

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III des  
Universitätsklinikums Halle (Saale)  
Direktor: Prof. Dr. med. Karl Werdan

**„Einfluss des PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon und von Ranolazin  
auf den septischen Schock am Tiermodell“**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Tina Putzschke, geb. Streufert  
geboren am 09.02.1988 in Halle (Saale)

Betreuer: Prof. Dr. med. Michael Buerke

Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Buerke  
Prof. Dr. med. Matthias Girndt  
Prof. Dr. med. Markus F. Neurath

Eröffnung am 16.01.2014

Verteidigung am 27.10.2014

*Für meine Eltern*

## **Referat**

Da der septische Schock trotz moderner Medizin noch immer eine sehr hohe Letalität von über 50 % ausweist, besteht ein enormer Forschungsbedarf nach neuen Arzneimitteln, die zu einer Verbesserung des Überlebens führen könnten. Im Hinblick darauf wurden in dieser Studie zwei verschiedene Medikamente getestet. Für die Glitazone gibt es bereits Studien, die einen protektiven Effekt im septischen Schock über die Inhibition von NF- $\kappa$ B vermuten lassen. Im Gegensatz zu den meisten Studien wurde diese bezüglich der Auswirkung einer Pioglitazon-Vorbehandlung auf die Organe Herz, Lunge, Leber und Niere ausgeweitet. Ranolazin ist bisher Zusatztherapeutikum bei der chronischen Angina pectoris, da es den späten Natrium-Einstrom in die Myokardzelle inhibiert und damit die Relaxation des Herzmuskels verbessert. Aktuell existieren noch keine Studien über einen potentiell kardioprotektiven Effekt im septischen Schock aufgrund einer möglichen Verringerung der Kardiomyopathie.

Die vorliegende, tierexperimentelle Studie wurde an einem Septic Shock Modell an Ratten durchgeführt. Dazu wurden die Versuchstiere in drei Gruppen eingeteilt: eine Sham-Gruppe, eine LPS Shock + Vehicle-Gruppe sowie eine LPS Shock + Medikament-Gruppe. Das jeweilige Medikament wurde einen Tag vor der LPS-Gabe intraperitoneal verabreicht. Am Versuchstag wurden die Tiere mittels Pentobarbital i.p. betäubt und durch LPS in einen septischen Schock versetzt. Nach einem maximalen Beobachtungszeitraum von vier Stunden oder nach Versterben der Tiere erfolgte die Entnahme der Schockorgane. Von diesen Geweben wurden Western Blots und histologische Präparate angefertigt sowie die Myeloperoxidaseaktivität bestimmt.

Für Pioglitazon ergab sich eine Verdopplung der Überlebenszeit, wenn die Tiere vor LPS-Gabe mit diesem Medikament vorbehandelt wurden. In den histologischen Präparaten war in allen vier Organen auch eine geringere Schädigung des Gewebes sichtbar. Die Analyse der MPO-Aktivität und der Proteinexpression zeigten dagegen nur einen Trend und lassen einen protektiven Effekt von Pioglitazon im septischen Schock vermuten. Diese Ergebnisse sollten in künftigen Studien näher untersucht und die Anwendbarkeit von Pioglitazon auch bei anderen Erregern getestet werden, um einen möglichen klinischen Einsatz zu verifizieren. Die Gabe von Ranolazin dagegen hatte weder einen positiven Einfluss auf das Überleben noch besserten sich die Entzündungsparameter. Die Gewebeschädigung konnte lediglich minimal verringert werden. Insgesamt ließ sich kein protektiver Effekt von Ranolazin im septischen Schock nachweisen.

Putzschke, Tina: Einfluss des PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon und von Ranolazin auf den septischen Schock am Tiermodell, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 78 Seiten, 2014

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Epidemiologie der Sepsis</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Septischer Schock</b> .....	<b>2</b>
1.2.1 Allgemeine Definition der Sepsis und des Septischen Schockes.....	2
1.2.2 Die Suche nach dem septischen Fokus.....	3
1.2.3 Pathophysiologie der Sepsis.....	4
1.2.4 Die zwei Phasen der Sepsis.....	6
1.2.5 Hämodynamische Veränderungen der Sepsis.....	6
1.2.6 Das Multiorgan dysfunktionssyndrom (MODS).....	7
<b>1.3 Therapie der Sepsis</b> .....	<b>9</b>
<b>1.4 Medikamentenwahl</b> .....	<b>12</b>
1.4.1 Pioglitazon.....	12
1.4.2 Ranolazin.....	14
<b>2. Zielstellung</b> .....	<b>17</b>
<b>3. Materialien</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1 Septic Shock Modell</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2 Hämatokritbestimmung</b> .....	<b>19</b>
<b>3.3 Histologie</b> .....	<b>19</b>
<b>3.4 Western Blots und Myeloperoxidase-Bestimmung</b> .....	<b>19</b>
<b>3.5 Statistische Auswertung und Analyseprogramme</b> .....	<b>20</b>
<b>4. Methoden</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1 Septic Shock Modell</b> .....	<b>21</b>
4.1.1 Versuchstiere und Einteilung der Gruppen.....	21
4.1.2 Durchführung.....	22
4.1.3 Hämatokritbestimmung.....	23
<b>4.2 Myeloperoxidaseaktivität</b> .....	<b>23</b>
<b>4.3 Histologie</b> .....	<b>24</b>
<b>4.4 Bestimmung der Proteinexpression mittels Western Blot</b> .....	<b>25</b>
4.4.1 Proteinextraktion.....	25
4.4.2 Proteinbestimmung nach Popov.....	25
4.4.3 Prinzipien des Western Blots.....	26
4.4.4 Gelelektrophorese.....	26
4.4.5 Western Blot.....	27
4.4.6 Nachweis spezifischer Antigene.....	27
<b>4.5 Statistische Auswertung</b> .....	<b>28</b>

