokines. *Chest* 118(2):503-8, 2000
- Dorresteyn, M.J.; Visser, T.; Cox, L.A.; Bouw, M.P.; Pillay, J.; Koenderman, A.H.; Strengers, P.F.; Leenen, L.P.; van der Hoeven, J.G.; Koenderman, L.; Pickkers, P.: C1-esterase inhibitor attenuates the inflammatory response during human endotoxemia. *Crit Care Med* Nov;38(11):2139-45, 2012
- Doyle, M.V.; Lee, M.T.; Fong, S.: Comparison of biological activities of human recombinant interleukin-2(125) and native interleukin-2. *J Biol Response Mod* 4:96, 1985
- Edwards, M.J.; Abney, D.L.; Miller, F.N.: Pentoxifylline inhibits interleukin-2-induced leukocyte-endothelial adherence and reduces systemic toxicity. *Surgery* 110(2):199-204, 1991
- Edwards, M.J.; Miller, F.N.; Sims, D.E.; Abney, D.L.; Schuschke, D.A.; Corey, T.S.: Interleukin 2 Acutely Induced Platelet and Neutrophil-Endothelial Adherence and Macromolecular Leakage. *Cancer Research* 52:3425-3431, 1992

- Ehrnthaller, C.; Ignatius, A.; Gebhard, F.; Hubert-Lang, M.: New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med* 17(34):317-29, 2001
- Eisele, B.; Lamy, M.; Thijs, L.G.; Keinecke, H.-O.; Schuster, H.-P.; Matthias, F.R.; Fourier, F.; Heinrichs, H.; Delvos, U.: Antithrombin III in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 24:663-672, 1998
- Esmon, C.T.: The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res* 114:321–327, 2004
- Esmon, C.T. Inflammation and the activated proteinC anticoagulant pathway. *Semin. Thromb. Hemost.* 32(Suppl. 1): 49–60. 2006
- Fattouch, K.; Bianco, G.; Speziale, G.; Sampognaro, R.; Lavalle, C.; Guccione, F.; Dioguardi, P.; Ruvolo, G.: Beneficial effects of C1 esterase inhibitor in ST-elevation myocardial infarction in patients who underwent surgical reperfusion: a randomised double-blind study. *Eur J Cardiothorac Surg* 32:326-332, 2007
- Fiane, A.E.; Videm, V.; Johansen, H.T.; Mellbye, O.J.; Nielsen, E.W.; Mollnes, T.E.: C1-inhibitor attenuates hyperacute rejection and inhibits complement, leukocyte and platelet activation in an ex vivo pig-to-human perfusion model. *Immunopharmacology* 1999, 42:231-243.
- Fiebig E, Ley K, and Arfors KE. Rapid leukocyte accumulation by “spontaneous” rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. *Int J Microcirc Clin Exp* 10:127–144, 1991
- Fischer, M.B.; Prodeus, A.P.; Nicholson-Weller, A.; Ma, M.; Murrow, J.; Reid, R.R.; Warren, H.B.; Lage, A.L.; Moore, F.D. Jr.; Rosen, F.S.; Carroll, M.C.: Increased susceptibility to endotoxin shock in complement C3- and C4-deficient mice is corrected by C1 inhibitor replacement. *J Immunol* 159:976-982, 1997
- Fischer, W.H.; Jagels M.A.; Hugli T.E.: Regulation of IL-6 Synthesis in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells by C3a and C3adesArg. *J Immunol* 162:453-459, 1999
- Fish, R.; Danneman, P.J.; Brown, M.; Karas, A.: *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*, Second Edition (American College of Laboratory Animal Medicine). Academic Press, 2 edition, June 23, S. 316, 2008
- Gaffen, S.L.; Kathleen, D.L.: Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* 28 109-123, 2004
- Galanzha, E.I.; Tuchin, V.V.; Zharov, V.P.: Advances in small animal mesentery models for in vivo flow cytometry, dynamic microscopy, and drug screening. *World J Gastroenterol* 14;13(2):192-218, 2007
- Gemsa, D.; Resch, K.: Entzündung, In Gemsa, D.; Kalden, J.R.; Resch, K.: *Immunologie* 4:135-158; Thieme-Verlag Stuttgart New York 1997

