

Aus dem Zentrum für Kardiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Der Einfluss des GLP-1-Analogons Liraglutid auf die vaskuläre Funktion und
Inflammation in polymikrobieller Sepsis

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Franziska Viktoria Aust
aus Memmingen

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter: xxx

2. Gutachter: xxx

Tag der Promotion: 28. Mai 2024

Inhaltsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	XIV
Tabellenverzeichnis	XVI
1 Zielsetzung	17
2 Literaturdiskussion.....	18
2.1 Sepsis	18
2.1.1 Historische Bedeutung	18
2.1.2 Aktuelle Definition der Sepsis	20
2.1.3 Epidemiologie	22
2.1.4 Ursachen und Erregerspektrum	25
2.1.5 Therapieansätze	27
2.2 Das Immunsystem	29
2.2.1 Zellen des Immunsystems	29
2.2.2 Pathogenese der Sepsis.....	32
2.3 Das Endothel.....	39
2.3.1 Aufbau und Funktion des Endothels	39
2.3.2 Endotheliale Dysfunktion	45
2.3.3 Endothel und Sepsis	46
2.4 GLP-1 und DPP-4.....	49
2.4.1 Physiologische Funktion	49
2.4.2 Pharmakologische Bedeutung.....	51
2.4.3 Weitere Funktionen.....	53
3 Material.....	58
3.1 Chemikalien und Reagenzien	58
3.2 Verbrauchsmaterialien	61
3.3 Antikörper	62
3.3.1 Antikörper Dot Blot	62
3.3.2 Antikörper Immunhistochemie	62
3.4 Laborgeräte	63
3.5 Auswertungsprogramme.....	66
3.6 Puffer und Lösungen	67
3.6.1 Puffer	67
3.6.2 Waschlösungen	69

4	Methoden.....	70
4.1	Versuchstiere.....	70
4.2	Sepsisinduktion.....	70
4.3	Organentnahme	72
4.4	Aorten- und Organpräparation	73
4.5	Organbad.....	73
4.6	Dot Blot und Stripping	75
4.6.1	Aufbereitung der Gewebeproben und Proteinbestimmung nach Bradford	75
4.6.2	Proteinnachweis im Dot Blot.....	76
4.6.3	Stripping	77
4.6.4	Digitale Auswertung	77
4.7	Fluoreszenzmikroskopie von Kryoschnitten.....	78
4.7.1	Herstellung von Kryoschnitten	78
4.7.2	Färbung mit Dihydroethidium	78
4.8	"Oxidative Burst" - Erfassung des oxidativen Stresses mittels Chemilumineszenz.....	79
4.9	DHE-HPLC	80
4.10	Messung der Genexpression	81
4.10.1	RNA-Isolation.....	82
4.10.2	RNA-Quantifizierung.....	83
4.11	Immunhistochemie.....	84
4.12	Statistische Auswertung	85
5	Ergebnisse	87
5.1	Zelluläre Blutkomponente.....	87
5.2	Körpergewicht, Körpertemperatur und Blutzuckerspiegel	88
5.3	Vaskuläre Funktionen.....	90
5.3.1	Vaskuläre Dilatation	90
5.3.2	Vaskuläre Kontraktion	91
5.4	Oxidativer Stress.....	92
5.4.1	Vaskulär	92
5.4.2	Kardial.....	94
5.4.3	Vollblut	95
5.5	Vaskuläre Inflammation: Veränderung auf mRNA-Ebene.....	96
6	Diskussion	98
6.1	Das CLP-Modell.....	98
6.1.1	Sepsis-Modelle im Vergleich	98
6.1.2	Sepsis-Induktion mittels LPS.....	101
6.1.3	Sepsis-Induktion mittels CLP	103
6.1.4	iNOS-Aktivierung mittels CLP	104

Inhaltsverzeichnis

6.1.5	CLP und oxidativer Stress	105
6.1.6	Endotheliale Dysfunktion im CLP-Modell	107
6.2	GLP-1-Analoga-vermittelte Effekte	107
6.2.1	Antiinflammatorische Effekte von GLP-1-Analoga	108
6.2.2	Oxidativer Stress, endotheliale Dysfunktion und deren Beeinflussung durch GLP-1-Analoga	110
6.2.3	Mechanismen	114
6.3	GLP-1-Rezeptor-abhängige Beeinflussung weiterer Organsysteme	116
6.4	Ausblick.....	120
7	Zusammenfassung	124
8	Literaturverzeichnis	126
	Danksagung	140
	Curriculum Vitae	141

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

2-HE	2-Hydroxyethidium
3-NT	3-Nitrotyrosin
A	Absorption
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACh	Acetylcholin
ADP	Allgemeine Dendritische Progenitorzelle
Ala	Alanin
ALI	Acute Lung Injury
ALP	Allgemeine Lymphoide Progenitorzelle
A_{max}	Absorptionsmaximum
AMP	Allgemeine Myeloide Progenitorzelle
APC	Aktiviertes Protein C
ApoE	Apolipoprotein E
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
Asc•	Ascorbinsäureradikal
AscH	Ascorbinsäure
Asp	Asparagin
AT I	Angiotensin I
AT II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
B/NP	B-Zell/NK-Zelle Progenitorzelle
BP	Basophile-Progenitorzelle
BSA	Bovine Serum Albumin Fraktion V
BZL	B-Zell-Lymphozyt
C	Konzentration
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
cAMP	cycklisches Adenosinmonophosphat
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome
CD	Cluster of Differentiation
cdsDNA	komplementäre doppelstrangige DNA

Abkürzungsverzeichnis

cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CLP	Cecal Ligation and Punction
COX	Cyclooxygenase
DAMP	Damage-Associated Molecular Patterns
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHE	Dihydroethidium
DIC	Disseminated Intravascular Coagulation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP-4	Dipeptidylpeptidase 4
DRG	Diagnostic Related Groups
DTT	Dithiothreitol
E+	Ethidium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycolbis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELIXA	Evaluation of Lixisenatide in Acute Coronary Syndrome
EPC	Endothelial Progenitor Cell
EPR	Elektronenspinresonanz
eNOS	endotheliale NO-Synthase (NOS III)
ESICM	European Society of Intensive Care Medicine
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavin-Mononukleotid
F _i O ₂	Fraktion des eingeatmeten Sauerstoffs
FT	Frühe T-Zelle
G-Protein	Guaninriphosphat-bindendes Protein
GCS	Glasgow Coma Scale
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GIP	Gastric Inhibitory Polypeptide
Gln	Glutamin
GLP-1	Glucagon Like Peptide-1
GLP1r	GLP-1-Rezeptor
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GMP	Granulozyten-/Monozyten-Progenitorzelle
GPI	Glykosylphosphatidylinositol

Abkürzungsverzeichnis

HCl	Salzsäure
HCT	Hämatokrit
HGB	Hämoglobin
His	Histidin
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
HUVECS	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
ICAM-1	Intercellular Cell Adhesion Molecule-1
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-12	Interleukin-12
Ile	Isoleucin
iNOS	inducible NO-Synthase (NOS II)
IRF3	Interferon Regulatory Factor 3
JAM	Junctional Adhesion Molecules
K ₂ HPO ₄	Di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat
KCl	Kaliumchlorid
KH-Puffer	Krebs-Hepes-Puffer
L-Arg	L-Arginin
L-Cit	L-Citrullin
LBP	LPS-Binding Protein
LDL	Low Density Lipoprotein
LEADER	Liraglutide Effect and Action in Diabetes: Evaluation of Cardiovascular Outcome Results
Leu	Leucin
LPS	Lipopolysaccharid
Lym	Lymphozytenkonzentration
Lys	Lysin
MACE	Major Adverse Cardiovascular Events
MAD	Mittlerer Arterieller Druck
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase

Abkürzungsverzeichnis

MCH	Mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MCV	Mittleres Erythrozytenvolumen
MDA	Malondialdehyd
MDP	Makrophagen-/Dendritische Progenitorzelle
MEP	Megakaryozyt-/Erythrozyt-Progenitorzelle
MGB	Minor Groove Binder
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	Major Histocompatibility Complex
MLP	Myeloide/Lymphoide Progenitorzelle
MMP2	Matrix Metalloproteinase-2
MPO	Myeloperoxidase
MPV	Mittleres Thrombozytenvolumen
mRNA	messenger RNA
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylokokkus aureus</i>
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamadendinukleotidphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
NaOH	Natronlauge
NFκB	Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-cells
NFQ	Nicht-Fluoreszierender Quencher
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nNOS	neuronale NO-Synthase (NOS I)
NO	Stickstoffmonoxid (Nitric Oxide)
Nox2	NADPH-Oxidase 2
NTG	Nitroglycerin
O ₂ •	Superoxid
P_LCR	Anteil der großen Thrombozyten
PAF	Platelet Activating Factor
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor Type 1
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns

Abkürzungsverzeichnis

p _a O ₂	Sauerstoffpartialdruck
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCI	Peritoneal Contamination and Infection
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDBu	Phorbol 12,13-dibutyrat
PDW	Thrombozytenverteilungsbreite
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PGF2 α	Prostaglandin F2 α
PGI ₂	Prostacyclin
Phe	Phenylalanin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLT	Thrombozyten
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PRR	Pattern-Recognising Receptors
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
qSOFA-Score	quick SOFA-Score
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RBC	Anzahl an Erythrozyten
RDW _{CV}	Verteilungshäufigkeit der Erythrozytenvolumina
RDW _{SD}	Tatsächliche Bestimmung der Breite der Erythrozytenverteilungskurve
RNA	Ribonukleinsäure
RONS	Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAE	Sepsis-Associated Encephalopathy
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SDS	Natrium (Sodium) Dodecyl Sulfat
SDF-1 α	Stroma Derived Factor-1 α
Ser	Serin
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOD	Superoxid Dismutase
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SSC	Surviving Sepsis Campaign

Abkürzungsverzeichnis

ssDNA	einzelsträngige DNA
STE-ACS	Akutes Koronarsyndrom mit ST-Hebungen
SUSTAIN-6-Trial	Trial to Evaluate Cardiovascular and Other Long-term Outcomes with Semaglutide in Subjects with Type 2 Diabetes
TBE	Tris/Borat/EDTA Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TLR	Toll-Like Receptor
Thr	Threonin
TM	Thrombomodulin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
tPA	Tissue-Type Plasminogen Activator
TRIF	Toll/IL-1R Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN- β
Trp	Tryptophan
TVT	Tiefe Venenthrombose
TZL	T-Zell-Lymphozyt
UF	Umrechnungsfaktor
uPA	Urokinase-Type Plasminogen Activator
Val	Valin
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WBC	Anzahl an Leukozyten

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Flussdiagramm zum Vorgehen bei Patienten mit klinischem Verdacht auf Sepsis..	21
Abbildung 2.2 Anzahl an Sepsisfällen in den USA von 1979-2001 bezogen auf den auslösenden Erreger.....	25
Abbildung 2.3 Infektionsfokus septischer Patienten.....	26
Abbildung 2.4 Sepsis-auslösende Pathogene.....	26
Abbildung 2.5 Hämatopoese und die Rolle des NF- κ Bs.	30
Abbildung 2.6 Immunantwort der Sepsis – Schemazeichnung.....	33
Abbildung 2.7 TLR4 Signalkaskade.	36
Abbildung 2.8 Schematische Darstellung der Grundstruktur des Lipopolysaccharids gramnegativer Bakterien.....	38
Abbildung 2.9 Aufbau und grundlegende Funktionen des Endothels.	40
Abbildung 2.10 Aufbau und Funktion der eNOS.	42
Abbildung 2.11 Gerinnungskaskade.....	43
Abbildung 2.12 Endotheliale Funktion und Dysfunktion.....	46
Abbildung 2.13 Endotheliale Aktivierung nach LPS-Injektion.	48
Abbildung 2.14 Inkretinhormone und ihre Aufgabe im Glukosehaushalt..	50
Abbildung 2.15 Primärstruktur von Liraglutid.....	52
Abbildung 2.16 Antiinflammatorische, antioxidative und endothelprotektive Effekte des Linagliptins nach LPS-Injektion in Ratten.	55
Abbildung 4.1 Schematische Darstellung der CLP-Induktion und der Behandlungen.	72
Abbildung 4.2 Isometrische Spannungsmessung im Organbad – Schemazeichnung.	74
Abbildung 4.3 Superoxid (O_2^*) -abhängige Hydroxylation und unspezifische Oxidation von DHE	80
Abbildung 5.1 Leukozytenkonzentration.	88
Abbildung 5.2 A-C Differenz Körpergewicht, Differenz Körpertemperatur, Blutzuckerspiegel.....	89
Abbildung 5.3 A, B Endothelabhängige und unabhängige Vasodilatation.....	90
Abbildung 5.4 A, B Maximale Konstriktionsfähigkeit unter $PGF_2\alpha$ und Kontraktion unter KCl.....	91
Abbildung 5.5 A, B Vaskulärer oxidativer Stress.	93
Abbildung 5.6 A, B Vaskuläre Produktion von Superoxid und Peroxinitrit	94
Abbildung 5.7 Kardialer oxidativer Stress (DHE-Kryoschnitte).....	95
Abbildung 5.8 A, B Hämatologischer oxidativer Stress.	96
Abbildung 5.9 A-D Vaskuläre Inflammation, mRNA-Expression von iNOS, IL-6, ICAM-1 und TNF α	97
Abbildung 6.1 Gegenüberstellung von LPS-, PCI- und CLP-Modell anhand klinischer und serologischer Parameter im zeitlichen Verlauf.	100
Abbildung 6.2 A, B Oxidativer Stress nach LPS-Injektion.	102
Abbildung 6.3 Zeitlicher Verlauf von Thrombozytenkonzentration und Mikrothrombenbildung nach LPS-Injektion.	103

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 6.4 Bildung von NO, iNOS-Aktivität und Mortalität nach LPS-Injektion und GLP1r-abhängige Beeinflussung.....	110
Abbildung 6.5 Experimentelle arterielle Hypertonie und deren Beeinflussung durch Liraglutid.	113
Abbildung 7.1 Schematische Zusammenfassung der positiven kardiovaskulären Auswirkungen des GLP-1-Analogons Liraglutid auf CLP-induzierte polymikrobielle Sepsis.	125

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Kriterienkatalog zur Erhebung des SOFA-Scores.....	20
Tabelle 3.1 Chemikalien und Reagenzien.....	60
Tabelle 3.2 Verbrauchsmaterialien	62
Tabelle 3.3 Antikörper Dot-Blot	62
Tabelle 3.4 Antikörper Immunhistochemie.....	62
Tabelle 3.5 Laborgeräte.....	65
Tabelle 3.6 Auswertungsprogramme	66
Tabelle 3.7 Krebs-Hepes- (KH-) Puffer.....	67
Tabelle 3.8 KH-Puffer mit Inhibitoren (Inhibitoren-puffer)	67
Tabelle 3.9 Organbad-Puffer	67
Tabelle 3.10 Homogenisierungs- (Hg-) Puffer	68
Tabelle 3.11 Homogenisierungs- (Hg-) Lösung.....	68
Tabelle 3.12 Git-Puffer	68
Tabelle 3.13 Stripping-Puffer.....	68
Tabelle 3.14 Tris buffer saline (TBS) x 10	69
Tabelle 3.15 TBS-T	69
Tabelle 3.16 Phosphate Buffer Saline (PBS) x 10.....	69
Tabelle 3.17 PBS-T	69
Tabelle 4.1 Interventionsgruppen.....	70
Tabelle 4.2 PCR-Ansatz für die TaqMan qRT-PCR.....	84
Tabelle 4.3 PCR-Programm für die TaqMan qRT-PCR	84
Tabelle 5.1 Hämatologische Parameter.	87

1 Zielsetzung

Nach wie vor stellt die Sepsis ein schweres und trotz modernster Medizin oft tödlich verlaufendes Krankheitsbild dar. Dabei spielt nicht die Infektion selbst, sondern die Reaktion des Immunsystems mit nachfolgender Organdysfunktion, insbesondere des Herz-Kreislaufsystems, eine entscheidende Rolle und trägt dadurch zur Schwere dieses Krankheitsbildes bei.

Über positive Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System unter der Anwendung von Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) Analoga sowie von Dipeptidylpeptidase 4 (DPP-4) - Inhibitoren, zweier Wirkstoffgruppen, welche primär in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 Verwendung finden, war bereits seit dem vergangenen Jahrzehnt im Rahmen von randomisierten kontrollierten Studien wie LEADER, SUSTAIN-6 [1, 2] und REWIND berichtet worden [3]. Aus dieser Erkenntnis ergeben sich therapeutische Möglichkeiten, die über eine Anwendung bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, in dessen Behandlung beide Wirkstoffgruppen mittlerweile fest vertreten sind, hinausgehen.

Unsere Arbeitsgruppe hatte bereits in der Vergangenheit positive Auswirkungen einer GLP-1-Rezeptor-abhängigen Therapie bei Lipopolysaccharid (LPS) -induzierter Sepsis in Mäusen bestätigen können [4, 5]. Auf die bisherigen Erkenntnisse aufbauend sollte untersucht werden, ob sich diese Erkenntnisse auch auf die polymikrobielle Sepsis übertragen lassen. Hierfür wurde das Cecal Ligation and Punction (CLP) Mausmodell ausgewählt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen einer Behandlung mit GLP-1-Analoga in polymikrobieller Sepsis zu erforschen. Hierbei stehen insbesondere folgende Parameter im Fokus:

- Vaskuläre Funktion
- Oxidativer Stress
- Vaskuläre Inflammation

Die Erkenntnisse sollen sowohl zu einem besseren Verständnis der Wirkmechanismen der GLP-1-Analoga als auch der Pathomechanismen einer Sepsis führen. Zudem soll mithilfe dieser Ergebnisse langfristig dazu beigetragen werden, eine weitere Therapieoption und somit eine bessere Bekämpfung des Krankheitsbildes Sepsis zu ermöglichen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Sepsis

2.1.1 Historische Bedeutung

Das Krankheitsbild der Sepsis war schon im antiken Griechenland bekannt. So leitet sich der heutige Begriff vom altgriechischen „σηψις“ (gesprochen: „sipsis“) ab und bezeichnete den Zerfall organischer Materie. Bereits in den Gedichten von Homer findet sich der Begriff „σηπω“ („sepo“ zu dt. „ich rotte“) und somit erste Nachweise über das Wissen um das Krankheitsbild der Sepsis. Auch Hippocrates griff diesen Begriff auf und beschrieb um ca. 430 v. Chr. die Sepsis als eine „Fäulnis von Blut und Gewebe“ [6-8].

Trotz dieser frühen Erkenntnisse konnte der konkrete Pathomechanismus der Sepsis lange Zeit wissenschaftlich nicht nachvollzogen werden. Die durch Hippocrates aufgestellte Theorie, dass also eine Fäulnis des Körpers und in diesem Zusammenhang entstehende Gifte eine systemische Reaktion bewirken würden, hielt sich in Teilen bis Anfang des 20. Jahrhunderts [9, 10]. Durch die Arbeit und das Wirken von Ignaz Semmelweis in der Mitte des 19. Jahrhunderts gewannen antiseptische Maßnahmen (z. B. die Händedesinfektion mit Chlorwasser) zunehmend an Bedeutung, wodurch eine wirkungsvolle Prävention der Sepsis erzielt werden konnte [11-14]. Heute zählen sie mehr denn je zu den Hygienestandards einer jeden Krankenversorgung, ein genaueres Verständnis über die Pathophysiologie von Infektionen und insbesondere der Sepsis ergab sich zum damaligen Zeitpunkt aber noch nicht.

Im Jahr 1914 definierte Hugo Schottmüller die Sepsis als eine „subjektive oder objektive Krankheitserscheinung“ [9] aufgrund pathogener Keime, die von einem Erregerherd ausgehend in die Blutbahn gelangen. Dabei hob er nicht nur den Einfluss von bakteriellen Toxinen auf die Entstehung einer Sepsis hervor, sondern beschrieb zudem die ausgelöste Reaktion des Körpers als wesentlichen Bestandteil des Krankheitsbildes und nicht nur die zugrundeliegende Infektion [9, 15].

1991 wurde diese Definition überarbeitet und der Begriff der systemischen Inflammationsreaktion (Systemic Inflammatory Response Syndrome – SIRS) eingeführt. Demnach lag eine Sepsis genau dann vor, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt waren: Hypo-/Hyperthermie, Tachykardie, Tachypnoe und Leukopenie/Leukozytose bzw. Linksverschiebung [16]. Letzteres bezeichnet die vermehrte Freisetzung von teilweise noch unreifen Leukozyten aus dem Knochenmark in das Blut aufgrund vorausgegangener Zytokinstimulation [17].

Literaturdiskussion

Bei zusätzlich bestehender Organdysfunktion sprach man von einer schweren Sepsis; ein septischer Schock lag bei flüssigkeitsrefraktärer Hypotonie mit konsekutiver Kathecholaminpflichtigkeit vor. Der Kriterienkatalog wurde 2001 erweitert, gleich blieb jedoch das Verständnis der dysregulierten Immunantwort als wesentlicher Pathogenitätsfaktor und Screeningparameter erhalten [18].

Kritik erfuhren beide Definitionsansätze dahingehend, dass sowohl eine nicht-septische Infektion die Kriterien eines SIRS erfüllen konnte (z.B. Pankreatitis), als auch eine klinisch offensichtliche Sepsis nicht immer als solche bestätigt werden konnte [15, 18]. Die Sepsis-3-Taskforce, eine internationale Arbeitsgruppe der European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM), veröffentlichte daher im Jahr 2016 in Zusammenarbeit mit der Surviving Sepsis Campaign (SSC) eine neue Definition der Sepsis und beschrieben sie als eine „akut lebensbedrohliche Organdysfunktion, hervorgerufen durch eine inadäquate Wirtsantwort auf eine Infektion“ [16]. Zur Diagnose einer sich in diesem Zusammenhang ergebenden Organdysfunktion wurde der Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) -Score entworfen; eine Veränderung des Scores von mindestens zwei Punkten sprach für das Vorliegen einer Sepsis [16, 19] (*Tabelle 2.1*).

Organsystem	0	1	2	3	4
Lunge					
p_aO_2/F_iO_2 (mm Hg)	>400	<400	<300	<200+ Beatmung	<100+ Beatmung
Koagulation					
Thrombozyten ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	≥ 150	<150	<100	<50	<20
Leber					
Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	<20	20–32	33–101	102–204	>204
Kardiovaskulär					
MAD (mm Hg)	≥ 70	<70	–	–	–
Vasopressor ($\mu\text{g/kg/min}$)	–	–	Dopamin < 5 oder Dobutamin (dosisunabhängig)	Dopamin 5,1–15 oder Epinephrin $\leq 0,1$ oder Norepinephrin $\leq 0,1$	Dopamin>15 Epinephrin>0,1 Norepinephrin>0,1
Zentrales Nervensystem					
GCS-Score	15	13–14	10–12	6–9	<6
Niere					
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	<110	110–170	171–299	300–440	>440
Urinausscheidung (ml/Tag)	–	–	–	<500	<200

Tabelle 2.1 Kriterienkatalog zur Erhebung des SOFA-Scores Der Kriterienkatalog beschreibt jeweils vier Stufen einer entstehenden Dysfunktion für sechs verschiedene Organsysteme. Bei einer Veränderung des SOFA-Scores um zwei oder mehr Punkte gilt die Diagnose „Sepsis“ als wahrscheinlich. F_iO_2 = Fraktion des eingeatmeten Sauerstoffs; GCS = Glasgow Coma Scale; MAD = Mittlerer Arterieller Druck; p_aO_2 = arterieller Sauerstoffpartialdruck. Tabelle adaptiert aus [15].

2.1.2 Aktuelle Definition der Sepsis

Die Definition der Sepsis-3-Taskforce und der SSC genießt bis heute Gültigkeit. Eine Veränderung des SOFA-Scores beschreibt die Entstehung einer Organdysfunktion anhand einer Verschlechterung innerhalb sechs verschiedener Organsysteme in vier Schweregraden. Von einer Sepsis häufig betroffen und daher durch den SOFA-Score beschrieben sind die Lunge (Oxygenierungsindex = arterieller Sauerstoffpartialdruck/Fraktion des eingeatmeten Sauerstoffs [p_aO_2/F_iO_2 -Verhältnis]), das Bewusstsein (GCS [Glasgow Coma Scale]), der Kreislauf (MAD [Mittlerer Arterieller Druck], Katecholaminbedarf), die Niere (Kreatinin, Urinausscheidung), die Leber (Bilirubin) und die Gerinnung (Thrombozyten). Da deren Parameter im normalen klinischen Setting außerhalb der Intensivstation meist nicht sofort und routinemäßig für jeden Patienten ermittelbar sind, wurde zusätzlich der quick-

SOFA (qSOFA)–Score für die vorläufige Einschätzung auf Normalstation als Screeninginstrument eingeführt. Es erlaubt somit eine schnelle Beurteilung des Patienten bzgl. einer möglicherweise bestehenden Sepsis. Ermittelt werden dabei die folgenden Kriterien:

- Atemfrequenz ≥ 22 /Minute
- Bewusstsein (GCS < 15)
- systolischer Blutdruck ≤ 100 mmHg

Sind mindestens zwei von drei Kriterien erfüllt, so kann die vorläufige Diagnose einer Sepsis gestellt und eine entsprechende Therapie in die Wege geleitet werden. Eine Bestätigung dieser Verdachtsdiagnose hat dann in Form einer einmaligen Erhebung des SOFA-Scores zu erfolgen [15, 19, 20]. Das Vorgehen und die zeitlichen Abfolgen sofern klinisch der Verdacht auf eine Sepsis besteht, sind anhand eines Flussdiagrammes in der Abbildung 2.1 dargestellt.

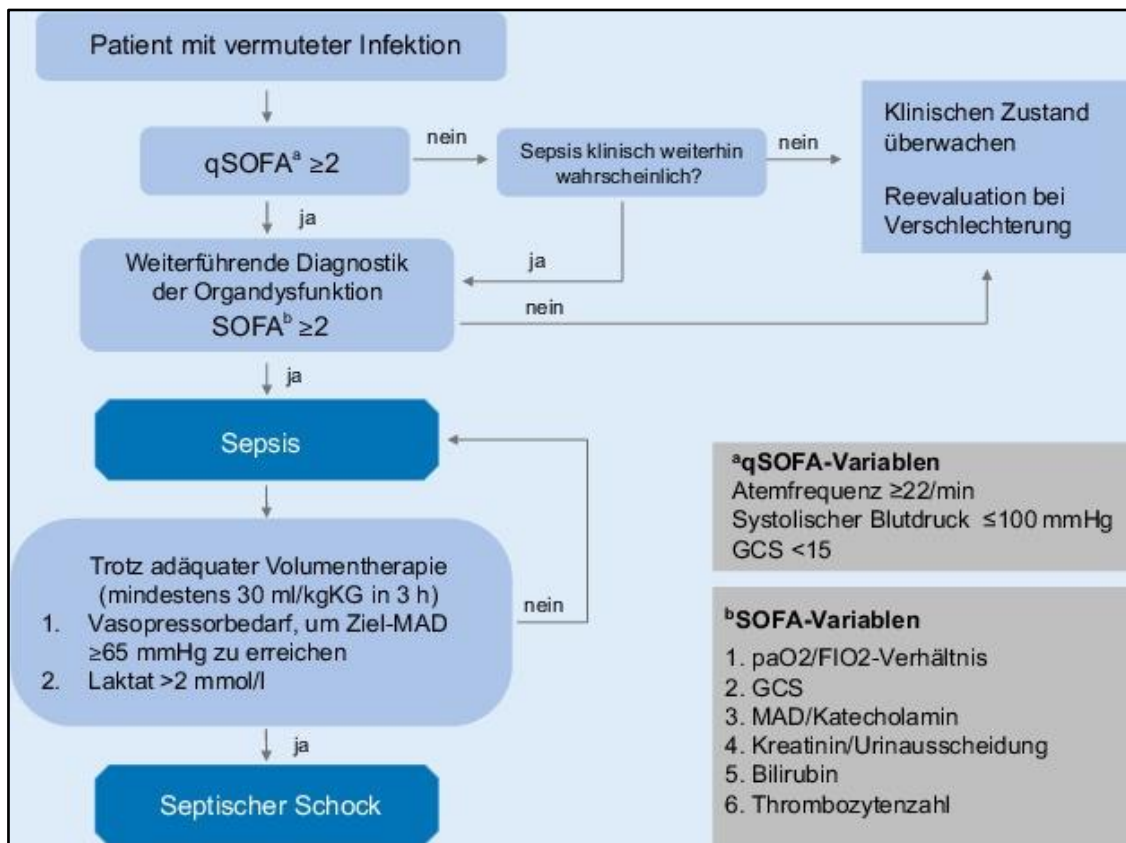


Abbildung 2.1 Flussdiagramm zum Vorgehen bei Patienten mit klinischem Verdacht auf Sepsis. Da der SOFA-Score aufgrund seiner Komplexität nicht geeignet ist, um routinemäßig den Verdacht auf eine Sepsis zu überprüfen, wird zunächst der qSOFA-Score als Screeninginstrument genutzt. Sind mindestens zwei von drei Kriterien erfüllt, oder gilt eine Sepsis weiterhin klinisch als wahrscheinlich, wird dieser durch Erhebung des SOFA-Scores überprüft. Besteht trotz adäquater Volumentherapie zusätzlich eine Laktatazidose (Laktat > 2 mmol/l) und der Bedarf an Vasopressoren, um einen Ziel-MAD von ≥ 65 mmHg erreichen, so spricht man von einem septischen Schock (s. oben). Abbildung entnommen aus [16].

Mit dieser überarbeiteten Definition und der damit einhergehenden Kopplung der Diagnose „Sepsis“ an eine akut bestehende Organdysfunktion entfiel auch die bis dahin übliche Unterscheidung zur sog. „schweren Sepsis“, ehemals bezeichnend für eine Sepsis mit zusätzlicher Organdysfunktion. Letztere hatte in den Definitionen von 1992 (Sepsis-1) und 2001 (Sepsis-2) neben der „normalen“ Sepsis eine eigene Entität gebildet.

Ebenfalls angepasst wurde der Begriff des „septischen Schocks“. Die DSG-Stellungnahme von 2018 definierte ihn wie folgt: „Ein septischer Schock ist definiert, als eine trotz adäquater Volumentherapie persistierende arterielle Hypotension mit der Notwendigkeit einer Therapie mit Vasopressoren, um einen mittleren arteriellen Blutdruck von ≥ 65 mmHg zu erreichen. Gleichzeitig muss der Laktatwert im Serum > 2 mmol/l betragen [16]. Die Diagnose eines septischen Schocks ist somit an eine fortgeschrittene Fehlfunktion auf zellulärer, metabolischer und zirkulatorischer Ebene geknüpft und wird im Vergleich zur normalen Sepsis mit einer erhöhten Mortalität verbunden [21].

2.1.3 Epidemiologie

Seit der Entdeckung des Penicillins 1928 durch Sir Alexander Fleming [22, 23] und der darauffolgenden „goldenen Ära der Antibiotika“ [22], aber auch im Zuge des flächendeckenden Einsatzes von Impfungen konnten Infektionserkrankungen im letzten Jahrhundert zunehmend eingedämmt werden [22, 24]. Obwohl auch zu Beginn einer septischen Erkrankung ein Infektionsgeschehen steht, lässt sich der oben beschriebene Rückgang nicht auf die Sepsis selbst übertragen. Studien aus den USA sowie weltweite Daten suggerieren vielmehr eine gegenteilige Entwicklung und zeigen auf, dass die Inzidenz in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich gestiegen ist. Nach aktuellem Stand geht man in den USA von über 1 Million betroffenen Patienten im Jahr bei einer jährlichen Wachstumsrate von 7–8 % aus. Weltweit wird die Zahl auf 35 Millionen Fälle an Sepsis, bzw. auf 19,4 Millionen Fälle an schwerer Sepsis (nach Sepsis-1-Definition) geschätzt [25, 26].

Lange Zeit lagen für Deutschland nur wenige Daten diesbezüglich vor, vergleichbare Studien existierten kaum. Diesem Problem nahm sich im Jahr 2003 die Deutsche Sepsisgesellschaft (SEPnet) in Form einer Prävalenzstudie an. Hierbei betrug die Punktprävalenz auf deutschen Intensivstationen nach damaliger Definition 12,4 % für Sepsis bzw. 11 % für schwere Sepsis. Aus diesen Zahlen heraus ergab sich eine geschätzte Inzidenz von 76–110 Fällen einer schweren Sepsis pro 100.000 Einwohner [27]. Zehn Jahre später wurde im Rahmen der INSEP Studie erneut die Punktprävalenz für schwere Sepsis/septischen Schock erfasst. Nach Sepsis-1 Definition lag dabei die Punktprävalenz bei 17,9 %. Von 11.883 erfassten Patienten hatten demnach 1285 Patienten einen septischen Schock. Wurde hingegen die Sepsis-3-Definition zugrunde gelegt, so sank diese Zahl auf 848 Patienten. Gleichzeitig stieg die Gesamtkrankenhausletalität von 23,4 % auf 50,9 %. Nicht abschließend geklärt werden konnte, ob es

sich bei dem Anstieg der Punktprävalenz gegenüber der deutschen Prävalenzstudien um eine tatsächliche Zunahme von Fällen mit schwerer Sepsis handelte, oder ob vielmehr die Unterschiede in den zugrundeliegenden Definitionen einer Organdysfunktion eine solche Zunahme erscheinen ließen [18, 28].

Mit Einführung des Diagnostic Related Groups (DRG) -Systems wurde ab 2004 erstmalig die flächendeckende Erfassung der Inzidenz in Deutschland ermöglicht. Damit konnten auch Fälle, die keine intensivmedizinische Behandlung erfahren hatten, berücksichtigt werden. Initial bestehende Mängel, wodurch nur bei gelungener Identifikation des ursächlichen Erregers eine Sepsis auch als solche erfasst werden konnte, wurden mit Einführung der Codes R65.0! (Sepsis), R65.1 (schwere Sepsis) und R57.2 (septischer Schock) behoben. Dieser Punkt war insofern von Relevanz, da sich positive Blutkulturen lediglich in 30–40 % der septischen Patienten nachweisen lassen.

In den Jahren 2007 bis 2013 konnte anhand von 27 verschiedenen International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD) -10-Kodierungen eine Zunahme der Inzidenz von 256 auf 335 pro 100.000 Einwohner beobachtet werden. Dies entspricht einer jährlichen Zunahme von 5,7 % [29]. Zu bedenken gilt es, dass auch ein erhöhtes Bewusstsein und somit eine vermehrte Wahrnehmung für die Entstehung einer Organdysfunktion und ebenso für die Sepsis selbst dazu beitragen können, dass eine steigende Anzahl an Fällen überhaupt registriert werden [28].

Im scheinbaren Gegensatz dazu geht aus den zuletzt veröffentlichten Daten des statistischen Bundesamtes seit 2020 eine deutliche Abnahme nahezu aller registrierten Sepsisdiagnosen (exklusive der verschiedenen Formen einer Sepsis in Neugeborenen) hervor [30]. Ob sich dieser Trend weiter fortsetzen wird oder sich lediglich anhand der durch die Corona-Pandemie bedingten Veränderungen in der Patientenstruktur erklärbar ist, wird sich in den nächsten Jahren zeigen. Gesundheitsprognosen gehen vielmehr von einer weiteren globalen Zunahme von Risikofaktoren, wie zum Beispiel Adipositas und Diabetes mellitus, aus [31, 32]. Insbesondere in Deutschland wird sich der demographische Wandel - wenngleich dieser ein globales Phänomen darstellt - in den kommenden Jahren weiter zuspitzen. Die Alterung spiegelt sich einerseits in einer Zunahme des Durchschnittsalters sowie des Altersquotienten, insbesondere aber in einem Anstieg der Anzahl der Hochbetagten (> 80 Jahre) wider [33]. Damit einhergehend steigt auch das Durchschnittsalter des chirurgischen Patientenkollektivs; stärker sogar, als in der Gesamtbevölkerung. Viele Eingriffe lassen sich dabei auf altersbedingte Pathologien zurückführen [34], darunter fallen unter anderem auch gelenkersetzende Maßnahmen mit dem damit verbundenen Einbringen von Fremdmaterial [35].

Insbesondere der letzte Punkt ist mit einem doppelten bis dreifachen Risiko einer nachfolgenden Sepsistentstehung assoziiert [36], ein hohes Alter gilt zudem als eigenständiger Risikofaktor [37, 38]. Eine zukünftig weitere Zunahme der Sepsisfälle scheint daher wahrscheinlich [37, 39].

Unter dem Aspekt der steigenden Fallzahlen sind auch ökonomische Faktoren von Bedeutung. Ca. 23000 € werden in der Regel für die intensivmedizinische Behandlung eines septischen Patienten ausgegeben, wobei Kostenabweichungen von über 18000 € auftreten können [40]. Grund für diese große Variabilität ist in erster Linie die Diversität der klinischen Verläufe. Bei einem Großteil der septischen Patienten ist eine intensivmedizinische Behandlung erforderlich, kommt es zum Versagen einer oder mehrerer Organsysteme, sind hier kostspielige Verfahren zur Aufrechterhaltung deren Funktionen notwendig [37, 40]. Zusätzlich zu den Basiskosten einer intensivmedizinischen sowie der sepsisspezifischen Behandlung (bestehend aus Antibiose und vasoaktiven Medikamenten) ergeben sich in über 95 % der septischen Patienten Beatmungskosten bei zugrundeliegender respiratorischer Insuffizienz. Etwas mehr als ein Viertel der Patienten benötigt darüber hinaus eine Nierenersatztherapie [40]. Auch der weitere klinische Verlauf spielt eine maßgebliche Rolle in Bezug auf die Behandlungskosten. So ergeben sich für Patienten, die an einer Sepsis verstorben sind, deutlich höhere Kosten als für überlebende Patienten. Als Gründe hierfür gilt der vermehrte Einsatz von teuren Medikamenten im Versuch, den tödlichen Verlauf abzuwenden [26, 40]. Dies betrifft nicht nur die Gesamtkosten, sondern auch die durchschnittlichen Kosten pro Tag, obwohl nicht-überlebende Patienten in der Regel vier Tage weniger auf der Intensivstation verbleiben [40]. Neben den direkten Kosten entstehen durch eine Sepsis weitere indirekte Kosten für eine Gesellschaft. Bedingt durch temporären oder permanenten Arbeitsausfall, nachfolgender Frühberentung sowie zuletzt durch Versterben belaufen sich diese auf ca. 2–4 Milliarden € im Jahr. Somit betragen die indirekten Kosten teilweise mehr als das doppelte der krankenhaus-assoziierten Aufwendungen (ca. 1–2 Milliarden €/Jahr) [41].

Nach wie vor ist die Sepsis durch eine hohe Mortalität gekennzeichnet, die Anzahl der Sepsis-assoziierten Tode entsprach 2013 in etwa der Anzahl an verstorbenen Patienten aufgrund eines akuten Myokardinfarktes [42]. Sowohl in Deutschland als auch in den USA konnten aber auch positive Entwicklungen beobachtet werden. Trotz steigender absoluter Anzahl an Todesfällen durch Sepsis, konnte ein Rückgang der relativen Anzahl festgestellt werden. Die Mortalität sank dabei in einem Zeitraum von fünf Jahren um 2,7 % auf 24,3 % (DE) bzw. innerhalb von 22 Jahren um 9,9 % auf 17,9 % (USA) [19, 25, 29].

2.1.4 Ursachen und Erregerspektrum

Den meisten Sepsisfällen liegt aktuell eine Infektion mit grampositiven Bakterien zugrunde, dicht gefolgt von den gramnegativen Erregern. In den weiteren Fällen handelt es sich meist um einen zugrunde liegenden Pilzbefall [25, 42-44] - in der Regel aus dem Stamm der *Candida* - oder um eine Mischinfektion [25, 43, 44]. Eine Identifikation des sepsisauslösenden Erregers gelingt dabei in etwa der Hälfte der Fälle [25, 44]. Die genaue mikrobiologische Epidemiologie weist sowohl geographische Unterschiede als auch eine zeitliche Dynamik auf [25, 43]. Ein prominentes Beispiel ist die Entstehung von Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA), durch die vor einigen Jahren ein Trend zugunsten der grampositiven Erreger beobachtet werden konnte (Abbildung 2.2) [42, 43]. Diese sind auch heute noch die häufigsten, Sepsis-auslösenden Erreger, wobei mittlerweile eine zunehmende Bedeutung den Pilzinfektionen beigemessen werden muss [42].

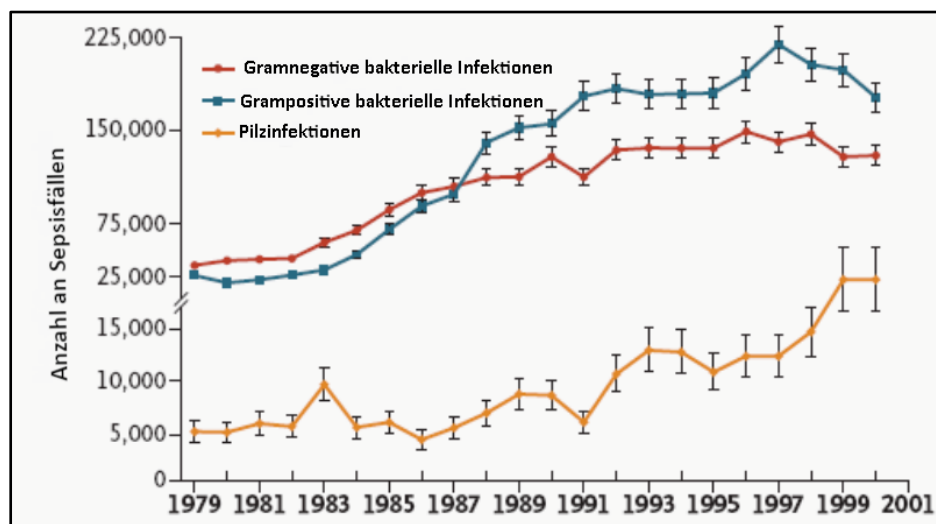


Abbildung 2.2 Anzahl an Sepsisfällen in den USA von 1979-2001 bezogen auf den auslösenden Erreger. Die Punkte repräsentieren die Anzahl der Fälle für das jeweilige Jahr, die Säulen stellen die Standardabweichung dar. Modifizierte Abbildung aus [45].

Der Frage nach der zugrunde liegenden Infektion - sowohl in Bezug auf Lokalisation als auch auf das ursächliche Pathogen - nahmen sich verschiedene Studien an, zuletzt eine schwedische Beobachtungsstudie aus dem Jahr 2021 um Melhammar et al.. Der urologische, der respiratorische und der abdominelle Trakt bildeten demnach die häufigsten Ausgangslokalisationen für eine beginnende Sepsis (Abbildung 2.2) [46].

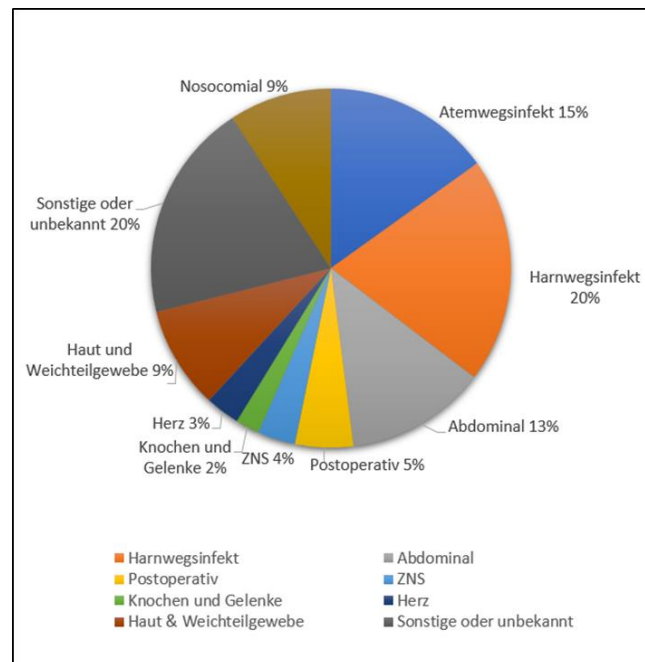


Abbildung 2.3 Infektionsfokus septischer Patienten. Selbsterstellte Abbildung auf Datenbasis von [46].

Dass auch dieser Punkt regional stark unterschiedlich ausfallen kann, zeigen vergleichbare Studien aus Äthiopien, wo insbesondere dem fieberhaften Infekt ohne gefundenen Fokus, aber auch der Tuberkulose-assoziierten Sepsis eine verstärkte Bedeutung beigemessen wird [47]. Konnte ein kausaler Erreger bestimmt werden, so handelte es sich in den meisten Fällen um *E. coli*, gefolgt von Pneumokokken, Staphylokokken (insb. *S. aureus*) und weiteren Streptokokken. Die folgende Grafik (Abbildung 2.4) gibt die beschriebene Verteilung kausaler Pathogene der schwedischen Studie wieder [46].

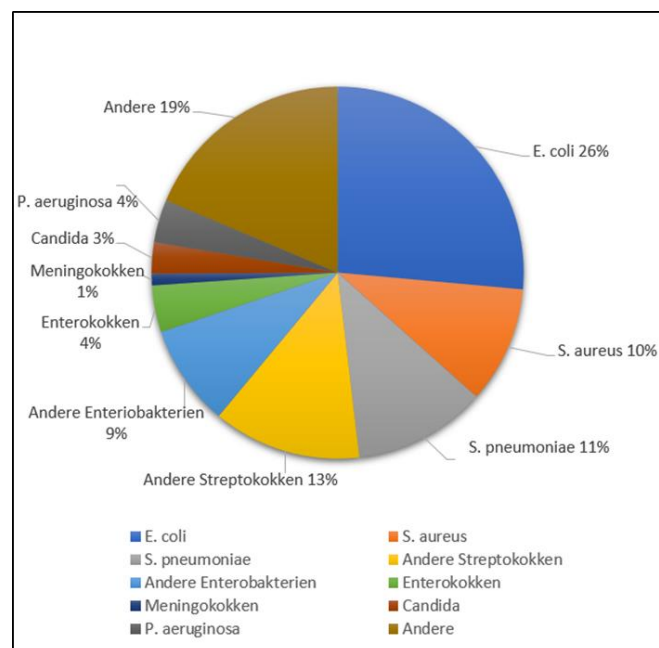


Abbildung 2.4 Sepsis-auslösende Pathogene. Selbsterstellte Abbildung auf Datenbasis von [46].

Damit eine Infektion tatsächlich eine Sepsis bedingt, sind eine ganze Reihe von endogenen und exogenen Faktoren beteiligt. Diese begünstigen in ihrer Gesamtkonstellation die Entstehung einer Sepsis.

Anhand typischer Oberflächenstrukturen wird zunächst ein invasiver Keim in der Regel erkannt und führt durch die Zellen des Immunsystems zu einer ersten Immunreaktion. In gramnegativen Bakterien ist dabei typischerweise das LPS in die Zellmembran integriert und nach außen gerichtet, in grampositiven Bakterien ist die Oberflächenstruktur durch Lipopeptide [48, 49] und Lipoteichonsäure gekennzeichnet. Diese Strukturmerkmale alleine können jedoch nicht in einem ausreichenden Maße die unterschiedliche Pathogenität der einzelnen Erreger erklären. Vielmehr spielt auch die jeweilige Virulenz eine entscheidende Rolle. Diese kann auch innerhalb eines Bakterienstammes große Unterschiede aufweisen, wie am Beispiel von *MRSA* als Untergruppe des *S. aureus* zu erkennen ist [49]. Durch Interaktion mit einem Toll-like-Rezeptor (TLR) wird schließlich eine Immunantwort generiert [48] (s. 2.2.2 Pathogenese der Sepsis).

Die Entstehung einer Sepsis aufgrund einer Infektion mit einem singulären Erreger mit hoher Virulenz (z.B. *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*) in einem ansonsten gesunden Organismus ist möglich, bildet jedoch eher die Ausnahme. Weitaus häufiger kommt es zu Mischinfektionen oder zu Sekundärinfekten im Organismus eines bereits vorbelasteten Patienten. Nicht selten handelt es sich bei dem Sepsis-auslösenden Pathogen um einen Erreger aus dem humanen Mikrobiom. Überschreitet dieser die Grenzen seines ursprünglichen anatomischen Besiedelungsgebietes, so kann es zu schwerwiegenden Infektionen kommen [50]. Hierbei zählen insbesondere chronisch vorerkrankte Patienten, allen voran Tumorkranken, ebenso wie fragile Altersgruppen (Neugeborene bzw. sehr hohes Alter) zu den besonders vulnerablen Gruppen [37, 50]. Auch unter schwangeren, splenektomierten [37] sowie Covid-19-Patienten konnte im Falle zusätzlich bestehender Sekundärinfektionen ein vermehrtes Auftreten septischer Verläufe beobachtet werden [51].

2.1.5 Therapieansätze

Aufbauend auf die überarbeitete Sepsis-Definition von 2016 wurde zwei Jahre später eine neue S3-Leitlinie zur Behandlung der Sepsis veröffentlicht. Diese beinhaltet sowohl Screening-Parameter und Diagnosekriterien, als auch Therapieoptionen. Die Leitlinie spricht sich für ein standardisiertes Vorgehen aus, da dieses nachweislich zu einer Senkung der Mortalität und damit auch der Kosten führt [16, 52-55].

Die Leitlinie sieht vor, dass Patienten außerhalb des intensivmedizinischen Bereiches, bei denen der Verdacht auf eine Sepsis besteht, regelmäßig anhand des qSOFA-Scores überprüft werden sollten [16, 53, 54]. Da jede Stunde Verzögerung mit einer vierprozentigen Zunahme der Mortalität einhergeht, ist

ein schneller Therapiebeginn essentiell [56]. Außerhalb der Intensivstation kann der SOFA-Score schwieriger zu bestimmen sein und einen verzögerten Therapiebeginn bedingen, daher spielt er in den aktuellen Leitlinien zunächst eine untergeordnete Rolle. Gleichwohl muss er im weiteren Verlauf zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose ermittelt werden [16, 53, 54].

Liegt der qSOFA über zwei Punkten, so steht zunächst einmal die initiale hämodynamische Stabilisierung im Vordergrund. Diese sollte innerhalb der ersten drei Stunden durch Zufuhr kristalloider Flüssigkeit und gegebenenfalls dem Einsatz von Vasopressoren erfolgen, eine weitere Fortsetzung wird nur dann empfohlen, wenn weiterhin klinische Anzeichen einer Hypoperfusion vorliegen. Dafür sollte in regelmäßigen Abständen die Messung von physiologischen Variablen (Herzfrequenz, Blutdruck, arterielle und zentralvenöse Sauerstoffsättigung, Atemfrequenz, Temperatur, Urinausscheidung und sonstige Variablen [je nach Verfügbarkeit]) stattfinden.

Der frühzeitige Beginn der Therapiemaßnahmen trägt dazu bei, die Manifestation eines septischen Schocks nach Möglichkeit zu verhindern. Eine bestehende Organdysfunktion aufgrund einer Hypoperfusion lässt sich durch einen verminderten arteriellen Blutdruck und einen Anstieg des Serumlaktates feststellen [16, 53, 55, 57-60].

Ein weiterer wichtiger Bestandteil in der Sepsistherapie besteht in der Identifikation und Eradikation des Infektfokus. Um eine zielgerichtete antimikrobielle Therapie in die Wege leiten zu können, müssen mindestens zwei Paar Blutkulturen (aerob/anaerob) vor Beginn einer intravenösen Antibiotikagabe entnommen werden. Bei Verdacht auf einen bestimmten Infektfokus sollten weitere Kulturen daraus entnommen werden bzw. der Infektfokus saniert werden. Wichtig ist jedoch, dass es durch diese Maßnahmen zu keiner Verzögerung in der antimikrobiellen Therapie kommt. Zu Beginn wird die Gabe eines empirischen Breitbandspektrum-Antibiotikums empfohlen. Nach erfolgter Identifikation des Keims kann dieses auf eine kalkulierte Antibiotikatherapie umgestellt werden. Von einer anhaltenden antimikrobiellen Prophylaxe sollte dann abgesehen werden, wenn es sich um eine inflammatorische Situation nicht-infektiösen Ursprungs handelt [16, 20, 53, 58, 60].