<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>
<b>5.1 Pioglitazon</b> .....	<b>30</b>
5.1.1 Effekte von Pioglitazon im Septic Shock Modell .....	30
5.1.2 Effekte von Pioglitazon auf die Myeloperoxidaseaktivität .....	34
5.1.3 Histologische Veränderungen unter dem Einfluss von Pioglitazon .....	35
5.1.4 Effekte von Pioglitazon auf die Proteinexpression in den Schockorganen.....	38
<b>5.2 Ranolazin</b> .....	<b>41</b>
5.2.1 Effekte von Ranolazin im Septic Shock Modell.....	41
5.2.2 Effekte von Ranolazin auf die Myeloperoxidasaktivität.....	45
5.2.3 Histologische Veränderungen unter dem Einfluss von Ranolazin .....	46
5.2.4 Effekte von Ranolazin auf die Proteinexpression in den Schockorganen.....	50
<b>6. Diskussion</b> .....	<b>52</b>
<b>6.1 Pioglitazon</b> .....	<b>52</b>
6.1.1 Effekte von Pioglitazon im Septic Shock Modell .....	52
6.1.2 Effekte von Pioglitazon auf die Myeloperoxidaseaktivität.....	57
6.1.3 Histologische Veränderungen unter dem Einfluss von Pioglitazon .....	58
6.1.4 Effekte von Pioglitazon auf die Proteinexpression im septischen Schock.....	62
<b>6.2 Ranolazin</b> .....	<b>64</b>
6.2.1 Effekte von Ranolazin auf das Überleben und die Hämodynamik im Septic Shock Modell.....	64
6.2.2 Effekt von Ranolazin auf die Myeloperoxidaseaktivität und die histologischen Veränderungen im septischen Schock.....	66
6.2.3 Effekt von Ranolazin auf die Proteinexpression im septischen Schock.....	67
<b>6.3 Limitationen der Studien</b> .....	<b>68</b>
<b>6.4 Ausblick</b> .....	<b>69</b>
<b>7. Zusammenfassung</b> .....	<b>70</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>71</b>
<b>9. Thesen</b> .....	<b>78</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Ampere
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AKI, ANV	acute kidney injury; akutes Nierenversagen
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ALI	acute lung injury
ARDS	acute respiratory distress syndrome
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveolarlavage
Bcl	B-cell lymphoma
BMI	Body-Mass-Index
BPI	bactericidal permeability-increasing protein
bpm	beats per minute, Schläge pro Minute
C5 <sub>a</sub>	aktivierter Komplementfaktor 5
ca.	circa
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
CBF	zerebraler Blutfluss
CDF	kardiodepressiver Peptidfaktor
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CK	Kreatinkinase
CLP	Caecum-Ligation und Punktion
COX	Cyclooxygenase
DBP	diastolischer Blutdruck
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DNA, DNS	Desoxyribonucleinsäure
DSG	Deutsche Sepsis Gesellschaft
EF	Ejektionsfraktion
EK	Erythrozytenkonzentrat
EKG	Elektrokardiogramm
EMA	European Medicines Agency
ENaC	epithelialer Natriumkanal
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FFP	Fresh Frozen Plasma
F <sub>i</sub> O <sub>2</sub>	Sauerstoffanteil der Atemluft
g	Gramm
GBA	Gemeinsamer Bundesausschuss
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GKV	Gesetzliche Krankenversicherung
GLUT	Glucose-Transporter
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
HAES	Hydroxyethylstärke
HbA <sub>1c</sub>	glykiertes Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HKT	Hämatokrit
HMGB1	high-mobility group box1
HSP	Hitzeschockprotein
i.a.	intraarteriell
i.c.	intracardial
i.p.	intraperitoneal
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
Ig	Immunglobulin
IKK	IκB-Kinase-Komplexe