- Ginsberg, M.H.; Partridge, A.; Shattil, S.J.: Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol* 17:509–516, 2005
- Goldbach-Mansky, R.; Kastner, D.L.: Autoinflammation: The prominent role of IL-1 in monogenic autoinflammatory diseases and implications for common illnesses. *J Allergy Clin Immunol. Dec.*; 124(6): 1141–1151, 2009
- Gompels, M.M.; Lock, R.J.; Abinun, M.; Bethune C.A.; Davies, G.; Grattan, C.; Fay, A.C.; Longhurst, H.J.; Morrison, L.; Price, A.; Price, M.; Watters, D.: C1 inhibitor deficiency: consensus document. *Clin Exp Immunol* 139(3): 379–394, 2005
- Grimm, E.A.; Robb, R.J.; Roth, J.A.: Lymphokine activated killer cell (LAK) phenomenon. Evidence that IL-2 alone is sufficient for direct activation of PBL into TAK. *L Exp Med* 158:1356-1361, 1983
- Hack, C.E.; Voerman, H.J.; Eisele, B.; Keinecke, H.O.; Nuijens, J.H.; Eerenberg, A.J.; Ogilvie, A.; Strack van Schijndel, R.J.; Delvos, U.; Thijs, L.G.: C1-esterase inhibitor substitution in sepsis. *Lancet* 339:378, 1992
- Hack, C.W.; Ogilvie A.C.; Eisele, B.; Eerenberg, A.J.M.; Wagstaff, J.; Thijs, L.G.: C1-inhibitor substitution therapy in septic shock and in the vascular leak syndrome induced by high doses of interleukin-2. *Intensive Care Med* 19:19-28 1993
- Haeney, M.R.: The role of the complement cascade in sepsis. *J Antimicrob Chemother* 41 Suppl A:41-6, 1998
- Hansen, P.R.: Role of Neutrophils in Myocardial Ischemia and Reperfusion. *Circulation* 91:1872-1885, 2002
- Harlan, J.M.: Consequences of Leucocyte-Vessel Wall Interactions in Inflammatory and Immune Reactions. *Sem Thromb Hemostas* 13:434-444, 1987
- Haslett, C.: Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. *Clin Sci* 83:639, 1992
- Hefeneider, S.H.; Conlon, P.J.; Henney C.S. et al.: In vivo interleukin-2 administration augments the generation of alloreactive cytolytic T lymphocytes and resident natural killer cells. *J Immunol* 130: 222-227
- Henn, V.; Slupsky, J.R.; Grafe, M.; Anagnostopoulos, I.; Forster, R.; Muller-Berghaus, G.; Krocck, R.A.: CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391: 591–594, 1998
- Hotchkiss, R.S.; Swanson P.E.; Jacobson, A.; Buchmann, T.G.; Karl, L.E.: Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: Findings in normal and B- and T-cell deficient mice. *Crit Care Med* 27:1230, 1997
- Hotchkiss, R.S.; Swanson P.E.; Freeman, B.D.; Tinsley, K.W.; Cobb, J.P.; Maruschak, G.M.; Buchmann, T.G.; Karl I.E.: Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 27:1230, 1999

- Höflich, C.; Volk, H.-D.: Immunmodulation in der Sepsis. *Chirurg* 73:1100-1104, 2002
- Hynes R.O.: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 69:11–25, 1992
- Ince, C.: The microcirculation is the motor of sepsis. *Critical Care* 9(suppl 4):S13-S19, 2005
- Igonin, A.A.; Protsenko, D.N.; Galstyan, G.M.: C1-esterase inhibitor infusion increases survival rates for patients with sepsis. *Crit Care Med* 40:770–777, 2012
- Jansen, P.M.; Eisele, B.; de Jong, I.W.; Chang, A.; Delvos, U.; Taylor, F.B.; Hack, C.E.: Effect of C1 inhibitor on inflammatory and physiologic response patterns in primates suffering from lethal septic shock. *J Immunol* 160:475-484, 1998
- Jean-Baptiste, E.: Cellular mechanisms in sepsis. *J Intensive Care Med*. Mar-Apr;22(2):63-72, 2007
- Jiang, H.; Wagner, E.; Zhang, H.; Frank, M.M.: Complement 1 inhibitor is a regulator of the alternative complement pathway. *J Exp Med* 2001;194:1609–1616
- Jimenez, M.F.; Watson, R.W.; Parodo, J.; Evans, D. Foster, D.; Steinberg, M., et al.: Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome. *Arch Surg* 132:1263-1269, 1997
- Johnson, D.; Mayers, I.: Multiple organ dysfunction syndrome: a narrative review. *Can J Anesth*. 48(5):502-509, 2001
- Johnson K : Potential mechanisms for a proinflammatory vascular cytokine response to coagulation activation. *J Immunol* 160:5130–5135, 1998
- Johnston, G.R.; Webster N.R.: Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve. *Br J Anaesth* 102(4):453-62, 2009
- Jones, S.A.: Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol Sep* 15;175(6):3463-8, 2005
- Kaplan, Z.S.; Jackson, S.P.: The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011:51-61, 2011
- Kirton, C.M.; Nash, G.B.: Activated platelets adherent to an intact endothelial cell monolayer bind flowing neutrophils and enable them to transfer to the endothelial surface. *J. Lab. Clin. Med*. 136: 303–313, 2000
- Klos, A.; Tenner, A.J.; Johswicha, K.O.; Agerb, R.R.; Reisc, E.S.; Köhl, J.: The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol* 2009 46(14): 2753–2766, 2009
- Krüttgen, A.; Rose-John, S.: Interleukin-6 in sepsis and capillary leakage syndrome. *J Interferon Cytokine Res*. 32(2):60-5, 2012
- Kubes, P.; Keerfort, S.M.: Leukocyte recruitment in the microcirculation: the rolling paradigm revisited. *News Physiol Sci* Apr;16:76-80, 2001