Die weiteren Maßnahmen zielen dann auf eine weitergehende Stabilisierung der Kreislauf- und Organfunktion des Patienten. Dazu zählen der Einsatz von vasoaktiven Substanzen, Corticosteroiden und Blutprodukten. Antikoagulanzen wie Thrombomodulin konnten in Sepsisfällen mit Disseminierter Intravasaler Koagulation (DIC) protektive Effekte nachgewiesen werden, die generelle Gabe wird aber bei aktuell unzureichender Studienlage nicht empfohlen [16, 57-59]. Anders gestaltet sich die Situation in Bezug auf Heparin. Auch hier wird eine generelle Verabreichung zur Antikoagulation nicht empfohlen. Da jedoch bei 10 % der intensivmedizinischen Patienten im Verlauf eine tiefe Venenthrombose (TVT) und bei 24 % eine Lungenarterienembolie entsteht, sollten zur Prophylaxe

niedermolekulare Heparinpräparate oder unfraktioniertes Heparin genutzt werden [16]. Weitere Verfahren, wie eine Beatmung und eine Nierenersatztherapie können zusätzlich zum Einsatz kommen. Blutzucker und Serum-pH müssen regelmäßig überprüft und bei zu hohen Abweichungen von der Norm korrigiert werden. Schließlich sollte auch eine Stressulcus-Prophylaxe, sowie eine adäquate Ernährung in der Therapieplanung Beachtung finden [16, 57-59].

Die Letalität ist trotz moderner Therapiemöglichkeiten nach wie vor hoch. Daher ist es ratsam, Patienten und Angehörige frühzeitig in die Therapieplanung mit einzubeziehen. Hierbei sollten Prognose und Therapieziele gemeinsam besprochen werden. Auch die Möglichkeit einer Therapiebegrenzung sollte in diesem Rahmen angesprochen sowie gegebenenfalls eine Sterbebegleitung in die Wege geleitet werden [16, 57].

2.2 Das Immunsystem

Um die zugrundeliegenden immunologischen Vorgänge im Rahmen einer Sepsis besser verstehen zu können, soll nun im Folgenden zunächst ein Überblick über das Immunsystem verschafft werden, bevor es um den Pathomechanismus einer Infektion und insbesondere einer Sepsis geht.

2.2.1 Zellen des Immunsystems

In einem funktionierenden Organismus laufen zu jeder Zeit immunologische Prozesse ab. Sowohl infektiöse, als auch symbiontisch agierende Mikroorganismen gelangen permanent über den direkten Kontakt mit Haut und Schleimhäuten, über Atem- und Schluckvorgänge in den Körper. Sie bilden dort einerseits ein natürliches Milieu - wichtig beispielsweise für eine Vielzahl an Verdauungsvorgängen - andererseits können auch sie schwere Infektionen verursachen [61]. Entzündungsfördernde Komponenten bekämpfen dabei körperfremde und potenziell bedrohliche Mikroorganismen, entzündungshemmende Komponenten schränken diesen Prozess wiederum ein. Ein funktionierendes Immunsystem setzt ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen beiden Prozessen voraus. Gerät dieses Zusammenspiel aus dem Gleichgewicht, so entstehen Immundefizite bis hin zu Tumorerkrankungen auf der einen, Allergien und Autoimmunerkrankungen auf der anderen Seite [62, 63].

Das Immunsystem lässt sich grob in zwei Hauptkomponenten unterteilen: Die angeborene und die erworbene Immunität. Die angeborene Immunität wird hauptsächlich durch Granulozyten (mit den Untergruppen Neutrophile, Basophile und Eosinophile), Mastzellen, dendritische Zellen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie das Komplementsystem gebildet; die erworbene Immunität setzt sich in erster Linie aus T- und B-Lymphozyten, sowie deren Antikörpern zusammen. Betrachtet man angeborene und erworbene Immunität im Detail, so lassen sich zahlreiche Interaktionen und

Querverbindungen zwischen den beiden Systemen erkennen. Eine strikte Trennung ist folgerichtig nicht möglich und wird hier lediglich zur besseren Veranschaulichung vorgenommen [64, 65]. Der überwiegende Anteil der zellulären Akteure lässt sich auf eine gemeinsame Vorläuferzelle zurückführen: die pluripotente Stammzelle. Hieraus erfolgt im Knochenmark die weitere Entwicklung, zunächst in eine myeloide und eine lymphatische Reihe, und anschließende weitere Differenzierung. Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B-cells (NFκB) spielt bei einigen dieser Schritte eine bedeutende Rolle [66] (Abbildung 2.5).

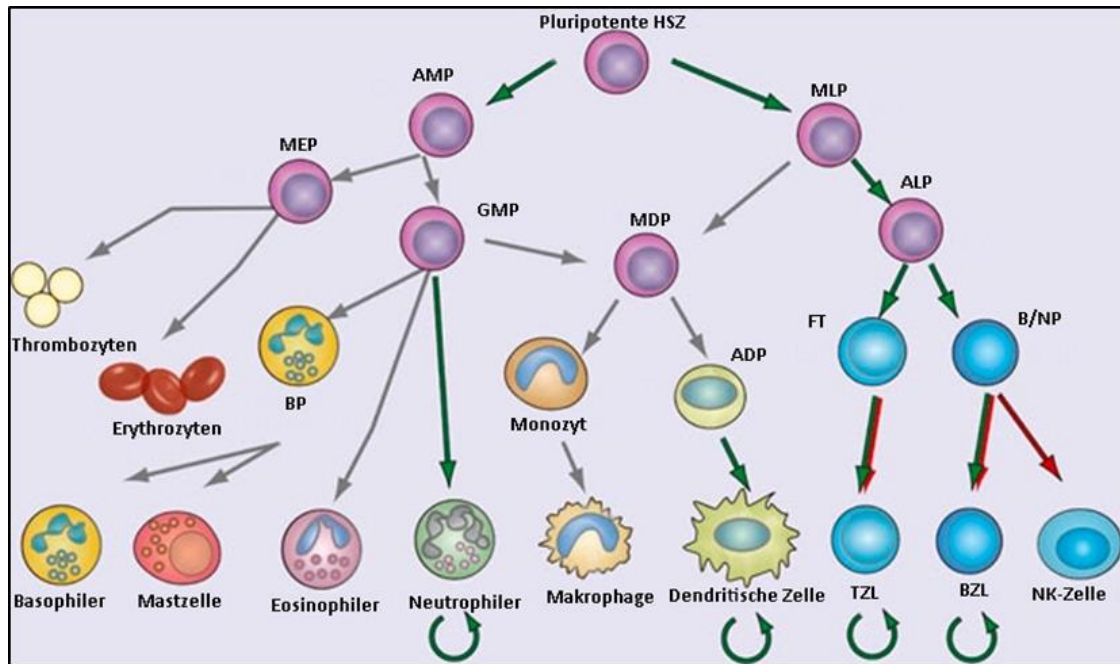


Abbildung 2.5 Hämatopoese und die Rolle des NF-κBs. Die roten Pfeile stehen für eine negative, die grünen Pfeile für eine positive Beeinflussung auf die Entstehung der nachfolgenden Linien durch NF-κB. Die gebogenen Pfeile zeigen Beispiele an, in denen NF-κB positiv das Überleben der Zellpopulation beeinflusst. Die grauen Pfeile stehen für Entwicklungsschritte, in denen NF-κB keine oder eine bislang unbekannte Funktion besitzt. (Hämatopoetische Stammzelle [HSZ], Allgemeine Myeloide Progenitorzelle [AMP], Myeloide/Lymphoide Progenitorzelle [MLP], Megakaryozyt-/Erythrozyt-Progenitorzelle [MEP], Granulozyt-/Monozyt-Progenitorzelle [GMP], Makrophagen-/Dendritische Progenitorzelle [MDP], Allgemeine Lymphoide Progenitorzelle [ALP], Basophile Progenitorzelle [BP], Allgemeine Dendritische Progenitorzelle [ADP], Frühe T-Zelle [FT], B-Zell-/NK-Zelle-Progenitorzelle [B/NP], T-Zell-Lymphozyt [TZL], B-Zell-Lymphozyt [BZL]). Abbildung und Text modifiziert von [66].

2.2.1.1 Angeborene Immunität

Zu Beginn einer Infektion kommt es durch Stimulation der myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark zu einer Ausschüttung an Neutrophilen, die sich anhand einer Leukozytose im Blutbild erkennen lässt [67]. Über die Blutbahn und Diapedese, getriggert durch die Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen gelangen die Neutrophile schließlich an den Ort des Infektionsgeschehens und können dort die Infektion mittels Phagozytose und Ausschüttung bakterizider Stoffe in vielen Fällen wirkungsvoll eindämmen [68-70].

Das Komplementsystem kann über drei verschiedene Kaskaden aktiviert werden. Alle drei münden jedoch mit der Aktivierung von C3 in dieselbe Endstrecke, die zur Bildung eines transmembranösen Proteins (bestehend aus C5 – C9) und somit zum Tod der Zielstruktur durch osmotische Lyse führt. Darüber hinaus besitzt das Komplementsystem chemotaktische Funktionen und ermöglicht weitere Interaktionen mit dem spezifischen Immunsystem [71, 72].

Die Aufgabe der Eosinophilen besteht vor allem in der Bekämpfung von Parasiten, insbesondere in den Industrieländern tritt ihre Rolle im Zusammenhang mit allergischen Reaktionen aber zunehmend in den Vordergrund. Im Gegensatz zu den Neutrophilen sind sie zwar nicht zur Phagozytose befähigt, besitzen aber eine Vielzahl an zytotoxischen Granula, die sie nach Aktivierung an der Zielstruktur entleeren können [73, 74].

Die Abwehrfunktion der NK-Zellen, die wiederum ebenfalls zu der Gruppe der Lymphozyten zählen, erfolgt auf zwei unterschiedlichen Wegen. Der erste besteht in der Vermittlung einer antikörperabhängigen Zytotoxizität, der zweite wird durch das Fehlen des Major Histocompatibility Complexes (MHC) I-Rezeptors aktiviert. Während gesunde Zellen anhand dieses Rezeptors zelleigene Proteinstrukturen an der Zellmembran gegenüber dem Immunsystem präsentieren, bewirken viele Tumorzellen und Viren eine verminderte Expression und Präsentation dieses Rezeptors. Damit entgehen sie zwar der Immunantwort durch T-Lymphozyten, gleichzeitig löst das Fehlen von MHC I-Rezeptoren aber die Freisetzung von Perforinen durch die NK-Zellen aus, durch die Granzyme in die Zielzelle injiziert werden, die dann zur Apoptose führen [75, 76].

Basophile und Mastzellen entfalten schließlich ihre Hauptfunktion in Abhängigkeit von IgE. Durch Bindung von IgE kommt es zur Degranulation und Freisetzung vasoaktiver Substanzen, Serotonin und Histamin. Wichtige Vertreter sind dabei die Leukotriene, Prostaglandine und PAF (Platelet Activating Factor). Diese spielen eine wichtige Rolle in der weiteren Modulation des Immunsystems [62, 77].

2.2.1.2 *Erworbene Immunität*

Betrachtet man das erworbene Immunsystem, so lässt sich eine erste Unterteilung in T- und B-Zell-Lymphozyten feststellen. Beide entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Ihren Namen erhalten sie durch unterschiedliche Orte der Ausreifung. Während die T-Zell-Lymphozyten ihre Ausreifung im Thymus erhalten, wo sie einen Prozess der positiven und negativen Selektion durchlaufen [78], verbleiben die B-Zell-Lymphozyten zunächst im Knochenmark, bevor sie in das Blut ausgeschwemmt werden [65, 79].

Die T-Zell-Lymphozyten wiederum lassen sich anhand ihrer Oberflächenproteine (Cluster of Differentiation = CD) in CD4 und CD8 unterteilen. Treffen die CD8 T-Zell-Lymphozyten - auch T-Killerzellen oder zytotoxische T-Zellen genannt - auf eine als pathologisch erkannte Zielstruktur, so kommt es zur Ausschüttung zytotoxischer Granula und Perforine. Diese durchdringen die Zellmembran der Zielstruktur, lösen dort intrazelluläre Kaskaden aus und führen somit letztendlich die Apoptose herbei [63].

Die Rolle der CD4-T-Zell-Lymphozyten - auch T-Helferzellen genannt - richtet sich nach dem Vorhandensein verschiedener Co-Faktoren. Sie können sowohl die Mastzell- und T-Killerzellfunktion unterstützen, indem sie Interferon- γ (IFN- γ) und Lymphotoxin-alpha ausschütten, als auch die B-Zell-Funktion und damit die Antikörperproduktion [63, 65].

Nach ihrer Reifung im Knochenmark zirkulieren die B-Zell-Lymphozyten im Blut und entlang der Lymphstationen. Durch Kombination verschiedener Gensegmente besitzt jeder B-Zell-Lymphozyt einen unterschiedlichen B-Zell-Rezeptor, der in seinem Aufbau einem membrangebundenen Antikörper gleicht. Trifft ein Antigen nun auf diesen B-Zell-Rezeptor und es kommt zur Bindung, so wird der entsprechende Lymphozyt aktiviert. Bei gleichzeitiger Aktivierung durch die T-Helferzelle kommt es zur klonalen Expansion mit Differenzierung zur Plasmazelle bzw. zur Gedächtniszelle. Während sich die Plasmazelle dadurch auszeichnet, dass sie eine sehr hohe Menge an Antikörpern produziert, vermittelt die Gedächtniszelle einen anhaltenden Schutz, da sie auch nach Jahrzehnten reaktiviert werden kann. Unterbleibt diese zusätzliche Aktivierung durch die T-Helferzelle, so kommt es zwar zur Vermehrung der B-Zelle mit darauffolgender Antikörperproduktion, jedoch in weitaus geringerem Maße als über eine Differenzierung zur Plasmazelle. Auch die Bildung von Gedächtniszellen bleibt hierbei aus, sodass sich eine auf diesen Weg erworbene Immunität über einen weitaus kürzeren Zeitraum erstreckt [78].

2.2.2 Pathogenese der Sepsis

2.2.2.1 Übersicht

Eine Sepsis zeichnet sich in der Regel durch einen zweiphasigen Verlauf aus. Zu Beginn steht eine hyperinflammatorische Phase im Sinne eines SIRS, gefolgt von einer zweiten, immunsuppressiven Phase, auch als CARS (Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome) bezeichnet. In beiden Phasen kann es zum multiplen Organversagen kommen [80-82] (*Abbildung 2.6*).

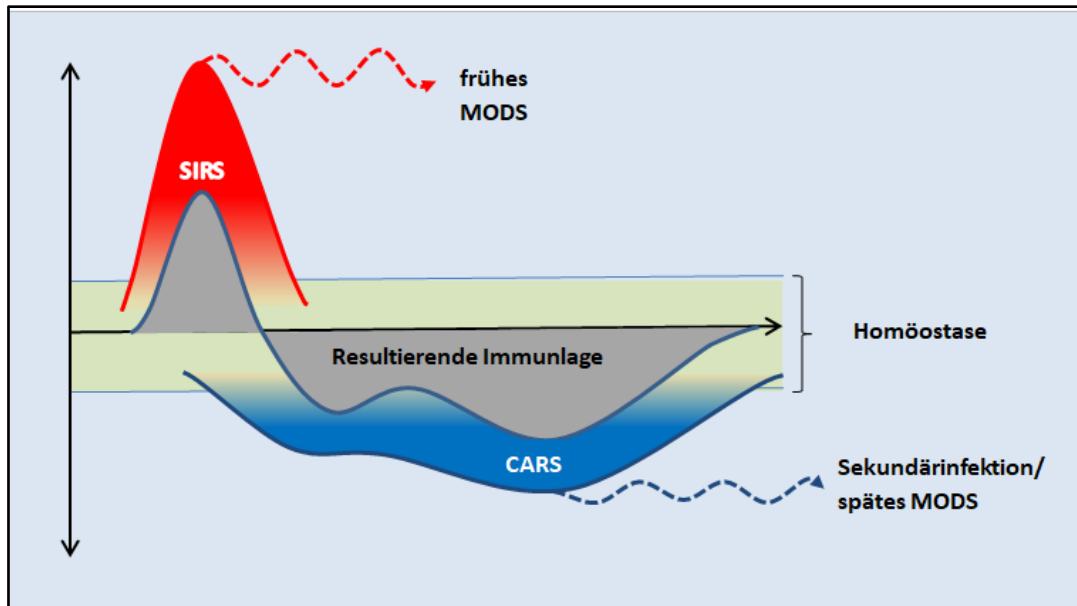


Abbildung 2.6 Immunantwort der Sepsis – Schemazeichnung. Zu Beginn einer Sepsis werden proinflammatorische Signalkaskaden aktiviert (SIRS, rote Kurve), welche insbesondere die erste Phase dominieren. Nahezu zeitgleich werden auch kompensatorische Prozesse in Gang gesetzt (CARS, blaue Kurve), welche insbesondere im späteren Verlauf die resultierende Immunlage bestimmen (graue Kurve). Kommt es zu einer persistierenden Überaktivierung (rot-gestrichelte Kurve), bzw. zu einer langfristigen Immunsuppression und damit assoziierten Sekundärinfekten (blau-gestrichelte Kurve), so kann es in beiden Phasen zu schwerwiegenden Verläufen kommen. (Systemic Inflammatory Response Syndrom [SIRS], Compensatory Antiinflammatory Response Syndrom [CARS], Multiple Organ Dysfunction Syndrome [MODS]). Selbsterstellte Abbildung in Anlehnung an [80].

Kommt es zu einer Infektion, so wird zunächst das angeborene (auch als unspezifisch bezeichnete) Immunsystem aktiviert. Einige Zellen, wie z.B. Neutrophile, verfügen über Pattern-Recognising Receptors (PRRs), an die eine Bindung von Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) sowie von Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) stattfinden kann. Zu den bekanntesten Vertretern der PRRs zählt der Toll-Like Receptor (TLR). Unter PAMPs und DAMPs werden eine Vielzahl an Molekülen zusammengefasst, die im Rahmen einer bakteriellen Infektion durch Produktion von Exotoxinen bzw. durch Zellzerfall freigesetzt werden. Daraus erklärt sich auch die Tatsache, dass eine Vielzahl an unterschiedlichen Erregern die gleiche Immunantwort bewirken kann. Da insbesondere DAMPs auch im Rahmen von sterilen und unsterilen Verletzungen entstehen, besteht auch nach traumatischen Ereignissen eine große Ähnlichkeit bezüglich des Immunprozesses [83-86].

Durch die Aktivierung kommt es zur Genexpression verschiedener Zytokine, wie z.B. Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukine (IL-1 β , IL-6, IL-12) und Chemokine (z.B. Intercellular Adhesion Molecule 1 [ICAM-1], Vascular Cell Adhesion Molecule 1 [VCAM-1]) [87, 88], und deren Ausschüttung. Diese wirken proinflammatorisch, es kommt zur Rekrutierung von Leukozyten und zur Aktivierung des Komplementsystems und der Gerinnung. In den meisten Fällen kann dadurch die Infektionsursache erfolgreich bekämpft und eliminiert werden, wobei ein gewisser Kollateralschaden

in Form von körpereigenem Zelluntergang dabei in der Regel unvermeidbar ist. Daher laufen zugleich auch anti-inflammatorische Prozesse ab. Diese hemmen die Inflammation und initiieren Reparaturmechanismen, sodass letztlich wieder ein homöostatischer Zustand hergestellt werden kann [89, 90].

Bei einer Sepsis ist diese Homöostase gestört, es kommt zu einer überschießenden Immunantwort mit darauffolgender Immunsuppression. Wird durch zu viel anfallende DAMPs ein gewisser Schwellenwert überschritten, so kommt es zu einer exzessiven Genaktivierung und darauffolgender Ausschüttung von Zytokinen, was auch als „Zytokin-Sturm“ bezeichnet wird [90]. Fanden die oben genannten Reaktionen bisher nur lokal statt, so erfolgt nun die systemische Ausbreitung. Auf zellulärer Ebene kommt es zu einem Sauerstoffdefizit, einem verändertem Apoptoseverhalten und einer direkten Zellschädigung durch pro- und antiinflammatorische Mediatoren unter Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Dies führt zunächst zur Bildung mikrovaskulärer Thromben und diffusen Endothelschädigung mit Störung der Glykokalix und parazellulärer Leckage, wodurch schließlich eine erhöhte Kapillarpermeabilität und gestörte Mikrozirkulation bedingt wird [37, 87]. Auch eine häufig begleitende Anämie - verursacht durch Hämolyse - erhöhte Blutungsneigung bei beeinträchtigter Gerinnung und vermindertem Erythrozytenwachstum trägt zu den Mikrozirkulationsstörungen bei [91, 92]. Im Zusammenspiel dieser Mechanismen kommt es zunächst zur Organdysfunktion, bei weiterem Fortschreiten zum Organversagen. Ein solches Organversagen äußert sich in Form einer exazerbierten akuten Nierenschädigung, myokardialen Depression, hepatischen Dysfunktion, Enzephalopathie, akuten Lungenschädigung mit erhöhter Endothel- und Epithelpermeabilität und verminderter Barrieren- und Transportfunktion des Gastrointestinaltraktes [93]. Im weiteren Verlauf kommt es zur metabolischen Azidose und Abnahme des peripheren Gefäßwiderstandes bei gleichzeitig hohem kardialen Pumpvermögen, bis schließlich die kardiale Leistung ebenfalls abfällt und der Patient in einen Schock verfällt [10].

Durch die Aktivierung des TLRs werden gleichzeitig auch immunsuppressive Mechanismen in Gange gesetzt [94]. Es kommt zum einen zur Erschöpfung der Lymphozyten (betrifft NK-Zellen, T- und B-Zell-Lymphozyten), als auch zu einer Reprogrammierung der antigenpräsentierenden Zellen mit nachfolgender verminderter Aktivität. Weitere Mechanismen wie etwa der neuroinflammatorische Reflex scheinen dabei eine Rolle zu spielen. In Folge der Immunsuppression werden septische Patienten auch nach Überstehen der Primärinfektion anfälliger für weitere Infekte - nicht selten sind diese durch Erreger mit niedriger Virulenz bedingt - oder für die Reaktivierung latenter Infektionen [37, 89].

Bestanden schon im Voraus chronische Erkrankungen, so treten nach überstandener Sepsis gehäuft Exazerbationen auf, die einer stationären Behandlung bedürfen. All dies führt im postseptischen Patienten sowohl zu einer verminderten Lebensqualität, als auch zu einer erhöhten Letalität [95-97].

2.2.2.2 Toll-like Rezeptor

Zum besseren Verständnis der intrazellulären Mechanismen soll an dieser Stelle exemplarisch genauer auf einen Vertreter aus der TLR-Familie eingegangen werden. TLRs werden von einer Vielzahl an Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. von Makrophagen und dendritischen Zellen), des erworbenen Immunsystems (T- und B-Zell-Lymphozyten), aber auch von Zellen, denen keine primär immunologische Funktion zugeordnet wird (z.B. Fibroblasten und epitheliale Zellen), exprimiert [98]. Bis heute sind elf verschiedene Untergruppen des TLRs im Menschen bekannt [99, 100], wovon der TLR4 vermutlich der Bekannteste ist. Der TLR4 bezeichnet einen transmembranösen Rezeptor, der im Beisein von CD14 nach Aktivierung intrazelluläre Kaskaden in Gange setzt, die letztlich in der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine münden [101]. Diese Kaskaden können in Abhängigkeit von MyD88 (Myeloid Differentiation Factor 88), oder von TRIF (Toll/IL-1R Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN- β) und somit MyD88-unabhängig induziert werden (*Abbildung 2.7*). Fast alle anderen TLRs nutzen ebenfalls die MyD88-abhängige Kaskade, lediglich der TLR3 stellt eine Ausnahme dar, indem er nur über den TRIF-abhängigen Weg verfügt. Der TLR4 ist der einzige Rezeptor dieser Familie, der beide Eigenschaften vereint [99, 102, 103].

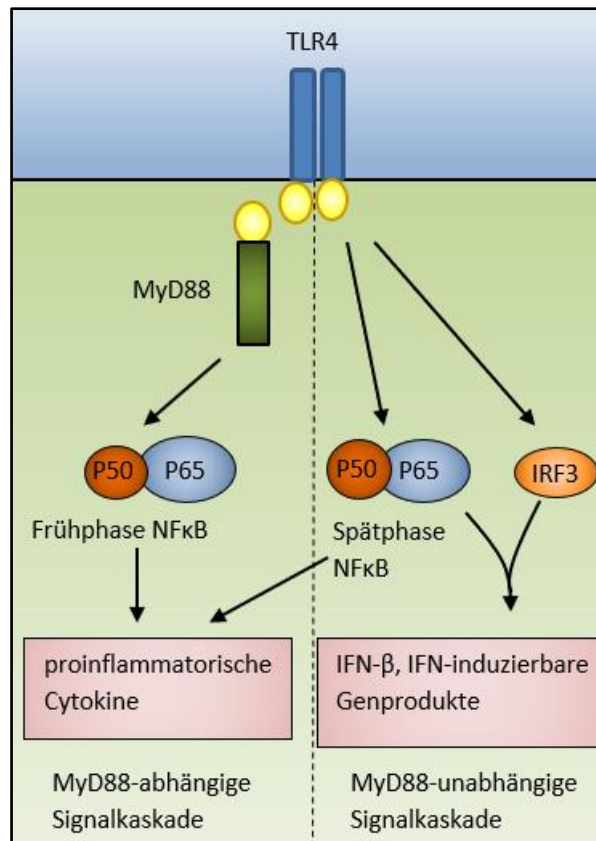


Abbildung 2.7 TLR4 Signalkaskade. MyD88-abhängige und MyD88-unabhängige Signalkaskade nach Stimulation des TLR4s. [Toll-like receptor 4 [TLR4]; Myeloid differentiation primary response protein 88 [MyD88]; IFN-regulatory factor 3 [IRF3]; Interferon [IFN], Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-cells [NFκB]]. Selbsterstellte Abbildung in Anlehnung an [103].

CD14 ist ein Protein, das in der Regel über einen Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) Anker in der Membran myeloider Zellen verankert ist; es gibt jedoch auch eine im Serum gelöste Form, die nicht über diesen Anker verfügt. Beide Formen ermöglichen den Transport des LPS zum TLR/MD-2-Komplex; durch Bindung des LPS an den Rezeptor kommt es zur Dimerisation zweier TLR4/MD-2-Komplexe [104, 105]. Eine Besonderheit des TLR4s besteht darin, dass zwei verschiedene Mechanismen in Gang gesetzt werden können. Der MyD88-Signalweg beginnt über eine Aktivierung des TLR4s an der Außenmembran und führt zu einer raschen Aktivierung von Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-Cells (NFκB) und Mitogen-Activated-Protein Kinase (MAPK) in der Frühphase und zu einer Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-6 und TNFα. Über eine CD14-vermittelte Endozytose wird zusätzlich die TRIF-Signalkaskade aktiviert, die zu einer vermehrten Expression von Typ I-Interferonen (IFN) und IFN-induzierten Chemokinen führt sowie zu einer Aktivierung von NFκB und MAPK in der Spätphase [106, 107].

Über 30 direkte und indirekte Agonisten des TLR4 wurden bisher entdeckt, darunter auch LPS, ein Oberflächenprotein, welches von gramnegativen Bakterien an der Außenmembran exprimiert wird. Beim Zerfall von gramnegativen Bakterien wird LPS freigesetzt und wirkt toxisch, zudem sind

Literaturdiskussion

verschiedene Proteine in der Lage, das LPS aus der Außenmembran zu lösen [106, 108]. LPS besteht aus drei Grundstrukturen (*Abbildung 2.8*): Dem Lipid A, der Kernregion und dem O-Antigen, einem Polysaccharid. Diese drei Grundbausteine können je nach Bakterium variieren [109-111]. Das Lipid A entspricht dem Teilbaustein, der nach Freisetzung als Endotoxin fungiert. Aufgrund seiner Fettsäurestruktur und der damit verbundenen Hydrophobie formiert es sich im hydrophilen Serum zu Mizellen. Daran bindet das LPS Binding Protein (LBP) und ermöglicht eine Interaktion mit CD14, das wiederum eine Bindung an den TLR4/MD-2-Komplex erleichtert. Neben seiner Transportfunktion wird dem LBP auch eine Funktion in der Neutralisation von LPS zugeschrieben [112-114].

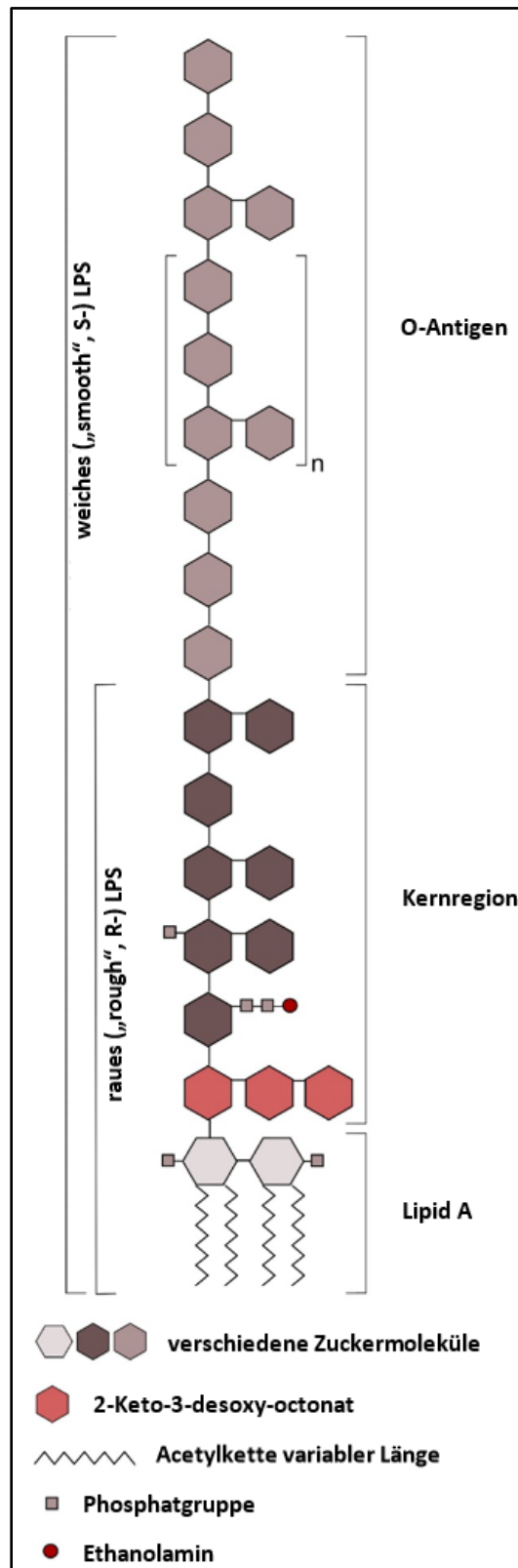


Abbildung 2.8 Schematische Darstellung der Grundstruktur des Lipopolysaccharids gramnegativer Bakterien. Lipopolysaccharide Gramnegativer Bakterien bestehen im Wesentlichen aus drei Untereinheiten (von unten nach oben): dem Lipid A, der Kernregion und dem O-Antigen. Lipid A und die Kernregion bilden zusammen das raue (rough [R-]) LPS; Lipid A, Kernregion und O-Antigen bilden zusammen das weiche (smooth [S-]) LPS. Die Anzahl und Struktur der Acetylketten ist variabel, ebenso wie die Anzahl und Struktur der verschiedenen Zuckermoleküle, welche hier als Hexagone unterschiedlicher Colorierung dargestellt sind. Abbildung und Text modifiziert von [111].

2.3 Das Endothel

Die für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen beschäftigten sich insbesondere mit den kardiovaskulären Veränderungen im Rahmen einer Sepsis sowie deren medikamentöse Beeinflussung durch GLP-1-Analoga. Dem Endothel als wichtigem Bestandteil des Herz-Kreislauf-Systems kommt dabei eine tragende Funktion zugute. Diese soll im Folgenden unter verschiedenen Gesichtspunkten erörtert werden.

2.3.1 Aufbau und Funktion des Endothels

Mit 1–7 m² Oberfläche stellt das Endothel neben der Haut und der Leber eines der größten Organe des menschlichen Körpers dar [115]. Seine Bedeutung erlangt es aus der Bereitstellung einer mechanischen Barriere zwischen Gefäßlumen und umgebenden Geweben mit selektiver Durchlässigkeit für Flüssigkeit und Stoffwechselfsubstrate, vor allem aber durch seine endokrinen Fähigkeiten. Mithilfe einer Vielzahl an Rezeptoren ist das Endothel in der Lage, sowohl auf äußere Einflüsse bzw. Signale zu reagieren, als auch selbst Signale auszusenden, um mit der Umgebung zu kommunizieren. Aufbau und Funktion des Endothels sind dabei unmittelbar miteinander verknüpft [115-118].

Das Endothel selbst wird aus einer einlagigen Zellschicht gebildet, die das Innere von Gefäßen, sowohl von Arterien, als auch von Venen und Kapillaren, auskleidet. In Abhängigkeit des umgebenden Gewebes unterliegt es einer variablen Merkmalsausprägung. Dadurch ist es optimal an die unterschiedlichen Bedingungen angepasst. Hierbei werden verschiedene Grundtypen unterschieden: Das kontinuierliche und das diskontinuierliche Endothel, wovon sich ersteres wiederum in ein fenestriertes und in ein nicht-fenestriertes Endothel unterteilen lässt.

Fenestriertes Endothel wird von ca. 70 nm großen Poren penetriert, es findet sich überall dort, wo Filtration und aktive Transportprozesse stattfinden, so zum Beispiel in den Glomeruli der Niere und dem Gastrointestinaltrakt. Nicht-fenestriertes Endothel stellt im Gegensatz dazu eine äußerst wirkungsvolle zelluläre Barriere dar und ist somit in der Lage, den Stoffaustausch streng zu regulieren. Es findet sich beispielsweise im ZNS, wo es die Blut-Hirn-Schranke bildet. Diskontinuierliches Endothel findet sich dagegen hauptsächlich in den Sinusoiden der Leber, wo eine große Durchlässigkeit erforderlich ist [119, 120].

Intrazellulär stehen endotheliale Zellen über verschiedene Arten von Adhäsionsmolekülen miteinander in Kontakt. Unterschieden wird hierbei zwischen Tight Junctions, Adherens Junctions und Gap Junctions. In ihrem Zusammenwirken ermöglichen sie die Entstehung einer semipermeablen Membran [121]. Tight Junctions werden durch Claudine, Occludine und Junctional Adhesion Molecules

(JAM) gebildet, sie sorgen für einen straffen Zellverband und regulieren den Austritt von Flüssigkeit und Ionen, sowie die Entstehung eines Konzentrationsgefälles. Im Gegensatz dazu ermöglichen Adherens Junctions sowohl die Stabilität der endothelialen Struktur als auch die interzelluläre Kommunikation, insbesondere in Fragen des endothelialen Wachstums und der Apoptose. Gebildet werden sie durch Cadherine, die eine Vernetzung der Aktin-Filamente zwischen den Zellen bewirken. Gap Junctions wiederum bestehen aus mehreren Connexinen, die im Zusammenschluss ein Connexon bilden und damit einen Kanal für den Austausch von Ionen, Flüssigkeit und kleinen Molekülen bereitstellen [122, 123]. Hierbei handelt es sich jedoch keineswegs um ein starres System: Durch kontinuierliche Neuvernetzung und Auflösung bestehender Adhäsionen ist das Endothel in der Lage, auf äußere Einflüsse und Signale flexibel zu reagieren und z.B. die Diapedese von Leukozyten in entzündetes Gewebe zu ermöglichen [124, 125]. Eine Übersicht über den Aufbau und die Grundfunktionen des Endothels bietet *Abbildung 2.9*.

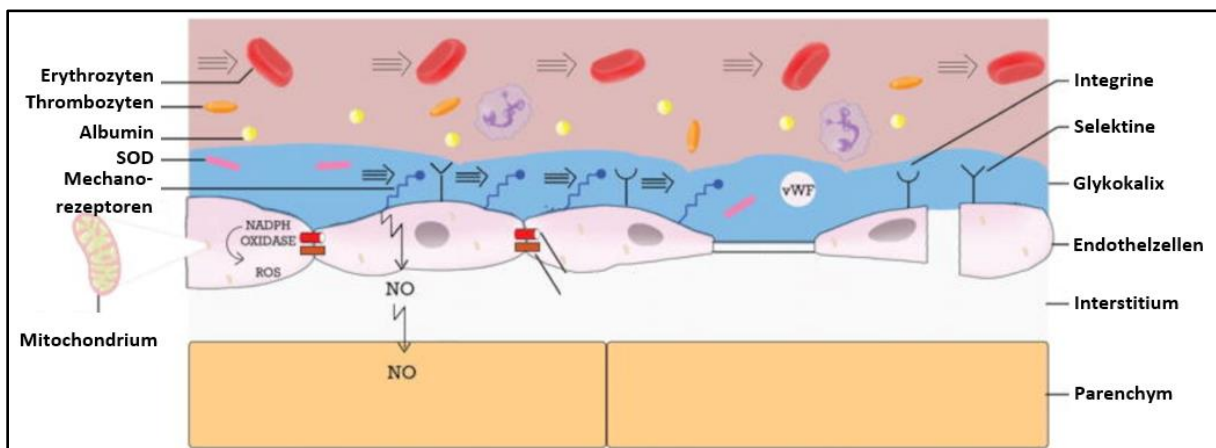


Abbildung 2.9 Aufbau und grundlegende Funktionen des Endothels. Das Endothel besteht aus einer einlagigen Zellschicht zwischen intravasalem Lumen und umgebenden Parenchym. Gap und Adherens Junctions ermöglichen dabei die intrazelluläre Kommunikation, während der interzelluläre Austausch unter anderem über Fenestrierung und Porenbildung reguliert wird. Mithilfe von in der Glykokalix verankerten Rezeptoren kann das Endothel auf systemische Einflüsse reagieren. NO ist dabei ein wichtiger Transmitter, welcher von den Endothelzellen gebildet und ausgeschüttet werden kann. (Superoxid Dismutase [SOD]) *Abbildung modifiziert aus [126], Original publiziert in [127].*

Wie bereits oben beschrieben, kleidet das Endothel als innerste Zellschicht das gesamte Gefäßsystem aus und ist somit maßgeblich an dessen Aufbau beteiligt. Da das Gefäßsystem wechselnden Einflüssen ausgesetzt ist, muss auch das Endothel sich immer wieder neu anpassen. Bei der feinabgestimmten Kommunikation zwischen den verschiedenen Zelltypen spielen unter anderen Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) eine wichtige Rolle, um Reparaturmechanismen und (Neo-) Angiogenese zu ermöglichen [121, 128]. In diesem Kontext gilt es zwischen Vaskulogenese und Angiogenese zu unterscheiden. Ersteres beschreibt die de-novo Entstehung endothelialer Zellen und Gefäße aus Vorläuferzellen in der Embryonalentwicklung. Unter Angiogenese versteht man dagegen das

Aussproießen von neuem Endothel ausgehend von einem bereits existierenden Gefäßnetz [129]. Exogene und endogene Faktoren beeinflussen dabei nicht nur den Vorgang generell, sondern auch die Spezifizierung des Endothels [130]. Da die Neoangiogenese mittels VEGFs auch bei einer Vielzahl an pathologischen Prozessen, wie zum Beispiel Tumorwachstum, Makuladegeneration und Retinopathien eine Schlüsselfunktion darstellt, wird an dieser Stelle auch zunehmend therapeutisch interveniert [128, 131, 132].

Um einen kontinuierlichen Blutfluss zu gewährleisten, spielt die Aufrechterhaltung eines hämostatischen Gleichgewichts eine wichtige Rolle. Dies beinhaltet sowohl die plasmatische Gerinnung und Thrombusbildung bei Beschädigung des Endothels als auch die Verhinderung ebendieser Mechanismen im intakten Gefäßsystem. Daher besitzt das Endothel sowohl proaktive, als auch antizipative Eigenschaften gegenüber thrombotischer und plasmatischer Gerinnung [121]. Die zwei wichtigsten Vertreter des antithrombotischen Systems sind Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI₂). Über die endotheliale NO-Synthase (eNOS) kommt es auch im Ruhezustand zu einer konstanten Bildung von NO aus L-Arginin und dessen Ausschüttung [133]. Auf Molekularebene entspricht die eNOS einem Dimer, deren Monomere jeweils eine Oxygenase Domäne am N-Terminus sowie eine Reduktase Domäne am C-Terminus besitzen. Wird NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) in der Reduktase Domäne gebunden, so kommt es zum Elektronentransfer auf die Hämgruppe der eNOS in der Oxygenase Domäne. Anschließend wird L-Arginin in einer zweistufigen Reaktion zu L-Citrullin oxidiert, wobei zusätzlich NO entsteht [134]. Aufbau und Funktion der eNOS sind in *Abbildung 2.10* dargestellt. Ebenso wie PGI₂, welches von Endothelzellen aus Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase gebildet wird, bewirkt NO eine verminderte Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten. Beide Syntheseprodukte besitzen darüber hinaus potente vasodilatatorische Eigenschaften [133].

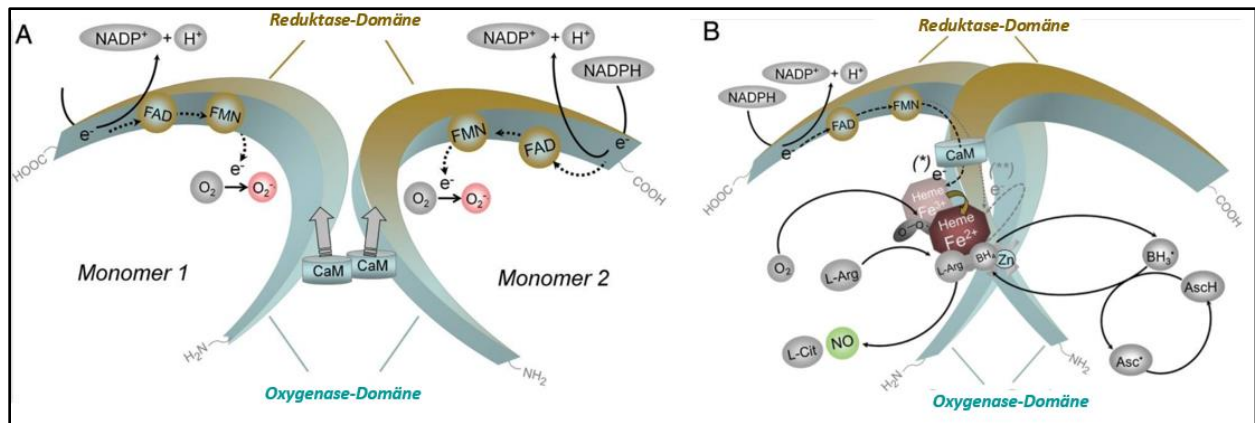


Abbildung 2.10 Aufbau und Funktion der eNOS. Nach Dimerisation zweier eNOS-Monomere und Bindung von NADPH in der Reduktase-Domäne (A) kommt es zum Elektronentransfer auf die Hämgruppe der eNOS in der Oxygenase-Domäne. Daraufhin oxidiert L-Arginin zu L-Citrullin, als Nebenprodukt entsteht NO (B). (L-Arginin [L-Arg], L-Citrullin [L-Cit], Ascorbinsäure [AscH], Ascorbinradikal [Asc•], Flavin-Adenin-Dinukleotid [FAD], Flavin-Mononukleotid [FMN], Calmodulin [CaM]). Abbildung modifiziert aus [135].

Zur Hemmung der plasmatischen Gerinnung kann an verschiedenen Stellen der Gerinnungskaskade eingegriffen werden. Die Gerinnungskaskade wiederum wird klassischerweise über den intrinsischen oder den extrinsischen Weg gestartet und resultiert in beiden Fällen in einer gemeinsamen Endstrecke mit der Aktivierung von Thrombin und der Abscheidung eines „weißen Thrombus“, bestehend aus quervernetzten Fibrinmonomeren [136]. Einen Überblick über die ablaufenden Prozesse der Gerinnungskaskade bietet *Abbildung 2.11*. Das in der Leber synthetisierte Antithrombin III (AT III) wird durch das Endothel bereitgestellt und wirkt als Hemmstoff verschiedener Serin-Proteasen. Es hemmt dabei nicht nur Thrombin (Faktor IIa), sondern auch eine Vielzahl an anderen Serin-Proteasen der sekundären Hämostase (Faktor IXa, Xa, XIa und XIIa). Damit aus Prothrombin zunächst einmal Thrombin entstehen kann, ist eine Aktivierung durch den Tissue Factor (TF) notwendig. Durch die Sekretion von Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) aus endothelialen Zellen kann auch an dieser Stelle hemmend eingegriffen werden. Darüber hinaus unterstützen endotheliale Zellen das antikoagulative Protein-C/S-System. Mithilfe von Thrombomodulin (TM), einem transmembranösen Rezeptor für Thrombin, wird dieses gebunden und somit die Menge an frei zirkulierendem Thrombin herabgesetzt. TM wirkt dabei zusätzlich als Cofaktor und Katalysator des aktivierten Protein-C/S-Systems. Ist die plasmatische Gerinnung bereits abgelaufen und ein „weißer Thrombus“ abgeschieden, so kann dieser Vorgang mittels Fibrinolyse wieder aufgelöst werden. Zu diesem Schritt kommt es durch die endotheliale Ausschüttung von tissue-type Plasminogen Activator (tPA) und urokinase-type Plasminogen Activator (uPA), die eine Umwandlung von Plasminogenen zu Plasmin initiieren, welches wiederum die Fibrinquervernetzung in einzelne Fibrinmonomere spaltet [133, 137]. Der Inhibitor der Plasminogenaktivierung, Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1), wird nach entsprechender Aktivierung ebenfalls durch Endothelzellen ausgeschüttet.

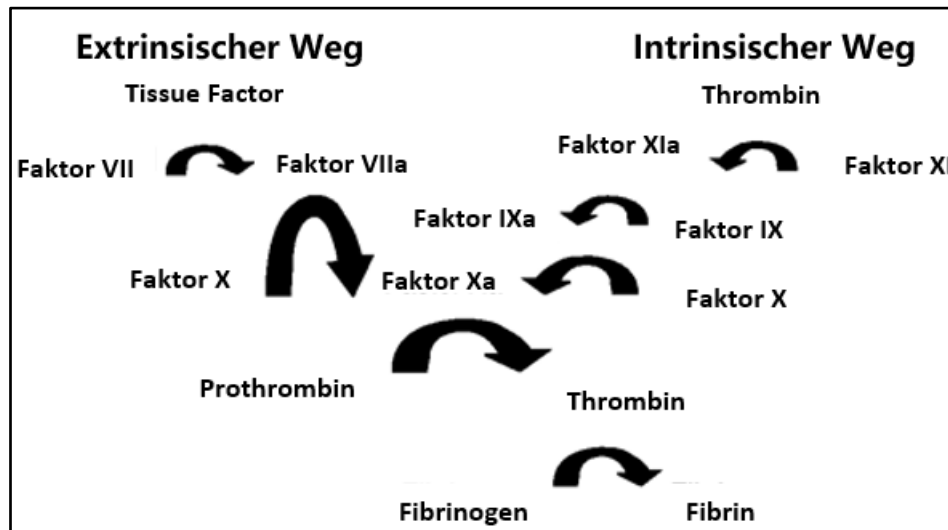


Abbildung 2.11 Gerinnungskaskade. Extrinsischer und intrinsischer Weg mit gemeinsamer Endstrecke. Abbildung modifiziert aus [138].

Während im intakten Endothelverband die antithrombotischen und antikoagulativen Prozesse überwiegen, kommt es im Rahmen einer Endothelschädigung oder eines Entzündungsgeschehens zu einer Verschiebung des Gleichgewichts. Gerinnungshemmende Mechanismen werden supprimiert, gleichzeitig kommt es zur Sekretion von Platelet Activating Factor (PAF) und von Willebrandt Faktor (vWF), die eine Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten ermöglichen. Ebenso kommt es nach entsprechender Aktivierung - beispielsweise durch Thrombin, Zytokine oder LPS - zur Synthese und Expression von TF und somit zur Auslösung bzw. zur Verstärkung der Gerinnungskaskade. Alle beschriebenen Prozesse sind eng miteinander verschränkt und bedingen gegenseitige Verstärkung wie auch gegenseitige Hemmung. In einem funktionierenden Mechanismus laufen daher gerinnungsfördernde und gerinnungshemmende Prozesse parallel zueinander ab [121].

Eine weitere wichtige endotheliale Funktion besteht in der Aufrechterhaltung eines vaskulären Grundtonus. Intaktes Endothel setzt daher NO und PGI₂ frei, die neben ihren antithrombotischen Eigenschaften darüber hinaus zur Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) bzw. cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) führen und dadurch eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur bewirken. Neben der eNOS finden sich noch eine neuronale (nNOS) und eine induzierbare (iNOS) Unterform der NO-Synthase, die ebenfalls im Beisein von NADPH, O₂ und L-Arginin zur Synthese von NO fähig sind. Auf der Gegenseite finden sich vasokonstriktive Substrate, die unter pathophysiologischen Umständen wie Hypoxie, Hypertension oder Endothelschädigung vermehrt ausgeschüttet werden und die Gefäße eng stellen. Entscheidendes Stellglied in der Regulation des Vasotonus sind die Scherkräfte und davon ausgehend die Wandspannung [121]. In einem Rezeptorunabhängigen Weg werden diese registriert und mit einer erhöhten NO-Freisetzung

beantwortet. NO besitzt eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden. Um der intrinsischen vasokonstriktiven Aktivität des Acetylcholins (ACh) an den muskarinergen Rezeptoren der Glattmuskelzellen entgegenzuwirken, erfolgt daher eine basale Freisetzung, die bei erhöhter Wandspannung entsprechend gesteigert werden kann [139]. Dieser Effekt wird sich im Rahmen der sogenannten paradoxen Vasokonstriktion bei Herzkatheteruntersuchungen zunutze gemacht, um stenotische Aerale mit geschädigtem Endothel zu identifizieren. In diesen geschädigten Gefäßabschnitten führt die Acetylcholinexposition zu einer paradoxen Vasokonstriktion [140]. Normalerweise wird dieser Effekt von der gleichzeitig stattfindenden Vasodilatation durch die Acetylcholin-vermittelte muskarinerge und Calcium-abhängige Aktivierung der eNOS in den Endothelzellen übertroffen und somit relativiert, anders verhält es sich jedoch bei einer Endothelschädigung. Hierbei kann es aufgrund der gestörten und verminderten Freisetzung von NO zur Vasokonstriktion durch Acetylcholin kommen [139].

Des Weiteren führen Zytokine wie IL-1 und TNF α , die durch Vertreter der spezifischen und unspezifischen Immunität freigesetzt wurden, zu einer Aktivierung endothelialer Zellen. Dies gilt ebenso für die LPS-abhängige Aktivierung der NF κ B-Signalkaskade, ähnlich dem TLR4-Mechanismus. Es kommt zu einer Veränderung des Vasotonus und der Koagulabilität bzw. der Thromboseneigung, zur Expression proinflammatorischer Gene und zur Freisetzung von Mediatoren. Auf makroskopischer Ebene lassen sich einige dieser Veränderungen an den Kardinalzeichen einer Entzündung (Rubor, Tumor, Calor, Dolor und Functio laesa) erkennen. Dadurch nimmt das Endothel eine wichtige Funktion im Rahmen inflammatorischer Prozesse ein [141]. Da auch die Genexpression von Zytokinen (IL-1, TNF α) hochreguliert wird, kommt es zur parakrinen und autokrinen Verstärkung. Ebenso sind Chemokine (MCP-1, IL-8) und Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) von einer verstärkten Expression betroffen [121].

Normalerweise bildet das Endothel eine für Blutzellen undurchlässige Barriere. Diese Integrität muss aufgehoben werden, um eine Diapedese der Leukozyten zu ermöglichen und diese an den Ort der Inflammation zu bringen. Dies geschieht nach einem festen Schema in fünf Schritten, je nach Gewebeart ergeben sich davon aber spezifische Abweichungen. Die ersten beiden Schritte, das *Tethering* und das *Rolling*, werden hierbei durch Interaktion mit endothel- und leukozytenständigen Selektinen vermittelt. Die Leukozyten werden in ihrer Flussgeschwindigkeit gebremst und zeigen eine verstärkte Haftung an der Gefäßwand, eine festen Bindung entsteht jedoch erst in Verbindung mit Integrinen (*Adhesion*). Durch Chemokine zur exakten Lokalisation geführt (*Crawling*), kommt es nun zur transzellulären oder parazellulären transendothelialen Zellmigration der Leukozyten. Adhäsionsmoleküle spielen an dieser Stelle ebenso wie Auflösung und Neuverknüpfung von endothelialen Zellverbindungen für den Prozess der *Transmigration* eine wichtige Rolle [68, 142, 143].