IL	Interleukin
INF- $\gamma$	Interferon $\gamma$
iNOS	induzierbare NO-Synthase
I $\kappa$ B $\alpha$	Inhibitor $\kappa$ B $\alpha$
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
LBP	lipopolysaccharide-binding-protein
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MABP	mittlerer arterieller Blutdruck
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MARS	mixed antagonistic response syndrome
mCD	membrane Cluster of Differentiation
MD 2	myeloid differentiation protein 2
MDS	myocardial depressant substance
$\mu$ l	Mikroliter
mg	Milligramm
MIF	Makrophagenmigrations-inhibierende-Faktor
MMP	Matrix-Metallproteinasen
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Non-ST-Elevation Myocardial Infarction
NYHA	New York Heart Association
p <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
p <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PEEP	positive endexpiratory pressure
PGI	Prostaglandin I
PPAR $\gamma$	Peroxisomal Proliferator Activated Receptors
PRI	Pressure-Rate-Index
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SAPS	simplified acute physiological score
SBP	systolischer Blutdruck
sCD	soluble Cluster of Differentiation
ScvO <sub>2</sub>	zentralvenöse Sauerstoffsättigung
SepNet	Kompetenznetz Sepsis
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
spp.	species
TH	T-Helferzelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRALI	transfusion-related acute lung injury
U/g	Units pro Gramm
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## 1. Einleitung

### 1.1 Epidemiologie der Sepsis

Die schwere Sepsis und der septische Schock zählen zu den Haupttodesursachen auf Intensivstationen und weisen trotz moderner Medizin eine extrem hohe Letalität auf. Daher ist ihre Bedeutung für den medizinischen und gesundheitsökonomischen Alltag unverändert hoch.

In den USA wird die Inzidenz der schweren Sepsis auf Grundlage einer retrospektiven Studie der Krankenhausentlassungsdaten von sieben amerikanischen Bundesstaaten von Angus et al. aus dem Jahr 1995 auf ca. 750.000 Fälle (300 Fälle auf 100.000 Einwohner) geschätzt [Angus et al., 2001]. Martin et al. führten für die Jahre 1979 bis 2000 eine retrospektive Analyse über die Sepsishäufigkeit in den USA durch. Neben der Erkenntnis, dass Männer häufiger an einer Sepsis erkrankten als Frauen, stellten sie einen enormen Anstieg der Häufigkeit fest. Während 1979 noch 82,7 Fälle pro 100.000 Einwohner verzeichnet wurden, waren es 2000 240,4 Fälle pro 100.000 Einwohner. Das entspricht einem mittleren jährlichen Anstieg der Inzidenz von 8,7% [Martin et al., 2003].

Nachdem die Datenlage in Deutschland lange unklar war, konnten 2003 erstmals mit Hilfe von SepNet Erkenntnisse zur Epidemiologie der Sepsis gewonnen werden. Diese prospektive Querschnittsstudie erfasste die Ein-Tagesprävalenz auf 454 Intensivstationen von 310 deutschen Krankenhäusern. Von den insgesamt 3.877 Patienten litten 12,4% an einer Sepsis und 11,0% an einer schweren Sepsis inklusive septischem Schock. Daraus konnte eine Inzidenz für die schwere Sepsis von 76 bis 110 Fälle pro 100.000 Einwohner in Deutschland ermittelt werden [Engel et al., 2007]. Desweiteren ergab sich in dieser Studie eine Krankenhaussterblichkeit von 55% bei Patienten mit schwerer Sepsis [Engel et al., 2007]. Diese hohe Sterblichkeit bestätigt sich auch im internationalen Vergleich wie Tab. 1 zeigt. Mit 60.000 Patienten, die in Deutschland jährlich an einer schweren Sepsis versterben, ist diese Erkrankung die dritthäufigste Todesursache nach der koronaren Herzkrankheit und dem Myokardinfarkt [Moerer et al., 2009].

**Tab. 1:** Letalität der Sepsis, schweren Sepsis und des septischen Schocks im internationalen Vergleich in Prozent [Engel et al., 2007, Muckart und Bhagwanjee, 1997, Salvo et al., 1995, Ponce de Leon-Rosales et al., 2000, Silva et al., 2004]

	<b>Sepsis</b>	<b>Schwere Sepsis</b>	<b>Septischer Schock</b>
Deutschland		48,4	55,2
USA	10	18	53
Italien	36	52	82
Mexiko		45,7	55,6
Brasilien		47	52

Boussekey et al. veröffentlichten 2010 aus ihrer prospektiven Studie mit einem Betrachtungszeitraum über fünf Jahre und mit 320 Patienten sechs signifikante, unabhängige Variablen, die mit einer erhöhten Mortalität einhergingen: Beatmungspflichtigkeit, SAPS II > 60, chronischer Alkoholabusus, Alter über 65 Jahre, Prothrombin Ratio (PR) < 40% und  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 150$ . Mit Hilfe dieser Variablen war es schnell möglich Patienten im septischen Schock herauszufiltern, die ein hohes Mortalitätsrisiko besaßen [Boussekey et al., 2010].