- Langer, H.F.; Chavakis, T.: Leukocyte-Endothelial Interactions in Inflammation. *J Cell Mol Med* 13(7):1211–1220, 2009
- Lazareva, N.B.; Igonin, A.A.: Safety and efficacy of purified human C1-esterase inhibitor in the treatment of patients with sepsis. *Antibiot Khimioter* 54:42-46, 2009
- Lee, R.E.; Gaspari, A.A.; Lotze, M.T.: Interleukin-2 and psoriasis. *Arch Dermatol* 124:1811 - 1815, 1988
- Lehmann, C.; Birnbaum, J.; Lührs, C.; Rückbeil, O.; Spies, C.; Ziemer, S.; Gründling, M.; Pavlovic, D.; Usichenko, T.; Wendt, M.; Kox, W.J.: Effects of C1 esterase inhibitor administration on intestinal functional capillary density, leukocyte adherence and mesenteric plasma extravasation during experimental endotoxemia. *Intensive Care Med* 30:309-314, 2004
- Leithäuser, B.; Matthias, F.R.: Mikrozirkulation und Hämostase bei entzündlichen Prozessen. *Med Klin* 92:426-431, 1997
- Lendemanns, S.; Leithäuser, B.; Schumacher, J.; Tillmanns, H.; Matthias, F.R.: C1 esterase inhibitor (C1-INH) improves impaired microcirculation of rat mesentery in response to Endotoxin (LPS)-challenge. *Annals of Hematology* 79:121, 2000
- Lentsch, A.B.; Miller, F.N.; Edwards, M.J.: Interleukin-2-induced hepatic injury involves temporal patterns of cell adhesion in the microcirculation. *Am J Physiol.* 272(4 Pt 1):G727-31, 1997
- Lentsch, A.B.; Miller, F.N.; Edwards, M.J.: Mechanisms of leukocyte-mediated tissue injury induced by interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother* Jan;47(5):243-8, 1999
- Levi, M.; van der Poll, T.; Büller, H.R.: M.D.: Bidirectional Relation Between Inflammation and Coagulation. *Circulation* 8;109(22):2698-704, 2004
- Ley, K.; Laudanna, C.; Cybulsky, M.I.; Nourshargh, S.: Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7:678–89, 2007
- Ley, K.: Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovascular Research* 32:733-742, 1996
- Liao, W.; Lin, J.X.; Leonard, W.J.: Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* Jan 24;38(1):13-25, 2013
- Liu, D.; Cai, S.; Gu, X.; Scafidi, J.; Wu, X.; Davis, A.E. 3rd: C1 inhibitor prevents endotoxin shock via a direct interaction with lipopolysaccharide. *J Immunol* 171:2594-2601, 2003
- Liu, D.; Lu, F.; Qin, G.; Fernandes, S.M.; Li, J.; Davis, A.E. III.: C1 inhibitor-mediated protection from sepsis. *J Immunol* 79:3966–3972, 2007
- Lu, F.; Chauhan, A.K.; Fernandes, S.M.; Walsh, M.T.; Wagner, D.D.; Davis, A.E. 3rd: The effect of C1 inhibitor on intestinal ischemia and reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295:G1042-1049, 2008