2.3.2 Endotheliale Dysfunktion

Führt man sich die vielfältigen Funktionen vor Augen, so erschließen sich auch schnell die Probleme, die aus einem pathologischen Endothelzustand resultieren können. Nahezu jede Aktivierung endothelialer Zellen kann, wenn sie einen gewissen Schwellenwert bzgl. Intensität und Dauer des Bestehens überschreitet und kompensatorische Gegenmechanismen fehlen, zu einer endothelialen Dysfunktion führen [144]. Diese ist durch prothrombotische, proinflammatorische und prokoagulative Eigenschaften sowie eine beeinträchtigte Vasodilatation gekennzeichnet und spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen [145] (*Abbildung 2.12*). Daher ist es nicht weiter verwunderlich, dass zu den Risikofaktoren einer endothelialen Dysfunktion all jene, die klassischerweise als Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen bekannt sind, gezählt werden. Beispielhaft zu nennen sind hierbei chronische Hypertonie, Rauchen, Alter und Diabetes mellitus; neuere Erkenntnisse belegen zudem einen Effekt durch Umweltfaktoren wie Lärmexposition und Luftverschmutzung [144], sowie durch ionisierende bzw. radioaktive Strahlung [146]. Die endotheliale Dysfunktion stellt somit eine der ersten Manifestationen in der Entstehung atherosklerotischer Erkrankungen dar [119, 144].

Die Mehrheit der im oberen Abschnitt genannten Risikofaktoren ist durch ein Ungleichgewicht zwischen ROS-bildenden und ROS-abbauenden Prozesse zugunsten ersterer gekennzeichnet. Somit kommt es zu einer Zunahme des oxidativen Stresses [135, 147]. Ein erhöhtes Level an oxidativem Stress wiederum steht in direkter Kausalität zur Entkopplung der eNOS [135]. Die Entkopplung der eNOS kann im Rahmen der endothelialen Dysfunktion auftreten und diese gleichzeitig verstärken [148, 149]. Der Begriff beschreibt ein Umschalten der eNOS von einem NO-produzierenden Enzym zu einer ROS-Synthase [148]. Dabei kommt es zum Elektronentransfer von NADPH auf O_2 anstatt, wie im physiologischen Zustand, auf L-Arginin. Anstelle von NO entsteht somit O_2^- , welches wiederum mit NO zu Peroxynitrit weiterreagiert [134]. Zugrundeliegend sind hierfür mehrere sog. „Redox Switches“, welche sowohl die eNOS selbst als auch deren Substrate und Cofaktoren betreffen. Einem bedeutenden „Redox Switch“ unterläuft der essentielle Cofaktor Tetrahydrobiopterin (BH_4) [147]. Besteht ein hohes Level an oxidativem Stress, so erhöht sich auch das Level an Peroxynitrit, im Beisein von Peroxynitrit wird dann BH_4 zum BH_3 -Radikal oxidiert, welches weiter zu BH_2 disproportionieren kann. Ein ausgewogenes BH_4/BH_2 -Verhältnis zugunsten ersterem ist hierbei durchaus physiologisch, kann sich bei einer Erhöhung des oxidativen Stresses jedoch auch umkehren. Durch beide Mechanismen verringert sich die Menge an BH_4 , welches für die NO-Synthese zur Verfügung steht. Darüber hinaus liegt mit dem BH_2 ein kompetitiver Agonist für die Bindungsstelle der eNOS vor. Beide Mechanismen begünstigen eine Entkopplung der eNOS [150]. Innerhalb der eNOS kann der „Redox Switch“ als Oxidation des Zink-Sulfur-Komplexes mit konsekutiver Spaltung des eNOS-Dimers in seine

zwei Monomere, sowie als Modifikation verschiedener Aminosäurereste vorstättengehen [147]. Cysteinreste in der Reduktasendomäne [151] sowie Threonin- und Thyrosinreste sind dabei zunächst an der physiologischen Regulation der eNOS beteiligt [152, 153], können aber ebenso nach entsprechender Modifikation deren Entkopplung bewirken. So wurde die S-Glutathionylierung der Cystein-Thiolgruppen in der Reduktase Domäne mit einer Entkopplung der eNOS in Verbindung gebracht [151]. Die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC) und Proteintyrosinkinase 2 (PYK-2) führt zu einer Hemmung der NO Bildung durch die eNOS [152, 153]. Darüber hinaus kann ein vermehrtes ROS-Vorkommen über eine Zunahme des eNOS-Inhibitors Asymmetrisches Dimethylarginin zu deren Inaktivierung führen [147].

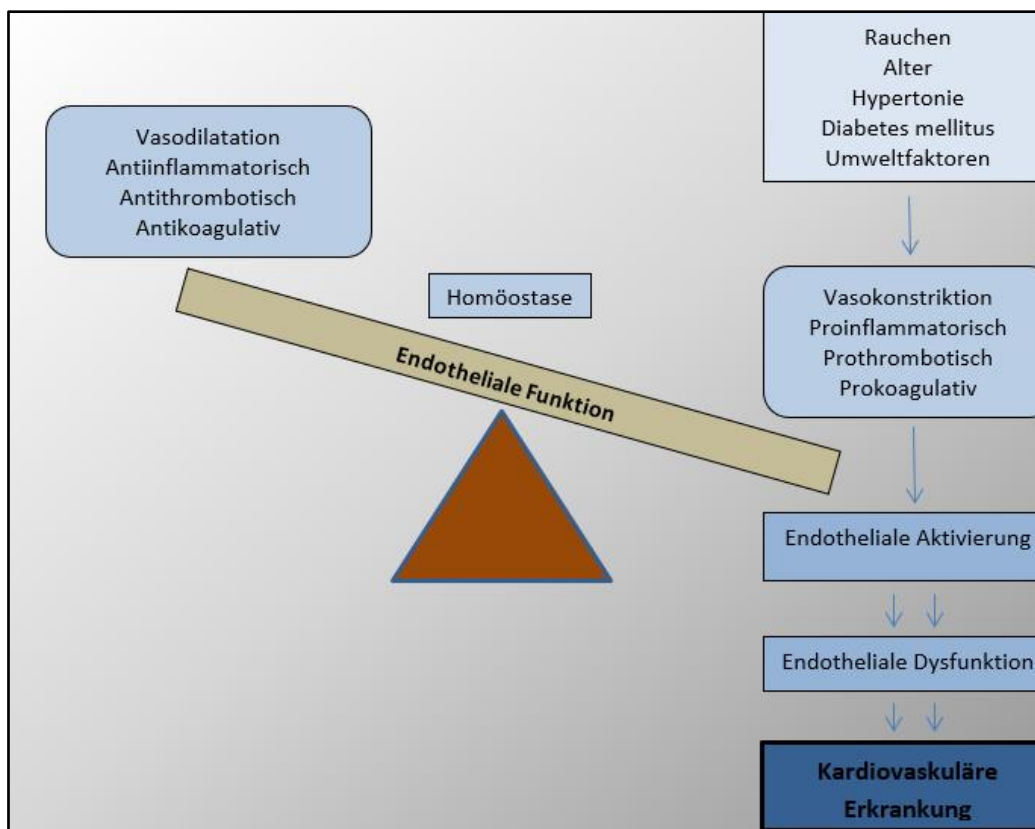


Abbildung 2.12 Endotheliale Funktion und Dysfunktion. Risikofaktoren tragen dazu bei, das homöostatische Gleichgewicht des Endothels zu stören, sodass es zunächst zu einer endothelialen Aktivierung und schließlich zur endothelialen Dysfunktion kommt, welche in hohem Ausmaß zu einer Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen beiträgt. Selbsterstellte Abbildung in Anlehnung an [146].

2.3.3 Endothel und Sepsis

Die im vorangegangenen Absatz beschriebenen Mechanismen der Endothelschädigung aufgrund einer persistierenden (Über-) Aktivierung ähneln den Vorgängen im Rahmen einer Sepsis. Auch hier kommt es zunächst zu einer Aktivierung, welche aufgrund ihrer Dauer und Intensität das physiologische Maß einer Inflamationsreaktion übersteigt, und zu einer damit einhergehenden Schädigung des

Endothels. Das Ausmaß der Endothelschädigung korreliert dabei in der Regel mit dem Schweregrad der Erkrankung [154]. Diese exzessive Aktivierung kann unabhängig von der ursprünglichen Art des Erregers ausgelöst werden und bis hin zur vollständigen Dysfunktion führen [145]. Die Entstehung von ROS an sich ist dabei keineswegs pathologisch, sondern vielmehr Nebenprodukt der mitochondrialen Atmungskette zur Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) und Energiegewinnung. Im septischen Patienten übersteigt jedoch die ROS-Produktion die Kompensationsfähigkeit durch Antioxidativa und es kommt zur Entstehung von oxidativem Stress [155]. Dieser Effekt wird zusätzlich verstärkt, indem es zu einer Induktion der iNOS mit nachfolgender gesteigerter NO-Synthese kommt, welches analog zu dem oben beschriebenen Mechanismus (*s. 1.3.2 Endotheliale Dysfunktion*) zur Entstehung von Peroxynitrit führt [156]. So steht einerseits weniger NO für die Aufrechterhaltung eines relaxierten Vasotonus zur Verfügung, zudem hemmt Peroxynitrit die PGI₂-Synthase (PGIS) im Endothel, das weiterhin produzierte Prostaglandin H₂ akkumuliert und bindet an den Thromboxan-A₂/PGH₂-Rezeptor. Dadurch entsteht zunächst eine Vasokonstriktion, welche die Adhäsion und Migration von Leukozyten ermöglicht [157, 158] (*Abbildung 2.13; Phase I*). Besteht eine fortdauernde Aktivierung des Endothels, so bewirken proinflammatorische Cytokine eine Induktion der Cyclooxygenase (COX) -2. Diese stellt der PGIS in der glatten Muskulatur [157, 158], welche bis zu diesem Punkt keiner relevante Nitrierung unterlaufen war [158], große Mengen an benötigtem Substrat (Prostaglandin H₂) zur Verfügung, wodurch es zu einer exzessiven Freisetzung von PGI₂ kommt [157, 158] (*Abbildung 2.13; Phase II*). Zusammen mit einer Schädigung der Glykokalix und nachfolgender gesteigerter Permeabilität kommt es zum Austritt von Leukozyten und Flüssigkeit in das umliegende Gewebe und somit zur Ödembildung [126, 159]. Die initial protektiven Funktionen des Endothels werden durch einen proinflammatorischen, proadhäsiven und prothrombotischen Phänotyp abgelöst [156].

Bezogen auf eine lokale Infektionsquelle dienen all diese Änderungen dem Ziel, eine möglichst effektive und zielgerichtete Bekämpfung des Erregers zu koordinieren. Da bei einer Sepsis aber diese Funktionsänderungen systemisch auftreten, kann es zu erheblichen Beeinträchtigungen des Herz-Kreislauf-Systems kommen [159]. Dies äußert sich unter anderem in einer erhöhten Vasodilatation mit nachfolgender Hypotonie. Auch das Auftreten von Mikrothromben wird gehäuft beobachtet und als Ausdruck der endothelialen Dysfunktion gedeutet. Hypotonie und Mikrothromben tragen zusammen mit der gestörten Barrierefunktion zu einer verminderten Perfusion und Oxygenierung des Gewebes bei, wodurch wiederum die Entstehung einer Organdysfunktion gefördert wird [160]. Während der Körper im physiologischen Zustand in der Lage ist, einen verminderten MAD mithilfe nachfolgender Vasokonstriktion der peripheren Blutgefäße und der Ausschüttung von Katecholaminen auszugleichen, so zeichnet sich eine Sepsis häufig durch Insuffizienz dieser Mechanismen aus [161]. Dieser auch als Vasoplegie bezeichnete Zustand ist durch ein fehlendes vaskuläres Ansprechen auf Vasopressoren gekennzeichnet [162]. Es liegt somit eine therapierefraktäre Hypotonie trotz

ausreichender Flüssigkeitszufuhr und Katecholamintherapie vor [163]. Das Auftreten einer Vasoplegie ist nicht auf den septischen Schock beschränkt, viele weitere Formen des Schocks weisen vergleichbare Prozesse auf. Die zugrundeliegenden Pathomechanismen sind vielseitig und reichen von einer Affinitätsänderung der Vasokonstriktion-vermittelnden Rezeptoren über deren Downregulation bis hin zur vermehrten Freisetzung des vasodilatativen NOs. Letzteres geschieht maßgeblich über die iNOS, die wiederum durch Endotoxine und proinflammatorische Zytokine verstärkt exprimiert wird [162]. Zugrundeliegende Pathomechanismen implizieren die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion [164, 165].

In einer dritten Phase wiederholt sich aufgrund des persistenten nitrosativen Stresses die Nitrierung der aus der glatten Gefäßmuskulatur entsamtmenden PGIS, wodurch diese ebenfalls inaktiviert wird. Entsprechend der oben genannten Mechanismen kommt es erneut zur Vasokonstriktion. Im Unterschied zur Phase I läuft Phase III vorwiegend lokal ab, wodurch die Entstehung von Mikrothromben und eine nachfolgende Minderperfusion des entsprechenden Gewebes begünstigt wird [166] (Abbildung 2.13; Phase III).

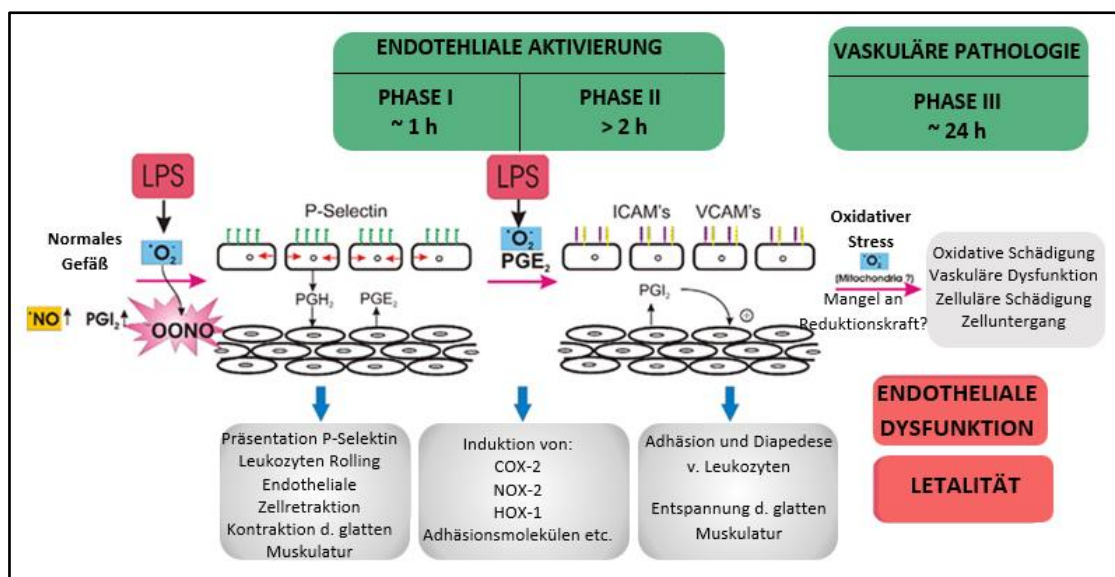


Abbildung 2.13 Endotheliale Aktivierung nach LPS-Injektion. Ausgelöst durch LPS-Injektion können verschiedene Phasen der endothelialen Aktivierung voneinander abgegrenzt werden. Durch verminderte Bereitstellung von Vasorelaxantien kommt es zunächst zur Vasokonstriktion (Phase I). Durch Rekrutierung von PGIS aus der glatten Muskulatur sowie Bereitstellung von PGH₂ durch Induktion der COX-2 erfolgt der Übergang in eine hypotensive Phase (Phase II). Zuletzt erschöpfen auch diese Mechanismen, sodass erneute (lokale) vasokonstriktive Prozesse überwiegen, in deren weiterem Verlauf es zur Zellschädigung und Entstehung einer Organdysfunktion kommt (Phase III). Abbildung modifiziert aus [166].

2.4 GLP-1 und DPP-4

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich nicht nur mit den pathophysiologischen Hintergründen und Prozessen, die in einer Sepsis vonstattengehen, sondern insbesondere auch, inwieweit sich diese durch Aktivierung des Glucagon-Like Peptide-1-Rezeptors (GLP1r) beeinflussen lassen. Daher soll in den folgenden Abschnitten zunächst auf die physiologische und anschließend auf die pharmakologische Bedeutung des GLP-1 bzw. der DPP-4 genauer eingegangen werden.

2.4.1 Physiologische Funktion

Der Blutzuckerspiegel unterliegt im Tagesverlauf starken Schwankungen. Um ihn auch nach erfolgter Nahrungsaufnahme in einem physiologischen Rahmen zu halten und zu hohe Blutzuckerspiegel zu vermeiden, kommt es zur Sekretion von Insulin. Maßgeblich daran beteiligt ist eine Gruppe von Hormonen, die unter dem Begriff „Inkretine“ zusammengefasst werden. Das aus dem englischen abgeleitete Akronym „Incretin“ setzt sich dabei aus „INtestin seCRETion INsulin“ zusammen. Dazu zählen das Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP) und das GLP-1. Beide stimulieren die glucoseabhängige Freisetzung von Insulin aus den β -Zellen des Pankreas [167]. Bezogen auf 100 g Glucose können bis zu 80 % der Insulinfreisetzung dem Inkretin-Effekt gutgeschrieben werden, also der Inkretin-vermittelten Freisetzung von Insulin, die nur bei oraler Glucosezufuhr, nicht jedoch bei intravenöser Applikation zutage tritt [168, 169]. Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ist der Inkretin-Effekt beeinträchtigt. Supraphysiologische Applikation von GLP-1 kann die Insulinausschüttung auf ein normales Ausmaß anheben, wohingegen auch bei höheren GIP-Dosierungen keine Anhebung beobachtet werden konnte [168, 170]. Im Rahmen dieser Arbeit wird daher nur das GLP-1 genauer betrachtet.

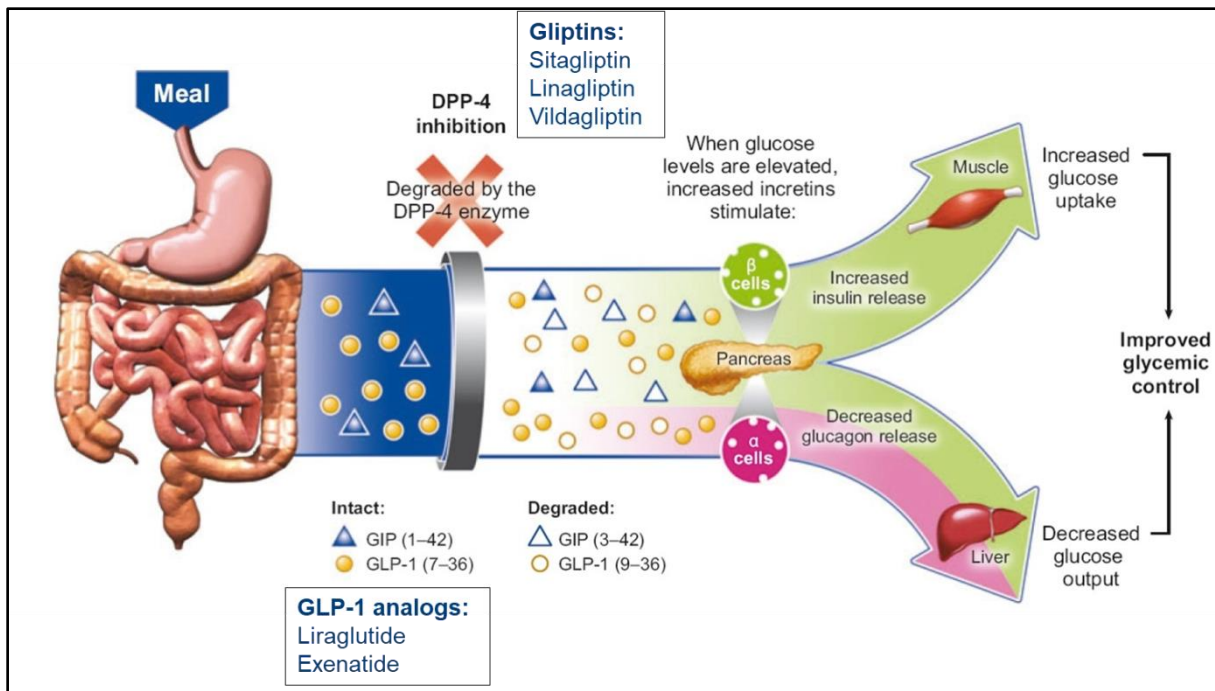


Abbildung 2.14 Incretinhormone und ihre Aufgabe im Glukosehaushalt. Nach Nahrungsaufnahme und einem Anstieg des Blutzuckerspiegels werden sogenannte Incretine (GLP-1, GIP) aus den enteroendokrinen Zellen des Gastrointestinaltraktes freigesetzt. Im Pankreas stimulieren sie die Insulinfreisetzung aus den β -Zellen und hemmen die Glukagonausschüttung aus den α -Zellen und tragen so zu einer verbesserten Blutzuckerregulation bei. Beide Hormone besitzen eine relativ kurze Halbwertszeit, da sie rasch durch die DPP-4 abgebaut werden. Pharmakologische Bedeutung insbesondere in der Behandlung des Typ 2-Diabetes besitzen daher sowohl GLP-1-Analoga, als auch DPP4-Inhibitoren. Abbildung entnommen aus [166], in Anlehnung an [171].

GLP-1 leitet sich von Präglucagon ab und besitzt mit diesem eine zu ca. 50 % übereinstimmende Aminosäuresequenz [167]. Es wird postprandial durch die L-Zellen des Ileums, Colons und Rektums freigesetzt. Neben der Aktivierung von β -Zellen bewirkt es eine verzögerte Magenentleerung sowie eine Hemmung der Glucagon-Sekretion und beeinflusst somit den Glucosespiegel im Plasma [169, 170, 172] (Abbildung 2.14). Durch die Interaktion von GLP-1 mit dem GLP-1-Rezeptor (GLP1r) wird eine Umwandlung von ATP zu cAMP induziert. Der erhöhte cAMP-Spiegel wiederum bewirkt eine Aktivierung der Proteinkinase C. Es kommt zur Depolarisation der Zellmembran sowie zur Aktivierung von Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG). Dies führt zu einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen und zur Generierung eines Aktionspotentials mit nachfolgender ATP-Synthese und Freisetzung von Insulin [173]. Die Aktivierung von zentralen GLP-1-Rezeptoren führt zu einem verstärkten Sättigungsgefühl und somit zu einer verminderten Nahrungsaufnahme [174]. Da die Plasmaspiegel von GLP-1 auch nach Nahrungsaufnahme relativ konstant bleiben, wird zusätzlich eine Sekretion durch pankreatische α -Zellen und parakrine Stimulation vermutet [175].

Die systemische Verfügbarkeit von GLP-1 ist dabei relativ gering, da ein Großteil bereits vor und während der Leberpassage durch die DPP-4 deaktiviert wird. Diese trennt die beiden N-terminalen Aminosäuren vom Rest des Peptides und inaktiviert es dadurch. Die Halbwertszeit des GLP-1 beträgt daher nur wenige Minuten [168, 175]. DPP-4 selbst ist ein Glykoprotein, bestehend aus einer zytoplasmatischen, einer transmembranösen und einer extrazellulären Domäne. Neben der membranständigen existiert zudem eine lösliche Form, welcher die zytoplasmatische und die transmembranöse Domäne fehlt. Nicht abschließend geklärt ist, ob es sich dabei um eine Abspaltung oder um eine eigenständige sezernierte Form handelt [176]. Neben GLP-1 können zahlreiche andere Verbindungen durch das Enzym gespalten werden, darunter weitere Inkretine wie GIP, Zytokine, Neuropeptide und Wachstumsfaktoren [177, 178].

2.4.2 Pharmakologische Bedeutung

Der Inkretin-Effekt kann auch therapeutisch genutzt werden, insbesondere wenn die First-Line-Therapie bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 zu keiner ausreichenden Reduktion des HbA1c führt [179]. Die sehr kurze Halbwertszeit und parenterale Applikationsform des nativen GLP-1 machte dessen pharmakologischen Einsatz im klinischen Alltag unrealistisch, sodass neue Wirkstoffe entwickelt werden mussten. Die GLP-1-getriggerte Insulinfreisetzung kann über zwei unterschiedliche Wege erreicht werden: GLP-1-Analoga entziehen sich der enzymatischen Spaltung durch die DPP-4 und weisen somit eine längere Halbwertszeit auf, imitieren jedoch dessen insulinotrope Wirkung an den β -Zellen. DPP-4-Inhibitoren hemmen, wie schon der Name sagt, die Aktivität der DPP-4, sodass vorhandenes GLP-1 länger und - da kumulierend - in höheren Dosierungen zirkulieren kann [167, 170]. In beiden Gruppen existieren mehrere Unterformen, die sich in ihrer jeweiligen Pharmakodynamik und -kinetik, sowie in ihrem Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil unterscheiden. Im Rahmen der Dissertation wird beispielhaft auf einige dieser Vertreter eingegangen:

Exenatid war das erst-entdeckte GLP-1-Analoga, zu dessen Aminosäuresequenz es eine Ähnlichkeit von ca 50 % aufweist. Es besitzt eine Halbwertszeit von 2,4 h und muss somit zweimal täglich appliziert werden. Es aktiviert glucoseabhängig die Insulinsekretion, verzögert die Magenentleerung, führt zu einem erhöhten Sättigungsgefühl und reduziert sowohl den nüchternen als auch den postprandialen Glucosespiegel. Zudem bewirkt es eine Gewichtsreduktion, ein Effekt der bislang noch bei keinem anderen, bis dahin erforschten, Antidiabetikum nachgewiesen werden konnte [180-183].

Vergleicht man Liraglutid und humanes GLP-1, so stimmt der Aufbau bis auf wenige Aminosäuresequenzen überein (Abbildung 2.15). Die positiven Effekte entsprechen denen des Exenatides, jedoch mit einer stärkeren Reduktion des HbA1c. Da die Halbwertszeit mit 13 h deutlich länger ist, muss es zudem nur einmal täglich in einer Dosierung von bis zu 1,8 mg/d appliziert werden [180, 181, 183, 184].

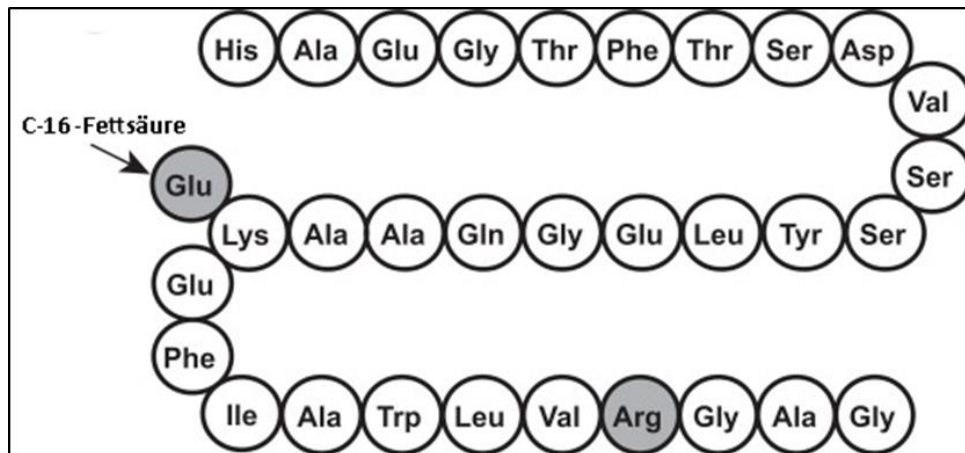


Abbildung 2.15 Primärstruktur von Liraglutid. Die grau-hinterlegten Aminosäuren repräsentieren die Abweichungen von der zugrundeliegenden Struktur des GLP-1-Hormons (Histidin [His], Alanin [Ala], Glutaminsäure [Glu], Glycin [Gly], Threonin [Thr], Phenylalanin [Phe], Serin [Ser], Asparagin [Asp], Valin [Val], Leucin [Leu], Glutamin [Gln], Lysin [Lys], Isoleucin [Ile], Tryptophan [Trp]). Modifizierte Abbildung aus [185].

Die Wirkung der DPP-4-Inhibitoren, auch Gliptine genannt, erhöht den GLP-1-Spiegel um das Zwei- bis Dreifache des Ausgangswertes und stimuliert so die Insulinausschüttung der β -Zellen. Seit der Entdeckung und Erforschung von Sitagliptin wurde mittlerweile eine Vielzahl an weiteren DPP-4-Inhibitoren entdeckt. Die unterschiedlichen Wirkstoffe interagieren mit verschiedenen Untereinheiten der DPP-4, anhand derer sie in die Klassen 1 bis 3 unterteilt werden können. Sie alle können oral eingenommen werden, führen zu einer 70–90-prozentigen Hemmung der DPP-4 und führen somit zu einer Reduktion des HbA1c. Die Elimination findet - bis auf Linagliptin, welches biliär verstoffwechselt wird - überwiegend renal statt [177, 186]. Eine Gewichtsreduktion unter der Behandlung mit Gliptinen ist weniger stark ausgeprägt gegenüber einer Therapie mit GLP-1-Analoga, jedoch profitieren die DPP-4-Inhibitoren durch verminderte gastrointestinale Nebenwirkungen wie Übelkeit [177, 180].

Beiden Wirkstoffgruppen ist gemein, dass sie glucoseabhängig zu einer Stimulation der pankreatischen β -Zellen mit nachfolgender Insulinausschüttung führen. Das Risiko von Hypoglykämien ist daher - vor allem im Vergleich zu anderen Antidiabetika - relativ gering [170, 180].

2.4.3 Weitere Funktionen

Die Auswirkungen von DPP-4-Inhibitoren und GLP-1-Analoga auf das Herz-Kreislaufsystem in Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 wurde intensiv erforscht, nicht zuletzt aufgrund der Anforderung der US Food and Drug Administration, die für die Neuzulassung von Diabetesmedikamenten seit 2008 eine Untersuchung bzgl. kardiovaskulärer Auswirkungen voraussetzen [1]. Beide Gruppen konnten für unbedenklich erklärt werden [170].

Dass beide Wirkstoffgruppen darüber hinaus sogar protektive Funktionen in weiteren Organsystemen ausüben, die sich nicht auf die glucosesenkende Wirkung zurückführen lassen, war in den letzten Jahren zunehmend Gegenstand der Forschung geworden [1]. Untermauert wird diese These durch die Entdeckung von GLP-1-Rezeptoren in Zellen des Myokards und des Endothels, sowie in zahlreichen weiteren Organen [187]. Im Folgenden soll auf die organspezifischen Wirkungen der GLP-1-Analoga und DPP-4-Inhibitoren genauer eingegangen werden, eine genauere Erläuterung der zugrundeliegenden Pathomechanismen findet sich dagegen an späterer Stelle (s. 6).

2.4.3.1 *Modulation von Risikofaktoren*

Neben dem Diabetes mellitus, einhergehend mit erhöhten Blutzuckerspiegeln, gibt es eine ganze Reihe weiterer Risikofaktoren, die zur Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen und Atherosklerose beitragen. Einige dieser Risikofaktoren lassen sich durch GLP-1-Analoga positiv beeinflussen. Dazu zählt unter anderen eine positive Modulation des Lipidstoffwechsels. Unabhängig von einer verzögerten Magenentleerung lässt sich eine verminderte intestinale Synthese und Sekretion von Chylomikronen sowie eine postprandiale Reduktion von Triglyzeriden und Apolipoprotein B48 beobachten [187-189]. Auch zeigt sich in einer Mehrzahl der Studien eine Abnahme des systolischen Blutdruckes unter langfristiger Therapie mit Exenatid oder Liraglutid. Dieser korreliert zwar mit der Gewichtsabnahme, tritt jedoch schon einige Monate früher in Erscheinung, sodass eine Kausalität bisher nicht abschließend geklärt werden konnte [1, 187, 190].

Auch DPP-4-Inhibitoren sind in der Lage, positiv auf den Lipidstoffwechsel einzuwirken. Verschiedene Wirkstoffe zeigten eine Reduktion von Triglyzeriden und Apolipoprotein B48 in diabetischen und nicht-diabetischen Patienten bereits ab einer Anwendung von sieben Tagen [191]. Von einer Reduktion des Blutdrucks unter Therapie mit DPP-4-Inhibitoren wird zudem berichtet, jedoch differieren die Ergebnisse bezüglich des tatsächlichen Ausmaßes [192, 193]. Mögliche Einflussfaktoren scheinen in einer verstärkten Sekretion von ANP und NO-Synthese, einem verminderten Abbau von BNP sowie einer Beeinflussung des RAAS-Systems zu liegen [193].

2.4.3.2 Auswirkungen auf das Immunsystem

Zusätzlich zu einem Anstieg von IL-6 konnte auch ein Anstieg von Proglucagon-verwandten Peptiden, darunter auch GLP-1, bei intensivmedizinisch behandelten Patienten einer Intensivstation bzw. 24 h nach kardialen Eingriff (unabhängig von einer vorliegenden Diabeteserkrankung) festgestellt werden. Zusammen mit der Beobachtung, dass sowohl Hyper-, als auch Hypoglykämie zur Ausschüttung inflammatorischer Proteine sowie zur Entstehung von oxidativem Stress im Probanden führt (messbar an einem Anstieg von IL-6, ICAM-1 und Nitrotyrosin im Plasma), lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass ein Zusammenhang zwischen Immunreaktion und GLP-1-Aktivität besteht. In beiden Fällen können die Plasmaspiegel durch zusätzliche Gabe von GLP-1-Analoga wieder in Richtung Ausgangsniveau gesenkt werden. Für Liraglutid konnte ein direkter Einfluss auf die Zytokinausschüttung durch Makrophagen und somit eine Regulation der Immunzellfunktion nachgewiesen werden. Auch in gesunden Probanden, ohne das Vorhandensein einer Diabetes mellitus Erkrankung, lässt sich eine Reduktion von proinflammatorischen Markern bei gleichzeitiger Gabe von GLP-1-Analoga beobachten [188].

Neben ihrer enzymatischen Funktion, besteht eine wichtige Aufgabe der DPP-4 in der Regulation der Monozyten- und T-Zell-Funktion sowie deren biologischer Prozesse. DPP-4, auch als T-Zell-Antigen CD26 bezeichnet, hat somit wesentlichen Einfluss auf die T-Zell-Aktivität [176]. Unter der Behandlung mit DPP-4-Inhibitoren zeigte sich eine supprimierte Immunreaktion mit verminderter CD4+T-Zell-Aktivierung unter Sitagliptin, bzw. verminderten Migration von Monozyten unter Alogliptin [194]. In der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen besitzen inflammatorische Prozesse einen hohen Stellenwert. Eine Hemmung der Dipeptidasenfunktion der DPP-4 resultiert in einer verminderten Zytokinsynthese, darunter IL-2, IL-10, IL-12 und IFN- γ . Immunsuppressive Zytokine und TGF- β 1 zeigten dagegen ein verstärktes Vorkommen [176, 194]. Im LPS-Modell zeigte sich in den mit Linagliptin behandelten Ratten eine verminderte Aktivierung, Adhäsion und Migration von Leukozyten. Auch die Entstehung von oxidativem Stress zeigte sich unter der Therapie deutlich vermindert (*Abbildung 2.16*) [195].

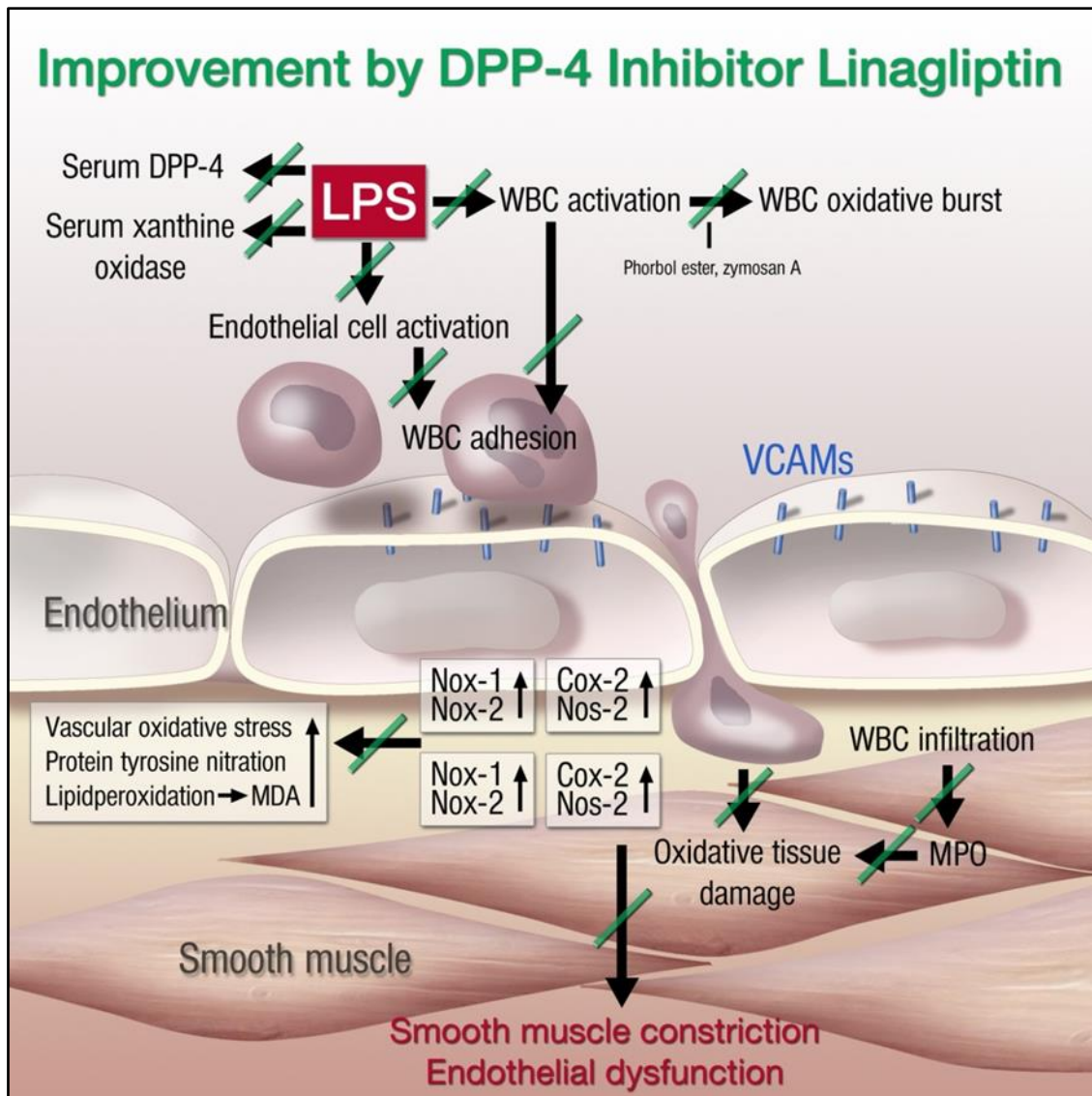


Abbildung 2.16 Antiinflammatorische, antioxidative und endothelprotektive Effekte des Linagliptins nach LPS-Injektion in Ratten. Die durch LPS-Injektion herbeigeführten proinflammatorischen Prozesse sowie die Entstehung von oxidativem Stress und endothelialer Dysfunktion konnten unter Therapie mit Linagliptin deutlich verbessert werden. (Leukozyten [WBC], Malondialdehyd [MDA], Myeloperoxidase [MPO], NADPH-Oxidase [Nox], NO-Synthase [NOS], Cyclooxygenase [Cox],). Abbildung entnommen aus [195]

2.4.3.3 Auswirkungen auf das Endothel

Weitere Schritte in der Entstehung von Atherosklerose können durch GLP-1-Analoga sowie deren native Form durch direkte und indirekte Mechanismen gehemmt werden. Im Tiermodell konnte eine Beeinflussung des Wachstums bzw. der Entstehung atherosklerotischer Plaques nachgewiesen werden [187, 190, 196]. In nicht-diabetischen Mäusen zeigte sich unter Infusionstherapie mit Exenadin-4 eine verminderte Adhäsion von Monozyten an den Gefäßwänden und Reduktion der atherosklerotischen Läsion über einen Beobachtungszeitraum von 40 Tagen. Gemessen werden konnte dieser Effekt auch an einem Rückgang von MCP-1. Unter Therapie mit GLP-1, wie auch mit Liraglutid, konnte zudem ein

Rückgang der Schaumzellbildung, sowie eine verminderte Sekretion von VCAM-1 und PAI-1 in Apolipoprotein E (ApoE)^{-/-}-Mäusen aufgezeigt werden [196]. Ein weiterer positiver Effekt besteht in der Prävention endothelialer Dysfunktion. Unter Behandlung mit Exenatid und Liraglutid kommt es zu einer vermehrten Phosphorylierung der eNOS [189, 197] an Ser-1177, wodurch die eNOS aktiviert wird [198]. Dies bedingt wiederum eine erhöhte NO-Produktion des Endothels und eine Reduktion endothelialer Entzündungsmarker [189, 197].

Auch in endothelialen, insbesondere mikrovaskulären, Zellen wird DPP-4 exprimiert. Eine Hemmung des Enzyms führt zu einer erhöhten eNOS-Funktion mit vermehrter NO-Freisetzung und Vasodilatation. Auch bei geblocktem GLP-1-Rezeptor lässt sich dieser Effekt beobachten, sodass von einer zusätzlichen Beeinflussung der eNOS durch DPP4-Inhibitoren ausgegangen werden kann [199]. Zudem werden positive Auswirkungen auf endotheliale Reperaturmechanismen vermutet. Über stroma derived factor-1 α (SDF-1 α) kommt es zur Mobilisierung von endothelial progenitor cells (EPCs) aus dem Knochenmark, die wiederum in das defekte Gewebe einwandern und dort zu reifen endothelialen Zellen ausdifferenzieren. SDF-1 α wird ebenfalls durch DPP-4 inaktiviert, unter Einsatz von DPP-4-Inhibitoren lässt sich ein erhöhter SDF-1 α -Spiegel und mutmaßlich eine erhöhte EPC-Stimulation beobachten [199, 200]. Die zuvor beschriebene verminderte Aktivierung von Leukozyten nach LPS-Injektion in Ratten unter Therapie mit Linagliptin und nachfolgende Reduktion von oxidativem Stress bewirkte zudem eine Verbesserung der endothelialen Funktion mit verbesserter Relaxation. Die verminderte endotheliale Aktivierung wirkte sich im Modell positiv auf die Aktivierung von Leukozyten aus (*Abbildung 2.16*) [195].

2.4.3.4 Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System

Auch in Myokardzellen wird der GLP1r exprimiert. Anhand der Expression eines eingebrachten gelb fluoreszierenden Reporter-Proteins in den Genabschnitt des GLP1r konnte gezeigt werden, dass der GLP1r zwar im atrialen, nicht jedoch im ventrikulären Anteil des Myokards exprimiert wird. Der Nachweis von mRNA-Transkripten des GLP1r in Volllänge in der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bestätigten diese Erkenntnisse. Dies führt zu der Annahme, dass sowohl direkte als auch indirekte GLP-1-vermittelte Mechanismen Auswirkungen auf das Myokard haben. So zeigt sich im Tiermodell unter Gabe von GLP-1-Analoga eine verminderte Apoptoserate nach Hypoxie bzw. Hydrogen Peroxid Stress gegenüber der Placebogruppe [189]. Erhalten Patienten mit einem STE-ACS (Akutes Koronarsyndrom mit ST-Hebungen) zusätzlich zu einer interventionellen Therapie ein GLP-1-Analogen, so resultieren nicht nur niedrigere Plasmaspiegel für Troponin T und I sowie Creatininkinase MB, sondern auch eine bessere Funktionalität [188]. Dies lässt sich sowohl für Diabetes- wie auch für Nicht-Diabetes-Patienten anhand einer kleineren Infarktgröße in der Kontroll-MRT bestätigen, sowie anhand einer höheren linksventrikulären Ejektionsfraktion [188, 201]. Auch in größeren klinischen Studien ließ sich ein

positiver Einfluss der GLP-1-Analoga auf die kardiovaskuläre Funktion nachweisen. Eine Verringerung von schwerwiegenden unerwünschten kardiovaskulären Ereignissen (MACE), hiermit sind im engeren Sinne der nichttödliche Myokardinfarkt, der nichttödliche Schlaganfall sowie der kardial bedingte Tod gemeint, konnte für Liraglutid (LEADER [Liraglutide Effect and Action in Diabetes: Evaluation of Cardiovascular Outcome Results]) [202, 203] und Semaglutid (SUSTAIN-6 Trial [Trial to Evaluate Cardiovascular and Other Long-term Outcomes with Semaglutid in Subjects with Type 2 Diabetes]) [202, 204] belegen.

Obwohl die oben aufgeführten Beobachtungen eine generelle kardiovaskuläre Verbesserung unter DPP-4-Inhibitoren suggerieren, so konnte dies in größeren klinischen Studien bislang nicht bestätigt werden. Eine fehlende Unterlegenheit hinsichtlich des kardiovaskulären Risikos gegenüber anderen Antidiabetika bzw. Placebo, nicht jedoch eine Überlegenheit, konnte bislang unter anderen für Sitagliptin (TECOS [Trial Evaluating Cardiovascular Outcomes with Sitagliptin]) [200, 205], Alogliptin (EXAMINE [Examination of Cardiovascular Outcomes: Alogliptin vs. Standard of Care in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Acute Coronary Syndrome]) [200, 206] und Linagliptin (CARMELINA [Cardiovascular and Renal Microvascular Outcome Study With Linagliptin in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus], CAROLINA [Cardiovascular Outcome Study of Linagliptin Versus Glimepiride in Patients With Type 2 Diabetes]) [200, 207, 208] beobachtet werden.