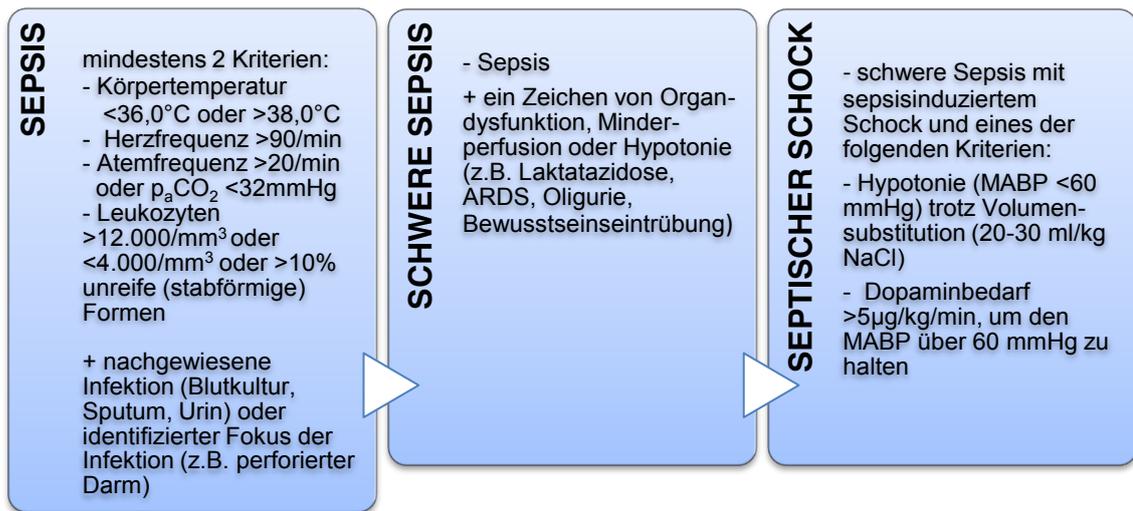
Die Intensivtherapie verbraucht 13% der Gesamtausgaben des Gesundheitssystems und stellt mit ca. 5,5 Milliarden Euro einen enormen Kostenfaktor dar [Moerer et al., 2009]. Die intensivmedizinische Betreuung der an einer schweren Sepsis erkrankten Patienten trägt zu einem wesentlichen Anteil zu diesen hohen Kosten bei. Laut einer retrospektiven Studie von Moerer et al. aus dem Jahr 2002 an drei deutschen Universitätskliniken belaufen sich die mittleren Behandlungskosten pro Patient auf 23.297 Euro (mittlere Tageskosten: 1318 Euro) bei einer mittleren Liegedauer auf der Intensivstation von 16,6 Tagen. Auffällig ist auch, dass Patienten, die nicht überlebten, deutlich höhere Kosten verursachten als überlebende Patienten (25.446 Euro vs. 21.984 Euro). 40% der Kosten entstanden allein durch Medikamente und weitere 36% durch pflegerisches und ärztliches Personal [Moerer et al, 2002]. Im Hinblick auf neue, aber auch kostenintensive Medikamente ist in den nächsten Jahren mit einem weiteren Anstieg der Kosten für die Behandlung der Sepsis zu rechnen.

## **1.2 Septischer Schock**

### **1.2.1 Allgemeine Definition der Sepsis und des Septischen Schockes**

Die Definition der Sepsis hat sich stets gewandelt und wurde immer wieder angepasst. Dennoch hat sich an der Kernaussage von Schottmüller aus dem Jahr 1914 nicht viel geändert: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ [Schottmüller, 1914]

Werdan et al. unterscheiden heute fünf Grundpfeiler des septischen Prozesses: der septische Fokus, die Invasion pathogener Keime, die Mediatorexplosion, die Zellschädigung sowie die Multiorgandysfunktion und Multiorganschädigung [Schuster und Müller-Werdan, 2005a]. Nach den Empfehlungen der amerikanischen Konsensuskonferenz zur Definition von Sepsis und Organversagen 1991 wird die Sepsis definiert als eine systemisch-inflammatorische Reaktion auf eine gesicherte infektiöse Ursache [Bone et al., 1992]. Die folgende Übersicht fasst die wichtigsten Merkmale zusammen:



**Abb. 1:** Unterschiede zwischen Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock nach den Empfehlungen der amerikanischen Konsensuskonferenz zur Definition von Sepsis und Organversagen von 1991 [Bone et al., 1992]

### 1.2.2 Die Suche nach dem septischen Fokus

Obwohl das Keimspektrum der Sepsis breit gefächert ist, stellen die bakteriellen Infektionen mit fast 75% den größten Anteil dar. Weitere häufige Erreger sind Pilze und intraabdominelle Anaerobier, wobei auch polymikrobielle Infektionen in 11,1% der Fälle Auslöser der Sepsis sind [Sands et al., 1997, Hauber und Zabel, 2009]. Zum Nachweis der Erreger sollte unbedingt vor Gabe von Antibiotika die Abnahme von aeroben und anaeroben Blutkulturen erfolgen. Desweiteren können histo- oder zytopathologische Untersuchungen infizierter Gewebe sinnvoll sein. Entscheidend für den Schweregrad der Sepsis sind prädisponierende Erkrankungen des Patienten, die eine abgeschwächte Abwehrlage zur Folge haben.