- Mackman, N.: The many faces of tissue factor. *J Thromb Haemost* 7 Suppl 1:136-9, 2009
- Marie, C.; Muret, J.; Fitting, C. ; Losser, M.-R.; Payen, D. ; Cavaillon J.-M.: Reduced Ex Vivo Interleukin-8 Production by Neutrophils in Septic and Nonseptic Inflammatory Response Syndrome. *Blood* 91:3430-3446, 1998
- Markiewski, M.M.; Lambris J.D.: The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight." *Am. J. Pathol.* 171: 715-727 2007
- Matsuda, N; Hattori, Y.: Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *J Pharmacol Sci* 101(3):189-98, 2006
- Matsuda, N; Hattori, Y.: Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J. Smooth Muscle Res* 43(4):117–137, 2007
- Matthias, F.R.: *Bloodcoagulation Disorders, Maemorrhagic Diatheses und Thromboembolic Diseases*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1-28, 1987
- Mazzoni, M.C.; Schmid-Schönbein, G.W.: Mechanisms and consequences of cell activation in the microcirculation. *Card Research* 32:709-719, 1996
- McGill, S.N.; Ahmed, N.A.; Christou, N.V.: Endothelial Cells: Role in Infection and Inflammation. *World J. Surg.* 22:171-178, 1998
- McGilvray, I.D.; Rotstein, O.D.: Role of the CoagulationSystem in the Local and Systemic Inflammatory Response. *World J. Surg* 22:179-186, 1998
- Members of ACCP/SSCM Consensus Conference Committee, Defenitions for Sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 20:864-874, 1992
- Mempel, T.R.; Scimone, M.L.; Mora, J.R.; von Andrian, U.H.: In vivo imaging of leukocyte trafficking in blood vessels and tissues. *Curr Opin Immunol* 16(4):406-17, 2004
- Menger, M.D.; Lehr, H.A.: Scope perspectives of intravital microscopy bridge over from in vitro to in vivo. *Immunology Today* 14:519-522, 1993
- Menger, M.D.; Richter, S.; yamauchi, J.I.; Vollmar, B.: Intravital Microscopy for the Study of the Microcirculation in Various Disease States. *Ann Acad Med* 28;542-56, 1999
- Moreau, M.E.; Garbacki, N.; Molinaro, G.; Brown, N.J.; Marceau, F.; Adam, A.: The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. *J Pharmacol Sci* 99, 6 – 38, 2005
- Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* 24:327–34, 2003
- Nakagawa, K.; Miller, F.N.; Sims, D.E.; Lentsch, A.B.; Miyazaki, M.; Edwards, M.J.: Mechanisms of interleukin-2-induced hepatic toxicity. *Cancer Res.* 1;56(3):507-10, 1996
- Nathan, C.F.: Secretory Products of Macrophages. *J Clin Invest* 79:319-326, 1987