3 Material

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
(R)-(-)-Phenylephrin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
1,1-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl Radikal	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
ABC-Reagenz	Vector Laboratories
Acetonitril	LGC Standards (LGC Promiochem)
Acetylcholin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Albumin Fraction V (BSA)	Carl Roth GmbH
Aprotinin (from bovine lung)	Sigma-Aldrich
Aqua ad iniectabilia	Braun B.Braun Melsungen AG
Bernsteinsäuredinatriumsalz Hexahydrat (Succinat)	Fluka & Riedel
Bio-Rad DC Protein Assay Reagent A	BIORAD Laboratories GmbH
Braunol® (Providon-Iod)	B.Braun Melsungen AG
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	Fluka & Riedel
Corneregel (Augengel)	Roche
Cytochrom C	Sigma-Aldrich
D-(+)-Glucose 45%	Sigma-Aldrich
DAB-Reagenz	Vector Laboratories
DEPC (Diethylpyrocarbonat) -Wasser	Carl Roth GmbH
D-Glucose (α-D(+)-GlucoseMonohydrat	Carl Roth GmbH
DHE (Dihydroethidium)	Fluka & Riedel
D-Mannitol	Fluka & Riedel
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fluka & Riedel
DTT (Dithiothreitol)	AmershamLife Science
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Carl Roth GmbH
EDTAfree COMPLETE	Roche
EGTA (Ethylenglycolbis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich
Essigsäure 100%	Merck KGaA
Ethanol 99,8%	Carl Roth GmbH
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Guanidinthiocyanat	AppliChem
Glycerin (wasserfrei)	AppliChem
Glycin	Carl Roth GmbH,

Material

Name	Hersteller
HCl (Salzsäure)	Merck KGaA
Heparin	Ratiopharm
Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich
Hypoxanthin	Fluka & Riedel
Indomethazin	Sigma-Aldrich
Isoamylalkohol	Merck KGaA
Isofluran (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether)	ABBOTT GmbH & Co KG
Isopropanol	Sigma-Aldrich
K ₂ HPO ₄ (Di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat)	Carl Roth GmbH
Kaliumiodid	Merck KGaA
KCl (Kaliumchlorid)	AppliChem
Ketamin HCl/Xylazine HCl Solution	Sigma-Aldrich
L-012	Wako Chemicals GmbH
Liraglutid Pen 6 mg/ml Victoza	Novo Nordisk
Leupeptin-HCl (min. 90%(HPLC))	Sigma-Aldrich
L-Glutamin 200 mM 100x GIBCO	Invitrogen GmbH
Lucigenin (N,N'-Dimethyl-9,9'-biacridinium dinitrate)	Fluka & Riedel
Methanol	VWR International GmbH
MgSO ₄ (Magnesiumsulfat)	Carl Roth GmbH
Milchpulver	Carl Roth GmbH
N-Laurylsarcosine	Sigma-Aldrich
Na Hepes (Natrium-Hepes)	Carl Roth GmbH
Na ₂ HCO ₃ (di-Natriumhydrogenphosphat)	AppliChem
Natriumacetat	Merck KGaA,
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth GmbH
NaCl (Natriumchlorid), isotone Kochsalz Lösung 0,9% Braun	B.Braun Melsungen AG
NADPH (β-Nicotinamid adenine dinucleotide phosphate)	Sigma-Aldrich
NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat)	AppliChem
NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat)	Carl Roth GmbH

Material

Name	Hersteller
NaOH (Natronlauge)	Merck KGaA,
Natriumfluorid	Merck KGaA,
Natriumnitrit	Merck KGaA,
Natriumorthovanadate (Oxo-phenylarsin)	Sigma-Aldrich
Nitroglycerin (Nitrolingual infus)	G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG
PBS (Phosphat Buffered Saline)	Invitrogen GmbH
PDBu (Phorbol-12,13-Dibutyrat)	Sigma-Aldrich
Pepstatin A	Sigma-Aldrich
Phenol	Sigma-Aldrich
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma-Aldrich
Pierce ECL Western Blotting Substrate (Peroxidase Solution, Luminol Enhancer Solution)	Perbio Science
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
Proteinase K	QIAGEN GmbH
QuantiTect™ Probe RT-PCR Kit	QIAGEN GmbH
RNAse free H ₂ O	QIAGEN GmbH
Roti® -Quant für lösliche Proteine (Bradford)	Carl Roth GmbH
RT-PCR Expressionassays: <ul style="list-style-type: none"> - iNOS (<i>iNos</i>, <i>Mm00440485_m1</i>) - TNFα (<i>Tnfa</i>, <i>Mm00443259_g1</i>) - IL-6 (<i>Il6</i>, <i>Mm00446190_m1</i>) - ICAM-1 (<i>Icam1</i>, <i>Mm00516023_m1</i>) TATA box binding protein (<i>Tbp</i> , <i>Mm00446973_m1</i>)	Applied Biosystems
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Carl Roth GmbH
Sucrose (Saccharose)	Sigma-Aldrich
SuperSignal™ Chemiluminescent Substrat	Thermo Fisher Scientific GmbH
TBE (Tris/Boric Acid/EDTA Buffer)	BIORAD Laboratories GmbH
Tris-base	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Carl Roth GmbH
Triton X-100	Fluka & Riedel
Trypsin Solution 0,25% (prep. In GIBCO Sol. A) GIBCO	Invitrogen GmbH
Tween-20	SERVA Electrophoresis GmbH
Waschpuffer Immunhistologie 10x	Dako Denmark A/S
Zymosan A	Sigma-Aldrich

Tabelle 3.1 Chemikalien und Reagenzien

3.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
96-well plate	Greiner Bio-One GmbH
Adhesive Towel (OP Abdecktuch)	Mölnicke Health Care
Autosampler snap caps	Jasco Labor- & Datentechnik GmbH
Autosampler vials 0,3 ml	Jasco Labor- & Datentechnik GmbH
BD Microlance™ 3 Kanüle 20 G	Becton Dickinson GmbH
BD Microlance™ 3 Kanüle 26 G	Becton Dickinson GmbH
BD Plastipak Insulinspritze	Becton Dickinson GmbH
Blotting Filterpapier GB003	Whatman GmbH - Schleicher und Schuell
Butangas CV360	camping gaz Deutschland GmbH
Cellstar® PP-Test tubes, 15 ml steril	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar® PP-Test tubes, 50 ml steril	Greiner Bio-One GmbH
Deckgläser	Diagonal GmbH & Co. KG
Einbettkassetten	Carl Roth GmbH
Einmalpipetten 5 ml	Greiner Bio-One GmbH
Einwegskalpell No. 10	Feather Safety Razor Co.
Einwegskalpell No. 21	Feather Safety Razor Co.
epT.I.P.S. Standard 50-1000µl	Eppendorf AG
Gazin Tupfer aus Verbandmull	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG
HPLC Columns	MARCHERY-NAGEL GmbH & Co. KG
Micro Amp Optical Well Reaction Plate	Applied Biosystems
Mikrotomklingen	Leica Biosystems Nussloch GmbH
Nunc Lab Tec Chamber Slide	Nalge Nunc International
Objektträger	Thermo Scientific GmbH
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems
Original Perfusor Spritze OPS 50 ml	B.Braun Melsungen AG
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH & Co. KG
Pipettenspitze 0,1 – 1000 µl	SARSTEDT AG & Co.
Petrischalen 100 x 20 mm	STARLAB GmbH
Petrischalen 40 x 12 mm	Carl Roth GmbH
Prolene* 6-0 ETHICON	Johnson & Johnson International
Prolene* 7-0 ETHICON	Johnson & Johnson International
Protran BS85 Nitrocellulosemembran	GE Healthcare
Safelocktubes 1,5 ml	Eppendorf AG
Self Sealing Septum	Waters Corporation

Material

Name	Hersteller
Serum-Gel Monovette 7,5 ml	SARSTEDT AG & Co.
Sterile Flieskompresen	Fink & Walter GmbH
Sterilfilter FP30 / 0,2 CA-S	Whatman GmbH - Schleicher und Schuell
Tissue Culture 6Well Plate Cellstar	Greiner Bio-One GmbH
Tissue Culture flask Cellstar 250 ml	Greiner Bio-One GmbH
Tissue-Tek O.C.T. TM Compound	Sakura Finetek Europe B.V.
Vasofix Safety (Sicherheitsvenenverweil-katheter)	B.Braun Melsungen AG
Wundklammern Michel 7,5 x 1,75 mm	B.Braun Melsungen AG

Tabelle 3.2 Verbrauchsmaterialien

3.3 Antikörper

3.3.1 Antikörper Dot Blot

Name	Proteingröße	Puffer	Blockmedium	Host	Verdünnung	Firma
Primäre Antikörper						
3-NT	-	PBS/PBS-T	3 % MLK	Rabbit	1:1000	Merck Millipore
Transferrin	77 [kDa]	TBST	5 % BSA	Rabbit	1:1000	Thermo Scientific GmbH
Sekundäre Antikörper						
Anti-rabbit	-	S. Primär-AK		Goat	1:10000	Vector Lab

Tabelle 3.3 Antikörper Dot-Blot

3.3.2 Antikörper Immunhistochemie

Name	Blockmedium	Host	Verdünnung	Firma
Primäre Antikörper				
Nox-2	Normalserum Horse 2,5%	Rabbit	1:200	LSBio, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH
3-NT	Normalserum Horse 2,5%	Rabbit	1:150	Merck Millipore
Sekundäre Antikörper				
Anti-rabbit	Normalserum Horse 2,5%	Goat	1:1100	Thermo Fisher Scientific GmbH

Tabelle 3.4 Antikörper Immunhistochemie

3.4 Laborgeräte

Name	Hersteller, Firmensitz
4 Channel Tissue Bath System	Kent Scientific Corp
4 Channel Tissue Bath System	Radnoti LLC
Biomate3 Pektrophotometer	Thermo Scientific GmbH
Bridge Bioamplifier ETH 255	C.B.Sciences Inc
Brutschrank "DRY-Line"	VWR International GmbH
Cell Counter KX-21N	Sysmex Corp
Centro LB 960 Microplate Luminometer	Berthold Technologies
Cleanbench Faster BH-EN	xxx
Cryostat Leica CM 3050S	Leica Biosystems Nussloch GmbH
Einbettautomat (Paraplast)	Leica Biosystems Nussloch GmbH
Federschere "Noyes Spring Scissors -- 14mm Blades"	Fine Science Tools GmbH
Federschere Student Vannas Spring	Fine Science Tools GmbH
Federschere Vannas-Stil	Fine Science Tools GmbH
Festtemperaturdewar	Magnettech GmbH
Fireboy ECO	IBS Integra Bioscience AG
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40CFL + AxioCam MR	Carl Zeiss MicroImaging GmbH
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems
GENterphorese System	GENterprise Genomics
Gewebsinfiltrationsautomat	Leica Biosystems Nussloch GmbH
Hairclipper	Philips Medizin Systeme GmbH
Heizplatte Leica	Leica Biosystems GmbH
Homogenisator RW16 Basic	IKA® Werke GmbH & Co. KG
Hera Safe biologische Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific GmbH
HPLC Autosampler: - AS-2057 Plus - AS-4050	Jasco Labor- & Datentechnik GmbH
HPLC-System: - UV-1575 (UV/VIS Detector) - UV-2077 Plus (UV/VIS Detector) - FP-920 (Fluorescence Detector) - FP-1520 Plus (Fluorescence Detector) - PU-1580 (Pumpe) - PU-2080 Plus (Pumpe) - CO-2067 Plus (Ofen) - DG-2080-53 (3-Line Degaser) - LC-Net II/ADC (Hardware Interface)	Jasco Labor- & Datentechnik GmbH
Infrarotthermometer	BIOSEB

Material

Name	Hersteller, Firmensitz
Innova® CO₂ Incubator	New Brunswick Scientific Co., Inc.,
Inversmikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss MicroImaging GmbH
Irispinzette	Stoss Medika
IVIS Spectrum Imaging System	PerkinElmer
Kaltlicht Lampe KL1500 electronic	Schott AG
Kern KB Präzisionswaage	Kern & Sohn GmbH
Klammer Applikator "Graefe Forceps - 0.8 mm – 1 mm Tip"	Fine Science Tools GmbH
Laboport N840 Vakuumpumpe	VWR International GmbH
Lumat LB 9507	Berthold Technologies GmbH & Co.KG
Magnetrührer MR 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Matmagnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Megafuge 16R (Zentrifuge)	Thermo Scientific GmbH
Mess- & AnalysePC BenQ	Intas - Science Imaging Instruments GmbH
Micro 22 R 1110 (Zentrifuge)	Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Microliter Syringe	Hamilton Bonaduz AG
Microplate Reader MRX II Dynex	iLF bioserve e.K
Microprocessor pH-Meter 211	HANNA Instruments Deutschland GmbH
Mikropinzette	Stoss Medika
Mikroskop MSZ 5400	A. KRÜSS Optronic GmbH
Minifold® I System (DotBlot System)	Whatman GmbH - Schleicher und Schuell
Minispin Plus Zentrifuge	Eppendorf AG
Mithras LB 943 plate reader	Berthold Technologies
Nadeldose	Stoss Medika
Octal Bridge Amp ML228	ADInstruments
Olympus IX71 Mikroskop (20x Objektiv)	Olympus Corporation
Olympus Color View II Kamera	Olympus Corporation
pH-Meter GPHR1400A	GHM Messtechnik GmbH Greisinger
Photometer Heλios α	Thermo / Fisher Scientific GmbH
Pinzette "Dumont Mini Forceps - Inox Style 5"	Fine Science Tools GmbH
Pinzette "Graefe Forceps-- 0.8mm – 1mm Tip"	Fine Science Tools GmbH
Pipette Eppendorf Research 0,1 – 5000 µl	Eppendorf AG
Pipetten Pipetman 0,2 – 1000 µl	Gilson International
Powerlab 8/30 ML870	ADInstruments
Powerlab 8sp	ADInstruments
PURELAB Ultra Reinstwasseranlage	Veolia

Material

Name	Hersteller, Firmensitz
Rotofix 32 Typ 1205 (Zentrifuge)	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
Sartorius Präzisionswaage	Sartorius AG
Schere "Iris - Delicate"	Fine Science Tools GmbH
Schere "Mayo"	Fine Science Tools GmbH
Schwenktisch GFL 3005	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Sonopuls HD/GM 2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
Sonopuls Ultraschallnadel	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
Sorvall Discovery M120 SE (Ultrazentrifuge)	Thermo Scientific GmbH
Spektrometer MiniScope MS400	Magnettech GmbH
StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems	Applied Biosystems
Test Tube Thermostat TCR 100	Carl Roth GmbH
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG
Thermostat 2761	Eppendorf AG
Thermostat Plus	Eppendorf AG
TissueLyser	QIAGEN Retsch GmbH
Uniprotect Luftstromschrank	ZoonLab GmbH, D-4579 Castrop-Rauxel
Videoprinter P93DW	Intas - Science Imaging Instruments GmbH
Vortex-Genie (G560E) 2, 230 V, 50 Hz 0.5 amps	Scientific Industries
Wasserbad GFL Anova Winhorst	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Wasserstrahlpumpe	VWR International GmbH
Western Blot Imager, CHEMICAM HR 16	Intas - Science Imaging Instruments GmbH

Tabelle 3.5 Laborgeräte

3.5 Auswertungsprogramme

Name	Hersteller
7900HT Fast Real Time System	Applied Biosystems
Adobe Photoshop CS2 Version 9.0.2	Adobe Systems GmbH
Axiovision Rel 4.3	Carls Zeiss Vision GmbH
Chemilux Imager	Intas - Science Imaging Instruments GmbH
Clarity Lite Chromatographie Station	DataApex TECHLAB GmbH
LabChart Version 8	ADInstruments GmbH
Gel-Pro Analyser 6.0 (densitometrisches Auswertung)	Intas - Science Imaging Instruments GmbH
GraphPad Prism 8	GraphPad Software Inc
ImageJ Software	Wayne Rasband (NIH)
JACO ChromPass	Jasco Labor- & Datentechnik GmbH
MikroWin 2000	Mikrotek-Laborsysteme GmbH
Organbad, Chart 5	ADInstruments GmbH
Revelation 4.25	iLF bioserve
Screenshot CHEMICAM Bildaufnahme Software	Intas - Science Imaging Instruments GmbH

Tabelle 3.6 Auswertungsprogramme

3.6 Puffer und Lösungen

3.6.1 Puffer

Krebs-Hepes- (KH-) Puffer		
NaCl	99,01	mM
KCl	4,69	mM
CaCl ₂	2,5	mM
MgSO ₄	1,2	mM
NaHCO ₃	25	mM
K ₂ HPO ₄	1,03	mM
Na-Hepes	20	mM
D-Glucose	11,1	mM
pH	7,4	

Tabelle 3.7 Krebs-Hepes- (KH-) Puffer

KH-Puffer mit Inhibitoren (Inhibitorenpufer)		
Aprotinin	100	µl
Pepstatin	40	µl
Leupeptin	10	µl
Auf 10 ml KH-Puffer		

Tabelle 3.8 KH-Puffer mit Inhibitoren (Inhibitorenpufer)

Organbad-Puffer		
NaCl	118,3	mM
KCL	4,69	mM
CaCl ₂	1,87	mM
MgSO ₄	1,2	mM
NaHCO ₃	25	mM
K ₂ HPO ₄	1,03	mM
Glucose	11,1	mM
pH	7,4	
Fünf Liter Pufferlösung auf 37°C erwärmen		

Tabelle 3.9 Organbad-Puffer

Material

Homogenisierungs- (Hg-) Puffer		
Tris-HCl	20	mM
Sucrose	250	mM
EGTA	3	mM
EDTA	20	mM
pH	7,5	

Tabelle 3.10 Homogenisierungs- (Hg-) Puffer

Homogenisierungs- (Hg-) Lösung		
Hg-Puffer	10	ml
Protease Inhibitor Cocktail	100	µl
Phosphatase Inhibitor Cocktail	100	µl
PMSF (0,1 M in Methanol, final 0,5 M)	50	µl
Triton X-100	100	µl
Na-Vanadat (0,1 M in H ₂ O, final 0,5 mM)	100	µl
Na-Fluorid (0,5 M in Methanol, final 2,5 mM)	100	µl

Tabelle 3.11 Homogenisierungs- (Hg-) Lösung

Git-Puffer		
4 M Guanidiniumisothiocyanat	472,6	g/L
25 mM Na-Citrat pH=7,0	25	mL, 1 M/L
0,5 % N-Laurylsarcosine	5,0	g/L
Vor Gebrauch Zugabe von 360 µL β-MercaptoEtOH pro 50 mL		

Tabelle 3.12 Git-Puffer

Stripping-Puffer		
Tris-HCl	24,76	mM
SDS	34,62	mM
H ₂ O bidest	200	ml
2-Mercaptoethanol	700	µl

Tabelle 3.13 Stripping-Puffer

Material

3.6.2 Waschlösungen

Tris Buffer Saline (TBS) x 10		
NaCl	1,4	M
Tris base	20	mM
pH 7,6		

Tabelle 3.14 Tris buffer saline (TBS) x 10

TBS-T		
TBS x10	100	ml
Aqua (destilliert)	890	ml
Tween-20	1	ml

Tabelle 3.15 TBS-T

Phosphate Buffer Saline (PBS) x 10		
NaCl	1,5	M
Na₂HPO₄	200	mM
NaH₂PO₄	40	mM
pH 7,6		

Tabelle 3.16 Phosphate Buffer Saline (PBS) x 10

PBS-T		
PBS	100	ml
Aqua (destilliert).	890	ml
Tween-20	1	ml

Tabelle 3.17 PBS-T

4 Methoden

4.1 Versuchstiere

Der Einfluss des GLP-1-Rezeptors (hier anhand des GLP-1-Analogons Liraglutid) auf den Verlauf einer polymikrobiellen Sepsis wurde für diese Studie im Tierexperiment untersucht. Hierfür wurden von Charles River erworbene, zwischen 8 und 12 Wochen alte männliche Mäuse der Tierversuchslinie C57BL/6J verwendet. Die Mäuse wurden in einem 12-stündigen Tag-/Nacht-Rhythmus mit freiem Zugang zu Wasser und Futter in der institutionseigenen Tiereinrichtung gehalten. Die Haltung dieser Tiere, ebenso wie alle Tierexperimente, wurden im Einklang mit den „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ des U.S. National Institutes of Health [209] durchgeführt. Darüber hinaus wurden alle für diese Arbeit durchgeführten Experimente gemäß § 5a des Heilberufsgesetzes durch die Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz in Mainz und durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz in Koblenz (Tierversuchsnummer: 23 177-07/G 14-1-039) geprüft und genehmigt.

4.2 Sepsisinduktion

Für die Durchführung der Tierexperimente wurden die Versuchstiere in drei Gruppen eingeteilt:

Gruppe	Intervention	Behandlung
B6J	Sham-Operation	Placebo
CLP	Cecal Ligation and Punction	Placebo
+Lira	Cecal Ligation and Punction	Liraglutid (200 µg/kg/d, 3d, i.p.)

Tabelle 4.1 Interventionsgruppen

In zwei dieser Gruppen wurde mittels Cecal Ligation and Punction (CLP) eine Sepsis induziert. Sowohl Placebobehandlung (isotone Kochsalzlösung in adäquatem Volumen) als auch Liraglutid wurden erstmalig am Vortag der CLP-Induktion intraperitoneal injiziert und anschließend zweimal täglich à 100 µg alle 12 Stunden bis zur Tötung fortgeführt (*Tabelle 4.1*). Vor Intervention und vor Tötung wurden jeweils das Körpergewicht sowie die Körpertemperatur erfasst. Hierfür wurde ein Infrarotthermometer der Firma Bioseb (Vitrolles, Frankreich) verwendet. Die Tötung der Mäuse fand 48 Stunden nach CLP-Induktion statt. Die zeitliche Abfolge der CLP-Induktion und der periinterventionellen Behandlung sind in der *Abbildung 4.1* dargestellt.

Da eine Sepsis häufig auf dem Boden einer polymikrobiellen Infektion entsteht (*s. 1.1.4 Ursachen und Erreger*), wurde für unser Tiermodell die Sepsisinduktion mittels CLP gewählt. Hierfür erfolgt eine Ligatur des Caecums hinter der Ileocaecalklappe mit nachfolgender Punction und Perforation mittels

Methoden

Nadel. Dieses Sepsismodell gilt mittlerweile als Goldstandard in der experimentellen Sepsisforschung und findet häufig bei Versuchstieren Anwendung, da es die Entstehung und den Verlauf eines septischen Geschehens mit Bakteriämie, Aktivierung einer Immunantwort, septischem Schock mit Organversagen bis hin zum Tod in realistischer und somit in klinisch relevanter Weise nachbildet. Die einzelnen Schritte wurden gemäß dem von Rittirsch et al. veröffentlichten Protokoll durchgeführt und werden im Folgenden nochmals kurz erörtert:

Die Sepsisinduktion erfolgte unter intraperitonealer Ketamin-/Xylazinanästhesie (120 mg/kg Ketamin und 16 mg/kg Xylazin in 0.9 % NaCl). Dem schlossen sich die abdominale Rasur der Mäuse und die mediane Laparotomie an. Das Caecum wurde ausgehend von der Ileocaecalklappe aufgesucht, mit einer Ligatur im medianen Anteil zur Induktion einer mittelgradigen Sepsis unterbunden und mit Hilfe einer 21 G-Kanüle in mesenterial-antimesenteriale Richtung punktiert. Durch leichten Druck auf das Caecum wurde an beiden Punktionsstellen (Nadeleintritt/-austritt) jeweils ein Tropfen des Faeces extrahiert, um so eine bakterielle Peritonitis herbeizuführen. Die Darmschlingen wurden anschließend wieder zurückverlagert und Peritoneum, Faszie, Muskulatur und Haut mittels fortlaufender Naht bzw. Klammern adaptiert und verschlossen. B6J-Kontrollmäuse erhielten eine Sham-Operation identisch zum oben beschriebenen Vorgehen mit Ausnahme der caekalen Ligatur und Punktion sowie der Faecesextraktion. Im Anschluss erfolgte bei allen Versuchstieren die Injektion mit vorgewärmter isotoner Kochsalzlösung (37 °C, 50 ml/kg, s.c.) zur Wiederherstellung der Bewusstseinslage und Vorbeugung eines postoperativen Flüssigkeitsdefizites. Die Tiere wurden postoperativ für sechs Stunden bei 28 °C Raumtemperatur gehalten, um eine Auskühlung zu verhindern. Zudem erfolgte eine engmaschige Überwachung und Injektion von Buprenorphin (0,05 mg/kg) über sechs Stunden zur postoperativen Analgesie. Um möglichst identische Ausgangsbedingungen zu schaffen und eine Reproduzierbarkeit der Daten zu ermöglichen, wurden alle Operationen zur gleichen Tageszeit vom selben Operateur durchgeführt [210].

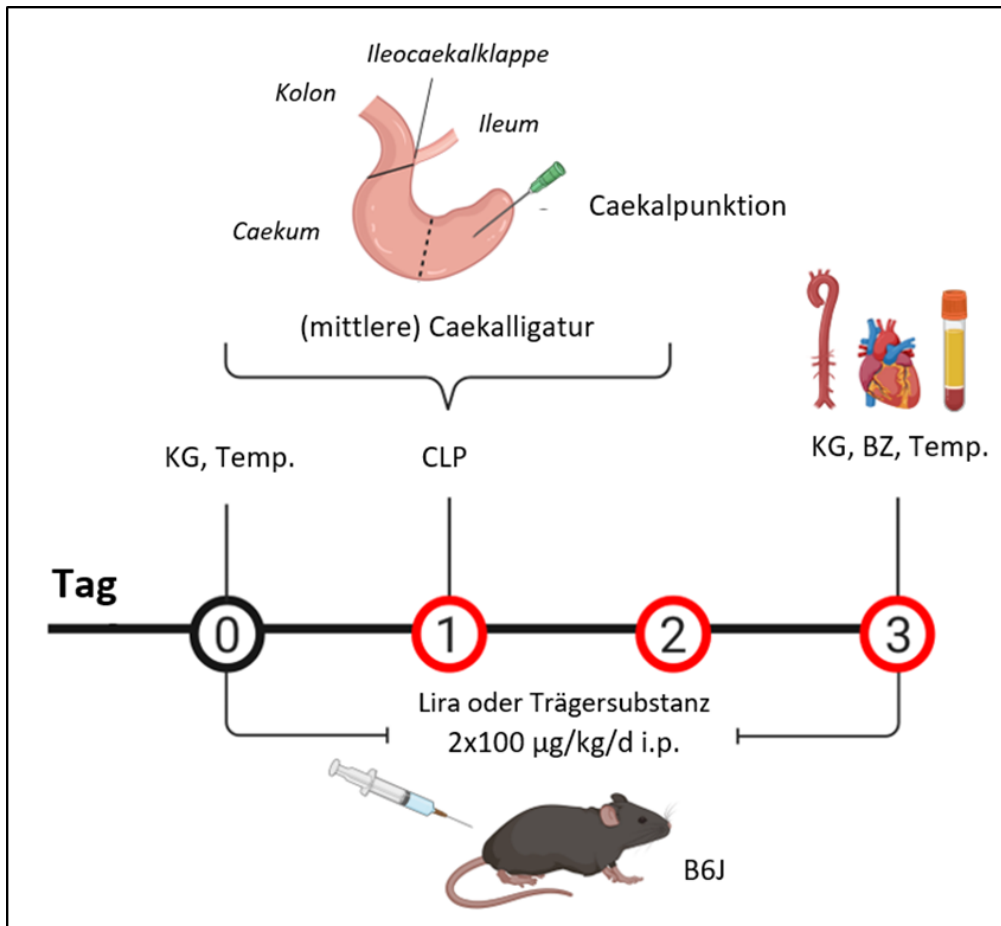


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung der CLP-Induktion und der Behandlungen. Männliche C57BL/6J Mäuse wurden zweimal täglich alle 12 Stunden entweder mit Liraglutid (Lira) oder mit dessen Trägersubstanz (Kochsalzlösung) mittels intraperitonealer (i.p.) Injektion mit einer Dosis von $2 \times 100 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ Lira bzw. adäquatem Volumen der Trägersubstanz über jeweils drei Tage behandelt. Am Tag nach der ersten Applikation erfolgte die CLP-Induktion anhand einer Caekalligatur in mittlerer Position hinter der Ileocaekalklappe und anschließender Perforation bzw. Punktion des ligierten Caekums. Am dritten Tag erfolgte die Tötung der Mäuse mit Entnahme von Aorta, Herz und Vollblut, aus dem auch der Blutzuckerspiegel (BZ) ermittelt werden konnte, sowie vorherige Erfassung von Körpergewicht (KG) und Temperatur (Temp.). Letztere beiden waren zudem vor Beginn der Behandlung für jede Maus erfasst worden. Modifizierte Abbildung aus [211].

4.3 Organentnahme

Unter Inhalationsnarkose mit Isofluran wurde das rasierte Abdomen von cranial nach caudal eröffnet. Ein Querschnitt auf Höhe des Zwerchfells bot Zugang zu Thorax und Abdomen, ein weiterer kleiner Schnitt durch das Zwerchfell löste dasselbige von der Thoraxwand, sodass das Herz freipräpariert werden konnte.

Dem noch schlagenden Herzen wurde mit einer Injektionskanüle (20 G) etwa $200 \mu\text{l}$ einer Heparinlösung (1.000 I.E. in 1 ml 0,9 % NaCl) in den linken Ventrikel injiziert. Das Heparin wirkte einer frühzeitigen Koagulation des Blutes entgegen und ermöglichte somit eine problemlose Blutentnahme. Diese erfolgte aus dem rechten Ventrikel in Serum-Gel- und Citrat-Monovetten.

Methoden

Für die Entnahme der Aorta mussten alle abdominellen und thorakalen Organe entfernt werden. Nieren, Leber und Milz wurden dabei in ein mit 4°C kalten Krebs-HEPES-Puffer (KH-Puffer; *Tabelle 3.7*) gefülltes Gefäß zwischengelagert.

Im Anschluss wurde die Aorta, ausgehend von der Iliakalbifurkation, nach kranial bis zum Aortenbogen vorsichtig freipräpariert und ebenfalls in gekühlten KH-Puffer gelagert. Dabei galt es insbesondere auf die Intaktheit des Endothels zu achten sowie Zugspannung und sonstige Traumata zu vermeiden, da all dies die isometrischen Spannungsmessungen im Organbad verfälschen kann.

4.4 Aorten- und Organpräparation

Die entnommenen Aorten wurden in 4 °C kalten KH-Puffer inkubiert und unter dem Binokularmikroskop mit Hilfe von Mikropräparierbesteck von perivaskulärem Fett- und Bindegewebe befreit. Da durch zu hohen Druck oder Spannung am Gewebe das Endothel geschädigt werden kann, war hier auf besonders große Sorgfalt zu achten. Die freipräparierte Aorta wurde vorsichtig mit KH-Puffer gespült und kaudal des Aortenbogens im thorakalen Anteil in 4 mm lange Ringe für das Organbad und die Fluoreszenzmikroskopie geschnitten. Die restlichen Aortenstücke wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 ° C für ggf. spätere Analysen gelagert. Die Aortenbögen (Immunhistochemie) bzw. Aortenringe von 4 mm (Fluoreszenzmikroskopie) wurden über 10 Minuten bei 37° C in Inkubationspuffer (*Tabelle 3.8*) für die nachfolgende Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie inkubiert.

4.5 Organbad

Die isometrische Spannungsmessung im Organbad beschreibt eine Methode, mit deren Hilfe man durch Zugabe bestimmter vasoaktiver Pharmaka die Fähigkeit der Aorten zur Konstriktion und Relaxation, den Hauptfunktionen eines jeden Gefäßes, bestimmen kann. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll der Arbeitsgruppe [212-214].

Hierfür wurden die Aortenringe in einem Glaskolben zwischen zwei dünne Dreiecke aus Draht gespannt. Von den Drahtdreiecken wurde das eine mit einem Widerlager verbunden und das andere an einem Transducer (Kraftaufnehmer Letica Scientific Instruments, Kent cScientific Corporation sowie Grass Instruments Corporation) befestigt. Dieser misst die Änderung der Zugspannung, die durch Relaxation und Kontraktion des Gefäßes entsteht und wandelt diese Kraftänderung in ein digitales Signal um (PowerLab der Firma ADInstruments).

Methoden

Die Aortenringe wurden dabei von einem Organbadpuffer (Tabelle 3.9) umgeben, dessen Zusammensetzung dem physiologischen Milieu gleicht und der zusätzlich mit Carbogen (95 % CO₂, 5 % O₂) begast wurde. Die Glaskolben wiederum wurden von 37 °C warmem Wasser umspült, sodass eine konstante Temperatur von 37 °C im Inneren während der Messungen sichergestellt werden konnte (Abbildung 4.2).

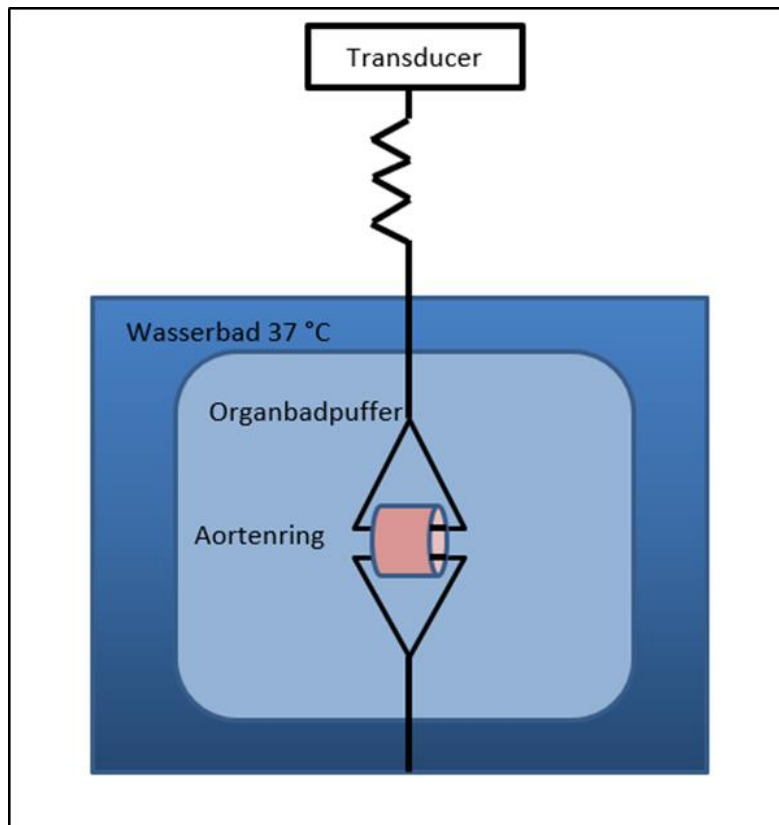


Abbildung 4.2 Isometrische Spannungsmessung im Organbad – Schemazeichnung. Die Spannungsmessung im Organbad findet in einem doppelwandigen Glasgefäß statt. In der äußeren Kammer befindet sich 37 °C warmes Wasser, die innere Kammer ist mit Organbadpuffer gefüllt. Puffer und Wassertemperatur tragen zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Milieus bei. Die 4 mm langen Aortenringe sind zwischen zwei Drahtdreiecken eingehängt. Während das untere Dreieck als Fixpunkt dient, ist das obere mit einem sog. „Transducer“ verbunden, welcher die Spannungsänderungen misst und aufzeichnet. Selbsterstellt Abbildung in Anlehnung an [215].

Da eine gewisse Grundspannung benötigt wird, um eine Spannungsänderung detektieren zu können, bedurfte es zunächst einer Eichung. Dazu wurden die Aorten über einen Zeitraum von sieben Minuten einer Kraft von bis zu 3,0 G ausgesetzt, die zuletzt registrierte und konstant bleibende Spannung wurde als „Nulllinie“ festgelegt. Um die generelle Funktionsfähigkeit der Aorten zu überprüfen, wurden anschließend 2 M KCl zugegeben, welches eine maximale Kontraktion bewirkte. Hatte sich dies eingestellt, wurde das KCl wieder vollständig mit KH-Puffer ausgewaschen, sodass die Aorten wieder relaxierten und zurück zu ihrer Ausgangs- und somit Grundspannung kehrten. Die individuelle Kontraktionsfähigkeit wurde im Anschluss über die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve ermittelt. Dafür wurden die Aorten erneut einer KCl-Lösung ausgesetzt, nun jedoch in aufsteigender Dosierung

Methoden

(5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM, 80 mM) und ohne zwischenzeitliches Auswaschen. Nach Zugabe der letzten Dosis und erneuter Einstellung der Spannung auf einem Plateau wurde das KCl ausgewaschen und die Werte kehrten wieder zur Nulllinie zurück.

Zur Messung der Relaxationsfähigkeit der Aorten bedurfte es zunächst einer Vorkontraktion unter Zugabe von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (10 mM, final 3 μ M). Hatte die Spannung erneut ein Plateau erreicht, wurden nun in zwei separaten Messvorgängen aufsteigende Konzentrationen von Acetylcholin (ACh, 10^{-9} – $10^{-5.5}$ M) bzw. Nitroglycerin (NTG, 10^{-9} – $10^{-4.5}$ M) hinzugegeben. Zwischen beiden Messvorgängen wurde die Lösung vollständig ausgewaschen und durch Zugabe von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ erneut vorkontrahiert.

Bei intaktem Endothel vermittelt ACh über muskarinerge Rezeptoren eine Aktivierung der eNOS, die daraufhin NO freisetzt, wodurch eine cGMP-abhängige Signalkaskade in Gange gesetzt wird, was letztlich zu einer Relaxation der glatten Muskulatur in den Gefäßen führt. Gleichzeitig befinden sich in der glatten Gefäßmuskulatur selbst ebenfalls muskarinerge ACh-Rezeptoren, die dort jedoch einen gegenteiligen Effekt, eine Kontraktion, auslösen. Physiologisch überwiegt bei gesundem Endothel der gefäßrelaxierende Anteil, sodass eine Vasodilatation bei der Ausschüttung von ACh stattfindet. Ist das Endothel jedoch beschädigt und nicht mehr bzw. vermindert in der Lage NO auszuschütten, so überwiegt die Vasokonstriktion. Die Zugabe von ACh im Organbad lässt folglich wichtige Rückschlüsse auf die Intaktheit des Endothels zu. Im Gegensatz dazu bewirkt die Zugabe von Nitroglycerin eine endothelunabhängige Vasodilatation [166, 216].

4.6 Dot Blot und Stripping

Der Dot Blot dient dem Nachweis von Modifikationen an unterschiedlichen Proteinen. Die mit dem Dot Blot nachgewiesenen Proteinbindungen sind nicht an ein bestimmtes Protein gekoppelt, sondern können an vielen verschiedenen Proteinen auftreten, weshalb eine Probenauftrennung nach Molekulargewicht mittels WesternBlot-Technik hier nicht zweckmäßig ist.

4.6.1 Aufbereitung der Gewebeproben und Proteinbestimmung nach Bradford

Die bei -80 °C tiefgefrorenen Gewebeproben wurden mithilfe von stickstoffgekühlten Mörserutensilien pulverisiert und in Hg-Lösung (Tab. 3.11) resuspendiert. Darin enthaltene Protease- und Phosphatase-Inhibitoren schützen die Proteine vor zelleigener Lyse. Um nun den Zelldetritus von den gelösten Proteinen zu trennen, wurden die Probengefäße für 10 Minuten bei 4 °C mit $10.000 \times g$ zentrifugiert, der proteinhaltige Überstand wurde abpipettiert und erneut auf Eis gelagert, der Rückstand verworfen.

Methoden

Für die Proteinbestimmung nach Bradford wurden die Proben zunächst im Verhältnis 1:800 mit destilliertem H₂O verdünnt, dies geschah in doppelter Ausführung. Davon wurden jeweils 2 x 80 µl auf eine 96-Well-Platte pipettiert, sodass insgesamt eine Vierfachbestimmung erfolgte. Parallel dazu wurde eine sechsstufige Eichkurve mit Standardkonzentrationen von 0 bis 50 ng/µl BSA in destilliertem H₂O erstellt, ebenfalls in Vierfachbestimmung. Als Farbreagenz diente eine 1:4 Suspension aus destilliertem H₂O und dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (Roti®-Quant, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 1:5 Verdünnung mit destilliertem Wasser à 200 µl. Dieser verschiebt sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm, indem es mit den gelösten Proteinen Komplexe eingeht und so von der ungebundenen kationischen Form in eine gebundene anionische Form überführt wird. Optisch sichtbar wird dies über einen Farbumschlag von blau nach grün, photometrisch lässt sich der Farbumschlag mit dem Microplate Reader MRX II Dynex bemessen und erlaubt mithilfe der Software Revelation 4.25 eine Berechnung der Proteinkonzentration in den unverdünnten Lysaten.

4.6.2 Proteinnachweis im Dot Blot

Zunächst wurde die Gesamtproteinmenge untereinander mit destilliertem H₂O angepasst. Nach zweimaligem Spülen mit je 200 µl PBS erfolgte die direkte Auftragung der Analysate (200 µl à 200 µg) auf eine 0,45 µm dicke Protran BA85 Nitrocellulosemembran (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) über ein Minifold I Vakuum Dot Blot System (Schleicher&Schuell). Dem schloss sich ein weiterer zweistufiger Spülvorgang an. Die Membran wurde anschließend bei 60 °C über eine Stunde getrocknet, um so die Proteine an der Membran zu fixieren.

Um Antikörperreaktionen an proteinfreien Bindungsstellen der Membran zu verhindern, erfolgte zunächst eine einstündige Inkubation mit dem entsprechenden Blockpuffer (PBS-T +3% BSA, *Tab. 3.3*) bevor sich die eigentliche Inkubation mit dem Primärantikörper 3-Nitrotyrosin (3-NT, *Tabelle 3.3*; 1:1000, Merck Millipore, 06-284, Billerica, MA, USA) über Nacht bei 4 °C anschloss. Durch viermaliges Waschen (je 5 Minuten) mit Waschpuffer (PBS-T, *Tabelle 3.16*) wurden nicht- bzw. unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran entfernt. Die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1:10.000, Vector Lab, PI-1000, Burlingame, CA, USA) erfolgte bei Raumtemperatur über 90 Minuten. Es erfolgte ein erneuter Waschvorgang von 4 x 5 Minuten.

Die Detektion der gebildeten Komplexe aus Antigen, primärem und sekundärem Antikörper wurde über eine einminütige Inkubation der Membran mit Pierce™ ECL-Reagenz (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) erreicht. Das darin enthaltene Luminol wird dabei oxydiert. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysiert diesen Prozess, wodurch wiederum ein Lichtsignal entsteht, das in der Dunkelkammer mit einer Kamera und mittels der Software Chemi-Lux-Imager (CsX-1400M, Intas, Göttingen, Germany) detektiert werden kann [217]. Die Intensität der

Methoden

Chemilumineszenz ist dabei proportional zur Quantität des entsprechenden Antigens, in diesem Fall Tyrosin-nitrierte Proteine.

4.6.3 Stripping

Trotz sorgfältigem Vorgehen in der Probenaufbereitung und -auftragung lassen sich gewisse Schwankungen in der Proteingesamtmenge/dot nicht verhindern. Damit dies zu keiner Verfälschung der gemessenen Menge an relativem 3-NT-Proteinanteil führt, erfolgte in einem weiteren Arbeitsschritt die Ladungskontrolle via Transferrin. Durch seine Eigenschaft als Transportproteins des Fe^{3+} besitzt es ein ubiquitäres Vorkommen im Plasma, sodass von einer gleichbleibenden Expression ausgegangen werden kann. Die Messung von Transferrin dient dabei zunächst der Detektion solcher Schwankungen, die im Weiteren dann rechnerisch ausgeglichen werden können. Um nun die Membran in ihren Ausgangszustand zu versetzen und somit die Bindung neuer Antikörper zu ermöglichen, wurde das Stripping angewandt. Die Komplexbildung aus Primär- und Sekundärantikörper an das an die Membran fixierte Antigen wird dabei zerstört, sodass die Membran inklusiver der geblotteten Proteine wieder in ihrem ursprünglichen Zustand vorliegt.

Dazu wurden die belichteten Streifen zunächst für fünf Minuten bei Raumtemperatur im Waschpuffer gewaschen und anschließend bei 55 °C über 45 Minuten im Strippingpuffer inkubiert. Die Membranen wurden anschließend mit Wasser gründlich gespült und dem schloss sich ein weiterer Waschvorgang von 5x 10 Minuten mit TBS-T (*Tab. 3.14*) an. Danach stand die Membran für einen weiteren Proteinnachweis zur Verfügung. Analog zum oben genannten Vorgehen (*s. 4.6.2 Proteinnachweis im DotBlot*) erfolgte die erneute einstündige Inkubation in Blockpuffer (TBS-T +5%BSA) und anschließend die Inkubation mit dem Primärantikörper Transferrin (Transferrin; 1:1000, *Tabelle 3.3*, Thermo Scientific GmbH, Waltham, MA 02451, USA) über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde der überschüssige Primärantikörper in einem vierschrittigen Waschvorgang mit Waschpuffer ausgewaschen und die Membran über 90 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (anti-rabbit; *Tabelle 3.3*, 1:10000, Vector Lab, PI-1000, Burlingame, CA, USA) inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion des Transferrins mithilfe des ECL-Reagenz in der Dunkelkammer (*s. 4.6.2 Proteinnachweis im DotBlot*).

4.6.4 Digitale Auswertung

Die Auswertung am Computer erfolgte über die Software GelPro Analyzer 3.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Diese misst die optische Dichte der dargestellten Dots, sodass im Abgleich mit der Ladungskontrolle (in diesem Fall Transferrin) letztendlich der relative Anteil der Tyrosin-nitrierten Proteine (*s. 4.6.2 Proteinnachweis im Dot Blot*) in Bezug auf einen Kontrollwert (den der sham-operierten Kontrolltiere) ermittelt und in %-Abweichung dargestellt werden konnte.

4.7 Fluoreszenzmikroskopie von Kryoschnitten

Bei der Inkubation von kryogeschnittenen Gewebeproben mit Dihydroethidium (DHE) wird dieses durch ggf. vorhandenes Superoxid oxidiert und durch Anlagerung des dadurch entstandenen Ethidins an Nukleinsäuren entwickelt sich unter Einfluss von monochromatischem Licht eine superoxidabhängige Fluoreszenz. Dieser Effekt wird durch die Fluoreszenzmikroskopie genutzt, sodass anhand der erfassten Signale Rückschlüsse auf die endogene Superoxidbelastung und damit den oxidativen Stress des untersuchten Gewebes (in diesem Fall Aorta und Herz) gezogen werden können.

4.7.1 Herstellung von Kryoschnitten

Die Aortenringe und Gewebeproben der Herzen wurden nach erfolgter Präparation auf Eis für 10 Minuten bei 37 °C in Inhibitorenbuffer (*Tab. 3.8*) inkubiert. Der darin enthaltene Protease-Inhibitor verhindert den Abbau der Proteine durch zelleigene Proteasen. Die Gewebeproben wurden dann mithilfe kleiner Förmchen aus Aluminiumfolie in ein Kryoschnittmedium (TissueTek OCT-Compound) eingebettet. Da sich das TissueTek bei Temperaturen über 20 °C im flüssigen Aggregatzustand befindet, konnten Lufteinschlüsse vermieden und gleichzeitig unter Zugabe von flüssigem Stickstoff ein zügiges und gleichmäßiges Erstarren gewährleistet werden. Die formgebende Aluminiumfolie konnte dann entfernt und die OCT-Zylinder entweder bei -80 °C zwischengelagert, oder direkt am Kryotom zugeschnitten werden.

Mithilfe des auf -25 °C vorgekühlten Kryotoms wurden die zuvor angefertigten Zylinder in 8 µm dünne Schnitte geschnitten und auf einen Objektträger übertragen. Die Kühlung von Zylindern und Objektträgern erfolgte über eine Lagerung auf Trockeneis. Um von jeder Gewebeprobe repräsentative Daten zu erhalten, wurden mehrere Schnitte aus jeder Probe angefertigt. Dabei wurde ein Mindestabstand von 80 µm zwischen den einzelnen Schnitten gewählt.

4.7.2 Färbung mit Dihydroethidium

Bei der reduzierten Form von Ethidium, dem DHE, handelt es sich um einen lipophilen Farbstoff, der somit in der Lage ist, Zellwände zu durchdringen. Wird DHE oxidiert, so emittiert das resultierende Ethidium durch Anlagerung an Nukleinsäuren nach Anregung mit 520 nm (Excitation) ein fluoreszierendes Signal (Emission bei 590 nm). Dies geschieht beispielsweise bei Anwesenheit von ROS. DHE eignet sich daher für die Detektion und Lokalisation von intrazellulärem oxidativem Stress in Form von $O_2\bullet$ [218].

Methoden

Die Kryoschnitte wurden hierfür über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 37 °C mit einer 1 µm DHE-Lösung in PBS (*Tab. 3.15*) im Dunklen inkubiert. Die Detektion der rot-fluoreszierenden ROS-Signale und Aufnahme der Bilder in der Dunkelkammer erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss Axiovert 40 CFL Mikroskop, Zeiss Linsen und Axiocam MRm Kamera, Oberkochen, Germany), einer anregenden Lichtquelle und eines gekoppelten Computers. Um auch hier eine repräsentative Stichprobe eines jeden Schnittes zu erhalten, wurden pro Schnitt mehrere, mindestens jedoch zwei Bilder aufgenommen. Die weitere Verarbeitung der Bilder entspricht der digitalen Auswertung der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten im Dot Blot mittels GelPro Analyzer 3.0 Software (*s. 4.6.4 Digitale Auswertung*).

4.8 "Oxidative Burst" - Erfassung des oxidativen Stresses mittels Chemilumineszenz

Lumineszenz beschreibt allgemein das Sichtbarwerden freiwerdender Energie, wenn angeregte Elektronen eines höheren energetischen in ein niedrigeres energetisches Niveau übergehen. Erfolgt diese Anregung durch eine vorgelagerte chemische Reaktion, so spricht man von Chemilumineszenz. Das dabei emittierte Lichtsignal kann mittels Luminometer erfasst und quantitativ gemessen werden. Werden reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) mit dem Farbstoff L-012 angeregt, so lässt sich über die entstehende Photonenemission ein solches Signal erzeugen. L-012 reagiert dabei mit einer großen Bandbreite an RONS und freien Radikalen. Somit ist die Chemilumineszenz eine geeignete Methode, um den Gesamtanteil an oxidativen Stress in verschiedenen Proben zu vergleichen [166, 216].

Die Messungen wurden hierbei durch eine 8-fach Bestimmung aus Citrat-Vollblut durchgeführt. Dafür wurden aus jeder Gruppe zunächst 2 x 40 µl gepooltes Citrat-Vollblut mit 2 ml 100 µM L-012 in PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 mM) versehen. Die erste der beiden Lösungen diente als Basalwert und konnte bereits per 200 µl Multipipette auf eine 96-Well Platte transferiert werden. Den zweiten Lösung wurden zur Aktivierung ROS-produzierender Enzyme zusätzlich 2 µl Phorbol 12, 13-dibutyrat (PDBu, 10 µM) hinzugefügt, bevor ebenfalls der Transfer auf die 96-Well-Platte erfolgte. PDBu dient als direkter Aktivator der Proteinkinase C, welche über eine Aktivierung der NADPH-Oxidase eine RONS-Generierung bewirkt [219, 220]. Die Lumineszenz wurde mit Hilfe eines Mithras LB 943 plate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) erfasst, auf die Leukozytenanzahl im Vollblut, gemessen mittels automatischer hämatologischer Analyse (Sysmex KX-21N, Kobe, Japan), normalisiert und ausgewertet (MikroWin; Mikrotek-Laborsysteme GmbH, Overath, Germany). Über Sysmex KX-21N erfolgten auch die weiteren hämatologischen Analysen.

4.9 DHE-HPLC

Unter der Zugabe von DHE kommt es durch Oxidation über die Entstehung von DHE-Radikalen zur Generierung verschiedener fluoreszierender Produkte. Die bekanntesten Produkte 2-Hydroxyethidium (2-HE) und Ethidium (E+) quantifizieren dabei das Vorhandensein an Superoxid (detektierbar durch die Menge an 2-E+OH) bzw. der Gesamtmenge anderer Oxidantien (detektierbar durch die Menge an E+). Da sowohl 2-HE als auch E+ ein fluoreszierendes Signal emittieren, ist eine Unterscheidung und somit Quantifizierung des Superoxids erst nach Separation mittels Flüssigchromatographie möglich. Die nachgeschaltete HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) ermöglicht daher nach erfolgter Inkubation mit DHE die physikalische Auftrennung und Quantifizierung des Superoxids [221].

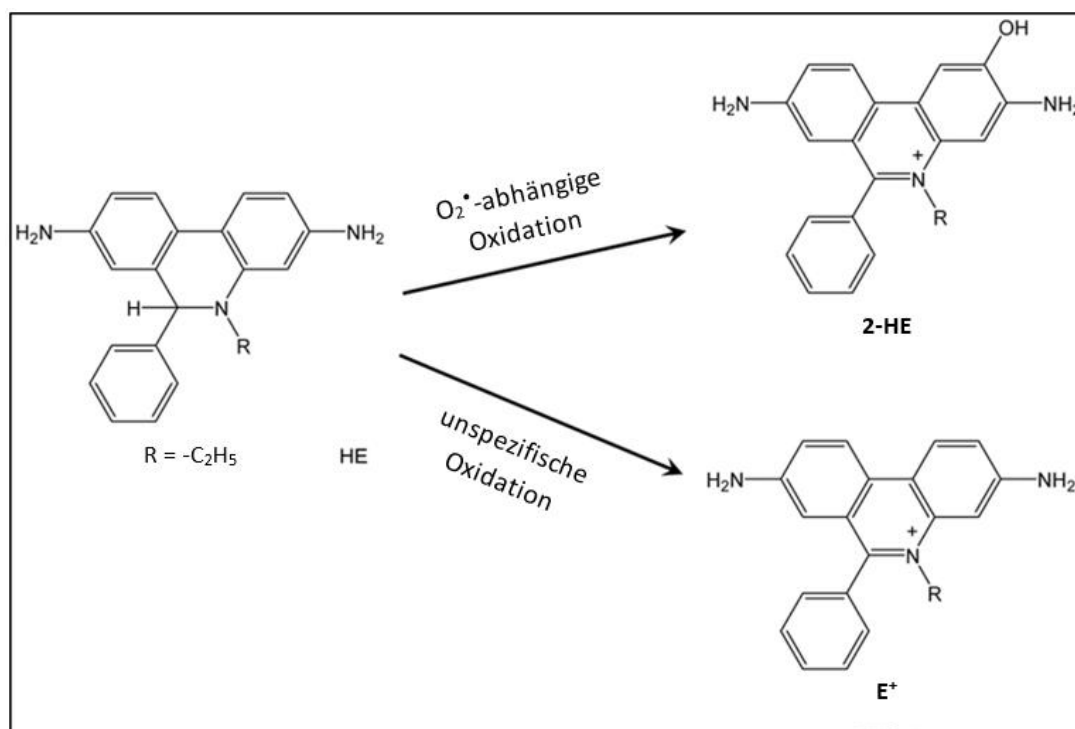


Abbildung 4.3 Superoxid (O_2^{\bullet})-abhängige Hydroxylation und unspezifische Oxidation von DHE Die Oxidation von DHE in Anwesenheit von Superoxid führt zur Bildung des fluoreszierenden 2-HE, während eine unspezifische Oxidation die Entstehung von fluoreszierenden E+ bewirkt. Modifizierte Abbildung aus [218].

Hierzu wurden mittels Skalpell ein ca. 0,2–0,5 mm großes Stück der in KH-Puffer gelagerten Herzen entnommen und für 30 Minuten bei 37 ° C in 500 μ l 50 μ M DHE in PBS (Tab. 3.15) bei 500 rpm inkubiert. Das Gewebe wurde im Anschluss unter der Zugabe einer Lösung aus Acetonitril und PBS im 1:1-Verhältnis mit einem Glas-Homogenisator (IKA® Werke GmbH & Co. KG, Stafen im Breisgau, Deutschland) homogenisiert. Die Suspension wurde für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur bei 2000 rpm zentrifugiert und schließlich 50 μ l des Überstandes der HPLC-Analyse zugeführt.

Methoden

Die HPLC beschreibt ein Trennverfahren, das auf dem Prinzip der Säulenchromatographie beruht. Der Einsatz eines hohen Umgebungsdruckes ermöglicht es dabei, innerhalb von kurzer Zeit eine Gewebsanalyse durchzuführen [222]. Dabei wandert die mobile Phase (Analyt) durch eine stationäre Phase (Kolben) und wird entsprechend ihrer Fähigkeit die stationäre Phase zu durchwandern, aufgetrennt. Dieser Prozess ist von einer Vielzahl an Faktoren abhängig wie beispielsweise der Molekülgröße, der Ladung, oder dem pH-Wert.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete HPLC-System (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) bestand - entsprechend dem üblichen Aufbau eines HPLC-Systems - aus einer Kontrolleinheit, einem Heizelement, zwei Pumpen, einem Hochdruckmischer, einem UV/VIS- und Fluoreszenzdetektor und einem Autosampler (AS-2057 plus, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland). Die stationäre Phase bestand aus C18-Nucleosil 100-3 (125x4)-Säulen von MARCHERY-NAGEL (Düren, Germany). Die mobile Phase mit Acetonitril und 50 mM Citrat-Puffer bildete bei einer Flussrate von 1 ml/min einen Hochdruckgradienten entsprechend den folgenden Werten des organischen Lösungsmittels: 0 min, 36 %; 7 min, 40 %; 8–12 min, 95 %; 13 min, 36 %. Entsprechend seines Absorptionsmaximums wurde DHE bei 355 nm detektiert. Die beiden Oxidationsprodukte 2-E+OH und E+ wurden dagegen über Fluoreszenz erfasst (Ex. 480 nm/Em. 580 nm).

4.10 Messung der Genexpression

Die PCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung und Detektion spezifischer DNA-(Desoxyribonukleinsäure-) Sequenzen. Der Nachweis gelingt über zyklische Abfolgen von DNA-Denaturierung, Anlagerung der Primer an die Einzelstränge und Elongation durch DNA-Polymerasen. Die einzelnen Zyklen sind dabei steuerbar, da für jeden der drei Schritte eine bestimmte Temperatur vorherrschen muss. Nach Abschluss der Vervielfältigung können die DNA-Sequenzen mittels Elektrophorese anhand ihrer Größe aufgeteilt werden. Da in jedem Zyklus eine Verdopplung der DNA-Stränge stattfindet, ist die Menge an neu entstandener DNA direkt proportional zur Ausgangsmenge [223].

Um nicht nur DNA, sondern auch Ribonukleinsäure (RNA) - in unseren Versuchen messenger RNA (mRNA) - zu quantifizieren und somit Aussagen über die Genexpression im untersuchten Gewebe treffen zu können, muss die RNA zunächst in doppelsträngige, komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt werden. Dies geschieht unter Verwendung einer Reversen Transkriptase. Die Reverse Transkriptase fungiert als RNA-abhängige DNA-Polymerase, wandelt also RNA in komplementäre DNA um, welche wiederum im doppelsträngigen Zustand als Startpunkt für die TaqMan-Polymerase (eine DNA-abhängige DNA-Polymerase) fungieren kann [224].