Ebenso wie das Keimspektrum kann auch der Fokus der Sepsis verschieden sein. Häufig sind u.a. katheter- und fremdkörperassoziierte Infektionen. Besonders das längere Liegen eines zentralen Venenkatheters oder Dauerkatheters sollte als mögliche Ursache herangezogen werden. Patienten auf Intensivstationen sind zudem durch ventilator-assoziierte Pneumonien nach mindestens 48 Stunden Beatmung gefährdet. Davon müssen Pneumonien unterschieden werden, die eine Beatmung zur Folge haben, wie z.B. nosokomial oder ambulant erworbene Pneumonien. Diagnostisch entscheidend sind „neuaufgetretene Infiltrate im Röntgen-Thorax, eine Leukozytose oder Leukopenie und purulentes Trachealsekret“ [Reinhart et al., 2010]. Weiterhin können Wundinfektionen infolge eines chirurgischen Eingriffs sowie intraabdominelle Infektionen Fokus eines septischen Prozesses sein. Immunsupprimierte Patienten und solche mit langer Antibiotikabehandlung unterstehen dem zusätzlichen Risiko einer Candida-Sepsis, die jedoch im Vergleich zu den bakteriellen Infektionen nur einen kleinen Anteil ausmacht.

### 1.2.3 Pathophysiologie der Sepsis

#### a) Invasion und primäre Mediatoren

Da sich diese Arbeit mit der Lipopolysaccharid-induzierten Sepsis beschäftigt, soll in dem folgenden Abschnitt vor allem auf die Wirkungsweise und Signaltransduktion des Endotoxins Lipopolysaccharid (LPS) eingegangen werden. LPS befindet sich in der äußeren Zellmembran von gram-negativen Bakterien und wird bei der Vermehrung oder dem Zerfall dieser Bakterien frei. Es besteht im Wesentlichen aus einem einheitlichen Lipid A und einer spezifischen Polysaccharidkette. Ist es einmal im Blut freigesetzt, erfolgt die Bindung an Apolipoproteine und bactericidal permeability-increasing protein (BPI), die die Wirkung des LPS abschwächen. Dahingegen verstärkt die Bindung an das in den Hepatozyten produzierte lipopolysaccharide-binding-protein (LBP) die Wirkung, sodass schon kleine Mengen des LPS aktiv werden. Desweiteren vermittelt LBP die Verknüpfung von LPS sowohl zum löslichen sCD14 als auch zum membrangebundenen mCD14, die wiederum Voraussetzung für das intrazelluläre Signaling sind. Beim Gesunden liegt sCD14 nur in sehr geringen Konzentrationen vor, die sich jedoch in der Sepsis rasant erhöhen. Mit Hilfe des sCD14 können auch CD14-negative Zellen (z.B. dendritische Zellen, Fibroblasten) auf LPS reagieren. Für die eigentliche intrazelluläre Signaltransduktion ist der Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) verantwortlich. Lagert sich CD14 zusammen mit dem Adapterprotein MD 2 an den TLR4 auf den Zielzellen (Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen) an, so kommt es zu dessen Aktivierung und zum Start des Signalings über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B. Dieser ist normalerweise an seinen Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  gebunden und wird so an einer Translokation in den Nucleus gehindert. Wird I $\kappa$ B $\alpha$  phosphoryliert und nach Ubiquitinierung im Proteasom abgebaut, kann NF- $\kappa$ B in den Zellkern gelangen und die Transkription von Zytokinen stimulieren [Alberts, 2002]. Auf diese Weise werden die typischen pro-inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ , aber auch IL-12, IL-15 und IL-18, in den ersten 30 bis 90 Minuten freigesetzt [Cohen, 2002].

#### b) Sekundäre Mediatoren

Die pro-inflammatorischen Zytokine sorgen zunächst für einen Zellschaden mit nachfolgender Apoptose, welche sich an einer erhöhten Konzentration der p38-mitogenaktivierter Proteinkinase (MAPK) und des Hitzeschockproteins 70 (HSP70) nachweisen lässt. Dabei kann die p38-MAPK selbst Auslöser eines verstärkten Zelluntergangs sein [Ho et al., 2012], wohingegen das HSP70 bei Zellstress vermehrt benötigt wird, um eine korrekte Proteinfaltung zu gewährleisten und um eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine zu verhindern [Daugaard et al., 2007].