- Nielsen, J.D.: The effect of antithrombin on the systemic inflammatory response in disseminated intravascular coagulation. *Blood Coagul and Fibrinolysis* 9(suppl 3):11-15, 1998
- Nuijens J.H.; Erenberg-Belmer A.J.M.; Huijbregts C.C.M.; Schreuder W.O.; Felt-Bersma R.J.F.; Abbink J.J.: Proteolytic inactivation of plasma C1-inhibitor in sepsis. *J Clin Invest* 84:443–50, 1989
- Nürnbergger, W.; Heying, R.; Burdach, S.; Gobel, U.: C1 esterase inhibitor concentrate for capillary leakage syndrome following bone marrow transplantation. *Ann Hematol* 75:95-101, 1997
- Ohkubo, C.; Bigos, D.; Jain, R.K.: Interleukin 2 Induced Leukozyte Adhesion to the Normal an Tumor Microvascular Endothelium in Vivo und Its Inhibition by Dextran Sulfate: Implications for Vascular Leak Syndrom. *Cancer Research* 51, 1561-1563, 1991
- Oikonomopoulou, K.; Ricklin, D.; Ward, P.A.: Interactions between coagulation and complement-their role in inflammation. *Semin Immunopathol* 34(1):151-65. 2012
- Parkinson, D.R.: Interleukin-2 in cancer therapy. *Semin Oncol* 15:10-26, 1988
- Patston, P.A.; Schapira, M.: Regulation of C1-inhibitor function by binding to type IV collagen and heparin. *Biochem Biophys Res Commun* 230: 597–601, 1997
- Patterson, R.L.; Webster N.R.: Sepsis and the inflammatory response syndrome. *J.R.Coll.Surg.Edinb.* 45:178-182, June 2000
- R Development Core Team: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, 2010
- Radke, A.; Mottaghy, K.; Goldmann, C.; Khorram-Sefat, R.; Kovacs, B.; Janssen, A.; Klosterhalfen, B.; Hafemann, B.; Pallua, N.; Kirschfink, M.: C1 inhibitor prevents capillary leakage after thermal trauma. *Crit Care Med* 28:3224-3232, 2000
- Rainger, G.E.; Fisher, A.; Shearman C.; Nash, G.B.: Adhesion of flowing neutrophils to cultured endothelial cells after hypoxia and reoxygenation in vitro. *Am J Physiol* 269:1298-1406, 1994
- Remick, D. G.; Bolgos, G.R.; Siddiqui, J.; Shin, J.; Nemzek, J.A.: Six at Six: Interleukin-6 Measured 6 H After the Initiation of Sepsis Predicts Mortality Over 3 Days. *J Immunol* 5;186(2):1199-208, 2012
- Riedemann, N.C.; Guo, R.-F.; Ward, P.A.: Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nature Medicine* 9, 517 – 524, 2003
- Riedemann, N.C.; Guo, R.F.; Hollmann, T.J; Gao, H.; Neff, T.A.; Reuben, J.S.; Speyer, C.L.; Sarma, J.V.; Wetsel, R.A.; Zetoune, F.S.; Ward, P.A.: Regulatory role of C5a in LPS induced IL-6 production by neutrophils during sepsis. *FASEB J* 18(2):370-2, 2004
- Rittirsch, D.; Flierl, M.A.; Ward, P.A.: Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8(10): 776–787, 2008

- Rosenberg, S.A.; Grimm, E.A.; Mc Grogan M.; Doyle, M.; Kawasaki, E.; Koths, K.; Mark, D.F.: Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in *Escherichia coli*. *Science* 223: 1412, 1984
- Rosenberg, S.A.; Lotze, M.T.; Muul, L.M. et al.: Observations in the systemic administration of the autologous lymphokine-activated cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 313:1485-1492, 1985
- Rosenberg, S.A.; Lotze, M.T.; Muul, L.M. et al.: A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 316:889-897, 1987
- Rot, A.; von Andrian, U.H.: Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 22:891–928, 2004
- Sanz, M.J.; Kubes, P.: Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking. *Eur. J. Immunol.* 42: 278–283, 2012
- Scherer, R.U.; Giebler, R.M.; Schmidt, U.; Paar, D.; Kox, W.J.: The influence of C1-esterase inhibitor substitution on coagulation and cardiorespiratory parameters in an endotoxin-induced rabbit model of hypercoagulability. *Sem Thromb Hemost* 22:357–366, 1996
- Schmaier, A.H.: The plasma kallikrein-kinin system counterbalances the renin-angiotensin system. *J. Clin. Invest.* 109:1007–1009, 2002
- Schmaier, A.H.; Røjkjær, R.; Shariat-Madar, Z.: Activation of the Plasma Kallikrein/Kinin System on Cells: A Revised Hypothesis. *Thromb Haemost* 82(2):226-33, 1999
- Schmedly, L.A.; Tonnesen M.G.; Sandhaus, R.A.; Haslett, C.; Guthrie, L.A.; Johnston, R.A.; et al.: Neutrophil-mediated injury to endothelial cells: enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 77:1233-1243, 1986
- Schmidt, W.; Stenzel, K.; Walther, A.; Gebhard, M.M.; Martin, E.; Schmidt, H.: Influence of C1-esterase inhibitor on tissue oxygenation of jejunal mucosa during endotoxemia. *Int J Surg Investig* 1:277-283, 1999
- Schouten, M.; Wiersinga, W.J.; Levi, M.; van der Poll, T.: Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 83(3):536-45, 2008
- Seiffge, D.; Kremer, E.: Effects of different mediators or cytokines and monoclonal antibodies to adhesion molecules on leukocyte adhesion in rat mesenteric venules. *Int J Microcirc* 15:301-308, 1995
- Selberg, O; Hecker, H.; Martin, M.; Klos, A.; Bautsch, W.,; Köhl, J.: Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma concentrations of procalcitonin, protein complement 3a, and interleukin-6. *Crit Care Med* 28(8):2793-8, 2000
- Sharma, J.N.: Cardiovascular Activities of the Bradykinin System. *ScientificWorld Journal* 14;8:384-93, 2008