Methoden

4.10.1 RNA-Isolation

Es erfolgte zunächst die Gewinnung der RNA aus dem Aortengewebe. Hierzu wurde die Säure-Guanidinium-Thiocyanate-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode angewandt. Diese Methode bietet den Vorteil, innerhalb von kurzer Zeit eine möglichst große Menge an RNA ausgehend von kleinsten Mengen an Gewebeproben zu isolieren. Neben diesem quantitativen Vorteil zeichnet sich die Methode auch durch ein hohes Maß an Qualität aus, da die isolierten Proben weitestgehend rein und frei von Denaturierungen sind [225]. Dazu wurden die Proben (schockgefrorenes Aortengewebe) jeweils in ein RNA-steriles Eppendorfergefäß, in welchem bereits Stahlkügelchen und Git-Puffer (Tab. 3.12) vorgelegt worden waren, überführt. Die Proben wurden dann im TissueLyser bei 30 Hz für fünf Minuten homogenisiert und anschließend für mindestens eine Stunde bei -20 °C lysiert. Es folgte die schrittweise Zugabe von 0,1 Vol Na-Acetat, 1 Vol Phenol (H₂O gesättigt) und 0,5 Vol CHCl₃/Isoamylalkohol, wobei jeweils eine Homogenisierung mittels Vortexen zwischen den einzelnen Schritten erfolgte. Nachdem das Lysat über 15 Minuten auf Eis herabgekühlt und über 20 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert worden war, konnte nun die wässrige Phase überführt und nach Zugabe von 1,0 Vol Isopropanol die RNA bei -20 °C über mindestens 60 Minuten ausgefällt werden. Es schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm und 4 °C über 20 Minuten an, bevor das Zentrifugat in 300 µl 80-prozentigem Ethanol „gewaschen“, also resuspendiert und anschließend zentrifugiert, wurde. Nach einer kurzen Trocknungsphase über 5 Minuten erfolgte die Überführung in Nuklease-freies DEPC-H₂O mit nachfolgender photometrischer Konzentrationsbestimmung. Da Nukleinsäuren bei 260 nm ihr Absorptionsmaximum (A_{\max}) aufweisen, wird die Absorption der Lösung für diese Wellenlänge bestimmt. Unter Einbezug der spezifischen optischen Dichte (50 µg/ml für dsDNA, 40 µg/ml für RNA und 33 µg/ml für ssDNA), die als Umrechnungsfaktor fungiert, kann mithilfe der umgestellten Lambert-Beer'schen Formel die Konzentration ermittelt werden:

$$C \text{ (Konzentration)} = UF \text{ (Umrechnungsfaktor)} \times A \text{ (Absorption)}$$

Um die Reinheit der Probe zu bestimmen, wird zudem die Absorption bei 230 nm ($A_{\max(\text{Zucker, Salz, Phenole})}$) und bei 280 nm ($A_{\max(\text{Proteine})}$) bestimmt. Eine Probe gilt als rein, wenn

- $A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,0$
- $A_{260}/A_{230} \geq 2,0$

erreicht wird [226]. Die Proben konnten anschließend wieder bei -20 °C zwischengelagert, oder direkt der RT-PCR zugeführt werden.

4.10.2 RNA-Quantifizierung

Im Unterschied zur konventionellen PCR beschreibt die qRT-PCR ein Verfahren, welches gleichzeitig und somit in Echtzeit Vervielfältigung und Quantifizierung ermöglicht [227]. Bei dem hier verwendeten TaqMan Assay laufen reverse Transkription und PCR in einem Schritt ab. Das Assay besteht aus jeweils einem Paar genspezifischer Primer, welche den zu vervielfältigenden Abschnitt auf der cDNA begrenzen sowie sequenzspezifischen Oligonucleotide. Diese beinhalten wiederum einen Fluoreszenz-Donor am 5'-Ende und einen Fluoreszenz-Acceptor, den nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ), am 3'-Ende [223, 224, 228].

Neben der Unterdrückung („Quenching“) des Fluoreszenzsignals blockiert NFQ zusätzlich das 3'-Ende und verhindert somit eine unspezifische Verlängerung der Oligonucleotide durch die DNA-Polymerase. Ein zusätzlicher Minor Groove Binder (MGB) sorgt für eine verbesserte Spezifität. Befinden sich Fluoreszenz-Donor und NFQ in ausreichender Nähe, so wird Energie in Form eines Förster Resonanz Energie Transfers (FRET) von Fluoreszenz-Donor auf NFQ übertragen [224], ein Fluoreszenzsignal entsteht hierbei nicht [228, 229].

Während der PCR kommt es nun zur Hybridisierung der Oligonucleotide mit der komplementären Zielsequenz auf der DNA. Erreicht die TaqMan-Polymerase diesen Abschnitt, so spaltet sie mithilfe ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität die Probe. Der Fluoreszenz-Donor wird durch diesen Schritt von NFQ entfernt [224, 228], sodass kein effizienter FRET mehr stattfinden kann. Die freigesetzte Energie wird daher in Form eines Fluoreszenzsignals abgegeben. Da die Probe über keine freie 3'-Hydroxylgruppe verfügt, findet keine weitere Verlängerung statt, während die PCR selbst weiterläuft [224]. Mit jedem PCR-Zyklus wird somit ein weiteres Fluoreszenzsignal durch Abspaltung des Fluoreszenz-Donors von der Probe generiert, welches sich während der Extensionsphase direkt proportional zur Menge an neu synthetisierter spezifischer cDNA verhält und somit eine Berechnung der ursprünglich vorliegenden Menge an mRNA ermöglicht [223, 224].

Eine Quantifizierung kann entweder absolut oder relativ erfolgen. Um eine absolute Quantifizierung vorzunehmen, ist das Vorliegen einer standardisierten Probe mit einer bekannten Menge der untersuchten Nucleotidsequenzen essenziell. Ausgehend von den Messungen an dieser Probe kann dann eine Standardkurve abgeleitet werden [230]. Die relative Genexpression lässt sich mithilfe der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode berechnen. Bei dieser Methode wird die Expression des untersuchten Genabschnittes in Abhängigkeit vom Ct-Wert („cycle threshold“: Anzahl der PCR-Zyklen, ab der das Fluoreszenzsignal einen gewissen Schwellenwert überschreitet und somit messbar ist) mit der Expression eines Kontrollgens verglichen [223, 231, 232]. Um eine relative Quantifizierung vorzunehmen, bedarf es somit einer internen Kontrolle. Der entsprechende Genabschnitt zeichnet sich durch eine von

Methoden

Versuchsbedingungen unabhängige und somit konstante Expression aus und wird auch als „Housekeeping Gene“ betitelt [224, 232]. In unserem PCR-Ansatz diente das TATA-Bindeprotein als ein solches „Housekeeping Gene“, die Angabe der Genexpression erfolgte somit als Prozentsatz des Kontrollgens.

Für den PCR-Ansatz wurden 125 ng RNA sowie das QuantiTect™ Probe RT-PCR Kit von QIAGEN herangezogen. In den verwendeten TaqMan® Genexpressions-Assays lagen Primer und Sonden gemeinsam vor. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze sowie das PCR-Programm sind in den folgenden Tabellen dargestellt (*Tabelle 4.2 und 4.3*).

PCR-Ansatz (20 µl)	
2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	10 µl
RNase-freies Wasser	6,8 µl
Primer/Sonden-Set	1,0 µl
Template RNA	2,0 µl
QuantiTect Probe RT Enzym	0,2 µl

Tabelle 4.2 PCR-Ansatz für die TaqMan qRT-PCR

PCR-Programm			
50 °C	30 Minuten	Reverse Transkription	1x
95 °C	15 Minuten	Initiale Aktivierung	1x
94 °C	15 Sekunden	Denaturierung + Primeranlagerung	40x
60 °C	60 Sekunden	+ Elongation	

Tabelle 4.3 PCR-Programm für die TaqMan qRT-PCR

4.11 Immunhistochemie

Mit dem Ziel, bestimmte Proteine direkt im Gewebe sichtbar zu machen, wurden immunhistochemische Verfahren angewandt. Markierte Antikörper binden hierbei an frei liegende Proteine oder Strukturen im Gewebe und machen diese damit sichtbar. Handelt es sich um Fluoreszenzmarkierungen, so spricht man auch von Immunfluoreszenz.

Um das entnommene Gewebe und die darin enthaltenen Proteine nach Entnahme vor einem Abbau durch Proteasen zu schützen, erfolgte zunächst eine Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd über ca. einen Tag. Bei diesem Vorgang findet zudem eine Entwässerung statt, sodass vor der Einbettung in Paraffin die Proben daher nochmal mit Leitungswasser benetzt werden mussten. Die Einbettung selbst wurde mithilfe eines Einbettungskarussells (LEICA TP 1020; Wetzlar, Deutschland) vollzogen. Dabei wurden die Proben, beginnend mit destilliertem Wasser, über Lösungen mit steigendem Gehalt an

Methoden

Isopropylalkohol (70–100 %) und anschließend Xylol (Roti-Histo) bis hin zu Einbettung in Paraffin überführt. Die eingebetteten Gewebeproben konnten anschließend in 5 µm dicke Schnitte geschnitten werden.

Damit die Schnitte nun immunhistologisch gefärbt werden konnten, mussten sie zunächst von der paraffinierten in eine entparaffinierte Form überführt werden. Dafür wurden im Wesentlichen die Stadien der Einbettung in umgekehrter Reihenfolge durchlaufen und die Präparate anschließend im Dampfgerät für 20 Minuten bei einem Ziel-pH von 6 bedampft. Dann wurden die endogenen Peroxidasen mit 3-prozentigem Wasserstoffperoxid über 30 Minuten geblockt. Für das anschließende Blocken der unspezifischen Bindungen mit 2,5-prozentigem Pferde-Normalserum wurde der doppelte Zeitraum genutzt. Dieses Normalserum wurde speziesentsprechend zum zweiten Antikörper gewählt. Nach Abkippen des Blockmediums wurde der Primärantikörper (*Tabelle 3.4*, Nox-2, 1:200, LSBio, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH bzw. 3-NT, 1:150, Merck Millipore) hinzugegeben und über 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein dreifacher Waschprozess von jeweils 5 Minuten mittels Waschpuffer, die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (*Tabelle 3.4*, anti-rabbit, 1:1100, Thermo Fischer Scientific GmbH) und ein erneuter Waschprozess von 3x5 Minuten. Um die gebundenen Antikörper nun sichtbar zu machen, wurden die Schnitte zunächst für 10 Minuten in ABC-Lösung und für 2x5 Minuten in DAB-Lösung inkubiert und anschließend für 5 Minuten mit Hämatoxylin gegengefärbt. Auch hierbei fanden zwischen den einzelnen Schritten jeweils Waschvorgänge statt [217].

Nach erneuter Einbettung konnten die gefärbten Schnitte mithilfe eines Olympus IX71 Mikroskops (20x Objektiv; Hamburg, Deutschland) visualisiert und einer Olympus Color View II Kamera (Shinjuku, Tokyo, Japan) festgehalten werden. Für die Quantifizierung der eingegangenen Bindungen und somit Nachweis einer Expression von 3-NT und Nox-2 wurde die Image J Software (NIH, USA) verwendet. Um möglichst repräsentative Ergebnisse zu erzielen, erfolgte die Durchführung jeweils in doppelter Ausführung.

4.12 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) angegeben. Die statistischen Berechnungen wurden mit GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc.) ausgeführt. Zum Vergleich der Konzentration-Entspannungs-Kurve wurde eine zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA; Einfluss zweier kategorial unabhängiger Variablen auf eine kontinuierliche abhängige Variable) mit Bonferroni Korrektur verwendet. Eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA; Vergleich zweier Mittelwerte auf signifikante Differenz) mit Turkey Korrektur wurde zum Vergleich der Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -induzierten maximalen Konstriktion, Körpergewicht und -temperatur,

Methoden

Blutzuckerspiegel, mRNA Expression, Dot Blot und oxidativer Stress sowie hämatologische Parameter verwendet. In Fällen fehlender Normalverteilung wurde der Kruskal-Wallis-Test (Dunn multiple comparison) verwendet. Das Signifikanzniveau wurde für $P < 0,05$ festgelegt und mit * vs. B6J und # vs. CLP gekennzeichnet.

5 Ergebnisse

5.1 Zelluläre Blutkomponente

Um die Auswirkungen einer CLP-bedingten Sepsis auf das Blutbild zu untersuchen, erfolgte wie oben beschrieben nach Eröffnung des Thorax die Entnahme des heparinisierten Vollblutes aus dem noch schlagenden linken Ventrikel der Versuchstiere. Dieses wurde aus jeweils 3–4 Mäusen gepoolt und der Blutbildanalyse zugeführt. Tiere der CLP-Gruppe wiesen dabei eine mikrozytäre normochrome Anämie mit reduzierter Erythrozytenanzahl und einem verminderten Hb-Wert gegenüber der Kontrollgruppe auf (Tabelle 5.1: RBC, HGB, HCT, MCV, MCHC). Anzahl und Größe der Erythrozyten sowie der Hb-Wert zeigten durch die Gabe von Liraglutid einen Trend in Richtung Messwerte der Kontrollgruppe (Tabelle 5.1: RBC, MCV, HGB). Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Tieren der CLP-Gruppe bestand jedoch nicht (Tab. 5.1).

Parameter	B6	CLP	+Lira
WBC [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	4,2 \pm 0,7	1,8 \pm 0,3	3,2 \pm 1,0
RBC [$\times 10^6/\mu\text{l}$]	6,87 \pm 0,18	5,05* \pm 0,33	5,76 \pm 0,52
HGB [g/dl]	10,7 \pm 0,2	8,1* \pm 0,5	9,0 \pm 0,7
HCT [%]	32,9 \pm 0,8	23,4* \pm 1,7	26,8 \pm 2,5
MCV [fl]	47,9 \pm 0,2	46,1* \pm 0,5	46,5* \pm 0,3
MCH [pg]	15,6 \pm 0,1	16,0 \pm 0,3	15,6 \pm 0,2
MCHC [g/dl]	32,5 \pm 0,2	34,7* \pm 0,8	33,6 \pm 0,5
PLT [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	845 \pm 84	381* \pm 53	451* \pm 81
Lym% [%]	73,4 \pm 4,2	61,8 \pm 10,4	44,5* \pm 8,2
Lym [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	4,0 \pm 1,0	1,0 \pm 0,2	1,7 \pm 0,8
RDW_SD [fl]	27,2 \pm 0,3	27,2 \pm 0,2	27,0 \pm 0,2
RDW_CV [%]	12,7 \pm 0,4	12,8 \pm 0,2	12,3 \pm 0,3
PDW [fl]	6,6 \pm 0,3	7,2 \pm 0,3	7,1 \pm 0,3
MPV [fl]	5,7 \pm 0,2		6,2 \pm 0,2
P_LCR [%]	2,4 \pm 0,4	4,5 \pm 0,8	4,9 \pm 0,9

Tabelle 5.1 Hämatologische Parameter. Die Blutentnahme und somit die Erfassung der Werte erfolgte zum Zeitpunkt der Organentnahme aus dem heparinisierten Vollblut. Die Messwerte stammten dabei aus 5–7 Blutproben, jeweils aus 3–4 Mäusen gepoolt. Die Angabe erfolgte als Mittelwert \pm SEM der Messwerte. * $p < 0,05$ vs. B6J. (Anzahl an Leukozyten [WBC], Anzahl an Erythrozyten [RBC], Hämoglobin [HGB], Hämatokrit [HCT], Mittleres Erythrozytenvolumen [MCV], Mittleres korpuskuläres Hämoglobin [MCH], Mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration [MCHC], Thrombozyten [PLT], Lymphozytenkonzentration [Lym], Tatsächliche Bestimmung der Breite der Erythrozytenverteilungskurve [RDW_SD], Verteilungshäufigkeit der Erythrozytenvolumina [RDW_CV], Thrombozytenverteilungsbreite [PDW], Mittleres Thrombozytenvolumen [MPV], Anteil der großen Thrombozyten [P_LCR])

Ergebnisse

Neben einer Anämie zeigte sich in den Tieren der CLP- und der +Lira-Gruppe auch eine verminderte Anzahl an Thrombozyten (*Tabelle 5.1: PLT*) gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe. Unter Liraglutid konnte ein gewisser, wenn auch nicht signifikanter, Anstieg beobachtet werden. Im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe blieben die Werte jedoch vermindert.

Des Weiteren wurden die Auswirkungen einer polymikrobiellen Sepsis und deren Beeinflussung durch die Gabe von Liraglutid auf die Anzahl der Leukozyten verglichen. Wie in *Abbildung 5.1* zu erkennen ist, betrug die Leukozytenkonzentration in den Versuchstieren aus der CLP-Gruppe knapp die Hälfte gegenüber Tieren der Kontrollgruppe. Durch eine Behandlung mit Liraglutid konnte eine Annäherung an die Leukozytenkonzentration in Tieren der B6J-Kontrollgruppe erreicht werden.

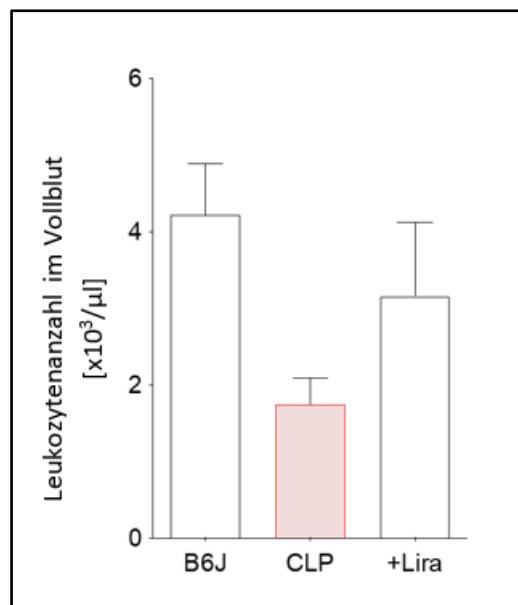


Abbildung 5.1 Leukozytenkonzentration. Zwei Tage nach Sepsisinduktion erfolgte die Bestimmung der Leukozytenkonzentration aus dem Vollblut. Die Messung fand an sechs Vollblutproben aus jeweils 3–4 gepoolten Einzelproben statt, die Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

5.2 Körpergewicht, Körpertemperatur und Blutzuckerspiegel

Eine Messung des Körpergewichts fand bei allen Versuchstieren sowohl vor Intervention (CLP-Induktion bzw. Sham-OP), als auch vor Tötung, also 48 Stunden später, statt. Beide Gruppen, die einer CLP unterzogen worden waren, unterlagen einem signifikanten Gewichtsverlust gegenüber der Kontrollgruppe (*Abbildung 5.2 A*). Versuchstiere, die eine Therapie mit Liraglutid erhalten hatten, wiesen dabei einen geringfügig (nicht signifikant) vermehrten Gewichtsverlust auf.

Ergebnisse

Ebenso wie das Körpergewicht wurde bei allen Versuchstieren die Körpertemperatur jeweils vor Intervention und vor Tötung mittels Infrarotthermometer erfasst. Dabei zeigte sich in Tieren der CLP-Gruppe ein Temperaturanstieg von durchschnittlich knapp 2 °C, während Versuchstiere der mit Liraglutid behandelten Gruppe mit ca. 1 °C Temperaturabfall ähnliche Werte wie die Tiere der Kontrollgruppe aufwiesen (Abbildung 5.2 B).

Eine Messung des Blutzuckerspiegels erfolgte zwei Tage nach Sepsisinduktion aus den heparinisierten Vollblutproben. Sowohl in Tieren der CLP-Gruppe als auch in der mit Liraglutid behandelten-Gruppe zeigte sich eine signifikante Reduktion des Blutzuckerspiegels im nicht-nüchternen Zustand um etwa die Hälfte gegenüber Tieren der Kontrollgruppe (Abbildung 5.2 C).

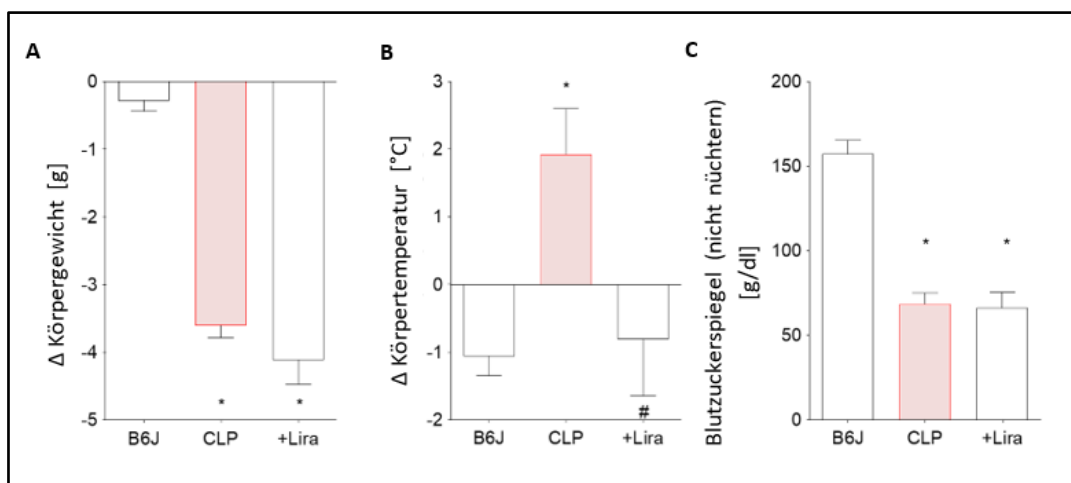


Abbildung 5.2 A-C Differenz Körpergewicht, Differenz Körpertemperatur, Blutzuckerspiegel. Erfassung des Körpergewichts an Tag 0 und an Tag 3 mit nachfolgender Bildung der Differenz. Die Messungen erfolgten an den jeweiligen einzelnen Individuen jeder Gruppe, die Werte wurden als Mittelwert \pm SEM von 22–26 angegeben (A). Erfassung der Körpertemperatur an Tag 0 und an Tag 3 mittels Infrarotthermometer und nachfolgender Bildung der Differenz. Die Messungen erfolgten an 3–4 Individuen pro Gruppe, die Werte wurden als Mittelwert \pm SEM von 16–24 angegeben (B). Die Bestimmung des Glukosespiegels erfolgte zwei Tage nach Sepsisinduktion im nicht-nüchternen Zustand der Versuchstiere aus Vollblutproben. Die Proben entstammten aus 6 verschiedenen Blutproben von jeweils 3–4 gepoolten Mäusen, die Daten wurden als Mittelwert \pm SEM von 19 – 22 angegeben (C). * $p < 0,05$ vs. B6J, # $p < 0,05$ vs. CLP.

5.3 Vaskuläre Funktionen

5.3.1 Vaskuläre Dilatation

Die endothelabhängige Vasodilatation zeigte im Versuch eine negative Beeinflussung durch CLP. Die Aortenringe septischer Tiere wiesen eine verminderte acetylcholinabhängige Relaxation im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Unter der Applikation von Liraglutid konnte eine signifikante Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation nachgewiesen werden (*Abbildung 5.3 A*).

Ob neben der endothelabhängigen auch die endothelunabhängige Vasodilatation in polymikrobiell induzierter Sepsis beeinträchtigt ist, wurde durch schrittweise Zugabe aufsteigender Konzentrationen von NTG untersucht. Ähnlich wie bereits unter der Zugabe von ACh zeigte sich auch in diesem Experiment eine verminderte Relaxationsfähigkeit der thorakalen Aortenringe in Tieren der CLP-Gruppe (*Abbildung 5.3 B*). Im Gegensatz zur ACh-vermittelten endothelabhängigen Vasodilatation fand in diesem Versuchsaufbau jedoch keine signifikante Verbesserung der Relaxationsfähigkeit durch die vorausgegangene Applikation von Liraglutid statt, die Relaxation zeigte sich auch bei diesen Tieren vermindert.

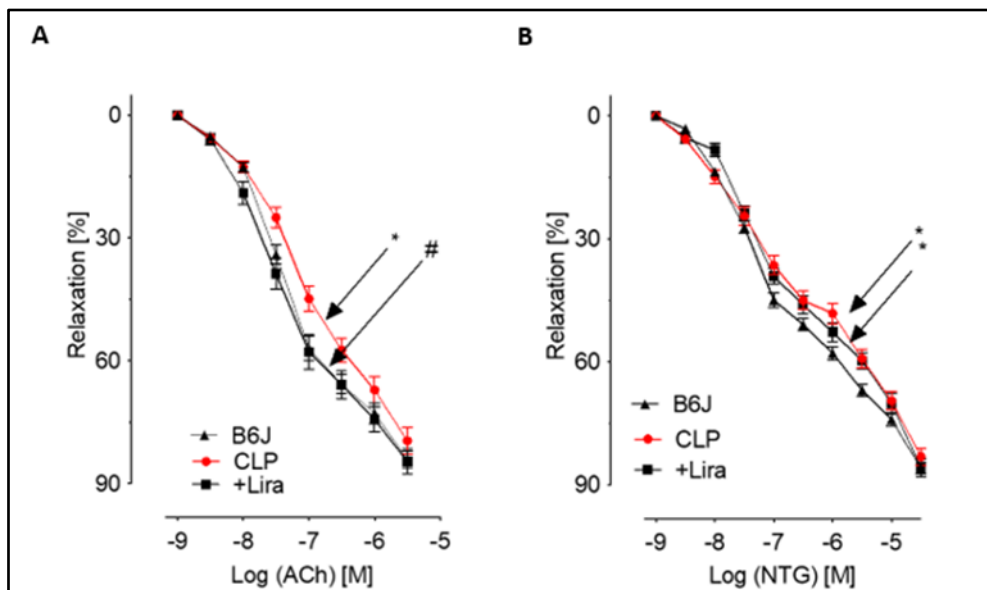


Abbildung 5.3 A, B Endothelabhängige und unabhängige Vasodilatation. Anhand aufsteigender Konzentrationen von ACh wurde die endothelabhängige Vasodilatation mittels isometrischer Spannungsmessungen im Organbad erfasst (A). Anhand aufsteigender Konzentrationen von Nitroglycerin (NTG) wurde die endothelunabhängige Vasodilatation erfasst (B). Die Messungen erfolgten als Einzelmessungen anhand thorakaler Aortenringe im Organbad (A, B). Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM von 22–34 (A), bzw. als Mittelwert \pm SEM von 21–35 (B) angegeben. * $p < 0,05$ vs. B6J; # $p < 0,05$ vs. CLP (A, B).

5.3.2 Vasculäre Kontraktion

Um die maximale Konstriktionsfähigkeit zu ermitteln, erfolgte die Applikation von 2 μM Prostaglandin F₂ α (PGF₂ α). Die Gruppe der Prostaglandine gehört zu den Abkömmlingen der Arachidonsäure und gilt als potenter Vasokonstriktor, der bei hohen Konzentrationen bis zum Vasospasmus führt. PGF₂ α findet daher häufig Anwendung zur Induktion tonischer Kontraktion in der glatten Gefäßmuskulatur [233]. Im hier beschriebenen Versuchsaufbau zeigte sich sowohl in der Gruppe der CLP-, als auch in der mit Liraglutid behandelten Tiere eine verminderte maximale PGF₂ α -induzierte Konstriktionsfähigkeit gegenüber der Kontrollgruppe (*Abbildung 5.4 A*).

Die KCl-abhängige Kontraktion beruht auf dem Prinzip der Membrandepolarisation und dem darauffolgenden Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ [234]. Um die so induzierte maximale Kontraktionsfähigkeit zu testen, wurden die Aortenringe im Organbad aufsteigenden Konzentrationen von KCl ausgesetzt, um eine Kontraktions-Relaxationskurve zu erstellen. Im Gegensatz zur maximalen Kontraktionsfähigkeit unter PGF₂ α ergaben sich hierbei weder signifikante Unterschiede in den Versuchstieren der Placebogruppe- noch in den mit Liraglutid-behandelten CLP-Tieren gegenüber Tieren der Kontrollgruppe (*Abbildung 5.4 B*).

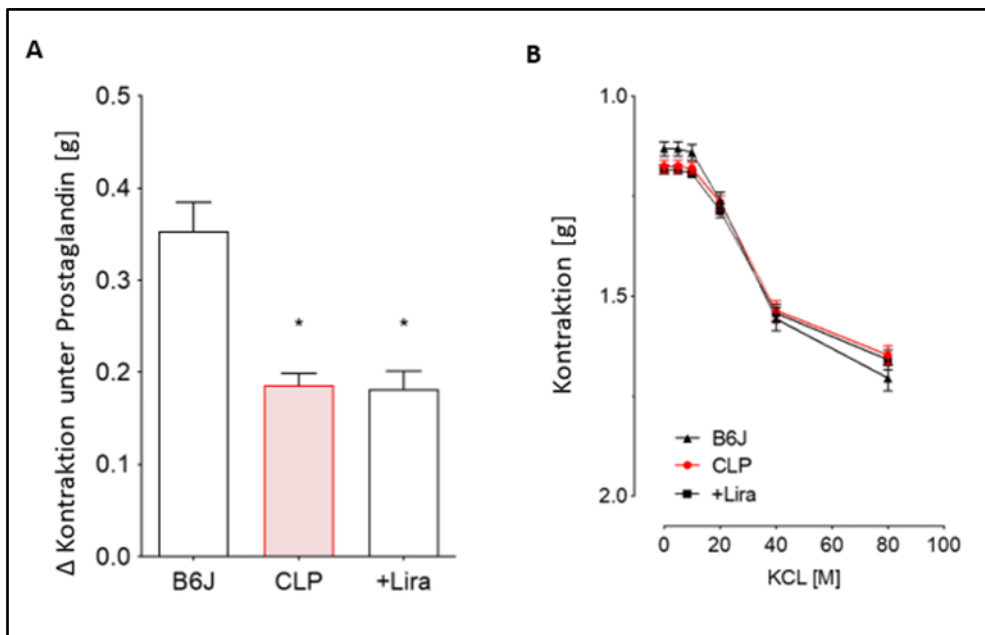


Abbildung 5.4 A, B Maximale Konstriktionsfähigkeit unter PGF₂ α und Kontraktion unter KCl. Unter der Zugabe von 2 μM PGF₂ α erfolgte die Erfassung der maximalen Kontraktionsfähigkeit. Das Diagramm veranschaulicht die Differenz zwischen gemessener Grund- bzw. Ausgangsspannung und der maximal erreichten Spannung nach Zugabe von PGF₂ α (A). Die Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve erfolgte unter der schrittweisen Zugabe von KCl (5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM, 80 mM) ohne zwischenzeitliches Auswaschen. Nach jedem Schritt wurde die Entstehung eines Plateaus abgewartet, bevor die Werte notiert wurden und eine erneute KCl-Gabe erfolgte (B). Die Messungen erfolgten als Einzelmessungen anhand thorakaler Aortenringe im Organbad (A, B). Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM von 26–36 (A) bzw. als Mittelwert \pm SEM von 26–36 (B) angegeben. * $p < 0,05$ vs. B6J (A, B).

5.4 Oxidativer Stress

5.4.1 Vaskulär

Wie bereits vorab beschrieben (s. 4.9 DHE-HPLC), kann unter Zugabe von DHE und nachfolgender HPLC die Menge an Superoxid im Gewebe bestimmt werden. Die vorhandene Menge an Superoxid ermöglicht wiederum Rückschlüsse auf die Bildung von oxidativem Stress. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die HPLC-basierte Messung am Aortengewebe der Versuchstiere. In den Mäusen mit polymikrobieller Sepsis ohne weitere Behandlung zeigte sich ein Anstieg des 2-Hydroxyethidiums und somit des Superoxides um knapp das Zweifache gegenüber Tieren der Kontrollgruppe. Unter Behandlung mit Liraglutid fiel dieser Anstieg deutlich, wenn auch nicht signifikant geringer aus (*Abbildung 5.5 A*).

Neben der HPLC-basierten Messung des Superoxids lässt sich nach Applikation von DHE auch die Gesamtmenge an ROS über eine Fluoreszenzmikroskopie von Kryoschnitten ermitteln (s. 4.7 *Fluoreszenzmikroskopie von Kryoschnitten*). Es konnte hierbei im verwendeten Aortengewebe ebenfalls ein deutlicher Anstieg des Fluoreszenzsignals in Tieren der CLP-Gruppe gegenüber Mäusen der Kontrollgruppe festgestellt werden. Versuchstiere die zusätzlich Liraglutid erhielten, wiesen gegenüber der CLP-Gruppe ein signifikant niedrigeres Signal auf (*Abbildung 5.5 B*).

Somit ließ sich eine erhöhte Entstehung von oxidativem Stress in septischen Mäusen erkennen, die unter der Behandlung mit Liraglutid reduziert werden konnte.

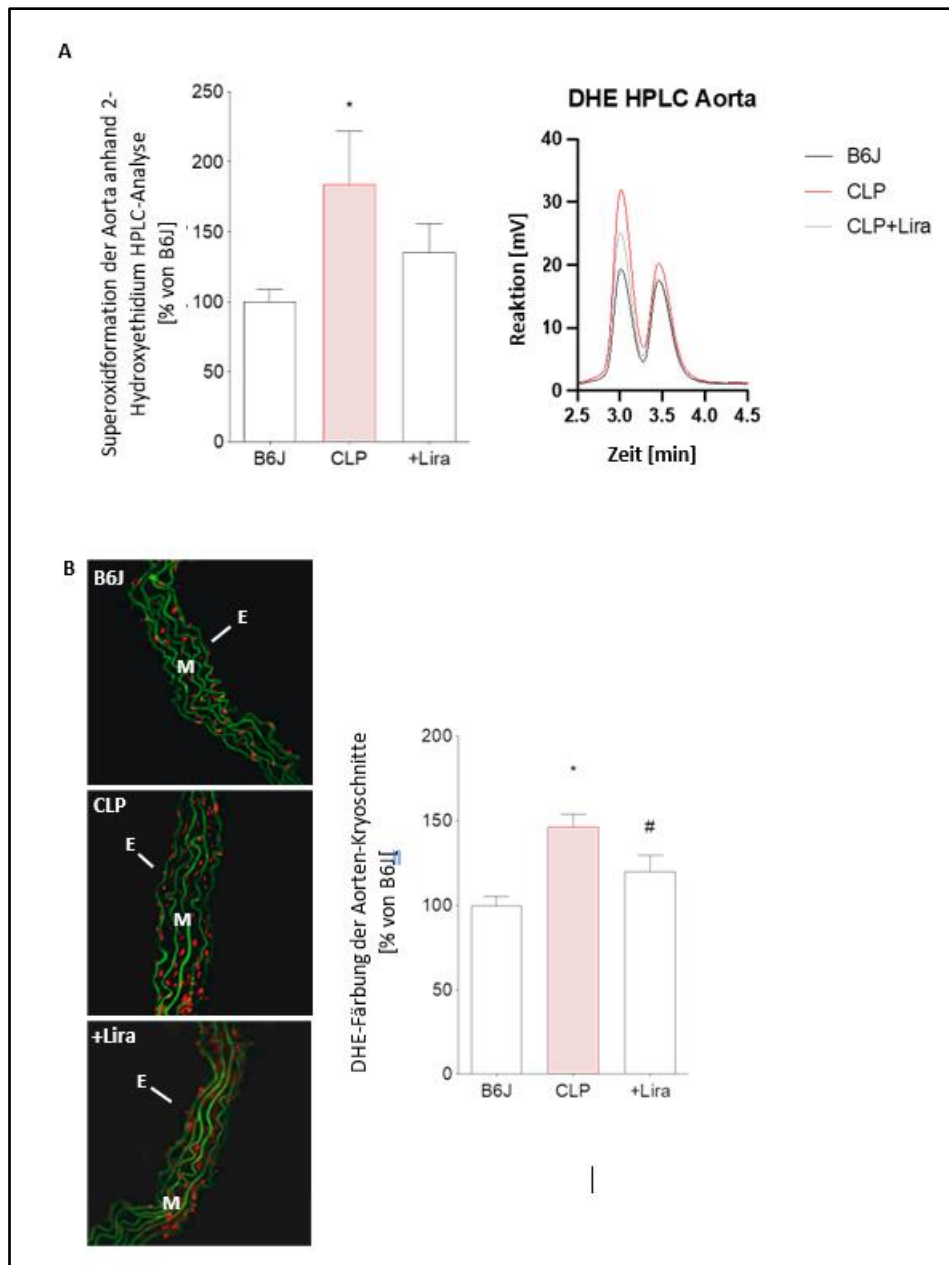


Abbildung 5.5 A, B Vaskulärer oxidativer Stress. HPLC-basierte Messung des Absorptionsspektrums von 2-Hydroxyethidium als spezifisches Produkt von Superoxid in Aortenringen unter der Zugabe von DHE. Die Angabe erfolgte als Prozentsatz von B6J. Daneben die Darstellung eines repräsentativen Chromatogramms mit den Absorptionsspektren für B6J, CLP und CLP+Lira (A). Quantifikation des Fluoreszenzsignals DHE-inkubierter Kryoschnitte von Aortenringen zur Detektion von ROS-Formationen. Die Messwerte sind als Prozentsatz von B6J angegeben. Daneben eine exemplarische Mikrophotographie der fluoreszierenden Aortenringe mit Superoxid-abhängiger roter Fluoreszenz im Beisein von ROS und grüner Autofluoreszenz (M = Media, E = Endothelium) (B). Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben mit 6–8 Einzelmessungen (A) bzw. mit vier Einzelmessungen (B) aus unterschiedlichen Tieren. * $p < 0,05$ vs. B6J; # $p < 0,05$ vs. CLP (A, B).

Die Entstehung von Peroxynitrit und Superoxid lässt sich zudem auch direkt im vaskulären Gewebe visualisieren, quantifizieren und anschließend vergleichen. Zu diesem Zwecke wurden spezifische immunhistochemische Färbungen an Gewebsschnitten aus den Aorten der unterschiedlichen Tiergruppen durchgeführt.

Ergebnisse

In den Gewebsschnitten aus Aorten von Tieren der CLP-Gruppe zeigte sich eine deutlich vermehrte Expression von 3-NT als Marker für das Vorhandensein von Peroxynitrit. Der Anstieg der 3-NT-Expression fiel in den Tieren der mit Liraglutid behandelten Tiere geringer aus (*Abbildung 5.6 A*).

Als Indikator für entstandenes Superoxid wurde zudem die Expression von Nox2 untersucht. Auch hier konnte in Tieren der CLP-Gruppe eine deutlich vermehrte Expression festgestellt werden, welche in Mäusen der +Lira-Gruppe vermindert ausfiel (*Abbildung 5.6 B*).

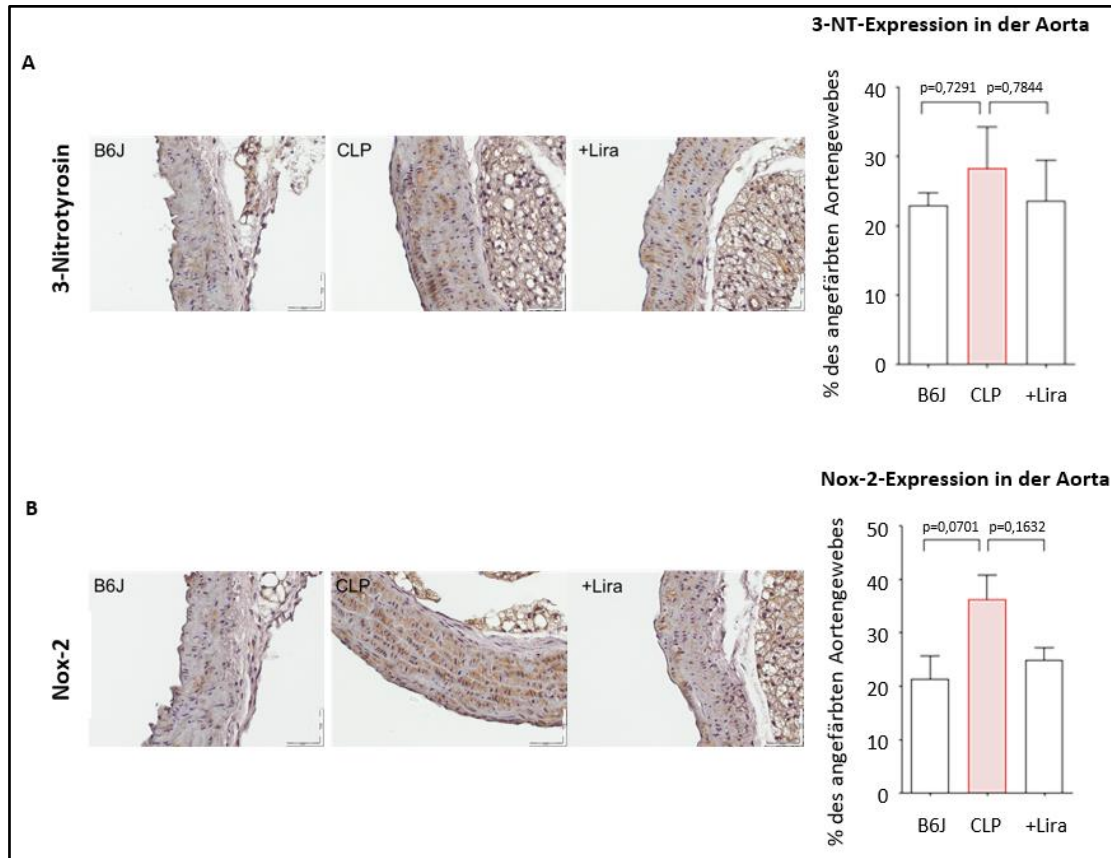


Abbildung 5.6 A, B Vaskuläre Produktion von Superoxid und Peroxynitrit Messung des oxidativen Stresses im Aortengewebe über die Anfärbung von 3-NT-exprimierenden Proteinen (A). Visualisierung der Superoxidentstehung im Aortengewebe über die Anfärbung und Messung der Nox-2-Expression (B). Angabe der Messwerte als Prozentsatz der angefärbten Aorta. Neben der densitometrischen Auswertung Darstellung einer repräsentativen Mikrofotographie mit immunhistochemischer Anfärbung von 3-NT (A) bzw. Nox2 (B). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, die Schnitte entstammen drei Einzeltieren (A, B).

5.4.2 Kardial

Analog zu den eben genannten Untersuchungen von DHE-Kryoschnitten des Aortengewebes erfolgte auch die Messung von oxidativem Stress im kardialen Gewebe. Die Entstehung von ROS betrug dabei in Versuchstieren der CLP-Gruppe mehr als das Doppelte gegenüber Mäusen der Kontrollgruppe. Wurden die septischen Mäuse mit Liraglutid behandelt, so konnte die Entstehung von ROS signifikant reduziert werden (*Abbildung 5.7*).

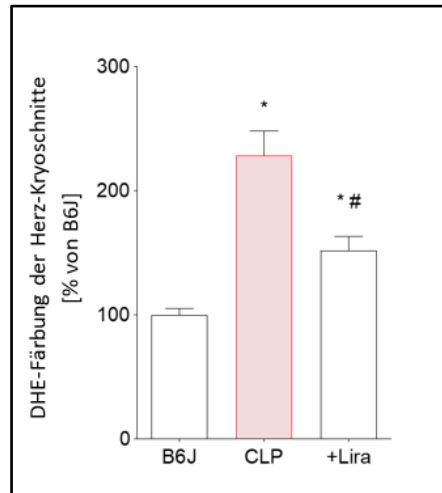


Abbildung 5.7 Kardialer oxidativer Stress (DHE-Kryoschnitte) Quantifikation des Fluoreszenzsignals DHE-inkubierter Kryoschnitte von Herzgewebe zur Detektion von ROS-Formationen. Die Messwerte sind als Prozentsatz von B6J angegeben. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben aus jeweils vier Einzelmessungen. * $p < 0,05$ vs. B6J; # $p < 0,05$ vs. CLP.

5.4.3 Vollblut

Der Oxidative Burst im Vollblut entspringt weitestgehend der Aktivität der NADPH-Oxidase und Myeloperoxidase und der dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies und kann somit als hämatologischer Marker für oxidativen Stress und Entzündungsreaktionen gehandhabt werden. Unter Zugabe von PDBu kommt es zur Stimulation und nachfolgenden Bildung von RONS. Diese werden mittels Chemilumineszenz visualisiert (s. 4.8 „Oxidative Burst“ Erfassung des oxidativen Stresses mittels Chemilumineszenz).

In den Tieren der CLP-Gruppe konnte ein deutlicher Anstieg des Oxidative Bursts und somit des oxidativen Stresses im Vollblut um das Zwei- bis Dreifache gegenüber Mäusen der Kontrollgruppe gemessen werden. Dieser Anstieg fiel in den vorab mit Liraglutid behandelten Versuchstieren signifikant geringer aus (Abbildung 5.8 A).

Die Nitrierung beschreibt die Reaktion von Tyrosin mit Peroxynitrit und weiteren RONS. Dabei kann es sich sowohl um freie Tyrosinreste, als auch um ungebundenes Tyrosin handeln. Die entstandene 3-NT-Modifikation kann anhand von Antikörperbindungen detektiert und visualisiert werden. Das dabei entstehende Messsignal kann somit als Marker für oxidativen Stress gewertet und in den verschiedenen Gruppen verglichen werden [235]. In den hier verwendeten Plasmaproben wiesen Mäuse der CLP-Gruppe ein zwei- bis dreifach höheres Signal gegenüber Tieren der Kontrollgruppe auf. Erhielten die Versuchstiere neben einer CLP-Induktion auch eine begleitende Therapie mit Liraglutid, so konnte eine signifikante Reduktion des nachgewiesenen oxidativen Stresses gezeigt werden, knapp oberhalb des Wertes von Tieren der Kontrollgruppe (Abbildung 5.8 B).

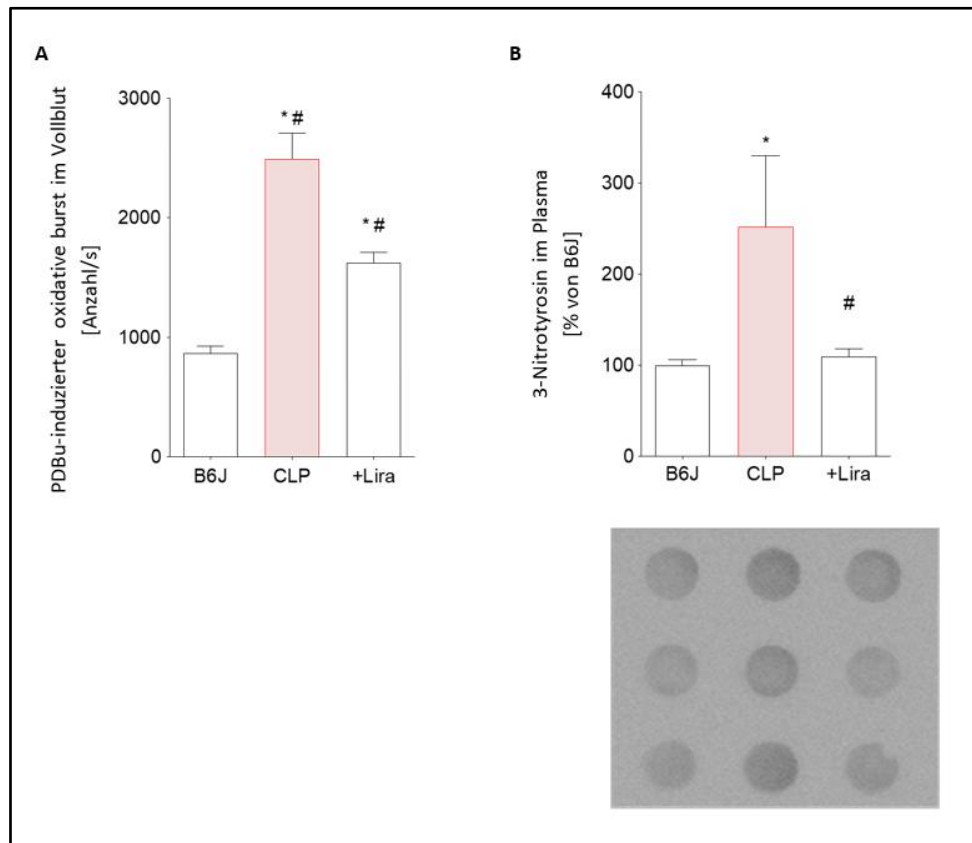


Abbildung 5.8 A, B Hämatologischer oxidativer Stress. Messung des Chemilumineszenzsignals im PDBu- (10 μ M) stimulierten Vollblut nach Zugabe von L-012 (100 μ M) ECL. Abgleich des gemessenen Signals und somit des Oxidative Bursts anhand der Leukozytenanzahl im Vollblut (A). Messung des oxidativen Stresses im Plasma über die 3-NT-Expression mittels Dot Blot Technik. Angabe der Messwerte als Prozentsatz von B6J. Darunter eine exemplarische Darstellung der Dot Blot Analyse (B). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben (A, B). Die Messung erfolgte anhand von sechs Vollblut- (A) bzw. vier Plasmaproben (B), die jeweils einem Pool von 3–4 Mäusen entstammen. * $p < 0,05$ vs. B6J; # $p < 0,05$ vs. CLP (A, B).

5.5 Vaskuläre Inflammation: Veränderung auf mRNA-Ebene

Die Auswirkungen einer polymikrobiellen Sepsis und deren Behandlung mit Liraglutid, insbesondere auf das Entzündungsgeschehen, ließen sich auch auf Ebene der Genexpression nachweisen (s. 4.10 *Messung der Genexpression*).

Da eine vermehrte Entstehung von Superoxid unter anderem über eine gesteigerte iNOS-Expression stattfinden kann, wurde auch deren Genexpression im Aortengewebe untersucht. Hierfür ließ sich in Mäusen der CLP-Gruppe eine vielfache Steigerung der mRNA-Expression nachweisen. In den Versuchstieren der mit Liraglutid behandelten Gruppe zeigte sich dagegen eine (wenn auch nicht signifikante) Reduktion, wenngleich die iNOS-mRNA-Expression höher als in Tieren der Kontrollgruppe ausfiel (Abbildung 5.9 A).

Ergebnisse

In der qRT-PCR zeigte sich zudem ein signifikanter Anstieg der *IL-6*-Expression in den Aorten septischer Versuchstiere. Unter begleitender Therapie mit Liraglutid konnte eine deutliche Reduktion der *IL-6*-Expression gegenüber Mäusen der CLP-Gruppe nachgewiesen werden (Abbildung 5.9 B).

Des Weiteren wurde die mRNA-Expression von ICAM-1 als zytokinabhängiges Genprodukt untersucht. Während in den Aorten von Mäusen der Kontrollgruppe nur eine geringe Expression nachgewiesen werden konnte, wurde in Versuchstieren der CLP-Gruppe signifikant mehr ICAM-1 exprimiert. Unter Therapie mit Liraglutid zeigten die Versuchstiere einen deutlich verminderten Anstieg der mRNA-Expression von ICAM-1 (Abbildung 5.9 C).

In der Betrachtung der $\text{TNF}\alpha$ -Genexpression zeigte sich im Aortengewebe von Tieren der CLP-Gruppe ein deutlicher Anstieg, wohingegen in den Versuchstieren der Kontrollgruppe nur eine marginale Expression von $\text{TNF}\alpha$ nachgewiesen werden konnte. Mäuse, die der +Lira-Gruppe entstammten wiesen zwar ebenfalls eine signifikant erhöhte $\text{TNF}\alpha$ -Expression auf, diese war jedoch deutlich weniger ausgeprägt gegenüber Tieren der CLP-Gruppe vor (Abbildung 5.9 D).