Zusätzlich bewirken die Zytokine die verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und Zelladhäsionsmolekülen. Zu den reaktiven Sauerstoffverbindungen zählen u.a. das Superoxid anion  $O_2^-$ , der Hydroxylradikal  $OH^\bullet$  und das Stickoxid NO. Sie werden z.B. von Leukozyten freigesetzt, die bereits aufgrund der Stimulation des Komplementsystems in das Interstitium migriert sind und bewirken durch den ausgelösten oxidativen Stress die Aktivierung diverser Signalkaskaden (z.B. über NF- $\kappa$ B) sowie eine erhöhte Gefäßpermeabilität. NO wird mithilfe der kalziumabhängigen NO-Synthase (NOS) aus L-Arginin u.a. in Endothelien, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten gebildet. Neben zwei konstitutiven Isoformen (cNOS), der neuronalen NOS (nNOS) und der endothelialen NOS (eNOS), existiert eine induzierbare Isoform (iNOS), die kalziumunabhängig ist und in Makrophagen vorkommt [Schoenberg et al., 1995]. Mithilfe der iNOS wird NO enzymunabhängig und durch die Reduktion von Nitrit gebildet. Diese Form der NO-Bildung entzieht sich so einer Kontrolle durch NOS-Inhibitoren und wurde vor allem im ischämischen Herzmuskel nachgewiesen [Zweier et al., 1995]. Da die Halbwertszeit von NO mit 3 bis 5 Sekunden enorm kurz ist, wird es permanent neu gebildet und wirkt entweder autokrin oder parakrin [Schoenberg et al., 1995]. Einen besonderen Einfluss auf das septische Geschehen hat NO aufgrund der Vasodilatation, auf die in 1.2.5 noch eingegangen wird. Alle Sauerstoffradikale bewirken in höherer Konzentration einen Endothelschaden mit nachfolgender Barrieredysfunktion. Das führt einerseits zum Abstrom intravasaler Flüssigkeit ins Interstitium, andererseits jedoch auch zu einer verschlechterten Durchblutung. Dieser Sauerstoffmangel lässt sich durch eine verstärkte Expression des VEGF in den Geweben nachweisen. VEGF wird von Zellen ausgeschüttet, die nur unzureichend mit Sauerstoff versorgt werden und fördert die Angiogenese und Endothelneubildung. Freie Sauerstoffradikale erhöhen außerdem die Konzentration von Prostaglandinen und Leukotrienen. Diese wiederum sind aufgrund der folgenden Thrombozytenhemmung, einem vermehrten Einstrom von Granulozyten und der Vasodilatation mit einer gesteigerten Letalität der Sepsis verbunden [Bernard et al., 1997, Müller-Werdan und Schuster, 2005a].

LPS induziert die Expression des Tissue-Factor auf aktivierten Monozyten und Endothelzellen. Dieser Faktor wirkt proteolytisch und führt zu einer verstärkten Umwandlung von Prothrombin in Thrombin bzw. von Fibrinogen in Fibrin. Weiterhin wird die Gerinnungskaskade über die Herabregulation von Antithrombin, Protein C und die vermehrte Freisetzung des plättchenaktivierenden Faktors (PAF) aus aktivierten Monozyten angestoßen. Daraus resultiert eine disseminierte intravasale Gerinnung [Cohen, 2002].

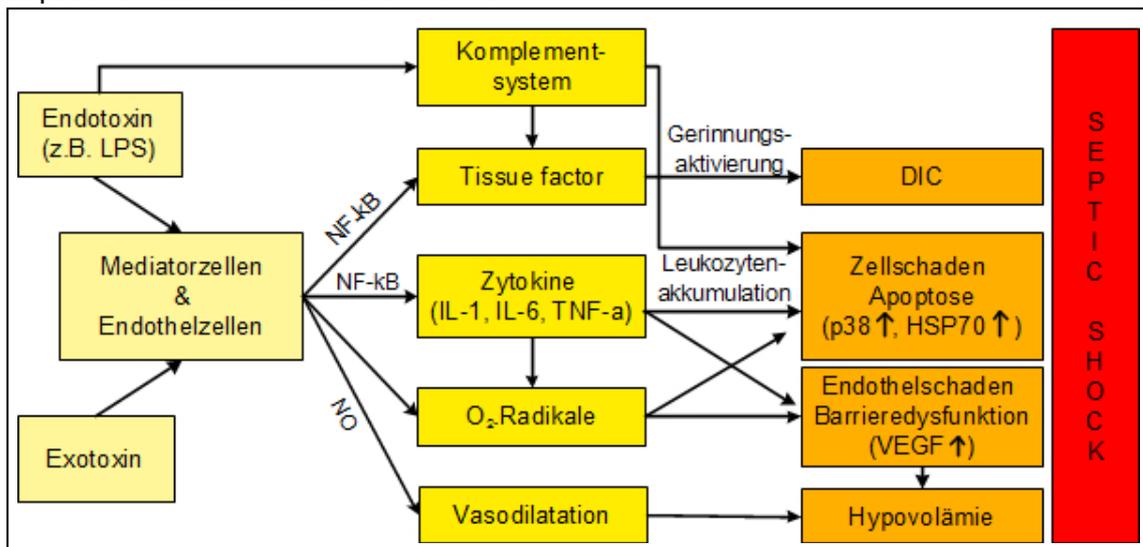
#### **1.2.4 Die zwei Phasen der Sepsis**