- Sharma, J.N; AL-Sherif, G.J.: Pharmacologic Targets and Prototype Therapeutics in the Kallikrein-Kinin System: Bradykinin Receptor Agonists or Antagonists. *ScientificWorld Journal* 6:1247-1261 2006
- Siegel-Axel, D.; Langer, H.; Lindemann S. et al.: Die Rolle der Thrombozyten bei Entzündungs- und Artheroskleroseprozessen. *Med Klein* 2006, 101:467
- Siegel, J.P.; Puri, R.K.: Interleukin-2 toxicity. *J Clin Oncol* 9:694, 1991
- Simms, H.H.: Polymorphnuclear leukocytes: their role as central cellular elements in shock pathogenesis. *Shock* 4:225-231, 1995
- Smith, K.A.: Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 240:1169-1176, 1998
- Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Kleinhenz ME, Lonigro AJ: Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity. *Am J Physiol* 275:H1726-H1732, 1998
- Spronk, P.E.; Zandstra, D.F.; Ince, C.: Bench-to-bedside review: Sepsis is a disease of the microcirculation. *Critical Care* 8:462-468, 2004
- Stieh, J.; Harding, P.; Scheewe, J.; Dutschke, P.;Kramer, H.H.: Capillary leak syndrome after open heart surgery for congenital heart defects: Therapy with C1-inhibitor. *Biomed Progress* 9:13–16, 1996
- Sumagin, R. and Sarelius, I. H., Intercellular adhesion molecule-1 enrichment near tricellular endothelial junctions is preferentially associated with leukocyte transmigration and signals for reorganization of these junctions to accommodate leukocyte passage. *J. Immunol.*184: 5242–5252, 2010
- Taylor, A.; Cooper, D.; Granger, D.N.: Platelet-vessel wall interactions in the microcirculation. *Microcirculation* 12:1–1, 2005
- Taniguchi, T.; Matsui, H.; Fujita T. et al.: Structure and expression of cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 302:305-307, 1983
- Therneau, T. and original R port by Thomas Lumley. *Survival: Survival analysis, including penalised likelihood.* R package version 2.35-8, 2009.
- Thijs, L.G.; Schneider, A.J.; Groenveld, A.B.J.: The haemodynamics of septic shock. *Intensiv Care Med* 16:182-186, 1990
- Tiruppathi, C.; Naqvi, T.; Sandoval, R.; Mehta, D.; Malik, A.B.: Synergistic effects of tumor necrosis factor- α and thrombin in increasing endothelial permeability. *Am. J. Physiol.* 281: 958–968, 2001
- Titheradge, M.A.: Nitric oxide in septic shock. *Biochim. Biophys. Acta* 1141: 437–455, 1999
- Ueno, A.; Oh-ishi, S.: Roles for the Kallikrein-Kinin System in Inflammatory Exudation and Pain. *J Pharmacol Sci* 93, 1 – 20, 2003