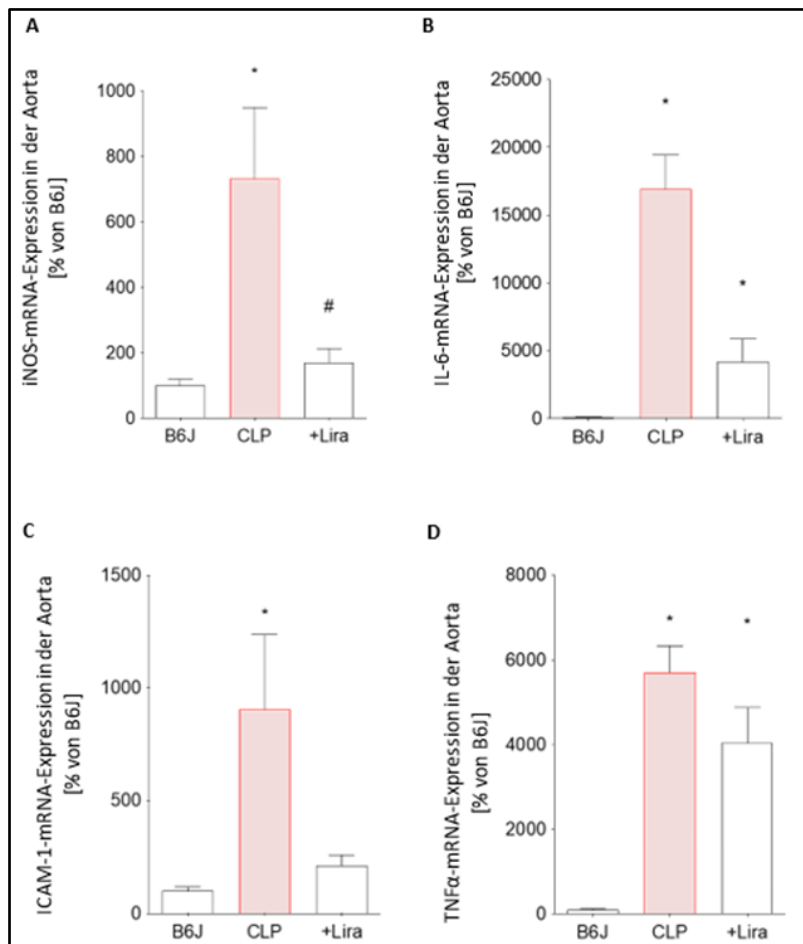


Abbildung 5.9 A-D Vaskuläre Inflammation, mRNA-Expression von iNOS, IL-6, ICAM-1 und $\text{TNF}\alpha$. Messung der mRNA-Expression von iNOS (A), IL-6 (B), ICAM-1 (C) bzw. $\text{TNF}\alpha$ (D) in der qRT-PCR im Aortengewebe. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben aus jeweils drei Messungen, die jeweils einem Pool von 3–4 Mäusen entstammen. * $p < 0,05$ vs. B6J; # $p < 0,05$ vs. CLP (A-D).

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die Auswirkungen einer Therapie mit dem GLP-1-Analogon Liraglutid auf polymikrobielle, durch CLP induzierte, Sepsis erforscht. Untersucht wurden dabei zwei CLP-operierte Versuchsgruppen, von denen die eine zusätzlich mit Liraglutid, die andere mit Placebo (Trägersubstanz) behandelt wurde. Eine dritte, sham-operierte Gruppe wurde ebenfalls mit Placebo behandelt und diente als Kontrolle. Dabei konnte in den mit Liraglutid behandelten septischen Tieren eine Verbesserung der endothelialen Funktion, des oxidativen Stresses und ein Rückgang der Inflamationsparameter beobachtet werden. Die Durchführung einer CLP bewirkte in allen Mäusen unabhängig von einer zusätzlichen Behandlung mit Liraglutid eine Reduktion des Körpergewichts sowie des Blutzuckerspiegels. Vaskuläre Relaxation und Kontraktion zeigten sich unter peritonealer Sepsis vermindert, unter Therapie mit Liraglutid konnte eine Verbesserung beobachtet werden. Als Zeichen einer systemischen Inflamationsreaktion wiesen die CLP-Tiere eine erhöhte Körpertemperatur und eine erniedrigte Anzahl an Leukozyten auf. Ebenso zeigten sich proinflammatorische Proteine wie TNF α , IL-6, ICAM-1 und iNOS erhöht. Auch eine kardiale, vaskuläre und systemische Erhöhung des oxidativen Stresses, gemessen anhand einer vermehrten Peroxynitrit-vermittelten Nitrierung von Tyrosinresten, einer erhöhten Expression der *Nox2* bzw. dem direkten Nachweis einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, konnte nachgewiesen werden. Unter Behandlung mit Liraglutid zeigten sich eine Verminderung der durch die CLP-Prozedur veränderten proinflammatorischen und prooxidativen Parameter.

Im Folgenden wird diskutiert, inwieweit sich die o.g. Ergebnisse in die bisherigen Forschungsergebnisse bzw. schließlich die klinische Realität einreihen. Zur besseren Beurteilung der Auswirkungen einer Behandlung mit Liraglutid in unserem gewählten Sepsismodell soll zunächst einmal das Tiermodell selbst diskutiert werden. Vor- und Nachteile einer solchen CLP-Induktion gegenüber bisherigen Sepsismodellen werden erörtert. Inwiefern das CLP-Modell die tatsächlichen Umstände im septischen Patienten widerspiegelt, ist ein weiterer Aspekt, wenn es um die Frage einer möglichen zukünftigen Anwendung unserer Befunde in der Behandlung der Sepsis geht.

6.1 Das CLP-Modell

6.1.1 Sepsis-Modelle im Vergleich

In der präklinischen Sepsisforschung gilt das CLP-Modell seit einigen Jahren als Goldstandard [236, 237]. Gegenüber vorangegangenen Modellen mittels Endotoxin-Injektion (z.B. LPS) bzw. Injektion von Faeces (z.B. Peritoneal Contamination and Infection; PCI) oder lebendiger Pathogene (z.B. Bakterien oder Viren) verspricht es eine höhere klinische Relevanz. Eine LPS-induzierte Sepsis zeichnet sich durch die Stimulation proinflammatorischer Vorgänge aus, im Zuge derer es zur Freisetzung von

Diskussion

Entzündungsmediatoren kommt [238, 239]. Da lange Zeit gramnegative Bakterien die führende Ursache einer Sepsis bildeten, galt insbesondere dieser Mechanismus als unumgänglicher und auslösender Schritt in der Pathogenese der Sepsis [42]. Dabei wird im Tiermodell durch den hochakuten Beginn und der Verwendung hoher LPS-Dosen aber weder der tatsächliche klinische Verlauf einer Sepsis wiedergegeben, noch kann die volle Vielfalt des Krankheitsbildes imitiert werden, da sämtliche durch grampositive Erreger ausgelöste Pathomechanismen unbeachtet bleiben. Ein weiteres Modell verspricht letzteren Punkt zu umgehen. Hierbei soll durch direkte Injektion von lebenden Pathogenen eine Sepsis ausgelöst werden. Kritisch gesehen werden muss aber auch in diesem Modell das plötzliche Einschwemmen einer hohen Menge an Pathogenen gegenüber der kontinuierlichen Ausschüttung von Krankheitserregern aus einem Infektionsfokus, wie es häufig bei einem septischen Patienten vorliegt. Zudem existieren große Unterschiede in der Anfälligkeit einzelner Mechanismen gegenüber unterschiedlichen Erregern. Die Erkenntnisse aus einer monomikrobiell induzierten Sepsis lassen sich daher nur bedingt auf den Menschen übertragen [238, 239].

Die Wahl eines geeigneten Sepsismodelles impliziert den immerwährenden Konflikt in der Schwerpunktsetzung bezüglich klinischem Realitätsbezug, experimenteller Simplifikation und technischer Durchführbarkeit [239]. Das CLP-Modell besticht in diesem Kontext mit einem engen Realitätsbezug bei gleichzeitig einfacher und kostengünstiger Durchführung sowie der Reproduzierbarkeit seiner Ergebnisse. Zudem können ausgehend vom Grundmodell weitere Variationen geschaffen werden. Für die Reproduzierbarkeit der Daten ist es unabdingbar, das verwendete CLP-Modell genau zu befolgen. Kleine Abweichungen, beispielsweise in der Lage der Ligatur, in der Größe der Punktionsnadel oder in der Anzahl der Perforationen, können bereits zu signifikanten Änderungen bzgl. des Ausmaßes der induzierten Sepsis und somit möglicherweise zu falschen Rückschlüssen führen. Gleichzeitig kann damit durch gezielte punktuelle Veränderungen ein sehr hohes Maß an Diversität bzgl. der Ausprägung des Krankheitsbildes geschaffen werden, welches Rückschlüsse auf die ablaufenden Immunprozesse zulässt [210, 236, 240, 241].

Seemann et al. beschreiben und vergleichen in ihrem Versuchsaufbau den zeitlichen Verlauf verschiedener septischer Tiermodelle. Sowohl unter LPS-, als auch unter CLP-Behandlung konnte eine Abnahme des Körpergewichts bereits innerhalb der ersten 24 Stunden beobachtet werden. Diese lässt sich am ehesten auf eine verminderte Aufnahme von Nahrung und Flüssigkeit infolge der systemischen Entzündungsreaktion zurückführen. Unterschiede bestanden dagegen in der Ausschüttung von Zytokinen. Während sich in den LPS-Tieren ein rapider Anstieg von IL-6, TNF α und IFN- γ unmittelbar nach Behandlungsbeginn mit einem Peak in den ersten Stunden feststellen ließ, war der Verlauf der CLP-Tiere durch einen späteren Beginn mit zunächst milderem Anstieg geprägt. Unter Verwendung

einer nicht-letalen LPS-Dosis sank die Zytokin-Expression nach 72 Stunden wieder auf ein annähernd normales Niveau ab, wohingegen CLP-Tiere einen prolongierten Verlauf aufwiesen (Abbildung 6.1).

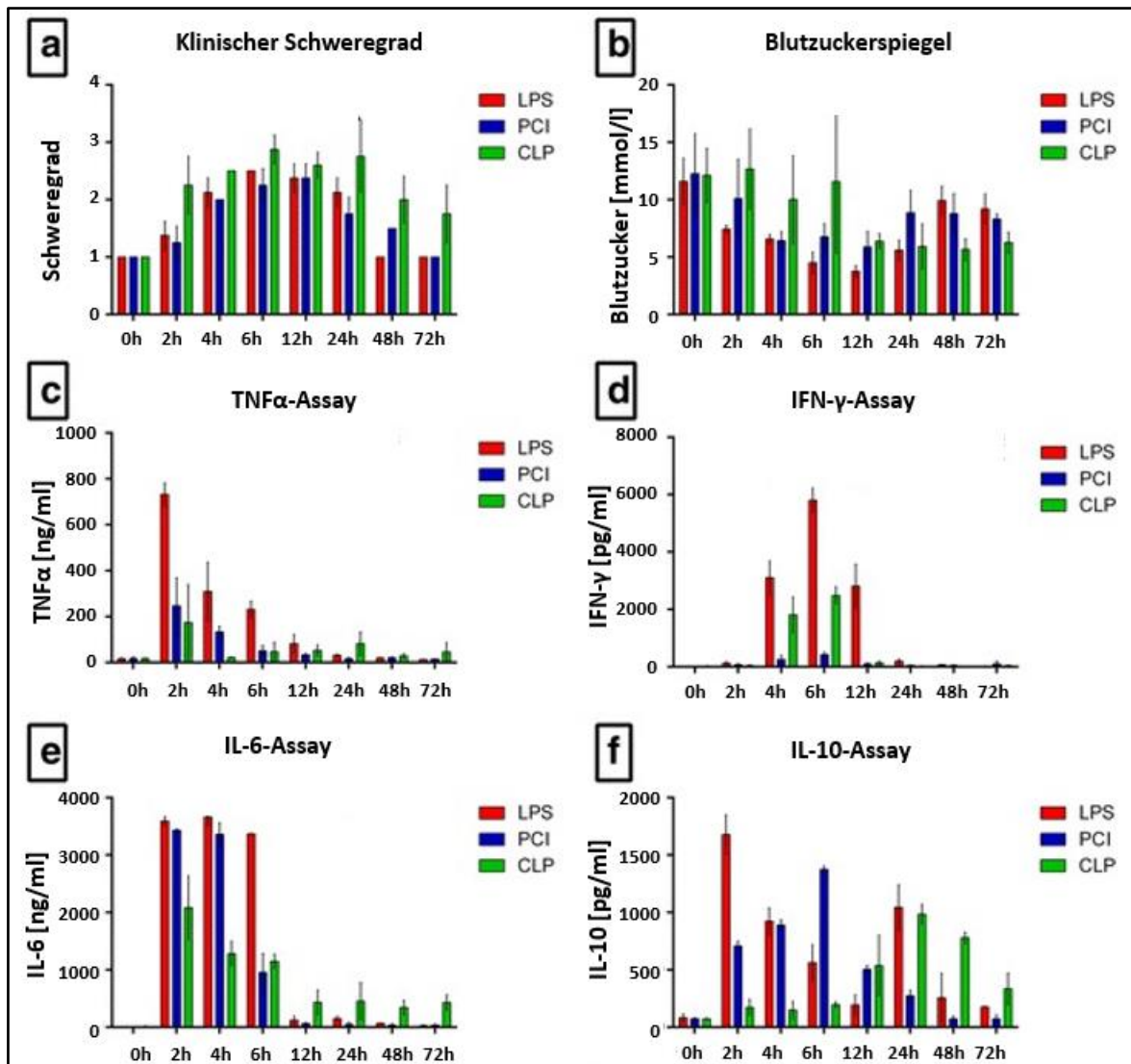


Abbildung 6.1 Gegenüberstellung von LPS-, PCI- und CLP-Modell anhand klinischer und serologischer Parameter im zeitlichen Verlauf. Das LPS-Modell zeichnete sich durch einen exzessiven Anstieg an pro-, aber auch antiinflammatorischen Cytokinen bereits wenige Stunden nach LPS-Injektion aus, während in Tiere des CLP-Modelles ein späterer und milderer, jedoch prolongierter Anstieg zu beobachten war (c-f). In Tieren der PCI-Gruppe fiel die Expression von proinflammatorischen Zytokinenn deutlich milder aus (ausgenommen IL-6-Expression), der zeitliche Verlauf ähnelte dem der LPS-Gruppe (c-e). Der Anstieg des IL-10 fiel in dieser Gruppe niedriger und später als in Tieren der LPS-Gruppe, jedoch stärker und früher als in Teiren der CLP-Gruppe aus (f). Der Blutzuckerspiegel sank bereits 2 h nach LPS- oder PCI-Injektion ab und erholte sich nach 12 h allmählich, wohingegen der Blutzucker nach CLP-Induktion zunächst stabil blieben und nach 48 h den tiefsten Wer erreicht hatte (b). Der klinische Schweregrad ähnelte sich in allen drei Gruppen, lediglich in der CLP-Gruppe konnte erneut ein prolongierter Verlauf beobachtet werden (a). Abbildung modifiziert aus [242].

In Konkordanz zu diesen Ergebnissen wurde geschlussfolgert, dass ab diesem Zeitpunkt das weitere Überleben der Versuchstiere nicht mehr durch die Intervention negativ beeinträchtigt wäre. Dagegen besteht auch 72 Stunden nach CLP-Intervention eine erhöhte Mortalität. [242].

6.1.2 Sepsis-Induktion mittels LPS

Die oben beschriebene fehlende Komplexität des LPS-Modelles (*s. 6.1.1 Sepsis-Modelle im Vergleich*) ist gleichzeitig auch eine Stärke dieses Tier-Modelles. Um die im Rahmen einer Sepsis zugrundeliegenden Signalkaskaden und pathophysiologischen Vorgänge besser verstehen zu können, ist es sinnvoll, diese Prozesse zunächst auf eine überschaubarere Anzahl zu reduzieren [243]. Während mithilfe der CLP-Induktion Therapieansätze in einer tatsächlich bestehenden Sepsis überprüft werden können (*s. 6.1.1. Sepsis-Modelle im Vergleich*), so dient das LPS-Modell in erster Linie dem Zwecke, entsprechende Therapieansätze zunächst einmal zu entwickeln und die zugrundeliegenden pathophysiologischen Vorgänge zu begreifen [243]. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Umsetzung bildet hierbei das hohe Maß an Übereinstimmung von hämodynamischen und metabolischen Veränderungen zwischen humanem Organismus und Versuchsspezies nach LPS-Injektion, wie sie beispielsweise in Mäusen oder Ratten bestehen, wengleich diese eine weitaus geringere Sensibilität gegenüber LPS als der Mensch aufweisen [239, 243]. Da eine unterschiedliche LPS-Sensibilität nicht nur zwischen verschiedenen Tierarten, sondern auch zwischen verschiedenen Rassen innerhalb einer Spezies und sogar zwischen verschiedenen Stämmen innerhalb derselben Rasse belegt werden konnte, ist eine exakte Befolgung des Versuchsprotokolls auch im LPS-Modell unabdingbar, um die Ergebnisse beurteilen und vergleichen zu können [244]. Umgekehrt können somit in Abhängigkeit von der gewählten LPS-Dosis und der diesbezüglichen Sensibilität der verwendeten Tierart unterschiedliche Aspekte in der Pathogenese der Sepsis von der Koagulopathie über eine zunehmende Organdysfunktion bis hin zum septischen Schock mit Herz-Kreislaufversagen genauer untersucht werden [238].

Nach LPS-Injektion und dessen Bindung an den TLR4 kommt es zur Expression und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine sowie zur Aktivierung von NFκB (*s. 2.2.2 Pathogenese der Sepsis*) und somit zur Initiierung septischer Prozesse [238]. In Übereinstimmung hierzu ließ sich auch in endotoxischen Ratten ein signifikanter Anstieg von IL-6, TNFα und ICAM-1 erkennen [4]. NFκB gilt als wichtiger Transkriptionsfaktor für die Expression der iNOS, welche wiederum NO produziert [245]. NO - unter physiologische Bedingungen ein wichtiger Mediator für Vasodilatation, Inhibition von Plättchenaggregation sowie Vermittlung antiapoptotischer und antiinflammatorischer Prozesse - liegt unter septischen Bedingungen aufgrund einer exzessiven Produktion durch die iNOS weit im Überschuss vor. Unter Vorhandensein von Superoxid führt dies zur Entstehung von Peroxynitrit [244], wie auch im LPS-Modell ubiquitär und insbesondere im Gastrointestinaltrakt nachweisbar (*s. Abbildung 6.2 A*). Durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine werden verschiedene immunmodulatorische Zellen aktiviert und rekrutiert, wodurch ebenfalls eine vermehrte Bildung von ROS und oxidativem Stress beobachtet werden kann [246], die wiederum das umliegenden Gewebe schädigen [245, 246].

Diskussion

Die oben beschriebenen Mechanismen lassen sich auch im LPS-Modell bestätigen. Steven et al. konnten nach LPS-Injektion in moderater Dosis (10 mg/kg) in Ratten einen Anstieg der iNOS-Expression und -Aktivität (s. *Abbildung 6.2 B*) belegen. Dies ging einher mit einer deutlichen Hypotonie, wie sie auch in septischen Patienten häufig zu finden ist. Auch die Entstehung von oxidativem Stress ließ sich deutlich gegenüber der Kontrollgruppe in den endotoxischen Tieren beobachten [4].

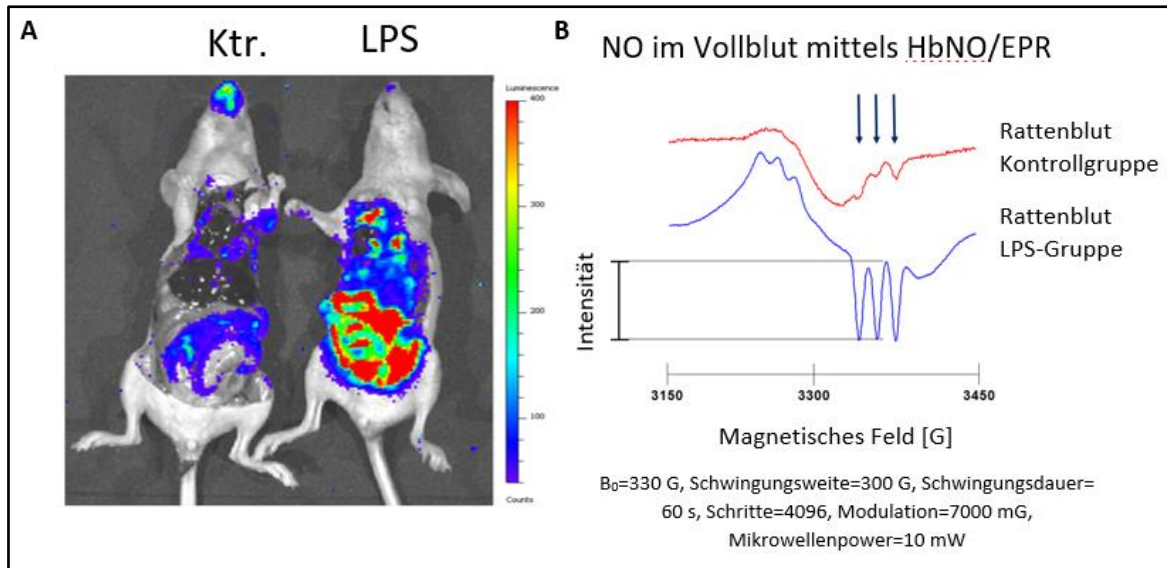


Abbildung 6.2 A, B Oxidativer Stress nach LPS-Injektion. Nach LPS-Injektion kommt es zu einer vermehrten Entsehung von ROS und Peroxynitrit in den inneren Organen und insbesondere im Gastrointestinaltrakt (A). Als eine der ursächlichen Ursachen gilt die vermehrte iNOS-Aktivität (B). Visualisierung der ROS- und Peroxynitrit-Bildung mittels IVIS-Imaging und L-012 als Chemilumineszenzfarbstoff (A). Messung der iNOS-Aktivität mittels Nitrosyl-Hämoglobin mittels EPR (B). (Nitrosyl-Hämoglobin [HbNO], Elektronenspinresonanz [EPR]). Rechte Seite: *Abbildung modifiziert aus unpublished Data [247] (A)*, Linke Seite: *Abbildung modifiziert aus [4] (B)*.

Neben einer prolongierten Hypotension [248] bewirkt auch das Auftreten einer DIC die Minderperfusion von Organen und Gewebe und fördert somit die Entstehung einer Organdysfunktion [5]. Neben dem Verschluss von Kapillaren durch Mikrothromben kommt es aufgrund der überschießenden Aktivierung der Gerinnungskaskade sowie der primären Hämostase zu einem Verbrauch von Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren. Daher besteht gleichzeitig ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von schweren Blutungen [5, 249]. Steven et al. demonstrierten unter diesem Aspekt eine Korrelation zwischen der Anzahl der zirkulierenden Thrombozyten und der Entstehung von Mikrothromben im Lungengewebe anhand des LPS-Modelles. Hierbei konnten bereits drei Stunden nach LPS-Injektion in Mäusen eine Reduktion der Thrombozytenkonzentration mit korrelierender Thrombusbildung beobachtet werden. Sowohl Thrombozytenabfall als auch Thrombusbildung erreichten nach neun Stunden ein Maximum, anschließend kam es zu einer leichten Erhöhung der Thrombozyten bei gleichzeitig stagnierendem Thrombusnachweis (s. *Abbildung 6.3*) [5].

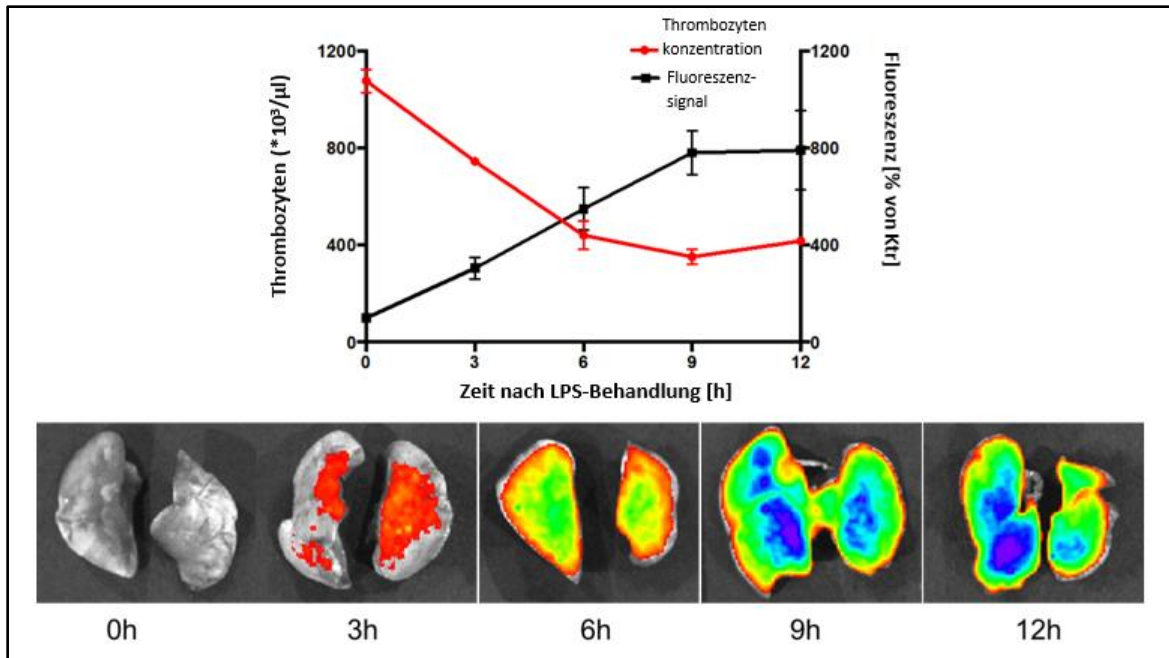


Abbildung 6.3 Zeitlicher Verlauf von Thrombozytenkonzentration und Mikrothrombenbildung nach LPS-Injektion. Entsprechend den pathophysiologischen Vorgängen einer DIC konnte nach LPS-Injektion in Mäusen ein Rückgang der Thrombozyten festgestellt werden mit entgegengerichteter Zunahme an detektierbaren Mikrothromben in der Lunge. Die Thrombozytenkonzentration wurde jeweils im entnommenen Vollblut gemessen, die Visualisierung der Mikrothromben erfolgte über IVIS Fluoreszenz Imaging von fluoreszierenden Microbeads, welche in den thrombotisch verschlossenen Mikrogefäßen stecken blieben. Abbildung modifiziert aus [5].

6.1.3 Sepsis-Induktion mittels CLP

Abhängig von der Länge des ligierten Caecums und der verwendeten Punktionskanüle kann im CLP-Modell eine unterschiedlich starke Induktion der Sepsis erfolgen (s. 6.1.1 Sepsis-Modelle im Vergleich), was sich in der Länge der durchschnittlichen Überlebenszeiten widerspiegelt. Die Überlebensdauer kann auch zwischen verschiedenen Mausstämmen variieren, die für ein Modell zum Einsatz kommen [250, 251]. Aus ethischen Gründen wurde auf die Durchführung solcher Überlebensstudien verzichtet und stattdessen die Expression proinflammatorischer Zytokine als prognostischen Marker für das potentielle Überleben bzw. für das Ausmaß der induzierten Sepsis ermittelt.

Die durchgeführten Untersuchungen belegten hierbei einen starken Anstieg der Expression von IL-6 und TNF α in der CLP-Gruppe. Diese tragen zum sogenannten „Zytokin-Sturm“ bei, mit nachfolgender Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, kennzeichnend für die hyperinflammatorische Phase einer Sepsis [237]. Insbesondere IL-6 zeigt sich auch in septischen Patienten regelmäßig erhöht und ist im CLP-Modell mit einer erhöhten Mortalität assoziiert [237, 241]. Auch konnte eine positive Korrelation zwischen IL-6-Expression und mikrozirkulatorischen Parametern belegt werden. Durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine kommt es bereits in den frühen Phasen einer Sepsis zur Beeinflussung der Mikrozirkulation. Diese wiederum ist als prognostischer Marker für die im weiteren

Verlauf auftretende Beeinträchtigung der Makrozirkulation und somit letztlich das Ausmaß der Endorganschädigung zu werten [252] (s. 6.1.2 *Sepsis-Induktion mittels LPS*). Die hyperinflammatorische Phase ist durch eine Hyperinsulinämie, Hypermetabolismus und hohe Laktatwerte gekennzeichnet. Nach ca. 16 Stunden erfolgt der Übergang in die hypoinflammatorische Phase mit Hypoglykämie, Hypoinsulinämie und erneut sehr hohen Laktatwerten [241, 253]. Einhergehend mit einer Abnahme der proinflammatorischen Zytokine während der immunsuppressiven Phase kommt es zudem zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber Pathogenen sowie einer vermehrten bakteriellen Belastung. Diese Faktoren tragen unter anderem zu einer vermehrten Anfälligkeit gegenüber nosokomialen Infektionen bei und führen zu einer erhöhten Mortalität im weiteren Verlauf [254].

6.1.4 iNOS-Aktivierung mittels CLP

Die Expression proinflammatorischer Zytokine geht einher mit einer Induktion der iNOS [255-257]. Daher ist auch eine erhöhte iNOS-Aktivität mit einer schwereren Verlaufsform einer Sepsis assoziiert [257]. Einmal induziert bleibt die Synthase über mehrere Tage lang aktiv und es kommt zur vermehrten NO-Produktion. Dieses, unter anderem von Endothelzellen, Neutrophile und Makrophagen freigesetzte Radikal leistet einen wertvollen Beitrag in der Abwehr pathogener Erreger [256]. Umgekehrt trägt NO entscheidend zur Inhibition der Migration von Leukozyten bei. Anhand von iNOS^{-/-} Tieren demonstrierten Benjamim et al. die zweiseitige Funktion des NOs im Falle einer Infektion. Neben der oben genannten Abwehrfunktion beeinflusst das Vorhandensein von NO die Migration der Leukozyten. Neutrophile gelangen somit in einem reduzierten Ausmaß zum Herd der Inflammation. Dadurch ist eine wirkungsvolle Eindämmung des Sepsisfokus nur erschwert möglich [258]. Darüber hinaus kehren sich die positiven Effekte des vielfältigen Neurotransmitters im Falle einer entkoppelten iNOS sogar ins Gegenteil um. So wird eine Überproduktion von NO mit der in einer Sepsis vorherrschenden, häufig katecholaminrefraktären, Hypotension in Verbindung gebracht, die mit zur späteren Organdysfunktion beiträgt [255, 258]. Eine erhöhte iNOS-Aktivität geht daher auch mit erhöhter Mortalität und Morbidität einher. Das geringe Ansprechen auf Katecholamine wie Norepinephrin wird in diesem Zusammenhang zumindest teilweise auf die erhöhte iNOS-Aktivität zurückgeführt [255, 257]. Damit trägt die exzessive pathologische Bildung von NO mit zur Entstehung eines Herz-Kreislaufversagens und eines septischen Schockgeschehens bei [257]. Die Bestimmung der IL-6- und iNOS-Expression eignet sich deshalb einerseits zur Bestätigung einer erfolgreich induzierten Sepsis bzw. zur Ermittlung deren Schweregrades, andererseits lassen sich Therapieerfolge auf einfache Art und Weise an einem Rückgang dieser beiden Inflammationsmarker bestätigen [259].

Die Zusammenhänge zwischen iNOS-Aktivität und Sepsis lassen sich hervorragend an Knockout-Modellen demonstrieren. Obwohl einige Parameter positiv durch die Abwesenheit von iNOS beeinflusst werden können, ergeben sich dennoch nur geringfügige bis keine Auswirkungen auf die

Mortalität. Die oben beschriebene verminderte Migration von Leukozyten unter CLP in Wildtyp-Mäusen zeigt sich in iNOS^{-/-} Tieren erhöht [258]. Auch die typischerweise auftretende Immunsuppression über eine vermehrte Expression antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 stellt sich bei fehlender iNOS-Expression als vermindert dar [260]. Eine direkte therapeutische Option lässt sich aus diesen Erkenntnissen aber nicht gewinnen. Ein Zusammenhang zwischen fehlender iNOS-Expression und einer Verbesserung der Überlebensrate wurde zwar angenommen und untersucht, ließ sich aber in aktuelleren Arbeiten nicht mehr bestätigen [258, 260]. Daraus geht hervor, dass auch in Bezug auf die iNOS-Aktivierung ein ausgewogenes Verhältnis vonnöten ist, um einerseits Inflammation und damit eine Abwehr von Pathogenen zu ermöglichen, andererseits den Schaden für den eigenen Organismus zu minimieren [261].

6.1.5 CLP und oxidativer Stress

Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies ist Teil der physiologisch ablaufenden Redoxreaktionen eines jeden Organismus. Diese Vorgänge sind wesentliche Voraussetzung für beispielsweise Zell-Zell-Kommunikation, Regulation des Vasotonus und der bakteriellen Abwehr [262]. Den NO-Synthasen kommt auch hier eine bedeutende Rolle zu. Während eNOS und nNOS in Abhängigkeit von vorangeschalteten Mediatoren die Differenzierung und Funktion der immunologischen Zellen und somit die Immunantwort beeinflussen, so ist die iNOS maßgeblich an der Entstehung des Oxidative Burst beteiligt [263]. Sie wird daher von einem Großteil der Zellen des angeborenen Immunsystems, wie etwa Neutrophile und Makrophagen, exprimiert [262]. Dem gegenüber stehen antioxidative Mechanismen, z.B. Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase und Catalase. Oxidativer Stress entsteht somit, wenn das homöostatische Verhältnis zwischen Oxidantien und Antioxidantien gestört ist, wenn die antioxidativen Kapazitäten nicht ausreichend sind, um die Entstehung von oxidativen Spezies und Schäden zu kompensieren [264].

Wie auch in den Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe demonstriert, kommt es bei einer CLP-induzierter Sepsis neben einer exzessiven NO-Produktion zur vermehrten Entstehung von Superoxid durch die NADPH-Oxidase. Diese Erkenntnisse stehen somit im Einklang mit vorausgegangenen Ergebnissen der Arbeitsgruppe Zhou et al. [265]. Zusätzlich wird eine verstärkte Superoxidproduktion beobachtet, welche unabhängig von NAD(P)H entsteht [266]. In Anwesenheit von Superoxid führt das erhöhte Vorkommen von NO bei entkoppelter iNOS zur vermehrten Produktion von Peroxynitrit [267]. Dieser Vorgang ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da NO selbst zwar bereits in hohen Konzentrationen zytotoxisch wirkt, allerdings zu den schwächeren Vertretern der freien Radikale gezählt wird [268]. Während es in niedrigeren Mengen zytoprotektiv wirkt, so kehrt sich die Funktion des NO im inflammatorischen Zustand ins Gegenteil um und es kommt zur vermehrten Oxidation durch Peroxynitrit Bildung nach Reaktion mit O₂• und Nitrosierung von Thiolgruppen und Aminogruppen

Diskussion

[269]. ONOO^- bedingt wiederum eine Vielzahl an zellulären Schäden durch Lipidperoxidation, Proteinmodifikationen und Inhibition der mitochondrialen Atmungskette [268] bis hin zu Interaktionen auf DNA-Ebene, z.B. Oxidation von Guaningruppen mit nachfolgenden Strangbrüchen. Über die Interaktion mit Tyrosinresten und der darauf aufbauenden Entstehung von Nitrotyrosin lässt sich das ONOO^- -Level quantifizieren [267, 268]. Bestehen darüber hinaus Interaktionen mit Okkludinen, so wird die endotheliale Barrierefunktion durch oxidativen Stress negativ beeinträchtigt. Es kommt zur Auflösung der Tight Junctions, sodass Flüssigkeit und Proteine in das interstitielle Gewebe entweichen. Dadurch wird eine Ödembildung begünstigt. Diese wiederum resultiert in einer Gewebshypoxie und Hypotension und unterstützt damit die Entstehung einer Organdysfunktion [265].

Ein weiterer Faktor in der Entstehung einer Sepsis-assoziierten Hypotension scheint in der verminderten Sensitivität des Baroreflexes zu bestehen, wie von Amorim et al. beschrieben [270]. Die Auflösung von Tight Junctions durch erhöhtes ROS-Vorkommen kann dabei nicht nur im kardiovaskulären System, sondern auch in pulmonalen Endothelzellen beobachtet werden [271].

Mit der Bildung von oxidativem Stress als einen der wesentlichen Schritte der Sepsisentstehung lassen sich ähnliche Pathomechanismen wie für eine Vielzahl an chronischen Erkrankungen belegen. García-Sánchez et al. beschreiben eine Zunahme der ROS-Produktion im Zusammenhang mit Hypertension, Atherosklerose, und Diabetes mellitus. Auch in autoimmunassoziierten Erkrankungen konnte eine solche Entstehung beobachtet werden [264].

Ein Zusammenhang zwischen der Expression proinflammatorischer Zytokine und oxidativem Stress wird aus den oben genannten Erkenntnissen als wahrscheinlich betrachtet. Pathak et al. bestätigen diese Schlussfolgerung. So kann durch Seruminjektion aus CLP-induzierten, septischen Versuchstieren in gesunden Mäusen nicht nur ein erhöhtes Vorkommen von NO, sondern auch von ROS beobachtet werden [272]. Des Weiteren konnte belegt werden, dass eine positive Korrelation zwischen der Ausschüttung von IL-6, IL-1 β und TNF α und der Entstehung einer myokardialen Funktionsstörung in polymikrobiell induzierter Sepsis besteht. Da insbesondere in den Kardiomyozyten ein erhöhtes Vorkommen an ROS nachgewiesen werden konnte, scheint auch hier ein Zusammenhang zwischen proinflammatorischen Zytokinen, der Entstehung von oxidativem Stress und nachfolgender Organdysfunktion sehr wahrscheinlich [273]. Die Expression proinflammatorischer Zytokine führt einerseits zu einer iNOS-Aktivierung, andererseits wird durch ein erhöhtes Vorkommen von NO die NF κ B Signalkaskade aktiviert. Diese induziert wiederum die Expression von IL-1 β , TNF α und weiteren Zytokinen. Es besteht somit also ein positiver Feedbackmechanismus zwischen Zytokinexpression und iNOS-Aktivität bzw. oxidativem Stress [274].

6.1.6 Endotheliale Dysfunktion im CLP-Modell

Das Zusammenspiel aus vermehrtem oxidativem Stress, der Aktivierung von Downstream-Signalkaskaden mit nachfolgender Zellschädigung, dem verminderten Vorkommen von antioxidativen Mechanismen und schließlich der Inflammationsreaktion selbst führt zu der Entstehung von endothelialer Dysfunktion. Coletta et al. bezeichnen diese vier Mechanismen auch als „Baseline Level of Endothelial Dysfunction“, die insbesondere im alternden Organismus besteht bzw. zunimmt. Durch CLP getriggert, werden diese Mechanismen verstärkt. Es besteht eine positive Korrelation zwischen verminderter bzw. fehlender eNOS-Aktivität, dadurch entstehender endothelialer Dysfunktion - gemessen anhand einer verringerten Vasorelaxation - und daraus hervorgehender mitochondrialen Dysfunktion und dem Ausmaß der einsetzenden Organdysfunktion [275]. Im septischen Patienten wie auch im CLP-Modell kann dabei eine Aktivierung des Endothels beobachtet werden (*s. Abbildung 2.13*). Dadurch werden vermehrt proinflammatorische Zytokine, wie auch Adhäsionsmoleküle exprimiert. Dies führt zur Einwanderung von Leukozyten und – bei fehlender Gegenregulation – im weiteren Verlauf zur Entstehung einer Organdysfunktion. Insbesondere die Entstehung einer septischen Kardiomyopathie steht hierbei im Vordergrund, da sie den weiteren Verlauf maßgeblich mit beeinflusst [276].

Die Auswirkungen auf die Integrität und Funktion des Endothels sind unter anderem auch deshalb von großer Bedeutung, da die Endothel-abhängige Vasodilatation einen wesentlichen Faktor in der Pathogenese der Sepsis darstellt. Darüber hinaus besteht ein enger Zusammenhang zwischen endothelialer Dysfunktion und Mortalität [261].

6.2 GLP-1-Analoga-vermittelte Effekte

GLP-1 ist ein körpereigenes Hormon, welches von enteroendokrinen L-Zellen im distalen Dünndarm, aber auch von α -Zellen im Pankreas und im ZNS sezerniert werden kann und durch Bindung an den GLP-1-Rezeptor über eine glucoseabhängige Insulinsekretion an der Regulation des Blutzuckerspiegels beteiligt ist [173]. Seit 2005 werden GLP-1-Analoga erfolgreich in der Therapie des Diabetes mellitus eingesetzt. Von Bedeutung sind dabei nicht nur das geringe Risiko einer Hypoglykämie, sondern auch die pleiotropen Zusatzeffekte, welche in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen haben. In den vergangenen Jahren wurde eine zunehmende Anzahl an Studien veröffentlicht, die sich mit dem kardiovaskulären Outcome der einzelnen GLP-1-Analoga über einen Beobachtungszeitraum von mindestens einem Jahr beschäftigen, darunter LEADER für Liraglutid, SUSTAIN-6 für Semaglutid und ELIXA (Evaluation of Lixisenatide in Acute Coronary Syndrome) für Lixisenatid, um nur beispielhaft einige zu nennen. Aus dem initialen Erfordernis, die kardiovaskuläre Sicherheit im Rahmen der Zulassung neuer Diabetesmedikamente zu demonstrieren, konnten bald zusätzliche Erkenntnisse

gewonnen werden. Die untersuchten GLP-1-Analoga konnten dabei nicht nur für kardiovaskulär unbedenklich erklärt werden, vielmehr zeigten sich weitere positive Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem, die über den glucosesenkenden Effekt hinausgingen. Diese zeigten sich in der LEADER-Studie in erster Linie in einer Reduktion von Fällen mit akutem Myokardinfarkt sowie von kardiovaskulären Todesereignissen [2, 277]. Obwohl in der Studie keine signifikante Reduktion für das Ereignis eines akuten Schlaganfalls festgestellt werden konnte [2], so ließ sich insgesamt dennoch ein verringertes Auftreten von MACE-Ereignissen (nichttödlicher Myokardinfarkt bzw. Apoplex sowie kardial bedingtes Todesereignis) unter Therapie mit Liraglutid beobachten. Darüber hinaus wiesen die mit Liraglutid behandelten Patienten eine geringere Gesamtmortalität auf [2, 277]. In einer Metaanalyse konnte zudem für die gesamte Gruppe der GLP-1-Analoga eine Reduktion an kardiovaskulären Ereignissen gezeigt werden, die sich nicht nur in einer Reduktion der oben beschriebenen MACE-Ereignisse und der Gesamtmortalität widerspiegelte, sondern auch mit einer verminderten Herzinsuffizienz-bedingten Hospitalisierungsrate [277].

6.2.1 Antiinflammatorische Effekte von GLP-1-Analoga

Neben den akut auftretenden Infektionserkrankungen [278] sind auch eine Vielzahl an kardiovaskulären Pathologien (Herzinsuffizienz [279, 280], Atherosklerose [281], arterielle Hypertonie [281, 282]) und chronischen Erkrankungen (Diabetes mellitus [283]), aber auch ein hohes Alter durch ein vermehrtes Auftreten von proinflammatorischen Zytokinen gekennzeichnet [284]. Oft scheint es dabei so, dass das Inflammationsgeschehen gleichermaßen Folge, wie auch Ursache der zugrundeliegenden Erkrankung darstellt [280, 282, 283]. Durch die entstehenden DAMPS und PAMPS als Folge von Gewebsschädigung und Zelluntergang [280], aber auch durch das Vorhandensein zugrundeliegender kardiovaskulärer Risikofaktoren einschließlich des Inflammationsgeschehens selbst, entsteht über die Aktivierung von TLRs und Induktion des Transkriptionsfaktors NF κ B ein positiver Feedback-Mechanismus mit chronischem Inflammationsgeschehen [283]. Dass umgekehrt eine erfolgreiche Behandlung der zugrundeliegenden chronischen Erkrankung auch eine Reduktion dieser inflammatorischen Prozesse mit sich bringt, konnte für eine Vielzahl der derzeit gängigen Pharmaka wie Statine, Angiotensin Converting Enzyme (ACE) -Hemmer und Angiotensin I (AT I) -Rezeptor-Blocker in der Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen belegt werden [285].

Im Zusammenhang mit den ersten Hinweisen auf eine positive Herz-Kreislauf-Funktion, konnten in den Probanden der Phase 3-Studie auch antiinflammatorische Eigenschaften der GLP-1-Analoga beobachtet werden [2, 173, 277], messbar an einer Reduktion proinflammatorischer Zytokine und des oxidativen Stresses. Auch Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, kennzeichnend für inflammatorische Prozesse, zeigten sich unter Therapie mit GLP-1-Analoga vermindert [202]. In einem experimentellen Tiermodell mit ATII-induzierter Hypertonie in Mäusen konnten Steven et al. sowohl die Entstehung

Diskussion

einer hypertoniebedingten vaskulären Inflammation als auch deren Reduktion unter Therapie mit Liraglutid analog zu einer Normalisierung des Vasotonus nachweisen. Zudem zeigte sich als Zeichen eines verminderten Leukozytenrollings und einer verminderten Infiltration der Immunzellen in die Gefäßwände die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und P-Selektin reduziert [217].

Ausgehend von den bislang entdeckten antiinflammatorischen Eigenschaften untersuchte unsere Arbeitsgruppe den Einfluss des GLP-1-Rezeptors in einem Endotoxik Shock-Modell [4, 5]. Nach erfolgter LPS-Injektion konnte in den mit dem GLP-1-Analogen Liraglutid bzw. den DPP-4-Inhibitoren Linagliptin und Sitagliptin behandelten Mäusen zunächst eine Normalisierung der LPS-induzierten Hypotonie, korrelierend und rückföhrbar auf eine verminderte iNOS-Expression und -Aktivität (*Abbildung 6.4 Linke Seite*), und eine Reduktion der endothelialen Dysfunktion, des oxidativen Stresses und des Inflammationsgeschehens beobachtet werden. Darüber hinaus spiegelten sich diese Beobachtungen in einer verminderten Mortalität nach LPS-Injektion wider, welche ebenfalls mit der verminderten iNOS-Aktivität korreliert (*Abbildung 6.4 Rechte Seite*). Diese Effekte zeigten sich insbesondere für Liraglutid und Linagliptin und waren für Sitagliptin weniger stark ausgeprägt [4]. Die Arbeitsgruppen um Solmaz et al. [286] und Rakipovski [287] et al. berichten zudem über eine verminderte proinflammatorische Zytokinexpression für weitere GLP-1-Rezeptor-Agonisten wie Exenatid [286] bzw. Semaglutid [287]. Dabei konnten die antiinflammatorischen Effekte von GLP-1-Analoga nicht nur nach direkter LPS-Injektion, sondern auch in Ratten mit einer intrauterinen LPS-Exposition beobachtet werden. Auch hier konnte unter Therapie mit einem GLP-1-Analogen eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden [286].

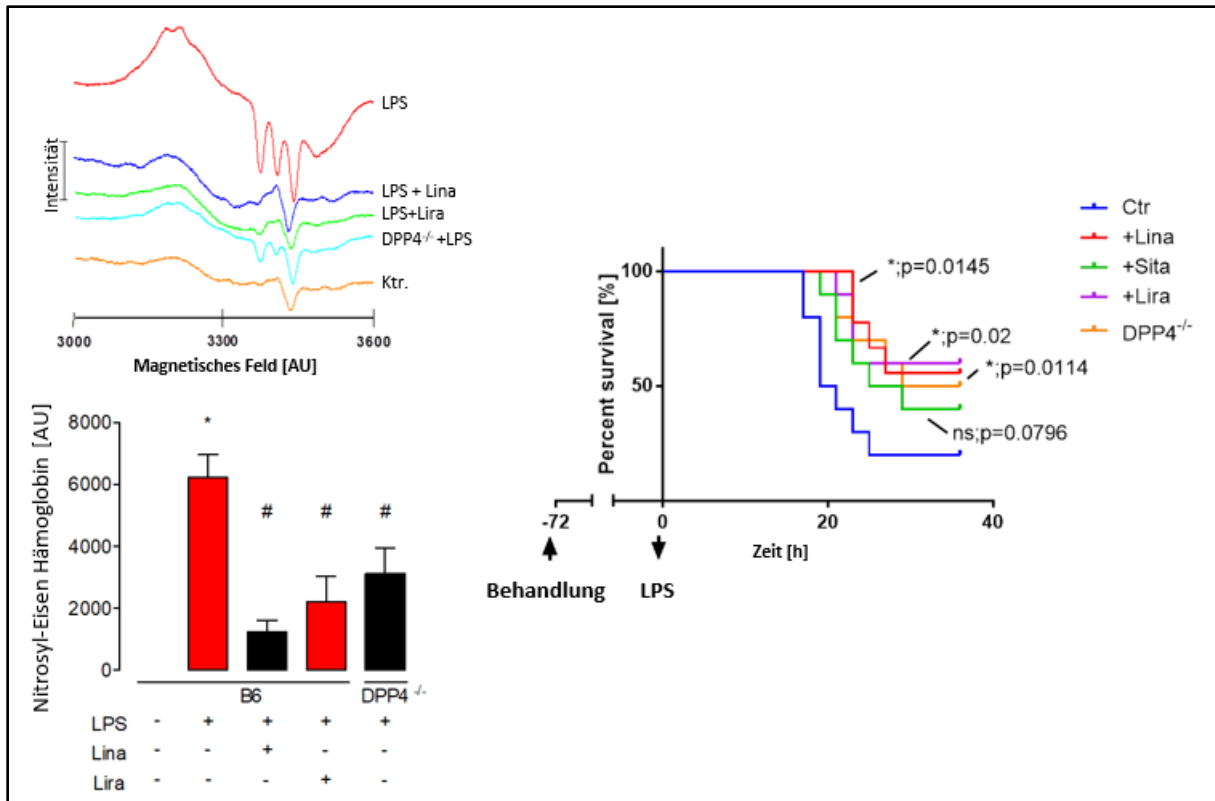


Abbildung 6.4 Bildung von NO, iNOS-Aktivität und Mortalität nach LPS-Injektion und GLP1r-abhängige Beeinflussung. Nach LPS-Injektion konnte ein deutlicher Anstieg des HbNOs und der iNOS-Aktivität (gemessen mittels EPR) registriert werden, welche beide unter Therapie mit Liraglutid und Linagliptin signifikant reduziert wurden. DPP-4^{-/-} Knockoutmäuse zeigten eine ähnliche Entwicklung. Auch die postinterventionelle Mortalität zeigte sich in den DPP-4^{-/-} Tieren sowie den mit Liraglutid bzw. Linagliptin behandelten Mäusen signifikant gegenüber Tieren der LPS-Gruppe reduziert. Linke obere und untere Abbildung entnommen aus [5], Rechte Abbildung modifiziert aus [4].

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Versuchsreihe konnte zum ersten Mal die antiinflammatorische Wirkung eines GLP-1-Analogons in einem CLP-Tiermodell – und somit in einem deutlich praxisnäheren Sepsismodell – bestätigen. In den mit Liraglutid behandelten Tieren konnte eine signifikante Reduktion der proinflammatorischen Zytokine wie IL-6, TNF α sowie ICAM-1 im Aortengewebe nachgewiesen werden, kennzeichnend für eine deutliche Reduktion der vaskulären Inflammation.

6.2.2 Oxidativer Stress, endotheliale Dysfunktion und deren Beeinflussung durch GLP-1-Analoga

Einige Zytokine wie TNF α und IFN- γ führen zu einem vermehrten Auftreten von oxidativem Stress, insbesondere im endothelialen Gewebe. Dabei handelt es sich auch hier wieder um einen sich selbst verstärkenden Mechanismus mit oxidativem Stress sowohl als Ursache, als auch als Konsequenz eines erhöhten Inflammationsgeschehens [281], denn auch ein erhöhtes Vorkommen von oxidativem Stress und Aktivierung der NADPH-Oxidase bewirkt umgekehrt eine vermehrte Sekretion proinflammatorischer Zytokine [288]. Es ist folglich nicht weiter überraschend, dass auch ein erhöhtes

Diskussion

Level an oxidativem Stress in den meisten kardiovaskulären und chronischen Erkrankungen zu finden ist [281-284]. Oxidativer Stress entsteht dabei, wenn die Produktion von ROS deren Elimination übersteigt und somit oxidativer Schaden/Stress akkumuliert [282]. ROS können daher insbesondere dann akkumulieren, wenn entweder die Entstehung auf ein pathologisches Ausmaß ansteigt oder wenn die antioxidativen Mechanismen reduziert sind. Die wichtigsten Entstehungsorte von ROS sind dabei die mitochondriale Atmungskette, die Xanthinoxidase und entkoppelte NO-Synthasen sowie die NADPH-Oxidasen. Die Unterformen der NOX entscheiden dabei über die spezifische Art der ROS-Entstehung. Während NOX1 und NOX2 insbesondere Superoxide produzieren, wird über NOX4 und NOX5 vor allem Wasserstoffperoxid generiert [289]. Aufgrund von Interaktionen auf DNA-Ebene mit ROS, sowie der oxidativen Modifikation von Proteinen, kommt es zu weiteren Inflamationsreaktionen und Zellschäden unter anderem im Gefäßsystem [290], sowie zur Entkopplung der eNOS [281, 285], letztere insbesondere durch die Oxidation des Cofaktors BH₄ durch NOX-induziertes Superoxid mit nachfolgender Peroxynitrit Bildung; ein Vorgang, der wiederum durch Zytokine reguliert wird [281, 289]. Auch diese Prozesse greifen wieder ineinander, da durch die Entkopplung der eNOS die ROS-Entstehung verstärkt wird, wodurch weiteres BH₄ zu BH₂ oxidiert und somit die Bioverfügbarkeit des BH₄ weiter vermindert wird [289].