Nach neuen Erkenntnissen handelt es sich bei der Sepsis um keine reine überschießende Immunantwort. Bone et al. beschrieben 1996 zwei Phasen der Sepsis. Dabei stellt das oben beschriebene SIRS mit pro-inflammatorischen Zytokinen die erste Phase der Sepsis dar. Die zweite Phase ist durch eine anti-inflammatorische Immunantwort (CARS) mit Immunparalyse geprägt, in der das von TH<sub>2</sub>-Zellen gebildete IL-10 als Hauptmediator agiert. Obwohl IL-10 durch Einschränkung der Monozytenfunktion einerseits die pro-inflammatorische Reaktion begrenzt, führt es auf der anderen Seite auch zu einer Suppression des Immunsystems und damit zu einer höheren Letalität im Verlauf des Schockgeschehens [Bone, 1996]. Weiterhin hat eine erhebliche Senkung der TNF- $\alpha$ -Sekretion einen Einfluss darauf, ob es dem Patienten gelingt, die Sepsis zu überleben. TNF- $\alpha$  besitzt eine duale Wirkung und hat neben seiner pro-inflammatorischen Funktion auch die Fähigkeit kardioprotektiv zu sein sowie Lymphozyten und Granulozyten zu aktivieren [Brinkmann und Madea, 2004]. Häufig entstehen pro- und anti-inflammatorische Geschehen sehr dicht beieinander, sodass eine klinische Trennung in SIRS und CARS schwierig ist. Aus diesem Grund gewinnt der Begriff des gemischten antagonistischen Reaktionssyndroms (MARS) bezüglich der Sepsis immer mehr an Bedeutung [Schuster und Müller-Werdan, 2005b].

#### **1.2.5 Hämodynamische Veränderungen der Sepsis**

Die Wirkung der sekundären Mediatoren und der vasoaktiven Substanzen führt zu einem Absinken des peripheren Gefäßwiderstandes, der primär eine arterielle Hypotension zur Folge hat. Durch die erhebliche periphere Vasodilatation der Venen und Venolen kommt es zu einer relativen Hypovolämie. Desweiteren bewirkt die Schädigung der Endothelzellen ein Kapillarleck, sodass neben Wasser auch Albumin in das Interstitium strömt und der intravasale onkotische Druck abnimmt. Die Folgen sind neben Ödemen auch eine absolute Hypovolämie. Unbehandelt führt das Kardinalsymptom der relativen und absoluten Hypovolämie schnell zur Instabilität, weil dann das Herzminutenvolumen vermindert bleibt [Van Aken et al., 2007a]. Erst unter adäquater Volumensubstitution ist eine kompensatorische Zunahme von Herzfrequenz und Herzzeitvolumen im Sinne einer hyperdynamen Kreislaufumstellung möglich. Aus diesem Grund stellt die ausreichende Volumensubstitution einen Grundpfeiler in der Therapie der Sepsis dar. Dabei wird die eigentliche Gewebepfusion nicht nur durch den Blutdruck alleine, sondern auch durch die Mikrozirkulation gewährleistet [Müller-Werdan und Schuster, 2005b]. Die im septischen Schock entstehende Gewebehypoxie ist ursächlich auf ein Versagen der Mikrozirkulation zurückzuführen. Das Problem ist dabei neben einer hohen Laktatkonzentration primär ein Sauerstoffextraktionsdefizit,

das besonders durch die Shuntbildung auf der Ebene der Mikrozirkulation bedingt ist. Ursachen dieser sind die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC), die Endothelschädigung mit folgendem Kapillarleck und das Verlegen der Kapillaren durch adhärierende Leukozyten und Erythrozyten, die aufgrund ihrer schlechteren Verformbarkeit die Strombahn verstopfen [Van Aken et al., 2007a]. Abbildung 2 gibt einen Überblick über das Zusammenwirken der verschiedenen Mediatoren, die einen septischen Schock hervorrufen können.