- Vallet, B.: Endothelial cell dysfunction and abnormal tissue perfusion. *Crit Care Med* 30(suppl 5):S229-S234, 2004
- Van Hinsbergh, V.W.M.: Endothelium-role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol* 34:93–106, 2012
- Vedder, N.B.; Fouty, B.W.; Winn, R.K.: Role of neutrophils in generalized reperfusion injury associated with resuscitation from shock. *Surgery* 106:509-516, 1989
- Vestweber, D.: Selectins: cell surface lectins which mediate the binding of leukocytes to endothelial cells. *Semin Cell Biol.* 3:211–20, 1992
- Wagner, D.D.; Burger P.C.: Platelets in Inflammation and Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.* 23; 2131-2137, 2003
- Wagner, D.D.; Frenette, P.S.: The vessel wall und its interactions. *Blood* 111:5271-5281, 2008
- Walport, M.J.: Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344: 1058-1066, 2001a
- Walport, M.J.: Complement. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344: 1140-1144, 2001b
- Wanecek, M.; Weitzberg, E.; Rudehill, A.; Oldner, A.: The endothelin system in septic and endotoxin shock. *Eur. J. Pharmacol.* 407: 1–15, 2000
- Wang, A.; Lu, S.D.; Mark, D.F.: Site-specific mutagenesis of the human interleukin-2 gene: structure function analysis of the cystein residues. *Science* 224:1431, 1984
- Ward, P.A.; Gao, H.; Sepsis, Complement, and the Dysregulated Inflammatory Response. *J Cell Mol Med* 13(10): 4154–4160, 2009
- Ward, P.A.; Mark, R.M.: The acute inflammatory reaction. *Curr Opinion Immunol* 2:5, 1989
- West, W.H.; Tauer, K.W.; Yanneli, J.R.; Marshall, G.D.; Orr, D.W.; Thumann, G.B.; Oldham, R.K.: Constant-infusion of recombinant interleukin-2 in adoptive immunotherapy of advanced cancer. *N Engl J Med* 316:898-905, 1987
- Weyrich, A.S.; Zimmerman, G.A.: Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol* 25: 489–495, 2004
- Weyrich, A.S.; Lindemann, S.; Zimmermann, G.A.: The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb haemost* 1:1897-905, 2003
- Wouters, D.; Wagenaar-Bos, I.; van Ham, M.; Zeerleder, S.: C1 inhibitor: just a serine protease inhibitor? New and old considerations on therapeutic applications of C1 inhibitor. *Expert Opin Biol Ther* 8(8):1225-1240, 2008
- Zarbock, A.; Ley, K.: Mechanisms and Consequences of Neutrophil Interaction with the Endothelium. *Am J Pathol* 172(1):1-7, 2008

Zarbock, A.; Ley, K.: Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation* 16(1): 31–42, 2009

Zeerleder, S.; Caliezi, C.; van Mierlo, G.; Eerenberg-Belmer, A.; Sulzer, I.; Hack, C.E.; Willemin, W.A.: Administration of C1 inhibitor reduces neutrophil activation in patients with sepsis. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(4):529-35, 2003

Zhu, C.; Yago, T.; Lou, J.; Zarnitsyna, V.I.; McEver, R.P.: Mechanisms for Flow-Enhanced Cell Adhesion. *Ann Biomed Eng* 36(4):604-21, 2008

9.2

Abkürzungsverzeichnis

ARDS.....	Adult respiratory distress syndrome
AT.....	Antithrombin
CARS.....	kompensatorisches antagonistisches Response Syndrom
C1-Inh.....	C1-Esterase-Inhibitor
CLS.....	Capillary leak syndrome
DAF.....	Decay acceleration factor
DIC.....	Disseminated intravascular coagulation
EGF.....	Endothelial growth factor
ERCR.....	Endotheliale Protein C receptor
FGF.....	Fibroblast growth factor
GM-CSF.....	Granulocyte-Makrophage Colonie Stimulating Factors
GPCR.....	G-protein-coupled receptors
HMGB-1.....	High-mobility group box-1 protein
HMWK.....	High molecular weight kininogen
ICAM.....	Intercellular cell adhesion molecule
I.E.....	Internationale Einheit
IGF.....	Insulin like growth factor
IL.....	Interleukin
IL-1-Ra.....	Interleukin 1 Rezeptor Antagonist Molekül
INF.....	Interferon
JAM.....	Junctional adhesion molecule
LT.....	Leukotrien
MAC.....	Membrane attack complex
MAPK.....	Mitogen activated protein kinases
MARS.....	Gemischtes antagonistisches Response Syndrome
MASP.....	Mannose-Bindungslektin assoziierte Serinprotease
MBL.....	Mannosebindungslektin
MCP-1.....	Monocyte-chemoattractant-Protein 1
MIF.....	Macrophage migratory inhibitor factor
MODS.....	Multiple organ dysfunction syndrome
MOF.....	Multiple organ failure
NADPH.....	Reduziertes Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat

NAF.....	Neutrophiler Aktivierungs-Faktor
NGF.....	Nerve growth factor
NK-Zellen.....	Natürliche Killerzellen
NO.....	Stickstoffmonoxid
PA.....	Plasminogen-Aktivator
PAF.....	Platelet activating factor
PAI.....	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PAR.....	Protease activated receptors
PDGF.....	Platelet derived growth factor
PECAM.....	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PG.....	Prostaglandin
PGL ₂	Prostacyclin
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SOD.....	Superoxid Desmutase
TAFI.....	Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor
TF.....	Tissue factor
TGF.....	Transforming growth factor
TM.....	Thrombomodulin
TNF.....	Tumor-Nekrose-Faktor
TX.....	Thromboxan
VCAM.....	Vascular cell adhesion molecule
VLS.....	Vaskular leak syndrome
VWF.....	von Willebrand Faktor
Tc.....	Zytotoxische T-Zellen
Th.....	T-Helferzellen