Ein erhöhtes Vorkommen von oxidativem Stress mit entkoppelter eNOS steht dabei ebenso wie chronisches und akutes Inflamationsgeschehen in negativer Korrelation zur endothelialen Funktion [144, 291, 292] und bildet so den Schlüsselmechanismus in der Entstehung von endothelialer Dysfunktion [281]. Die endotheliale Dysfunktion ist dabei durch einen vasokonstriktiven, pro-inflammatorischen, pro-atherosklerotischen, pro-koagulatorischen und pro-thrombotischen Phänotyp gekennzeichnet, der sich aufgrund einer veränderten Ausschüttung endothelabhängiger Transmitter bzw. Messenger ergibt [144]. Durch das vermehrte Vorkommen von ROS wird endotheliales NO nicht nur inaktiviert und verliert somit seine vasodilatatorische Komponente [291], vielmehr wandelt sich die ehemals protektive Synthese im entkoppelten Zustand in ein Superoxid-produzierendes Enzym um und begünstigt so vor allem die Peroxynitritsynthese (z.B. durch eine semi-entkoppelte NOS). All diese Komponenten bewirken eine Aktivierung des Endothels, wodurch weitere Adhäsionsvorgänge für Plättchen und die Aktivierung immunkompetenter Zellen initiiert werden. Durch deren Einwanderung wird das Inflamationsgeschehen zusätzlich verstärkt, es kommt zur weiteren Entstehung von oxidativem Stress und in der Folge zu einer Verstärkung der endothelialen Dysfunktion [293].

Cai et al. beobachteten in vitro die Effekte von GLP-1 auf HUVECS (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), welche mit H₂O₂ vorbehandelt waren. Durch die Zugabe von H₂O₂ konnte zunächst ein ROS-Anstieg mit nachfolgender Zellschädigung, Apoptose und Autophagie registriert werden. Sowohl ROS als auch dessen Auswirkungen auf das umliegende Gewebe konnten durch die Zugabe von GLP-1

Diskussion

signifikant gesenkt werden. Ebenso konnte die durch oxidativen Stress induzierte eNOS Dysfunktion deutlich verbessert werden [294]. Die beobachteten antioxidativen und endothelprotektiven Effekte ließen sich auch unter Therapie mit dem GLP-1-Analogon Exendin-4 in HUVECS replizieren [291]. In vorausgegangenen Untersuchungen an AT II-induzierten hypertensiven Mäusen konnte zunächst ein Anstieg des oxidativen Stresses unter AT II-Gabe festgestellt werden. Dieser manifestierte sich als kardialer (erhöhtes Vorkommen an ROS und erhöhte Aktivität der NADPH-Oxidase im kardialen Gewebe), als vaskulärer (erhöhte Expression von iNOS und NOX2 sowie vermehrte ROS Bildung im Aortengewebe, *Abbildung 6.4 E, G, H*) sowie als systemischer oxidativer Stress (erhöhtes Auftreten von NO_3^- im Plasma bzw. erhöhter Oxidative Burst im Vollblut, *Abbildung 6.4 C, D, F*). Unter der Therapie mit Liraglutid wurden diese Werte signifikant gesenkt. Auch die Beeinflussung der endothelialen Funktion und des Blutdrucks machte sich unter Therapie mit Liraglutid bemerkbar. So konnte nicht nur die ACh-abhängige Vasodilatation im Aortengewebe wiederhergestellt (*Abbildung 6.4 A*), sondern auch eine Rekopplung der eNOS registriert werden (*Abbildung 6.4 B*), die letztendlich mit einer Normalisierung des systolischen Blutdrucks und des Verhältnisses Herz/Körpergewichts einhergingen. Eine wichtige Erkenntnis bestand zudem in der Tatsache, dass all diese Veränderungen ohne eine wesentliche Beeinflussung des Blutzuckers vorstättengingen [217].

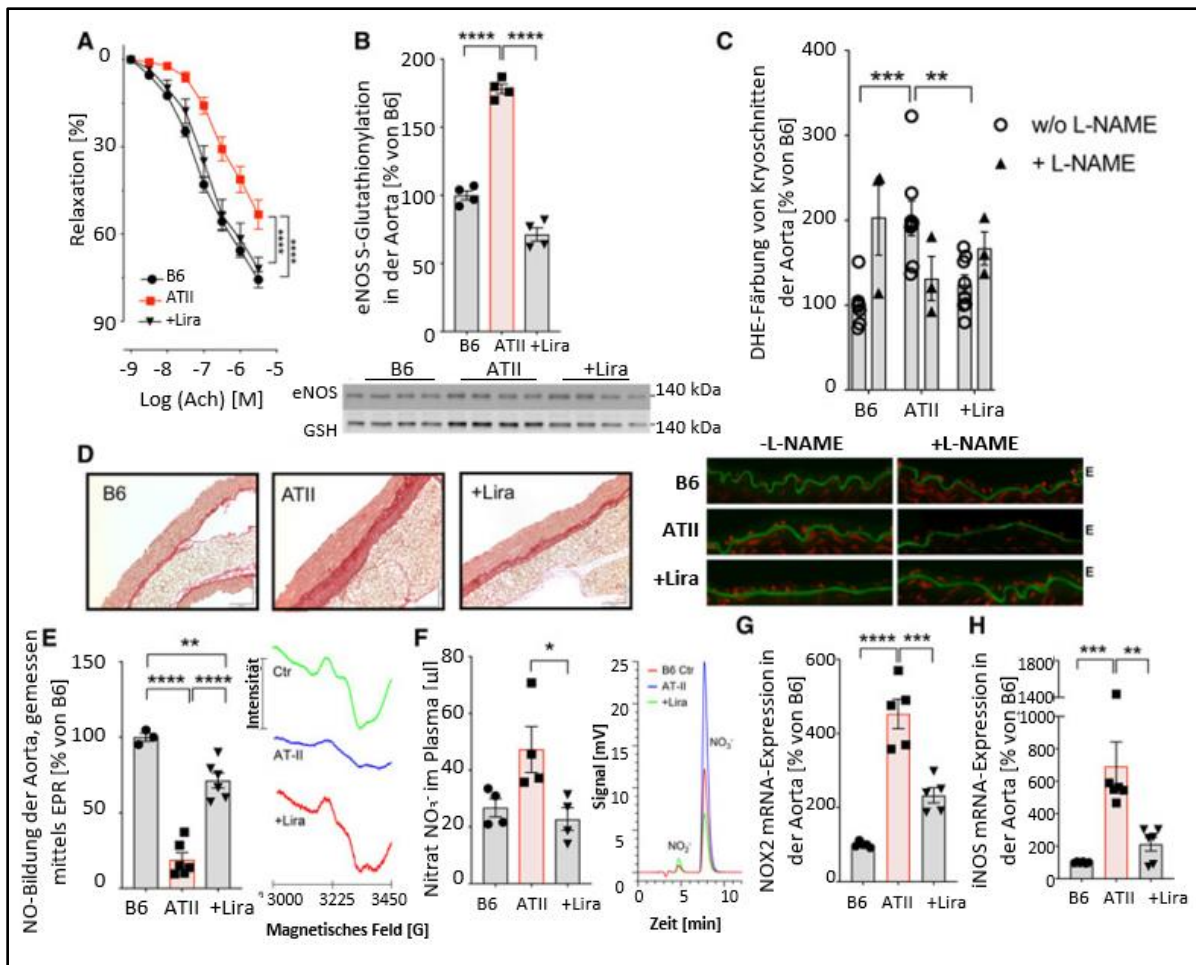


Abbildung 6.5 Experimentelle arterielle Hypertonie und deren Beeinflussung durch Liraglutid. Unter Therapie mit Liraglutid zeigten sich die Expression von NOX2 und iNOS (NOS2) vermindert (G, H). In Korrelation dazu ließen sich auch im Plasma sowie in der Aorta eine Reduktion von RONS nachweisen (C, D, E, F). Dies bewirkte in den mit Liraglutid behandelten Tieren eine Wiederherstellung der endothelialen Funktion (A, B). Abbildung modifiziert aus [217].

Auch im vorausgegangenen LPS-Modell konnten die antioxidativen Eigenschaften einer GLP-1-Analoga- bzw. DPP-4-Inhibitor-basierten Therapie aufgezeichnet werden. Es zeigte sich insbesondere für Liraglutid und Linagliptin eine Reduktion des Oxidative Bursts als Zeichen einer verminderten ROS-Entstehung im Vollblut gegenüber Mäusen der LPS-Gruppe. Auch die iNOS-Expression zeigte sich unter der Therapie signifikant vermindert. Die positiven Auswirkungen auf die ACh-abhängige Vasodilatation bestätigten diese Beobachtungen und zeugen von einer Wiederherstellung der endothelialen Funktion als protektiven Herz-Kreislauf-Parameter. All dies geschah, ohne dass sich eine wesentliche Beeinflussung des Blutzuckerspiegels zeigte, sodass die protektiven Effekte als eigenständiger Mechanismus gegenüber den antihyperglykämischen Wirkungen anzusehen sind [4]. Dass die Ergebnisse auch auf ein praxisnahes Sepsismodell übertragbar sind, veranschaulicht diese Arbeit. In den mit Liraglutid behandelten Mäusen konnte eine deutliche Reduktion von vaskulärem und kardialen oxidativen Stress sowie von oxidativem Stress im Vollblut aufgezeigt werden bei gleichzeitig vermindelter Expression von NOX2. Wie zu erwarten, bewirkte dies auch eine Wiederherstellung der

Diskussion

endothelialen Funktion im Sinne einer Verbesserung der endothelabhängigen (durch CLP negativ beeinflussten) Vasodilatation in den mit Liraglutid behandelten Tieren, wohingegen die endothelunabhängige Vasodilatation in beiden septischen Versuchsgruppen gegenüber den gesunden Kontrolltieren herabgesetzt war.

6.2.3 Mechanismen

6.2.3.1 Die Rolle des GLP-1-Rezeptors

Die Verifizierung der von der Arbeitsgruppe aufgestellten These, dass die oben beschriebenen antiinflammatorischen, antioxidativen und endothelprotektiven Effekte unter Therapie mit dem GLP-1-Analogon Liraglutid auch tatsächlich durch eine Aktivierung des GLP1r vorstättgehen, war bereits Inhalt vorausgegangener Publikationen dieser Arbeitsgruppe. Schon eine Erhöhung des körpereigenen GLP-1 durch Ausschaltung der DPP-4 (durch Verwendung von DPP-4^{-/-}Mäusen) hatte eine verlängerte Überlebenszeit nach moderater LPS-Injektion (17,5 mg/kg) bewirkt, vergleichbar mit der Überlebensrate der mit Liraglutid, Linagliptin und – in Teilen – Sitagliptin behandelten Tiere [4] (*Abbildung 6.4*). Ausgehend von genmodifizierten GLP1r-Knock-out-Mäusen hatten Steven et al. im weiteren Verlauf die Auswirkungen des GLP-1-Analogons Liraglutid bzw. dem DPP-4-Inhibitor Linagliptin nach LPS-Injektion untersucht. Über eine GLP1r-vermittelte Signalkaskade konnte eine verminderte iNOS-Expression und davon abhängige NO-Ausschüttung in Monozytenkulturen registriert werden, die in GLP1r^{-/-}-Versuchstieren bei ansonsten gleicher Behandlung fehlten. Während unter Linagliptin noch eine verminderte, aber nach wie vor signifikante Verbesserung der Mortalität bestand, fehlten die lebensverlängernden Auswirkungen unter Liraglutid in GLP1r^{-/-}-Versuchstieren. Dies lässt nicht nur auf eine protektive Funktion der GLP1r-abhängigen Signalkaskaden schließen, sondern auch auf eine weitere, vom GLP1r-unabhängige Funktionsweise der DPP-4, die sich positiv auf das Überleben der Septic Shock Mäuse auswirkte [5]. Cai et al. demonstrierten die Verbesserung des oxidativen Stresses mit verminderter Autophagie und Apoptose in HUVECS unter dem Einfluss von GLP-1, die protektiven Effekte blieben jedoch bei gleichzeitiger Behandlung mit dem GLP1r-Antagonisten Exendin-(9-39) aus, was erneut auf die bedeutende Rolle des GLP1r schließen lässt [294]. Auch im menschlichen Organismus lässt sich dem GLP1r eine Schlüsselrolle zuordnen. In PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) von COPD-Patienten fiel ohne vorausgegangene Therapie eine verminderte Expression des GLP1r auf, die sich unter Therapie mit Liraglutid signifikant erhöhte [295]. Sowohl im LPS-Modell (mit und ohne Knockout des GLP1r) [5], als auch in unseren CLP-Mäusen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des Blutzuckerspiegels in den Versuchstieren, sodass die protektiven Effekte als glucoseunabhängig betrachtet werden können.

6.2.3.2 Zugrunde liegende Signalkaskaden

Der GLP1r gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Er besteht aus einem extrazellulären N-Terminus, einer transmembranösen Hauptdomäne aus sieben α -Helices und einem intrazellulären C-Terminus [296-298]. Durch Bindung passender Substrate an den Rezeptor ändert dieser seine Konfiguration und es kommt zu Interaktionen mit verschiedenen Guaninriphosphatbindenden Proteinen (G-Proteinen), die wiederum verschiedene Signalkaskaden aktivieren [297].

Durch Aktivierung der $G\alpha_s$ -Untereinheit wird die Adenylatcyclase stimuliert, wodurch es zur Generierung von cAMP kommt. AMP selbst wiederum induziert die Aktivierung einiger weiterer Enzyme, darunter die Proteinkinase A (PKA). Im aktivierten Zustand bewirkt die PKA über die Schließung von K_{ATP} -Kanälen eine Depolarisation und anschließende Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowie eine glucoseabhängige Insulinausschüttung in den β -Zellen des Pankreas [296-298]. Neben den bekannten insulinergen Mechanismen gewannen in den letzten Jahren zunehmend die pleiotropen Effekte an Bedeutung. Auch diese werden in Abhängigkeit von cAMP/PKA vermittelt und bewirken zunächst eine Phosphorylierung und somit Inaktivierung der MyD88-abhängigen Signalkaskade [299], wodurch eine Inaktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B [300, 301] und somit eine Hemmung der proinflammatorischen Zytokinexpression resultiert [299-301]. Auch die iNOS-Expression in LPS-behandelten Tieren wies unter Therapie mit dem GLP-1-Analogen Exendin-4 in Abhängigkeit von cAMP/PKA eine Reduktion auf Proteinebene auf, wohingegen die Transkription unverändert blieb, wie Chang et al. demonstrierten [302]. Darüber hinaus vermittelt der cAMP/PKA-Mechanismus über eine vermehrte Expression der protektiven Hämoxigenase-1 (HO-1) die Inhibition der NADPH-Oxidase [303] und damit verbundene Reduktion des oxidativen Stresses [301, 303]. Steven et al. hatten in vorausgegangenen Publikationen die mikrovaskuläre Thrombusbildung im LPS-Modell untersucht und auch hier eine cAMP/PKA-abhängige Inhibition der Plättchenaggregation feststellen können [5]. Dies lässt sich unter anderem auf eine vermehrte Aktivität der thrombozytären eNOS und damit verbundenen NO-Ausschüttung zurückführen [217].

Weitere G-Proteine, welche durch Bindung an den GLP1r aktiviert werden, sind $G\alpha_q$ und $G\alpha_{i/o}$. Die physiologische Bedeutung der beiden Formen ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht eindeutig geklärt, jedoch wird eine Beteiligung von $G\alpha_q$ an der Insulinfreisetzung in den pankreatischen β -Zellen vermutet [297]. Des Weiteren aktiviert $G\alpha_q$ mittels Phospholipase C und Diacylglycerol die Proteinkinase C (PKC) und so nachgeschaltet die NOX2 (und ggf. die NOX1) [296, 297].

Nach Bindung des passenden Substrates erfolgt in Abhängigkeit von β -Arrestin die Endozytosevermittelte Internalisation des GLP1r. Dabei kann der Rezeptor entweder der lysosomalen Proteolyse zugeführt werden, oder er erfährt ein zellinternes Recycling und gelangt mittels Endosom erneut an die Zelloberfläche, um einem weiteren Signalzyklus zur Verfügung zu stehen [296, 297].

6.3 GLP-1-Rezeptor-abhängige Beeinflussung weiterer Organsysteme

Inflammation, oxidativer Stress und die daraus resultierende endotheliale Dysfunktion besitzen unabhängig von ihrer Art der Entstehung organsystemübergreifende und somit systemische Auswirkungen [281, 285, 289]. Die Sepsis und der septische Schock selbst sind davon nicht ausgenommen, macht doch gerade die daraus entstehende multiple Organdysfunktion das Krankheitsbild so komplex und schwer therapierbar [304, 305]. Ermöglicht durch das weit verbreitete extrapancreatische Vorkommen des GLP1r [306] sind daher auch die systemübergreifenden Einflüsse der GLP-1-Analoga unter dem Gesichtspunkt einer potentiellen zukünftigen Sepsisbehandlung von Bedeutung. Wie schon in der Einleitung erwähnt und durch den SOFA-Score ausgedrückt (s. 1.2.1 *Aktuelle Definition der Sepsis*), spielen dabei insbesondere die sechs Organsysteme Lunge, Bewusstsein, Kreislauf, Niere, Leber und Gerinnung (Thrombozyten) eine wichtige Rolle [15, 19, 20].

Lunge: Aufgrund des ständigen Gasaustausches und dem somit stetig bestehenden Kontakt zur Außen- und Umwelt ist die Lunge primäres Angriffsziel für eine Vielzahl an in der Luft befindlichen Pathogenen [307]. Auch im Zusammenhang mit Sepsis ist in der Regel die Lunge das erste und am häufigsten betroffene Organ. Klinisch äußert sich ein Versagen in Form eines „Acute Respiratory Distress Syndroms“ (ARDS), zusammengefasst unter dem Begriff einer „Acute Lung Injury“ (ALI), welcher auch weniger fulminante Verläufe mit einbezieht [307-309]. Neben der direkten Schädigung des Lungengewebes durch proinflammatorische Zytokine und der Entstehung von ROS bzw. oxidativem Stress treten Schäden insbesondere im Zusammenhang mit einer gestörten Mikrozirkulation zutage. Sowohl die Clusterbildung von Neutrophilen, als auch die Thrombusbildung in den alveolaren Kapillaren tragen hierzu bei. Das daraus entstehende Mismatch zwischen Perfusion und Ventilation führt zur Aggravation eines hypoxischen Zustandes [308]. Dieser wird durch eine erhöhte MAPK-abhängige endotheliale Permeabilität und der daraus entstehenden Ödembildung zunehmend verstärkt [309]. Der GLP1r ist im Lungengewebe weit verbreitet. Eine Aktivierung kann beispielsweise im Fötus die Surfactantsynthese steigern, bzw. diese in Mäusen mit Typ 1 Diabetes wiederherstellen. Über eine Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) findet unter Therapie mit Liraglutid eine Verbesserung der pulmonalen vaskulären Funktion statt [310]. Sowohl chronische als auch akute pulmonale Erkrankungen konnten von einer Therapie mit GLP-1-Analoga profitieren. Unter anderen Liraglutid wies auf eine Verbesserung der pulmonalen Funktion in Tiermodellen mit Bleomycin-induzierter Lungenfibrose, Ovalbumin-induzierter chronischer Inflammation bzw. LPS-induzierter ALI hin [300]. Bezogen auf die therapeutischen Möglichkeiten der pulmonalen Komplikationen einer Sepsis sind bislang wenige Studien verfügbar, doch lassen die bisherigen Ergebnisse auf eine positive Beeinflussung hoffen. Die Beobachtungen von Lee et al. bestätigen diese Vermutung. Sie untersuchten unter anderem die Auswirkungen von PEG-konjugiertem Exendin-4 in

Diskussion

polymikrobieller Sepsis. Hierbei zeigte sich eine Reduktion des pulmonalen Inflammationsgeschehens, der interstitiellen Ödembildung und des Lung Injury Scores [311]. Im Endotoxic Shock-Modell bewirkte die Therapie mit Liraglutid bzw. Linagliptin eine signifikante Reduktion der mikrovaskulären Thrombusbildung im Lungengewebe, welche mittels fluoreszierender Beads visualisiert werden konnte [5] (*Abbildung 6.3*). Auch diese Beobachtung spricht für eine Verbesserung der pulmonalen Funktion unter GLP-1-basierter Therapie.

Bewusstsein: Knapp dreiviertel der Patienten weisen in der Akutphase eine zentralnervöse Dysfunktion auf, die nach Ausschluss anderweitiger Ursachen als SAE (Sepsis-Associated Encephalopathy) bezeichnet wird [312]. Doch auch nach überstandener Sepsis bestehen bei ca. einem Sechstel der Patienten bleibende kognitive Einschränkungen [313]. Diese umfassen eine Verschlechterung der Gedächtnisfunktion, aber auch Depressionen und Angststörungen [312-314]. Zugrunde liegt eine entstandene endotheliale Dysfunktion mit Auflockerung der Tight Junctions und entsprechend erhöhter Expression von ICAM-1 und VCAM-1 vor. Dadurch wird die Blut-Hirn-Schranke aufgehoben und eine Aktivierung von Gliazellen sowie Entstehung einer Neuroinflammation ermöglicht. Es kommt zur Entstehung von oxidativem Stress und zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B mit nachfolgender Expression von TNF α , IL-1 β , IL-6 und weiteren proinflammatorischen Zytokinen [312, 313]. Auch erhöht die endotheliale Dysfunktion die Entstehung mikrovaskulärer Thromben mit nachfolgenden cerebralen Ischämien [314]. Der GLP1r wird in einer Vielzahl von unterschiedlichen Regionen und Zellarten des ZNS exprimiert. Darüber hinaus scheinen die gängigen GLP-1-Analoga in der Lage zu sein, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren [303]. Bezogen auf eine protektive Beeinflussung bei Sepsis-assoziiierter kognitiver Beeinträchtigung sind derzeit noch keine Studien verfügbar, jedoch lassen die bekannten antiinflammatorischen, antioxidativen und endothelprotektiven Eigenschaften der GLP-1-Analoga auf eine solche hoffen. Für chronische zentralnervöse Erkrankungen wie Alzheimer Demenz, Morbus Parkinson und MSL konnte dies bereits belegt werden. Aufgrund der vielfältigen zentralnervösen Expression des Rezeptors werden zahlreiche weitere positive Auswirkungen einer GLP-1-basierten Therapie beschrieben. Dazu zählen eine gesteigerte Serotonin- und Dopaminausschüttung ebenso wie eine Verminderung von Angstgefühlen und depressiven Verstimmungen sowie eine verminderte Neurodegeneration bzw. gesteigerte Neurogenese [303].

Kreislauf: Einhergehend mit der Entstehung einer Sepsis besteht die Gefahr einer Aggravation in Form des septischen Schocks. Dieser - gekennzeichnet durch eine katecholaminrefraktäre Hypotension trotz ausreichender Flüssigkeitszufuhr [16] - geht mit einer zusätzlich erhöhten Mortalität einher. Die Stabilisierung des Blutdrucks bildet daher eine der Hauptsäulen in der Sepsisbehandlung [16, 57-59] (*s. 2.1.5 Therapieansätze*). Die Entstehung einer Hypotension lässt sich dabei unter anderem auf eine

übermäßig gesteigerte NO-Synthese durch die aktivierte iNOS bzw. deren gesteigerte Aktivität (s. *Abbildung 6.1*) zurückführen. Im LPS-Modell konnte unter Behandlung mit Liraglutid und Linagliptin nicht nur eine verminderte Expression derselben beobachtet werden, sondern auch deren positive Auswirkung auf die Stabilisierung der Herz-Kreislauf-Funktion in Form einer Normalisierung des Blutdruckes [4]. In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen zeigte sich auch im CLP-Modell eine signifikante Reduktion der iNOS-Expression in den mit Liraglutid behandelten Tieren. Somit konnte die protektive Wirkung auch für ein deutlich praxisnäheres und klinisch relevanteres Sepsismodell belegt werden. Weiterhin führt die Auflösung der endothelialen Barriere, bestehend aus Adherens und Gap Junctions, zu einer erhöhten Durchlässigkeit des Endothels in das umliegende Gewebe. Dieser Prozess wird maßgeblich durch Zytokine gesteuert und bewirkt einen Austritt von Flüssigkeit und den darin gelösten molekularen Bestandteilen des Blutes in das Interstitium, wodurch einerseits Ödeme entstehen, andererseits die bestehende Hypoperfusion weiter vorangetrieben wird. Ob tatsächlich die Migration von Leukozyten, vermittelt unter anderem über Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 und PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Moleküle) aus dem Gefäßsystem zum Ort des Inflammationsgeschehens zur Hyperpermeabilität beiträgt, ist nach wie vor umstritten [156]. Unumstritten ist jedoch die Tatsache, dass ein erhöhtes Vorkommen der genannten Adhäsionsmoleküle im septischen Schock zu beobachten ist [315]. Ob die Behandlung mit Liraglutid nun tatsächlich hämodynamische Auswirkungen besitzt, konnte auch im Rahmen der vorgenommenen Untersuchungen nicht abschließend geklärt werden. Die verminderte Expression von iNOS und ICAM-1 lassen allerdings auf eine entsprechende Beeinflussung spekulieren.

Niere: Über das RAAS-System besteht bekanntermaßen eine enge Verknüpfung zwischen Nieren- und Herz-Kreislauffunktion, sodass über diesen Weg auch indirekte kardioprotektive Effekte vermittelt werden können. Umgekehrt wirkt sich eine Regulation von Herz-Kreislauf-Parametern positiv auf die Nierenfunktion aus [316]. Daher überrascht es nicht weiter, dass auch septische Patienten in vielen Fällen eine akute Beeinträchtigung ihrer renalen Funktion aufweisen. Über die Hälfte der Patienten mit nachgewiesener Sepsis leidet zusätzlich an einem akuten Nierenversagen, welches mit einer erhöhten Mortalität einhergeht. Die Ursachen für ein Sepsis-assoziiertes Nierenversagen sind vielfältig und nach wie vor Gegenstand der aktuellen Forschung. Eine veränderte Mikrozirkulation [317, 318] und die Bildung von Mikrothromben durch erhöhte Zytokinproduktion, aber auch eine hypovolämbedingte Hypoperfusion sowie der Einsatz von nephrotoxischen Medikamenten scheinen in diesem Zusammenhang eine Rolle zu spielen [317]. Die gestörte Mikrozirkulation begünstigt wiederum über eine vermehrte iNOS-Expression und Entkopplung der eNOS die Entstehung von endothelialer Dysfunktion. Dies geht einher mit einer beeinträchtigten Barrierefunktion [318]. Eine Kardioprotektion unter Therapie mit GLP-1-Analoga zeigte sich zunächst in einer Reduktion proinflammatorischer Zytokine und einer cAMP-abhängigen Aktivierung der PKA im Nierengewebe diabetischer

Diskussion

Versuchstiere [301, 319, 320] unabhängig von einer Änderung des Glucoselevels. Über die Entstehung von cAMP wird eine Hemmung der NAD(P)H-Oxidase und damit eine Verminderung des oxidativen Stresses bewirkt [303, 319]. Auch die iNOS-Expression zeigt sich unter Therapie mit GLP-1-Analoga im Nierengewebe vermindert [301]. Als Bindeglied zwischen Inflammationsgeschehen und oxidativem Stress lässt sich zudem eine Downregulation von NFκB und der p38MAPK beobachten [319]. Die beschriebenen molekularen Veränderungen spiegeln sich auf Organebene in einer Reduktion der Albuminurie [316, 320] sowie in einer verzögerten eGFR-Verminderung wider [320]. Sowohl direkte als auch indirekte Effekte scheinen somit zu einer renoprotektiven Funktion der GLP-1-basierenden Therapie bei akuten wie chronischen Nierenerkrankungen beizutragen [303]. Bezüglich des Outcomes einer Therapie mit GLP-1-Analoga in Sepsis-induzierter Nierenschädigung bleibt auf genauere Ergebnisse in den nächsten Jahren zu hoffen.

Leber: Ein weiteres, häufig durch Sepsis betroffenes, Organ ist die Leber. Ausgelöst durch Kontakt zu Endotoxinen wie LPS, aber auch durch die körpereigenen Zytokine oder eine Sepsis-bedingte Minderperfusion, werden reaktive Veränderungen der Hepatozyten, der Kupfer'schen Sternzellen sowie der sinusoidalen Endothelzellen hervorgerufen. In einem sich selbst verstärkendem Mechanismus kommt es zur Freisetzung weiterer inflammatorischer Mediatoren [321, 322], durch Aktivierung proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie NFκB, zur Aktivierung der iNOS, NO-Freisetzung und Entstehung von ROS, zur Rekrutierung von Neutrophilen und schließlich zur Zellschädigung und Apoptose [321]. Aufgrund der hohen Regenerationsfähigkeit der Leber tritt eine Dysfunktion deutlich seltener auf als in der Lunge und Niere, jedoch ist ein Organversagen mit einer weitaus höheren Mortalität verbunden [322, 323]. Da der Leber eine zentrale Rolle in der Entgiftung und Beseitigung bakterieller Erreger zukommt, ist sie gleichzeitig schon in den ersten Stunden einer Sepsis betroffen [323]. Als zentrales Stoffwechselorgan besitzt die Leber umfangreiche Auswirkungen auf den Gesamtmechanismus; ein dysfunktionaler Zustand äußert sich dagegen in Form einer zunehmenden Sepsis-induzierten Cholestase, einer hypoxischen Hepatitis [321, 322] und der Entstehung einer Koagulopathie [321]. Eine positive Beeinflussung chronischer Leberparenchymveränderungen im Sinne einer Steatohepatitis durch GLP-1-Analoga konnte bereits für verschiedene Wirkstoffe nachgewiesen werden [293, 303, 324, 325]. Dies geht abermals einher mit einer Reduktion des oxidativen Stresses sowie des Inflammationsgeschehens [303]. Bei einer Sepsis treten die pathologischen Veränderungen der Leber jedoch nicht als schleichender, chronischer Prozess, sondern hoch akut auf. Kommt es zu einer Sepsis-induzierten hepatischen Schädigung, so spricht man daher auch von einer Schock-Leber [321]. Das Modell einer toxischen Schädigung kommt dieser Situation deutlich näher. Durch Cytochrom P450 verändertes Carbon-Tetrachlorid (CCl₄) bewirkte über die Entstehung von Radikalen eine Zunahme des oxidativen Stresses. Auch in diesem, durch Milani et al. beschriebenem, Kontext konnte für die Behandlung mit Liraglutid eine signifikante

Diskussion

antioxidative Beeinflussung sowie eine Modulation des hepatischen Metabolismus nachgewiesen werden [324]. Die Sepsis-induzierte Leberschädigung spiegelte sich auch in einem Anstieg der hepatischen Enzyme Alanin-Transaminase und Aspartat-Transaminase wider, welcher durch Therapie mit PEGylated EX4 vermindert werden konnte [311]. Ob sich diese Ergebnisse tatsächlich auf eine Interaktion einer GLP-1-Analoga-basierenden Therapie auf Leberzellebene zurückführen lassen, konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

Gerinnung und Thrombozyten: Wie im vorangegangenen Absatz beschrieben, treten als Folge einer Leberschädigung häufig Koagulopathien im Zusammenhang mit einer Sepsis auf und der hämostatische Zustand gerät aus dem Gleichgewicht [321]. Zwei weitere, oft beobachtete Komplikationen einer Sepsis in Bezug auf die Gerinnung bzw. Blutungsneigung sind die DIC und die, häufig darauf aufbauende, Thrombozytopenie. Als Ursachen für die Entstehung einer Thrombozytopenie kommen daher sowohl ein erhöhter Verbrauch als auch eine beeinträchtigte Produktion der Thrombozyten in Frage (s. *Abbildung 6.3*). Auch Hämodilution, durch ein großzügiges Flüssigkeitsmanagement zur Vorbeugung von Hypoperfusion verursacht, scheint einen Einfluss zu besitzen. Die zugrunde liegenden Mechanismen einer DIC lassen sich auf eine Aktivierung des Endothels zurückführen, messbar an Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 [326]. Das aktivierte Endothel exprimiert daraufhin Tissue Factor und Phosphatidylserin-positive Mikropartikel, wodurch eine DIC begünstigt wird. Im Gegenzug wird vermindert aktiviertes Protein C (APC) freigesetzt [156]. Die DIC wird als thromboinflammatorisches Ereignis angesehen, welches selbst wiederum die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion und daraus resultierende Organschädigungen begünstigen kann [327]. Da sowohl murine, als auch humane Thrombozyten über einen GLP1r verfügen, schien eine positive Beeinflussung durch GLP-1-Analoga prinzipiell möglich [5]. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie weisen daher, den Erwartungen entsprechend, einen Anstieg der durch CLP signifikant verminderten Thrombozyten unter Behandlung mit Liraglutid nach. Steven et al. hatten bereits im Vorfeld gezeigt, dass im Endotoxic Shock Modell unter Behandlung mit den GLP1r-Agonisten Liraglutid und Exendin-4 bzw. dem DPP-4-Inhibitor Linagliptin in einer cAMP/PKA-abhängigen Signalkaskade die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten sowie die (mikrovaskuläre) Thrombusbildung verringert werden konnte [5].

6.4 Ausblick

Ob sich die in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse tatsächlich auch auf den klinischen Alltag übertragen lassen und somit eine Behandlung mit GLP-1-Analoga, insbesondere mit Liraglutid, eine Verbesserung der Herz-Kreislauf-Funktion im septischen Patienten bewirken kann, muss in zukünftigen Studien weiter erforscht werden. Das gewählte Sepsismodell mittels CLP soll insbesondere in dieser

Diskussion

Hinsicht eine wichtige Vorstufe vor dem tatsächlichen Beginn mit klinischen Studien darstellen, indem es die Entstehung und den Verlauf einer Sepsis möglichst realistisch imitiert. Dennoch bleibt es nur ein Modell und ist somit nicht in der Lage, die volle Komplexität der Realität abzubilden.

Ein großer Kritikpunkt am CLP-Modell besteht in der Auswahl der Tiere. Für die zugrundeliegenden Untersuchungen wurden, ebenso wie in den meisten präklinischen Studien, junge, gesunde und in der Regel männliche Tiere verwendet. Dies ermöglicht zwar genauere Daten, da weniger Störfaktoren die Ergebnisse beeinflussen und somit eher eine Reproduzierbarkeit gegeben ist, jedoch spiegelt es nicht das typischerweise von einer Sepsis betroffene Patientenkollektiv wider. Denn gerade alte und (multimorbid) vorerkrankte Patienten sind stärker gefährdet eine Sepsis zu entwickeln und an einer solchen zu versterben. Eine potentielle Therapie müsste also insbesondere bei vorliegenden Risikofaktoren und Vorerkrankungen in der Lage sein, eine protektive Funktion auszuführen. Coletta et al. beschreiben ein CLP-Modell, welches Mäuse zweier verschiedener Altersgruppen vergleicht. Die gealterten Versuchstiere wiesen in Bezug auf endotheliale Funktion, Inflammation und Überlebensrate ähnliche Werte wie die eNOS^{-/-} Mäuse auf und schnitten damit signifikant schlechter ab als junge Versuchstiere nach CLP-Induktion [275].

Eine weitere große Abweichung von den Realbedingungen stellt das Nichtvorliegen einer Begleittherapie dar. Wie in der Einleitung dargelegt, ist die Sepsis ein hochkomplexes Krankheitsbild, welches sich insbesondere durch seine Organsystem-übergreifenden Eigenschaften auszeichnet. Während im klinischen Alltag unterstützende Maßnahmen wie Flüssigkeitsgabe, Kreislaufstabilisation und die Verabreichung von Antibiotika zum festen Bestandteil einer Sepsistherapie gehören, fehlen diese Faktoren in den gängigen Tiermodellen. Die Anforderungen an ein Medikament, all diese Maßnahmen nicht nur zu kompensieren, sondern im besten Fall darüber hinaus zu übertreffen, scheinen unrealistisch. Erfährt die Vergleichsgruppe keinerlei Therapie, so lässt sich natürlich feststellen, ob prinzipiell eine protektive Wirkung der Therapie besteht. Ob sie jedoch als Zusatztherapie weitere protektive Funktionen besitzen oder ob diese angesichts gleichzeitig stattfindender supportiver Maßnahmen verpuffen, bleibt in solchen Modellen ungeklärt [237, 328, 329].

Der ursprüngliche Gedanke in der Entwicklung des CLP-Modelles bestand darin, ein tiefergehendes Verständnis über den natürlichen Verlauf einer unbehandelten Infektion, bzw. im engeren Sinne perforierten Appendizitis, Divertikulitis oder eines perforierten Magengeschwürs zu schaffen. Heutzutage sind Verläufe, in denen Patienten bereits innerhalb der ersten Tage am Infektionsgeschehen selbst sterben, eher selten. Insbesondere bei Vorliegen eines Infektfokus wird in der Regel eine erfolgreiche chirurgische Sanierung angestrebt.

Diskussion

Die hohe Sterblichkeit dagegen wird maßgeblich durch die zweite Phase, die Immunsuppression, bestimmt. Diese bleibt im CLP-Modell nahezu unbeachtet. In dieser vulnerablen Phase treten häufig Sekundärinfektionen auf, welche aufgrund der beeinträchtigten Immunfunktion zum Tod führen können [328].

Ansätze, um diese Probleme zu beheben und somit die präklinische Sepsisforschung dem klinischen Alltag weiter anzunähern, könnten in zusätzlichen Modifikationen des CLP-Modelles bestehen. Dies betrifft zum einen die Auswahl der Versuchstiere, zum anderen die erhaltene Therapie. Durch Auswahl von älteren Versuchstieren, durch Induktion eines zusätzlichen Diabetes mellitus oder einer arteriellen Hypertonie; durch zusätzliche Flüssigkeitssubstitution über die unmittelbar postoperative Episode hinaus oder die Gabe von Antibiotika - um nur einige Beispiele zu nennen - könnten die experimentellen den real vorliegenden Bedingungen ein weiteres Stück angepasst werden [237, 328, 329].

Wie in der Einleitung dargestellt (*s. 2.2.2 Pathogenese der Sepsis*), besteht der Verlauf einer Sepsis aus einer initialen hyperinflammatorischen und einer nachfolgenden hypoinflammatorischen Phase. Während erstere durch einen starken Anstieg proinflammatorischer Zytokine gekennzeichnet ist, zeichnet sich zweitens durch eine Immunsuppression aus. Ein Großteil der Patienten verstirbt in dieser zweiten Phase. Eine Therapie gegen Sepsis darf also nicht nur rein immunsuppressiv wirken, da hierbei wichtige Vorgänge zur Elimination des Sepsisfokus unterdrückt werden würden, muss aber gleichzeitig eine Überaktivierung des Immunsystems vorbeugen [237]. Um diese zweite Phase zu imitieren, wurde das sog. „Second Hit“-Modell entwickelt. Dieses beschreibt einige Tage nach erfolgter CLP das Einbringen eines weiteren Infektfokus, CLP-Tiere zeigten dabei eine signifikant verschlechterte Elimination des eingebrachten Pathogens [328].

Eine Modifikation des CLP-Modelles ist also auf vielfältige Art und Weise möglich, jedoch geht dies fast unumgänglich mit einer Erhöhung der benötigten Versuchstiere einher. Dies ist notwendig, um trotz variabler physiologischer Ausgangssituation und darauf aufbauenden klinischen Verläufen eine signifikante Beeinflussung der untersuchten Therapiemethode überprüfen zu können [329]. Daher müssen wissenschaftliche Interessen mit ethischen Grundsätzen abgewägt und in Einklang gebracht werden.

All diese Maßnahmen zur Errichtung eines möglichst detailgetreuen Szenarios können dabei helfen, die Auswirkungen einer Therapie mit GLP-1-Analoga, insbesondere Liraglutid, im Kontext einer Sepsis zu beurteilen, sind jedoch nicht in der Lage, klinische Studien zu ersetzen. Ob die These von einer protektiven Funktion des GLP-1-Analogons Liraglutid also tatsächlich auch im septischen Patienten eine Verbesserung der Herz-Kreislauf-Funktion und somit ein verbessertes Überleben bewirkt, bleibt

Diskussion

Gegenstand zukünftiger Forschungen. Aufgrund des steigenden Einsatzes von GLP-1-Analoga in der Diabetes-Therapie sind primär beobachtende Studien im Sinne einer Anwendungsbeobachtungs-Studie denkbar. Septische Patienten können anhand des Kriteriums einer vorab bestehenden GLP-1-basierten Therapie eingeteilt und bezüglich des Outcomes verglichen werden. In diesem Zusammenhang wäre ebenfalls von Interesse, inwieweit sich eine protektive Funktion auch bei anderen GLP-1-Analoga finden lässt.

Den Goldstandard stellen natürlich nach wie vor interventionelle Studien im Sinne von randomisierten, verblindeten und (Placebo-) kontrollierten Studien mit Fallzahlplanung dar. Aufgrund methodischer wie auch ethischer Grundsätze besitzt diese die zuverlässigste Aussagekraft in Bezug auf Verträglichkeit und Wirksamkeit des untersuchten Arzneimittels [330]. Ob es zur Durchführung solcher Studien kommt und wenn ja, inwieweit sie mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen korrelieren, bleibt in den nächsten Jahren abzuwarten.

7 Zusammenfassung

Nach wie vor stellt die Sepsis ein ernst zu nehmendes Krankheitsbild dar, welches ungeachtet der medizinischen Fortschritte der letzten Jahrzehnte mit einer hohen Mortalität einhergeht. Häufig Infekt-assoziiert, besteht die Sepsis aus einer initialen hyper- und nachfolgender hypoinflammatorischen Phase, welche in einem oder mehreren Organsystemen eine Dysfunktion bis hin zu irreparablen Schäden bedingt.

In der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 sind GLP-1-Analoga mittlerweile fest vertreten. Neben ihrer glucosesenkenden Wirkung bei gleichzeitig niedrigem Risiko für Hypoglykämien trugen insbesondere die positiven Auswirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem zu einer steigenden Popularität bei.

In vorausgegangenen Studien hatten Steven et al. bereits den Einfluss einer GLP1r-basierenden Therapie auf die ATII-induzierte arterielle Hypertonie und die LPS-induzierte Sepsis mittels Liraglutid und Linagliptin untersucht. Hierbei hatten sich in den behandelten septischen Mäusen eine verbesserte Überlebensrate mit Reduktion der endothelialen Dysfunktion, des oxidativen Stresses, sowie eine verminderte mikrovaskuläre Thrombenbildung in LPS-injizierten Mäusen gezeigt.

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob sich eine Verbesserung der kardiovaskulären - insbesondere der endothelialen - Funktion unter Therapie mit Liraglutid auch in einem klinisch relevanterem Sepsis-Modell belegen lässt. Hierzu wurde eine Sepsis mittels CLP induziert. Diese führte in den Tieren zur Entstehung einer polymikrobiellen Sepsis mit überschießender Immunantwort. Als Zeichen eines Inflammationsgeschehens ließ sich in den Mäusen der CLP-Gruppe die Entstehung einer Leukozytopenie bei gleichzeitig erhöhter Körpertemperatur und vermehrter Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF α sowie der iNOS feststellen. Auf vaskulärer und kardialer Ebene sowie im Vollblut zeigte sich eine vermehrte Entstehung von oxidativem Stress. Das Zusammenspiel dieser Faktoren wiederum begünstigte die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion. Damit gleichen die Vorgänge denen, welche in der Entstehung vieler kardiovaskulärer Erkrankungen eine maßgebliche Rolle spielen.

Unter Behandlung mit Liraglutid wurden eine Vielzahl der zuvor beobachteten Veränderungen positiv beeinflusst bei gleichzeitig verbesserter endothelialer Funktion. Dies zeigte sich insbesondere an einer Reduktion von Superoxid, Peroxynitrit sowie der Gesamtmenge an ROS und RONS und somit des oxidativen Stresses. Die Veränderungen konnten in der Aorta selbst, aber auch im Herzgewebe sowie im Plasma registriert werden. Für die vaskulären Inflammationsmarker wie IL-6, TNF α , ICAM-1 und iNOS ließ sich unter der Behandlung mit Liraglutid eine verminderte Expression in der qRT-PCR belegen. Eine reduzierte iNOS-Expression trägt mit zu der vorab genannten Reduktion des oxidativen Stresses bei. Dadurch konnte eine Normalisierung der endothelialen Funktion erlangt werden, die sich

Zusammenfassung

unter anderem in einer verbesserten endothelabhängigen Vasorelaxation widerspiegelte. Sowohl Körpergewicht als auch Blutzuckerspiegel blieben in den mit Liraglutid behandelten Mäusen unbeeinflusst, sodass die beobachteten Veränderungen als unabhängig von den glucosesenkenden Effekten der GLP-1-Analoga betrachtet werden können (Abbildung 7.1).

Damit bestätigen die im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse die bisherigen Erkenntnisse einer positiven Beeinflussung insbesondere der vaskulären Funktion, des oxidativen Stresses sowie der vaskulären Inflammation durch das GLP-1-Analogon Liraglutid im Rahmen einer Sepsis.

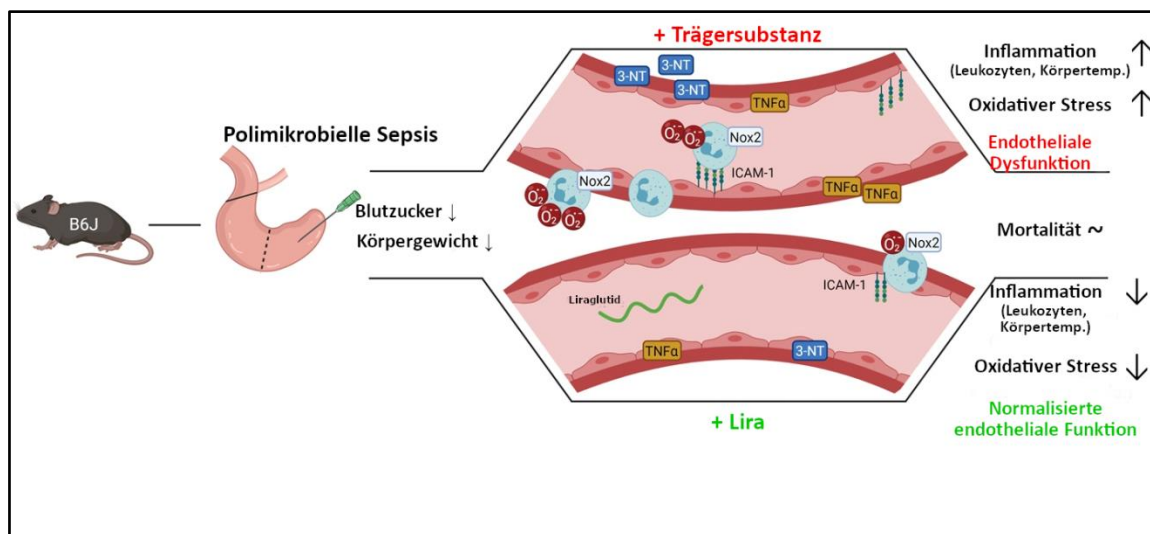


Abbildung 7.1 Schematische Zusammenfassung der positiven kardiovaskulären Auswirkungen des GLP-1-Analogons Liraglutid auf CLP-induzierte polymikrobielle Sepsis. CLP-induzierte Sepsis bewirkte sowohl in den mit Liraglutid als auch in den mit der Trägersubstanz behandelten Mäusen eine Senkung des Blutzuckerspiegels sowie des Körpergewichts. Hingegen konnte in den mit Liraglutid behandelten Tieren eine Reduktion der systemischen und vaskulären Inflammation sowie eine Reduktion des oxidativen Stresses gegenüber Tieren der CLP-Gruppe festgestellt werden. Dies führte in den Versuchstieren der +Lira-Gruppe zu einer Normalisierung der endothelialen Funktion. Die Daten veranschaulichen somit eine neue Funktion der GLP-1-Analoga wie Liraglutid, welche anhand ihrer antiinflammatorischen und antioxidativen Eigenschaften die kardiovaskulären Komplikationen in polymikrobieller Sepsis positiv beeinflussen können. Modifizierte Abbildung aus [211].

Die Ergebnisse stellen somit einen Beitrag in der Entwicklung neuer bzw. adjuvanter Therapiemöglichkeiten einer Sepsis dar. Zusätzlich zu den bereits etablierten Therapiemaßnahmen wie Antibiotikagabe, Herz-Kreislaufstabilisation und ggf. weiteren Maßnahmen zur passageren Überbrückung der dysfunktionalen Organeinheiten könnte der Einsatz von GLP-1-Analoga zu einer Reduktion des Inflammationsgeschehens, des oxidativen Stresses und der endothelialen Dysfunktion mit verbessertem Outcome beitragen. Ob sich diese Erkenntnisse tatsächlich in der Praxis bestätigen werden und somit eine Reduktion der Mortalität bei septischen Patienten – sowohl auf kurze, als auch auf lange Sicht – erreicht werden kann, lässt sich zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht feststellen und bleibt daher Gegenstand zukünftiger Forschungen.

8 Literaturverzeichnis

1. Andrikou, E., et al., *GLP-1 receptor agonists and cardiovascular outcome trials: An update*. Hellenic J Cardiol, 2019. **60**(6): p. 347-351.
2. Iqbal, A.M., et al., *Efficacy and Cardiovascular Safety of GLP-1 Receptor Analogues*. Curr Drug Saf, 2021. **16**(2): p. 197-206.
3. Verma, S., et al., *Applying REWIND cardiovascular disease criteria to SUSTAIN 6 and PIONEER 6: An exploratory analysis of cardiovascular outcomes with semaglutide*. Diabetes Obes Metab, 2021. **23**(7): p. 1677-1680.
4. Steven, S., et al., *Gliptin and GLP-1 analog treatment improves survival and vascular inflammation/dysfunction in animals with lipopolysaccharide-induced endotoxemia*. Basic Res Cardiol, 2015. **110**(2): p. 6.
5. Steven, S., et al., *Glucagon-like peptide-1 receptor signalling reduces microvascular thrombosis, nitro-oxidative stress and platelet activation in endotoxaemic mice*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(12): p. 1620-1632.
6. Kumar, V., *Inflammasomes: Pandora's box for sepsis*. J Inflamm Res, 2018. **11**: p. 477-502.
7. Funk, D.J., J.E. Parrillo, and A. Kumar, *Sepsis and septic shock: a history*. Crit Care Clin, 2009. **25**(1): p. 83-101, viii.
8. Geroulanos, S. and E.T. Douka, *Historical perspective of the word "sepsis"*. Intensive Care Med, 2006. **32**(12): p. 2077.
9. Kreymann, G. and M. Wolf, *[History and definition of sepsis--do we need new terminology?]*. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 1996. **31**(1): p. 9-14.
10. Yuki, K. and N. Murakami, *Sepsis pathophysiology and anesthetic consideration*. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2015. **15**(1): p. 57-69.
11. *Semmelweis*. Br Med J, 1893. **1**(1671): p. 26.
12. Citrome, L., *Happy Birthday Ignac Semmelweis! Now, Let's All Wash Our Hands!* Int J Clin Pract, 2018. **72**(10): p. e13256.
13. Macdermot, H.E., *Semmelweis and Holmes*. Can Med Assoc J, 1912. **2**(1): p. 24-32.
14. Walter, C.W., *Letter: Handwashing and Semmelweis*. Ann Intern Med, 1976. **85**(3): p. 398.
15. David, S. and F.M. Brunkhorst, *[Sepsis-3 : What has been confirmed in therapy?]*. Internist (Berl), 2017. **58**(12): p. 1264-1271.
16. Brunkhorst, F.M., et al., *[S3 Guideline Sepsis-prevention, diagnosis, therapy, and aftercare : Long version]*. Med Klin Intensivmed Notfmed, 2020. **115**(Suppl 2): p. 37-109.
17. Heffernan, A.J. and K.J. Denny, *Host Diagnostic Biomarkers of Infection in the ICU: Where Are We and Where Are We Going?* Curr Infect Dis Rep, 2021. **23**(4): p. 4.
18. Bracht, H., S. Hafner, and M. Weiss, *[Sepsis Update: Definition and Epidemiology]*. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 2019. **54**(1): p. 10-20.
19. Verdonk, F., A. Blet, and A. Mebazaa, *The new sepsis definition: limitations and contribution to research and diagnosis of sepsis*. Curr Opin Anaesthesiol, 2017. **30**(2): p. 200-204.
20. Esposito, S., et al., *Sepsis and septic shock: New definitions, new diagnostic and therapeutic approaches*. J Glob Antimicrob Resist, 2017. **10**: p. 204-212.
21. Shankar-Hari, M., et al., *Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 775-87.
22. Buchy, P., et al., *Impact of vaccines on antimicrobial resistance*. Int J Infect Dis, 2020. **90**: p. 188-196.
23. Ligon, B.L., *Penicillin: its discovery and early development*. Semin Pediatr Infect Dis, 2004. **15**(1): p. 52-7.
24. Alderson, M.R., et al., *Panel 8: Vaccines and immunology*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2020. **130** Suppl 1: p. 109839.
25. Martin, G.S., et al., *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000*. N Engl J Med, 2003. **348**(16): p. 1546-54.