9.3

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Mechanismen der systemischen Inflammation und Inhibition durch C1-INH
- Abbildung 2: Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion
- Abbildung 3: Exzessive Produktion inflammatorischer Mediatoren
- Abbildung 4: Einfluss von IL-2 auf Leukozyten und Endothelzellen
- Abbildung 5: Komplementaktivierung
- Abbildung 6: Membrangebundene und lösliche Komplementregulatoren und die verschiedenen Anfriffsebenen von C1-INH
- Abbildung 7: Einfluss der Anaphylatoxine auf die Inflammation
- Abbildung 8: Bidirektionale Interaktion zwischen Komplement-, Gerinnungs- und Fibrinolysesystem
- Abbildung 9: Gerinnungssystem
- Abbildung 10: Interaktion der Endothelzelle mit der Gerinnung, Inflammation, angeborenen und erworbenen Immunität
- Abbildung 11: Plasma- und Gewebe-Kallikrein-Kinin-System
- Abbildung 12: Einflüsse auf die Mikrozirkulation in der Sepsis
- Abbildung 13: Rekrutierung neutrophiler Granulozyten
- Abbildung 14: Inhibition der plasmatischen Kaskadensysteme durch C1-INH
- Abbildung 15: Präparierte Ratte mit ausgelagertem Darm
- Abbildung 16: Durchschnittliche adhärente Leukozytendichte pro mm² innerer Gefäßoberfläche über eine Strecke von 70µm.
- Abbildung 17: Behandlungsabhängige durchschnittliche „Grauzone“ im zeitlichen Verlauf durch Hierarchielevel-spezifischer punktwiser Eingrenzung durch die Standardabweichung
- Abbildung 18: Prozentualer Anteil der durchflossenen Venolen an den beobachteten Venolen einer Versuchsgruppe als Maß der Perfusion des postkapillären Schenkels im Mesenterium der Ratte über drei Stunden
- Abbildung 19: Mittlerer arterieller Blutdruck über 3 Stunden Versuchszeit
- Abbildung 20: Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes über 3 Stunden Versuchszeit
- Abbildung 21: Interleukin 6 Serumspiegel vor Versuchsbeginn und am Versuchende

9.4

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Definition von Sepsis und SIRS
- Tabelle 2: Pro- und antiinflammatorische Mediatoren
- Tabelle 3: Kontrolle der Hämostase durch die Endothelzelle
- Tabelle 4: Biologische Aktivität von C1-Esterase-Inhibitor
- Tabelle 5: Tierexperimentelle Studien zur C1-Esterase-Inhibitor-Substitution
- Tabelle 6: Klinische Studien zur C1-Esterase-Inhibitor-Substitution
- Tabelle 7: Versuchsgruppen und Infusionsschema
- Tabelle 8: Absolutzahl perfundierter Venolen und prozentualer Anteil der Venolen mit Stase des Blutflusses
- Tabelle 9: Interleukin 6 Serumspiegel Mittelwert und Standardabweichung

9.6

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei allen Personen, ohne deren Mitarbeit und Unterstützung die Durchführung der Promotionsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. med. K. Mayer danke ich für die Zuweisung des Themas und die wissenschaftliche Beratung.

Herrn Prof. Dr. med. F. R. Matthias danke ich für die Bereitstellung der Laboreinrichtung und die Hilfe bei der wissenschaftlichen Bearbeitung des Themas.

Herrn Dr. med. B. Leithäuser danke ich für die Unterstützung und Beratung bei der experimentellen Versuchsdurchführung.

Frau Daniela Reitz und Frau Henrike Thomas danke ich für die medizinisch-technische Unterstützung am Laborarbeitsplatz und für die Bestimmung der Plasmaproben.

Herrn Dr. G. Eichner danke ich für die statistische Bearbeitung der Daten.

Meinen Eltern für die stetige Unterstützung und Ermöglichung des beruflichen Werdeganges.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Giessen, den 11.05.2015

Roland Fischer



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6321-4



9 783835 1963214