26. Arefian, H., et al., *Hospital-related cost of sepsis: A systematic review*. J Infect, 2017. **74**(2): p. 107-117.
27. Engel, C., et al., *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study*. Intensive Care Med, 2007. **33**(4): p. 606-18.
28. SepNet Critical Care Trials, G., *Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study*. Intensive Care Med, 2016. **42**(12): p. 1980-1989.
29. Fleischmann, C., et al., *Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis*. Dtsch Arztebl Int, 2016. **113**(10): p. 159-66.
30. Statistisches Bundesamt, Z.B. *Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000 (Fälle, Berechnungs- und Belegungstage, durchschnittliche Verweildauer). Gliederungsmerkmale: Jahre, Behandlungsort, Alter, Geschlecht, Verweildauer, ICD10-4-Steller*. 2022 [cited 2023 29.03.2023]; Available from: https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg_olap_tables.prc_set_svg?p_uid=gast&p_aid=93039622&p_sprache=D&p_help=2&p_indnr=702&p_indsp=&p_ansnr=64047559&p_version=2&p_svg=2#SVG.
31. Foreman, K.J., et al., *Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories*. Lancet, 2018. **392**(10159): p. 2052-2090.
32. Murray, C.J. and A.D. Lopez, *Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study*. Lancet, 1997. **349**(9061): p. 1269-76.
33. Birg, H. and E.J. Flothmann, *[Long-term trends of the demographic aging in Germany]*. Z Gerontol Geriatr, 2002. **35**(5): p. 387-99.
34. Fowler, A.J., et al., *Age of patients undergoing surgery*. Br J Surg, 2019. **106**(8): p. 1012-1018.
35. Uckay, I., et al., *Low incidence of haematogenous seeding to total hip and knee prostheses in patients with remote infections*. J Infect, 2009. **59**(5): p. 337-45.
36. Yang, Q.F., et al., *Incidence and Risk Factors of In-Hospital Prosthesis-Related Complications Following Total Knee Arthroplasty: A Retrospective Nationwide Inpatient Sample Database Study*. Orthop Surg, 2021. **13**(5): p. 1579-1586.
37. Angus, D.C. and T. van der Poll, *Severe sepsis and septic shock*. N Engl J Med, 2013. **369**(9): p. 840-51.
38. Silosi, C.A., et al., *Sepsis and identification of reliable biomarkers for postoperative period prognosis*. Rom J Morphol Embryol, 2018. **59**(1): p. 77-91.
39. Eguia, E., et al., *Risk factors for infection and evaluation of Sepsis-3 in patients with trauma*. Am J Surg, 2019. **218**(5): p. 851-857.
40. Moerer, O., et al., *Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use*. Intensive Care Med, 2002. **28**(10): p. 1440-6.
41. Moerer, O. and H. Burchardi, *Außerordentliche ökonomische Belastung - Epidemiologie und Kosten der Sepsis*. Der Klinikarzt, 2004. **33**(06): p. 177-180.
42. Martin, G.S., *Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2012. **10**(6): p. 701-6.
43. Llewelyn, M.J. and J. Cohen, *Tracking the microbes in sepsis: advancements in treatment bring challenges for microbial epidemiology*. Clin Infect Dis, 2007. **44**(10): p. 1343-8.
44. Vincent, J.L., et al., *Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study*. Crit Care Med, 2006. **34**(2): p. 344-53.
45. Schmid, K.J., *Gram-positive or Gram-negative induced sepsis: custom-made microarrays to establish gene expression profiles*, in Ludwig Boltzmann Institut für experimentelle und klinische Traumatologie. 2009, Karl-Franzens Universität Graz.
46. Mellhammar, L., et al., *Bacteremic sepsis leads to higher mortality when adjusting for confounders with propensity score matching*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 6972.
47. Fuchs, A., et al., *Clinical and microbiological characterization of sepsis and evaluation of sepsis scores*. PLoS One, 2021. **16**(3): p. e0247646.

48. Lakshmikanth, C.L., et al., *Sepsis: in search of cure*. *Inflamm Res*, 2016. **65**(8): p. 587-602.
49. Cheung, G.Y.C., et al., *Bacterial virulence plays a crucial role in MRSA sepsis*. *PLoS Pathog*, 2021. **17**(2): p. e1009369.
50. Rozsa, L., et al., *The evolutionary logic of sepsis*. *Infect Genet Evol*, 2017. **55**: p. 135-141.
51. Zhang, H., et al., *Risks and features of secondary infections in severe and critical ill COVID-19 patients*. *Emerg Microbes Infect*, 2020. **9**(1): p. 1958-1964.
52. Mukherjee, V. and L. Evans, *Implementation of the Surviving Sepsis Campaign guidelines*. *Curr Opin Crit Care*, 2017. **23**(5): p. 412-416.
53. Rahmel, T., [*SSC International Guideline 2016 - Management of Sepsis and Septic Shock*]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 2018. **53**(2): p. 142-148.
54. Coopersmith, C.M., et al., *Surviving sepsis campaign: research priorities for sepsis and septic shock*. *Intensive Care Med*, 2018. **44**(9): p. 1400-1426.
55. Thompson, K., B. Venkatesh, and S. Finfer, *Sepsis and septic shock: current approaches to management*. *Intern Med J*, 2019. **49**(2): p. 160-170.
56. Berg, D. and H. Gerlach, *Recent advances in understanding and managing sepsis*. *F1000Res*, 2018. **7**.
57. Briegel, J. and P. Mohnle, [*International guidelines from the Surviving Sepsis Campaign : 2016 update*]. *Anaesthesist*, 2017. **66**(7): p. 530-538.
58. Hecker, A., et al., *Intra-abdominal sepsis: new definitions and current clinical standards*. *Langenbecks Arch Surg*, 2019. **404**(3): p. 257-271.
59. Genga, K.R. and J.A. Russell, *Update of Sepsis in the Intensive Care Unit*. *J Innate Immun*, 2017. **9**(5): p. 441-455.
60. Perner, A., et al., *Sepsis: frontiers in diagnosis, resuscitation and antibiotic therapy*. *Intensive Care Med*, 2016. **42**(12): p. 1958-1969.
61. Kamada, N. and G. Nunez, *Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(6): p. 1477-88.
62. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. *Lancet*, 2001. **357**(9270): p. 1777-89.
63. Tomar, N. and R.K. De, *A brief outline of the immune system*. *Methods Mol Biol*, 2014. **1184**: p. 3-12.
64. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 197-216.
65. McComb, S., et al., *Introduction to the Immune System*. *Methods Mol Biol*, 2019. **2024**: p. 1-24.
66. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *NF-kappaB in immunobiology*. *Cell Res*, 2011. **21**(2): p. 223-44.
67. Ganeshan, K. and A. Chawla, *Metabolic regulation of immune responses*. *Annu Rev Immunol*, 2014. **32**: p. 609-34.
68. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(3): p. 159-75.
69. Liew, P.X. and P. Kubes, *The Neutrophil's Role During Health and Disease*. *Physiol Rev*, 2019. **99**(2): p. 1223-1248.
70. Phillipson, M. and P. Kubes, *The neutrophil in vascular inflammation*. *Nat Med*, 2011. **17**(11): p. 1381-90.
71. Walport, M.J., *Complement. First of two parts*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(14): p. 1058-66.
72. Fujita, T., Y. Endo, and M. Nonaka, *Primitive complement system--recognition and activation*. *Mol Immunol*, 2004. **41**(2-3): p. 103-11.
73. Ravin, K.A. and M. Loy, *The Eosinophil in Infection*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2016. **50**(2): p. 214-27.
74. Weller, P.F. and K. Lim, *Human eosinophil-lymphocyte interactions*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1997. **92 Suppl 2**: p. 173-82.
75. Cichocki, F., E. Sitnicka, and Y.T. Bryceson, *NK cell development and function--plasticity and redundancy unleashed*. *Semin Immunol*, 2014. **26**(2): p. 114-26.

76. Shifrin, N., D.H. Raulet, and M. Ardolino, *NK cell self tolerance, responsiveness and missing self recognition*. *Semin Immunol*, 2014. **26**(2): p. 138-44.
77. Djukic, M., R. Nau, and C. Sieber, [*The ageing immune system*]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2014. **139**(40): p. 1987-90.
78. Huston, D.P., *The biology of the immune system*. *JAMA*, 1997. **278**(22): p. 1804-14.
79. Ward, A.E. and B.M. Rosenthal, *Evolutionary responses of innate immunity to adaptive immunity*. *Infect Genet Evol*, 2014. **21**: p. 492-6.
80. Uhle, F., et al., [*Pathophysiology of sepsis*]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 2015. **50**(2): p. 114-22.
81. Rello, J., et al., *Sepsis: A Review of Advances in Management*. *Adv Ther*, 2017. **34**(11): p. 2393-2411.
82. Salomao, R., et al., *Sepsis: evolving concepts and challenges*. *Braz J Med Biol Res*, 2019. **52**(4): p. e8595.
83. Taguchi, T. and K. Mukai, *Innate immunity signalling and membrane trafficking*. *Curr Opin Cell Biol*, 2019. **59**: p. 1-7.
84. Beutler, B., *Innate immunity: an overview*. *Mol Immunol*, 2004. **40**(12): p. 845-59.
85. Zindel, J. and P. Kubes, *DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation*. *Annu Rev Pathol*, 2020. **15**: p. 493-518.
86. Kim, Y.K., J.S. Shin, and M.H. Nahm, *NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases*. *Yonsei Med J*, 2016. **57**(1): p. 5-14.
87. Taeb, A.M., M.H. Hooper, and P.E. Marik, *Sepsis: Current Definition, Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. *Nutr Clin Pract*, 2017. **32**(3): p. 296-308.
88. Kumar, V., *Immunometabolism: Another Road to Sepsis and Its Therapeutic Targeting*. *Inflammation*, 2019. **42**(3): p. 765-788.
89. van der Poll, T., et al., *The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets*. *Nat Rev Immunol*, 2017. **17**(7): p. 407-420.
90. Chousterman, B.G., F.K. Swirski, and G.F. Weber, *Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis*. *Semin Immunopathol*, 2017. **39**(5): p. 517-528.
91. Kristof, K., et al., *Anaemia requiring red blood cell transfusion is associated with unfavourable 90-day survival in surgical patients with sepsis*. *BMC Res Notes*, 2018. **11**(1): p. 879.
92. Muady, G.F., et al., *Hemoglobin levels and blood transfusion in patients with sepsis in Internal Medicine Departments*. *BMC Infect Dis*, 2016. **16**(1): p. 569.
93. Gotts, J.E. and M.A. Matthay, *Sepsis: pathophysiology and clinical management*. *BMJ*, 2016. **353**: p. i1585.
94. Huang, M., S. Cai, and J. Su, *The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(21).
95. Prescott, H.C. and D.C. Angus, *Enhancing Recovery From Sepsis: A Review*. *JAMA*, 2018. **319**(1): p. 62-75.
96. Rosendahl, J., et al., *Physical and mental health in patients and spouses after intensive care of severe sepsis: a dyadic perspective on long-term sequelae testing the Actor-Partner Interdependence Model*. *Crit Care Med*, 2013. **41**(1): p. 69-75.
97. Kress, J.P. and J.B. Hall, *ICU-acquired weakness and recovery from critical illness*. *N Engl J Med*, 2014. **370**(17): p. 1626-35.
98. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
99. Mukherjee, S., S. Huda, and S.P. Sinha Babu, *Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review*. *Scand J Immunol*, 2019. **90**(1): p. e12771.
100. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. *Semin Immunol*, 2007. **19**(1): p. 24-32.
101. Ciesielska, A., M. Matyjek, and K. Kwiatkowska, *TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling*. *Cell Mol Life Sci*, 2021. **78**(4): p. 1233-1261.
102. Chen, Z., et al., *Sepsis Upregulates CD14 Expression in a MyD88-Dependent and Trif-Independent Pathway*. *Shock*, 2018. **49**(1): p. 82-89.

103. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
104. Park, B.S., et al., *The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex*. Nature, 2009. **458**(7242): p. 1191-5.
105. Kim, S.J. and H.M. Kim, *Dynamic lipopolysaccharide transfer cascade to TLR4/MD2 complex via LBP and CD14*. BMB Rep, 2017. **50**(2): p. 55-57.
106. Plociennikowska, A., et al., *Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(3): p. 557-581.
107. Zamyatina, A. and H. Heine, *Lipopolysaccharide Recognition in the Crossroads of TLR4 and Caspase-4/11 Mediated Inflammatory Pathways*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 585146.
108. Park, B.S. and J.O. Lee, *Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes*. Exp Mol Med, 2013. **45**: p. e66.
109. Bertani, B. and N. Ruiz, *Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides*. EcoSal Plus, 2018. **8**(1).
110. Raetz, C.R. and C. Whitfield, *Lipopolysaccharide endotoxins*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 635-700.
111. Steimle, A., I.B. Autenrieth, and J.S. Frick, *Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens*. Int J Med Microbiol, 2016. **306**(5): p. 290-301.
112. Schutt, C., *Cd14*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(5): p. 545-9.
113. Fenton, M.J. and D.T. Golenbock, *LPS-binding proteins and receptors*. J Leukoc Biol, 1998. **64**(1): p. 25-32.
114. Jerala, R., *Structural biology of the LPS recognition*. Int J Med Microbiol, 2007. **297**(5): p. 353-63.
115. Reiterer, M. and C.M. Branco, *Endothelial cells and organ function: applications and implications of understanding unique and reciprocal remodelling*. FEBS J, 2020. **287**(6): p. 1088-1100.
116. Rajendran, P., et al., *The vascular endothelium and human diseases*. Int J Biol Sci, 2013. **9**(10): p. 1057-69.
117. Aird, W.C., *Endothelium as an organ system*. Crit Care Med, 2004. **32**(5 Suppl): p. S271-9.
118. Bassenge, E., *Endothelial function in different organs*. Prog Cardiovasc Dis, 1996. **39**(3): p. 209-28.
119. Chistiakov, D.A., et al., *Vascular endothelium: functioning in norm, changes in atherosclerosis and current dietary approaches to improve endothelial function*. Mini Rev Med Chem, 2015. **15**(4): p. 338-50.
120. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms*. Circ Res, 2007. **100**(2): p. 158-73.
121. Michiels, C., *Endothelial cell functions*. J Cell Physiol, 2003. **196**(3): p. 430-43.
122. Bazzoni, G. and E. Dejana, *Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis*. Physiol Rev, 2004. **84**(3): p. 869-901.
123. Radeva, M.Y. and J. Waschke, *Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier*. Acta Physiol (Oxf), 2018. **222**(1).
124. Vandembroucke, E., et al., *Regulation of endothelial junctional permeability*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1123**: p. 134-45.
125. Dejana, E. and C. Giampietro, *Vascular endothelial-cadherin and vascular stability*. Curr Opin Hematol, 2012. **19**(3): p. 218-23.
126. Ince, C., et al., *The Endothelium in Sepsis*. Shock, 2016. **45**(3): p. 259-70.
127. 2014 [cited 2023 12.12.2023]; Available from: www.adqi.net.
128. Kliche, S. and J. Waltenberger, *VEGF receptor signaling and endothelial function*. IUBMB Life, 2001. **52**(1-2): p. 61-6.
129. Klagsbrun, M. and M.A. Moses, *Molecular angiogenesis*. Chem Biol, 1999. **6**(8): p. R217-24.
130. Coultas, L., K. Chawengsaksophak, and J. Rossant, *Endothelial cells and VEGF in vascular development*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 937-45.

131. Apte, R.S., D.S. Chen, and N. Ferrara, *VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development*. Cell, 2019. **176**(6): p. 1248-1264.
132. Melincovici, C.S., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis*. Rom J Morphol Embryol, 2018. **59**(2): p. 455-467.
133. Neubauer, K. and B. Zieger, *Endothelial cells and coagulation*. Cell Tissue Res, 2021.
134. Mittal, M., et al., *Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(7): p. 1126-67.
135. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
136. Chaudhry, R., S.M. Usama, and H.M. Babiker, *Physiology, Coagulation Pathways*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
137. Yau, J.W., H. Teoh, and S. Verma, *Endothelial cell control of thrombosis*. BMC Cardiovasc Disord, 2015. **15**: p. 130.
138. Chambers, R.C., *Role of coagulation cascade proteases in lung repair and fibrosis*. Eur Respir J Suppl, 2003. **44**: p. 33s-35s.
139. Tousoulis, D., et al., *The role of nitric oxide on endothelial function*. Curr Vasc Pharmacol, 2012. **10**(1): p. 4-18.
140. Suzuki, S., et al., *Role of acetylcholine spasm provocation test as a pathophysiological assessment in nonobstructive coronary artery disease*. Cardiovasc Interv Ther, 2021. **36**(1): p. 39-51.
141. van Hinsbergh, V.W., *Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation*. Semin Immunopathol, 2012. **34**(1): p. 93-106.
142. Nourshargh, S. and R. Alon, *Leukocyte migration into inflamed tissues*. Immunity, 2014. **41**(5): p. 694-707.
143. Filippi, M.D., *Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives*. Blood, 2019. **133**(20): p. 2149-2158.
144. Daiber, A., et al., *Targeting vascular (endothelial) dysfunction*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(12): p. 1591-1619.
145. Gavriilaki, E., et al., *Endothelial Dysfunction in COVID-19: Lessons Learned from Coronaviruses*. Curr Hypertens Rep, 2020. **22**(9): p. 63.
146. Baselet, B., et al., *Pathological effects of ionizing radiation: endothelial activation and dysfunction*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(4): p. 699-728.
147. Daiber, A., et al., *New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(1).
148. Siragusa, M. and I. Fleming, *The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction*. Pflugers Arch, 2016. **468**(7): p. 1125-1137.
149. Hong, F.F., et al., *Roles of eNOS in atherosclerosis treatment*. Inflamm Res, 2019. **68**(6): p. 429-441.
150. Rochette, L., et al., *Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets?* Pharmacol Ther, 2013. **140**(3): p. 239-57.
151. Chen, C.A., et al., *S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function*. Nature, 2010. **468**(7327): p. 1115-8.
152. Peluso, A.A., et al., *Identification of protein phosphatase involvement in the AT(2) receptor-induced activation of endothelial nitric oxide synthase*. Clin Sci (Lond), 2018. **132**(7): p. 777-790.
153. Rafikov, R., et al., *eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity*. J Endocrinol, 2011. **210**(3): p. 271-84.
154. Boos, C.J., P.K. Goon, and G.Y. Lip, *The endothelium, inflammation, and coagulation in sepsis*. Clin Pharmacol Ther, 2006. **79**(1): p. 20-2.
155. Galley, H.F., *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis*. Br J Anaesth, 2011. **107**(1): p. 57-64.

156. Joffre, J., et al., *Endothelial Responses in Sepsis*. Am J Respir Crit Care Med, 2020. **202**(3): p. 361-370.
157. Schildknecht, S., et al., *COX-2 inhibitors selectively block prostacyclin synthesis in endotoxin-exposed vascular smooth muscle cells*. FASEB J, 2004. **18**(6): p. 757-9.
158. Schildknecht, S., et al., *Endotoxin elicits nitric oxide release in rat but prostacyclin synthesis in human and bovine vascular smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **327**(1): p. 43-8.
159. Martin, L., et al., *The Endothelial Glycocalyx: New Diagnostic and Therapeutic Approaches in Sepsis*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 3758278.
160. Fernandez, S., et al., *Progressive endothelial cell damage in correlation with sepsis severity. Defibrotide as a contender*. J Thromb Haemost, 2021. **19**(8): p. 1948-1958.
161. Burgdorff, A.M., M. Bucher, and J. Schumann, *Vasoplegia in patients with sepsis and septic shock: pathways and mechanisms*. J Int Med Res, 2018. **46**(4): p. 1303-1310.
162. Levy, B., et al., *Vasoplegia treatments: the past, the present, and the future*. Crit Care, 2018. **22**(1): p. 52.
163. Sharawy, N., *Vasoplegia in septic shock: do we really fight the right enemy?* J Crit Care, 2014. **29**(1): p. 83-7.
164. Naoum, E.E., et al., *Methylene blue for vasodilatory shock in the intensive care unit: a retrospective, observational study*. BMC Anesthesiol, 2022. **22**(1): p. 199.
165. Cinel, I. and R.P. Dellinger, *Advances in pathogenesis and management of sepsis*. Curr Opin Infect Dis, 2007. **20**(4): p. 345-52.
166. Kopp, M., *Untersuchungen zum Einfluss von Dipeptidylpeptidase-4 Inhibitoren und Glucagon-like-peptide-1-Analoga auf vaskuläre Entzündung, Gefäßfunktion und disseminierte intravasale Gerinnung in septischen Mäusen*. 2017, Johannes Gutenberg Universität Mainz.
167. Tian, L. and T. Jin, *The incretin hormone GLP-1 and mechanisms underlying its secretion*. J Diabetes, 2016. **8**(6): p. 753-765.
168. Holst, J.J., *The incretin system in healthy humans: The role of GIP and GLP-1*. Metabolism, 2019. **96**: p. 46-55.
169. Holst, J.J., et al., *Roles of the Gut in Glucose Homeostasis*. Diabetes Care, 2016. **39**(6): p. 884-92.
170. Gilbert, M.P. and R.E. Pratley, *GLP-1 Analogs and DPP-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes Therapy: Review of Head-to-Head Clinical Trials*. Front Endocrinol (Lausanne), 2020. **11**: p. 178.
171. May, M., *Novo awaits green light for diabetes drug*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(8): p. 682-5.
172. Campbell, J.E. and D.J. Drucker, *Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action*. Cell Metab, 2013. **17**(6): p. 819-837.
173. Zhao, X., et al., *GLP-1 Receptor Agonists: Beyond Their Pancreatic Effects*. Front Endocrinol (Lausanne), 2021. **12**: p. 721135.
174. Kanoski, S.E., M.R. Hayes, and K.P. Skibicka, *GLP-1 and weight loss: unraveling the diverse neural circuitry*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2016. **310**(10): p. R885-95.
175. D'Alessio, D., *Is GLP-1 a hormone: Whether and When?* J Diabetes Investig, 2016. **7 Suppl 1**: p. 50-5.
176. Gong, Q., S. Rajagopalan, and J. Zhong, *Dpp4 inhibition as a therapeutic strategy in cardiometabolic disease: Incretin-dependent and -independent function*. Int J Cardiol, 2015. **197**: p. 170-9.
177. Rohrborn, D., N. Wronkowitz, and J. Eckel, *DPP4 in Diabetes*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 386.
178. Park, D.S., et al., *Role of dipeptidyl peptidase-4 as a potentiator of activin/nodal signaling pathway*. BMB Rep, 2018. **51**(12): p. 636-641.
179. Artasensi, A., et al., *Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs*. Molecules, 2020. **25**(8).
180. Stonehouse, A.H., T. Darsow, and D.G. Maggs, *Incretin-based therapies*. J Diabetes, 2012. **4**(1): p. 55-67.

181. Gentilella, R., et al., *Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in type 2 diabetes treatment: are they all the same?* Diabetes Metab Res Rev, 2019. **35**(1): p. e3070.
182. Malone, J., et al., *Exenatide once weekly for the treatment of type 2 diabetes*. Expert Opin Investig Drugs, 2009. **18**(3): p. 359-67.
183. Aroda, V.R., *A review of GLP-1 receptor agonists: Evolution and advancement, through the lens of randomised controlled trials*. Diabetes Obes Metab, 2018. **20 Suppl 1**: p. 22-33.
184. Jacobsen, L.V., et al., *Liraglutide in Type 2 Diabetes Mellitus: Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. Clin Pharmacokinet, 2016. **55**(6): p. 657-72.
185. Deacon, C.F., *Potential of liraglutide in the treatment of patients with type 2 diabetes*. Vasc Health Risk Manag, 2009. **5**(1): p. 199-211.
186. Gallwitz, B., *Clinical Use of DPP-4 Inhibitors*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 389.
187. Ussher, J.R. and D.J. Drucker, *Cardiovascular biology of the incretin system*. Endocr Rev, 2012. **33**(2): p. 187-215.
188. Drucker, D.J., *The Cardiovascular Biology of Glucagon-like Peptide-1*. Cell Metab, 2016. **24**(1): p. 15-30.
189. Ussher, J.R. and D.J. Drucker, *Cardiovascular actions of incretin-based therapies*. Circ Res, 2014. **114**(11): p. 1788-803.
190. Lorber, D., *GLP-1 receptor agonists: effects on cardiovascular risk reduction*. Cardiovasc Ther, 2013. **31**(4): p. 238-49.
191. Duan, L., et al., *The regulatory role of DPP4 in atherosclerotic disease*. Cardiovasc Diabetol, 2017. **16**(1): p. 76.
192. White, W.B. and W.L. Baker, *Cardiovascular Effects of Incretin-Based Therapies*. Annu Rev Med, 2016. **67**: p. 245-60.
193. Avogaro, A., S. Vigili de Kreutzenberg, and G.P. Fadini, *Cardiovascular actions of GLP-1 and incretin-based pharmacotherapy*. Curr Diab Rep, 2014. **14**(5): p. 483.
194. Zhong, J., X. Rao, and S. Rajagopalan, *An emerging role of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) beyond glucose control: potential implications in cardiovascular disease*. Atherosclerosis, 2013. **226**(2): p. 305-14.
195. Kroller-Schon, S., et al., *Glucose-independent improvement of vascular dysfunction in experimental sepsis by dipeptidyl-peptidase 4 inhibition*. Cardiovasc Res, 2012. **96**(1): p. 140-9.
196. Saraiva, F.K. and A.C. Sposito, *Cardiovascular effects of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor agonists*. Cardiovasc Diabetol, 2014. **13**: p. 142.
197. Gaspari, T., et al., *A GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits endothelial cell dysfunction and vascular adhesion molecule expression in an ApoE^{-/-} mouse model*. Diab Vasc Dis Res, 2011. **8**(2): p. 117-24.
198. Ding, L. and J. Zhang, *Glucagon-like peptide-1 activates endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells*. Acta Pharmacol Sin, 2012. **33**(1): p. 75-81.
199. Fadini, G.P. and A. Avogaro, *Cardiovascular effects of DPP-4 inhibition: beyond GLP-1*. Vascul Pharmacol, 2011. **55**(1-3): p. 10-6.
200. Scheen, A.J., *Cardiovascular Effects of New Oral Glucose-Lowering Agents: DPP-4 and SGLT-2 Inhibitors*. Circ Res, 2018. **122**(10): p. 1439-1459.
201. Lonborg, J., et al., *Exenatide reduces final infarct size in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction and short-duration of ischemia*. Circ Cardiovasc Interv, 2012. **5**(2): p. 288-95.
202. Nauck, M.A., et al., *Cardiovascular Actions and Clinical Outcomes With Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists and Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors*. Circulation, 2017. **136**(9): p. 849-870.
203. Marso, S.P., et al., *Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes*. N Engl J Med, 2016. **375**(4): p. 311-22.
204. Marso, S.P., et al., *Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes*. N Engl J Med, 2016. **375**(19): p. 1834-1844.

205. Green, J.B., et al., *Effect of Sitagliptin on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes*. N Engl J Med, 2015. **373**(3): p. 232-42.
206. Zannad, F., et al., *Heart failure and mortality outcomes in patients with type 2 diabetes taking alogliptin versus placebo in EXAMINE: a multicentre, randomised, double-blind trial*. Lancet, 2015. **385**(9982): p. 2067-76.
207. Rosenstock, J., et al., *Effect of Linagliptin vs Placebo on Major Cardiovascular Events in Adults With Type 2 Diabetes and High Cardiovascular and Renal Risk: The CARMELINA Randomized Clinical Trial*. JAMA, 2019. **321**(1): p. 69-79.
208. Rosenstock, J., et al., *Effect of Linagliptin vs Glimepiride on Major Adverse Cardiovascular Outcomes in Patients With Type 2 Diabetes: The CAROLINA Randomized Clinical Trial*. JAMA, 2019. **322**(12): p. 1155-1166.
209. in *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, th, Editor. 2011: Washington (DC).
210. Rittirsch, D., et al., *Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture*. Nat Protoc, 2009. **4**(1): p. 31-6.
211. Helmstadter, J., et al., *GLP-1 Analog Liraglutide Improves Vascular Function in Polymicrobial Sepsis by Reduction of Oxidative Stress and Inflammation*. Antioxidants (Basel), 2021. **10**(8).
212. Munzel, T., et al., *Evidence for a role of endothelin 1 and protein kinase C in nitroglycerin tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 5244-8.
213. Munzel, T., et al., *Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance*. J Clin Invest, 1995. **95**(1): p. 187-94.
214. Munzel, T., et al., *Hydralazine prevents nitroglycerin tolerance by inhibiting activation of a membrane-bound NADH oxidase. A new action for an old drug*. J Clin Invest, 1996. **98**(6): p. 1465-70.
215. Steven, S., *Der Einfluss des AT1-Rezeptorblockers Telmisartan auf Nitroglycerin-induzierte Nitratintoleranz und endotheliale Dysfunktion*. 2012, Johannes Gutenberg Universität Mainz.
216. Schuff, J.A., *Glukoseunabhängige Verbesserung der vaskulären Dysfunktion bei experimenteller Sepsis durch Linagliptin-Therapie – Nachweis von antioxidativen und entzündungshemmenden Eigenschaften von Linagliptin* 2014, Johannes Gutenberg Universität Mainz: Mainz.
217. Helmstadter, J., et al., *Endothelial GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1) Receptor Mediates Cardiovascular Protection by Liraglutide In Mice With Experimental Arterial Hypertension*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020. **40**(1): p. 145-158.
218. Wang, Q. and M.H. Zou, *Measurement of Reactive Oxygen Species (ROS) and Mitochondrial ROS in AMPK Knockout Mice Blood Vessels*. Methods Mol Biol, 2018. **1732**: p. 507-517.
219. Daiber, A., et al., *Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(1): p. 101-11.
220. Dillon, S., et al., *Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance*. J Clin Invest, 2006. **116**(4): p. 916-28.
221. Fernandes, D.C., R.C. Goncalves, and F.R. Laurindo, *Measurement of Superoxide Production and NADPH Oxidase Activity by HPLC Analysis of Dihydroethidium Oxidation*. Methods Mol Biol, 2017. **1527**: p. 233-249.
222. Snyder, L.R., *HPLC: past and present*. Anal Chem, 2000. **72**(11): p. 412A-420A.
223. Segundo-Val, I.S. and C.S. Sanz-Lozano, *Introduction to the Gene Expression Analysis*. Methods Mol Biol, 2016. **1434**: p. 29-43.
224. Singh, C. and S. Roy-Chowdhuri, *Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances*. Methods Mol Biol, 2016. **1392**: p. 161-76.
225. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
226. Armbrrecht, M. *Application note: Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen*. 2013; Available from:

- https://www.eppendorf.com/product-media/doc/de/59828/Eppendorf_Detection_Application-Note_279_BioPhotometer-D30_Detection-contamination-DNA-protein-samples-photometric-measurements.pdf.
227. Bhadra, S., et al., *One-Enzyme Reverse Transcription qPCR Using Taq DNA Polymerase*. *Biochemistry*, 2020. **59**(49): p. 4638-4645.
 228. Wagner, E.M., *Monitoring gene expression: quantitative real-time rt-PCR*. *Methods Mol Biol*, 2013. **1027**: p. 19-45.
 229. Lin, Q. and Y.P. Di, *Determination and Quantification of Bacterial Virulent Gene Expression Using Quantitative Real-Time PCR*. *Methods Mol Biol*, 2020. **2102**: p. 177-193.
 230. Peirson, S.N. and J.N. Butler, *Quantitative polymerase chain reaction*. *Methods Mol Biol*, 2007. **362**: p. 349-62.
 231. Kizhakeyil, A. and N.K. Verma, *Quantitative Real-Time PCR for Evaluating Transcriptional Changes in T-Lymphocytes*. *Methods Mol Biol*, 2019. **1930**: p. 59-66.
 232. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
 233. Morimoto, S., et al., *Effects of prostaglandin F2 alpha on the mobilization of cytosolic free calcium in vascular smooth muscle cells and on the tension of aortic strips from rats*. *Am J Hypertens*, 1990. **3**(8 Pt 2): p. 241S-244S.
 234. Hillemeier, C., et al., *Intracellular pathways for contraction in gastroesophageal smooth muscle cells*. *Am J Physiol*, 1991. **260**(5 Pt 1): p. G770-5.
 235. Ahsan, H., *3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions*. *Hum Immunol*, 2013. **74**(10): p. 1392-9.
 236. Ulloa, L., et al., *Scientific and clinical challenges in sepsis*. *Curr Pharm Des*, 2009. **15**(16): p. 1918-35.
 237. Dejager, L., et al., *Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?* *Trends Microbiol*, 2011. **19**(4): p. 198-208.
 238. Poli-de-Figueiredo, L.F., et al., *Experimental models of sepsis and their clinical relevance*. *Shock*, 2008. **30 Suppl 1**: p. 53-9.
 239. Freise, H., U.B. Bruckner, and H.U. Spiegel, *Animal models of sepsis*. *J Invest Surg*, 2001. **14**(4): p. 195-212.
 240. Mishra, S.K. and S. Choudhury, *Experimental Protocol for Cecal Ligation and Puncture Model of Polymicrobial Sepsis and Assessment of Vascular Functions in Mice*. *Methods Mol Biol*, 2018. **1717**: p. 161-187.
 241. Hubbard, W.J., et al., *Cecal ligation and puncture*. *Shock*, 2005. **24 Suppl 1**: p. 52-7.
 242. Seemann, S., F. Zohles, and A. Lupp, *Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation*. *J Biomed Sci*, 2017. **24**(1): p. 60.
 243. Dickson, K. and C. Lehmann, *Inflammatory Response to Different Toxins in Experimental Sepsis Models*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(18).
 244. Steven, S., et al., *Time Response of Oxidative/Nitrosative Stress and Inflammation in LPS-Induced Endotoxaemia-A Comparative Study of Mice and Rats*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(10).
 245. Hwang, J.S., et al., *Glucosamine improves survival in a mouse model of sepsis and attenuates sepsis-induced lung injury and inflammation*. *J Biol Chem*, 2019. **294**(2): p. 608-622.
 246. Jiang, W., et al., *Macrophage SAMSN1 protects against sepsis-induced acute lung injury in mice*. *Redox Biol*, 2022. **56**: p. 102432.
 247. Steven, S.D., A., *ROS und Peroxynitrit Bildung im Darm und inneren Organen mittels IVIS Imaging mit L-012 als Chemilumineszenzfarbstoff*.
 248. Hotchkiss, R.S., et al., *Sepsis and septic shock*. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. **2**: p. 16045.
 249. Greco, E., et al., *Platelets and Multi-Organ Failure in Sepsis*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(10).
 250. Toscano, M.G., D. Ganea, and A.M. Gamero, *Cecal ligation puncture procedure*. *J Vis Exp*, 2011(51).
 251. Torres, M.B. and A. De Maio, *An exaggerated inflammatory response after CLP correlates with a negative outcome*. *J Surg Res*, 2005. **125**(1): p. 88-93.

252. Hua, T., et al., *Micro- and Macrocirculatory Changes During Sepsis and Septic Shock in a Rat Model*. Shock, 2018. **49**(5): p. 591-595.
253. Zhai, X., et al., *Lactate as a Potential Biomarker of Sepsis in a Rat Cecal Ligation and Puncture Model*. Mediators Inflamm, 2018. **2018**: p. 8352727.
254. Deng, D., et al., *Systematic investigation on the turning point of over-inflammation to immunosuppression in CLP mice model and their characteristics*. Int Immunopharmacol, 2017. **42**: p. 49-58.
255. Hollenberg, S.M., et al., *Increased microvascular reactivity and improved mortality in septic mice lacking inducible nitric oxide synthase*. Circ Res, 2000. **86**(7): p. 774-8.
256. Kirkeboen, K.A. and O.A. Strand, *The role of nitric oxide in sepsis--an overview*. Acta Anaesthesiol Scand, 1999. **43**(3): p. 275-88.
257. Correa, P.B., et al., *Participation of iNOS-derived NO in hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis*. J Neuroimmunol, 2007. **183**(1-2): p. 17-25.
258. Benjamim, C.F., et al., *Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils*. Infect Immun, 2002. **70**(7): p. 3602-10.
259. Zongze, Z., et al., *Protective effects of remifentanil on septic mice*. Mol Biol Rep, 2010. **37**(6): p. 2803-8.
260. Song, G.Y., et al., *Mechanism of immune dysfunction in sepsis: inducible nitric oxide-mediated alterations in p38 MAPK activation*. J Trauma, 2002. **53**(2): p. 276-82; discussion 282-3.
261. Lv, D., et al., *Protective Effect of Sirtuin 3 on CLP-Induced Endothelial Dysfunction of Early Sepsis by Inhibiting NF-kappaB and NLRP3 Signaling Pathways*. Inflammation, 2021. **44**(5): p. 1782-1792.
262. Mantzaris, K., V. Tsolaki, and E. Zakyntinos, *Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 5985209.
263. Bogdan, C., *Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update*. Trends Immunol, 2015. **36**(3): p. 161-78.
264. Garcia-Sanchez, A., A.G. Miranda-Diaz, and E.G. Cardona-Munoz, *The Role of Oxidative Stress in Physiopathology and Pharmacological Treatment with Pro- and Antioxidant Properties in Chronic Diseases*. Oxid Med Cell Longev, 2020. **2020**: p. 2082145.
265. Zhou, G., et al., *Ascorbate protects against vascular leakage in cecal ligation and puncture-induced septic peritonitis*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012. **302**(4): p. R409-16.
266. Yu, H.P., et al., *Propofol improves endothelial dysfunction and attenuates vascular superoxide production in septic rats*. Crit Care Med, 2006. **34**(2): p. 453-60.
267. Kadoi, Y. and F. Goto, *Selective inducible nitric oxide inhibition can restore hemodynamics, but does not improve neurological dysfunction in experimentally-induced septic shock in rats*. Anesth Analg, 2004. **99**(1): p. 212-220.
268. Nishina, K., et al., *ONO1714, a new inducible nitric oxide synthase inhibitor, attenuates sepsis-induced diaphragmatic dysfunction in hamsters*. Anesth Analg, 2001. **92**(4): p. 959-66.
269. Giustina, A.D., et al., *Dimethyl Fumarate Modulates Oxidative Stress and Inflammation in Organs After Sepsis in Rats*. Inflammation, 2018. **41**(1): p. 315-327.
270. Amorim, M.R., et al., *Autonomic Disbalance During Systemic Inflammation is Associated with Oxidative Stress Changes in Sepsis Survivor Rats*. Inflammation, 2022.
271. Jiang, J., et al., *Targeting NOX4 alleviates sepsis-induced acute lung injury via attenuation of redox-sensitive activation of CaMKII/ERK1/2/MLCK and endothelial cell barrier dysfunction*. Redox Biol, 2020. **36**: p. 101638.
272. Pathak, E. and P.R. Mayeux, *In vitro model of sepsis-induced renal epithelial reactive nitrogen species generation*. Toxicol Sci, 2010. **115**(2): p. 475-81.
273. Haileselassie, B., et al., *Myocardial oxidative stress correlates with left ventricular dysfunction on strain echocardiography in a rodent model of sepsis*. Intensive Care Med Exp, 2017. **5**(1): p. 21.

274. Zhou, J.Q., et al., *Protective Effect of Citrulline on the Hearts of Rats with Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 2574501.
275. Coletta, C., et al., *Endothelial dysfunction is a potential contributor to multiple organ failure and mortality in aged mice subjected to septic shock: preclinical studies in a murine model of cecal ligation and puncture*. Crit Care, 2014. **18**(5): p. 511.
276. Zhang, X., et al., *Endothelial HSPA12B Exerts Protection Against Sepsis-Induced Severe Cardiomyopathy via Suppression of Adhesion Molecule Expression by miR-126*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 566.
277. Nauck, M.A., et al., *GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes - state-of-the-art*. Mol Metab, 2021. **46**: p. 101102.
278. Pober, J.S. and W.C. Sessa, *Evolving functions of endothelial cells in inflammation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(10): p. 803-15.
279. Shirazi, L.F., et al., *Role of Inflammation in Heart Failure*. Curr Atheroscler Rep, 2017. **19**(6): p. 27.
280. Dutka, M., et al., *Various aspects of inflammation in heart failure*. Heart Fail Rev, 2020. **25**(3): p. 537-548.
281. Guzik, T.J. and R.M. Touyz, *Oxidative Stress, Inflammation, and Vascular Aging in Hypertension*. Hypertension, 2017. **70**(4): p. 660-667.
282. Agita, A. and M.T. Alsagaff, *Inflammation, Immunity, and Hypertension*. Acta Med Indones, 2017. **49**(2): p. 158-165.
283. Lontchi-Yimagou, E., et al., *Diabetes mellitus and inflammation*. Curr Diab Rep, 2013. **13**(3): p. 435-44.
284. Mesquita, T., Y.N. Lin, and A. Ibrahim, *Chronic low-grade inflammation in heart failure with preserved ejection fraction*. Aging Cell, 2021. **20**(9): p. e13453.
285. Steven, S., et al., *Vascular Inflammation and Oxidative Stress: Major Triggers for Cardiovascular Disease*. Oxid Med Cell Longev, 2019. **2019**: p. 7092151.
286. Solmaz, V., et al., *Exenatide, a GLP-1 analog, has healing effects on LPS-induced autism model: Inflammation, oxidative stress, gliosis, cerebral GABA, and serotonin interactions*. Int J Dev Neurosci, 2020. **80**(7): p. 601-612.
287. Rakipovski, G., et al., *The GLP-1 Analogs Liraglutide and Semaglutide Reduce Atherosclerosis in ApoE(-/-) and LDLr(-/-) Mice by a Mechanism That Includes Inflammatory Pathways*. JACC Basic Transl Sci, 2018. **3**(6): p. 844-857.
288. Xiao, L. and D.G. Harrison, *Inflammation in Hypertension*. Can J Cardiol, 2020. **36**(5): p. 635-647.
289. El Assar, M., J. Angulo, and L. Rodriguez-Manas, *Oxidative stress and vascular inflammation in aging*. Free Radic Biol Med, 2013. **65**: p. 380-401.
290. Petrie, J.R., T.J. Guzik, and R.M. Touyz, *Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms*. Can J Cardiol, 2018. **34**(5): p. 575-584.
291. Cheng, C.K., et al., *A GLP-1 analog lowers ER stress and enhances protein folding to ameliorate homocysteine-induced endothelial dysfunction*. Acta Pharmacol Sin, 2021. **42**(10): p. 1598-1609.
292. Shiraki, A., et al., *The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF-alpha-induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells*. Atherosclerosis, 2012. **221**(2): p. 375-82.
293. Steven, S., T. Munzel, and A. Daiber, *Exploiting the Pleiotropic Antioxidant Effects of Established Drugs in Cardiovascular Disease*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(8): p. 18185-223.
294. Cai, X., et al., *GLP-1 treatment protects endothelial cells from oxidative stress-induced autophagy and endothelial dysfunction*. Int J Biol Sci, 2018. **14**(12): p. 1696-1708.
295. Huang, J., et al., *Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) signaling ameliorates dysfunctional immunity in COPD patients*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2018. **13**: p. 3191-3202.

296. Mayendraraj, A., M.M. Rosenkilde, and L.S. Gasbjerg, *GLP-1 and GIP receptor signaling in beta cells - A review of receptor interactions and co-stimulation*. *Peptides*, 2022. **151**: p. 170749.
297. Jones, B., et al., *Control of insulin secretion by GLP-1*. *Peptides*, 2018. **100**: p. 75-84.
298. Doyle, M.E. and J.M. Egan, *Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas*. *Pharmacol Ther*, 2007. **113**(3): p. 546-93.
299. Que, Q., et al., *The GLP-1 agonist, liraglutide, ameliorates inflammation through the activation of the PKA/CREB pathway in a rat model of knee osteoarthritis*. *J Inflamm (Lond)*, 2019. **16**: p. 13.
300. Wu, A.Y. and R.S. Peebles, *The GLP-1 receptor in airway inflammation in asthma: a promising novel target?* *Expert Rev Clin Immunol*, 2021. **17**(10): p. 1053-1057.
301. Winiarska, A., et al., *Inflammation and Oxidative Stress in Diabetic Kidney Disease: The Targets for SGLT2 Inhibitors and GLP-1 Receptor Agonists*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(19).
302. Chang, S.Y., et al., *Exendin-4 inhibits iNOS expression at the protein level in LPS-stimulated Raw264.7 macrophage by the activation of cAMP/PKA pathway*. *J Cell Biochem*, 2013. **114**(4): p. 844-53.
303. Rowlands, J., et al., *Pleiotropic Effects of GLP-1 and Analogs on Cell Signaling, Metabolism, and Function*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. **9**: p. 672.
304. Joffre, J. and J. Hellman, *Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Sepsis and Acute Inflammation*. *Antioxid Redox Signal*, 2021. **35**(15): p. 1291-1307.
305. Aydin, E., et al., *Evaluation of the effect of intraperitoneal etanercept administration on oxidative stress and inflammation indicators in the kidney and blood of experimental sepsis-induced rats*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2020. **53**: p. e20200016.
306. Tomas, A., B. Jones, and C. Leech, *New Insights into Beta-Cell GLP-1 Receptor and cAMP Signaling*. *J Mol Biol*, 2020. **432**(5): p. 1347-1366.
307. Kumar, V., *Pulmonary Innate Immune Response Determines the Outcome of Inflammation During Pneumonia and Sepsis-Associated Acute Lung Injury*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 1722.
308. Park, I., et al., *Neutrophils disturb pulmonary microcirculation in sepsis-induced acute lung injury*. *Eur Respir J*, 2019. **53**(3).
309. Tomita, K., et al., *Vascular endothelial growth factor contributes to lung vascular hyperpermeability in sepsis-associated acute lung injury*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2020. **393**(12): p. 2365-2374.
310. Fandino, J., et al., *GLP-1 receptor agonist ameliorates experimental lung fibrosis*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 18091.
311. Lee, W., et al., *Trimeric PEG-Conjugated Exendin-4 for the Treatment of Sepsis*. *Biomacromolecules*, 2016. **17**(3): p. 1160-9.
312. Danielski, L.G., et al., *Brain Barrier Breakdown as a Cause and Consequence of Neuroinflammation in Sepsis*. *Mol Neurobiol*, 2018. **55**(2): p. 1045-1053.
313. Barichello, T., et al., *The blood-brain barrier dysfunction in sepsis*. *Tissue Barriers*, 2021. **9**(1): p. 1840912.
314. Czempik, P.F., M.P. Pluta, and L.J. Krzych, *Sepsis-Associated Brain Dysfunction: A Review of Current Literature*. *Int J Environ Res Public Health*, 2020. **17**(16).
315. Leone, M., et al., *[Activation of adhesion molecules in patients with septic shock]*. *Ann Fr Anesth Reanim*, 2003. **22**(8): p. 721-9.
316. Mosterd, C.M., P. Bjornstad, and D.H. van Raalte, *Nephroprotective effects of GLP-1 receptor agonists: where do we stand?* *J Nephrol*, 2020. **33**(5): p. 965-975.
317. Poston, J.T. and J.L. Koyner, *Sepsis associated acute kidney injury*. *BMJ*, 2019. **364**: p. k4891.
318. Gomez, H. and J.A. Kellum, *Sepsis-induced acute kidney injury*. *Curr Opin Crit Care*, 2016. **22**(6): p. 546-553.

319. Nincevic, V., et al., *Renal Benefits of SGLT 2 Inhibitors and GLP-1 Receptor Agonists: Evidence Supporting a Paradigm Shift in the Medical Management of Type 2 Diabetes*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(23).
320. Alicic, R.Z., et al., *Incretin drugs in diabetic kidney disease: biological mechanisms and clinical evidence*. Nat Rev Nephrol, 2021. **17**(4): p. 227-244.
321. Woznica, E.A., et al., *Liver dysfunction in sepsis*. Adv Clin Exp Med, 2018. **27**(4): p. 547-551.
322. Sun, J., et al., *Gut-liver crosstalk in sepsis-induced liver injury*. Crit Care, 2020. **24**(1): p. 614.
323. Yan, J., S. Li, and S. Li, *The role of the liver in sepsis*. Int Rev Immunol, 2014. **33**(6): p. 498-510.
324. Milani, L., et al., *The GLP-1 analog liraglutide attenuates acute liver injury in mice*. Ann Hepatol, 2019. **18**(6): p. 918-928.
325. Armstrong, M.J., et al., *Glucagon-like peptide 1 decreases lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis*. J Hepatol, 2016. **64**(2): p. 399-408.
326. Bedet, A., et al., *Mechanisms of Thrombocytopenia During Septic Shock: A Multiplex Cluster Analysis of Endogenous Sepsis Mediators*. Shock, 2018. **49**(6): p. 641-648.
327. Iba, T., et al., *Diagnosis and management of sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation*. J Thromb Haemost, 2019. **17**(11): p. 1989-1994.
328. Alverdy, J.C., R. Keskey, and R. Thewissen, *Can the Cecal Ligation and Puncture Model Be Repurposed To Better Inform Therapy in Human Sepsis?* Infect Immun, 2020. **88**(9).
329. Mutlak, H., et al., *Cecum ligation and dissection: a novel modified mouse sepsis model*. J Surg Res, 2013. **183**(1): p. 321-9.
330. Rohrig, B., et al., *Types of study in medical research: part 3 of a series on evaluation of scientific publications*. Dtsch Arztebl Int, 2009. **106**(15): p. 262-8.

Danksagung

Danksagung

xxx

Curriculum Vitae

Curriculum Vitae

xxx

Wissenschaftliche Tätigkeit

Wissenschaftliche Hilfskraft	2015-2016	Institut für Physiologische Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
	2017-2019	Zentrum für Kardiologie unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. T. Münzel, Forschungsgruppe Molekulare Kardiologie unter Univ.-Prof. Dr. rer. nat. et med. habil. A. Daiber und Priv.-Doz. Dr. S. Steven im Rahmen der Promotion

Tagungsabstracts

Cardiovascular benefits of GLP-1 (Liraglutide) treatment in experimental arterial hypertension are mediated by the endothelial GLP-1 receptor

S. Steven, J. Helmstädter, K. Filippou, F. Pawelke, K. Frenis, K. Vujacic Mirski, S. Kalinovic, S. Kröller-Schön, M. Oelze, T. Münzel, A. Daiber (Mainz)

DKG Mannheim 2019, Freie Vorträge

Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) improves endothelial dysfunction and vascular inflammation in polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP)

S. Steven, J. Helmstädter, F. Pawelke, K. Filippou, K. Frenis, S. Kalinovic, K. Vujacic-Mirski, S. Kröller-Schön, M. Oelze, T. Münzel, A. Daiber (Mainz)

DKG Mannheim 2019, Young Investigator Award

Präsentationen

The endothelial GLP-1 receptor confers cardiovascular protection in experimental arterial hypertension.

Helmstädter J, Frenis K, Filippou K, Grill A, Dib M, Kalinovic S, Pawelke F, Kus K, Kröller-Schön S, Oelze M, Chlopicki S, Schuppan D, Wenzel P, Ruf W, Drucker DJ, Münzel T, Daiber A, Steven S

6th Science Day der TransMed Graduate School der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2019. (Best Presentation Award)

Publikationen

Endothelial GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1) Receptor Mediates Cardiovascular Protection by Liraglutide In Mice With Experimental Arterial Hypertension

J. Helmstädter, K. Frenis, K. Filippou, A. Grill, M. Dib, S. Kalinovic, F. Pawelke, K. Kus, S. Kröller-Schön, M. Oelze, S. Chlopicki, D. Schuppan, P. Wenzel, W. Ruf, D. J Drucker, T. Münzel, A. Daiber, S. Steven
In **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology** (Volume 40, Issue 01, Januar 2020)

GLP-1 Analog Liraglutide Improves Vascular Function in Polymicrobial Sepsis by Reduction of Oxidative Stress and Inflammation

J. Helmstädter, K. F. Aust, L. Küster, K. Frenis, K. Filippou, K. Vujacic-Mirski, S. Tsohataridis, S. Kalinovic, S. Kröller-Schön, M. Oelze, M. Bosmann, T. Münzel, A. Daiber, S. Steven

In **Antioxidants** (Volume 10, Issue 8, Juli 2021)