**Abb. 2:** Übersicht über die Wirkung der verschiedenen Mediatoren, die zum septischen Schock beitragen

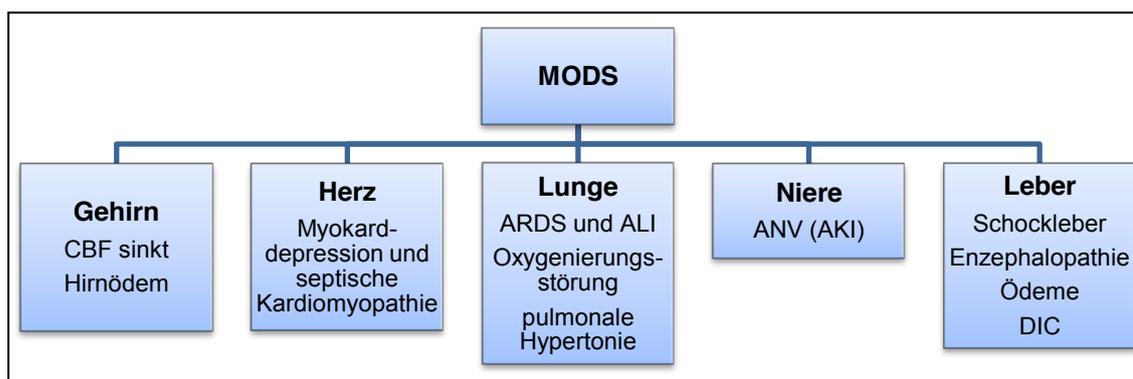
### 1.2.6 Das Multiorgan dysfunktionssyndrom (MODS)

„Eine Multiorgan dysfunktion ist definiert als eine parallele oder sequenzielle Funktionseinschränkung mindestens zweier Organsysteme“ [Van Aken et al., 2007a] und stellt eine vielfach beobachtete Komplikation der Sepsis dar. Auf Intensivstationen gehen 80% aller Todesfälle mit einem MODS einher, sodass es dort die häufigste Todesursache ist [Van Aken et al., 2007a]. Eine zentrale Stellung nimmt die Myokarddepression ein, die aufgrund einer akuten septischen Kardiomyopathie multifaktorieller Genese entsteht. Am weitesten verbreitet ist die Annahme, dass die freigesetzten Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1) über eine iNOS-Aktivierung zu einer Zunahme der NO-Produktion im Myokard führen. Darunter wird die Guanylatzyklase aktiviert und vermehrt cGMP hergestellt, das wiederum den Kalziumeinstrom in die Zellen hemmt und zu einer verschlechterten Kontraktilität führt. Folgen sind neben einer linksventrikulären Dilatation auch eine eingeschränkte Ejektionsfraktion (EF). Weiterhin wurden in den letzten Jahren kardiodepressive Faktoren wie myocardial depressant substance (MDS) und der kardiodepressive Peptidfaktor (CDF) gefunden, die negativ-inotrop wirken. Die im Verlauf der Sepsis hohen Katecholaminspiegel rufen eine Desensibilisierung der  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren hervor und schwächen damit die Wirkung

von Noradrenalin und anderen positiv-inotropen Substanzen ab. Bezüglich des erniedrigten Gefäßwiderstandes führen alle diese Faktoren insgesamt zu einer unzureichenden Steigerung der EF und zur Störung der Kontraktilität [Müller-Werdan und Schuster, 2005b, Van Aken et al., 2007a]. Trotz eines erhöhten Blutflusses in den Koronararterien konnte bei septischen Patienten öfter ein erhöhtes Troponin-I gemessen werden, welches auf eine myokardiale Ischämie deutet. Es wird vermutet, dass mitochondriale Funktionsstörungen im Bereich der Atmungskette einen Einfluss haben („cytopathic hypoxia“) [Ammann et al., 2001].

Das SIRS gilt als wesentliche indirekte Ursache für ein akutes Lungenversagen (ALI bzw. ARDS), da es mit einer Erniedrigung der pulmonalen Compliance und der funktionellen Residualkapazität einhergeht. Die Schädigung des Endothels und die Permeabilitätsstörung führen zu einem irreversiblen Verlust von Gasaustauschfläche. Die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie stellt einen weiteren Risikofaktor für den septischen Patienten dar [Van Aken et al., 2007b]. Nach der Berliner Definition von 2012 [Ferguson et al., 2012] sind folgende Kriterien entscheidend:

- Auftreten des ARDS innerhalb einer Woche nach einem klinischen Ereignis
- Bilaterale Infiltrate im Röntgen-Thorax-Bild, die nicht durch Ergüsse, Lungenkollaps oder Knoten erklärt werden können
- Ausschluss einer kardialen Dekompensation, Volumenüberlastung oder hydrostatischer Ödeme
- Einteilung in drei Schweregrade, abhängig vom Grad der Hypoxämie:
  - leicht:  $200 < P_aO_2/F_iO_2 \leq 300$  mit PEEP oder CPAP  $\geq 5$  cmH<sub>2</sub>O
  - mittel:  $100 < P_aO_2/F_iO_2 \leq 200$  mit PEEP  $\geq 5$  cmH<sub>2</sub>O
  - schwer:  $P_aO_2/F_iO_2 \leq 100$  mit PEEP  $\geq 5$  cmH<sub>2</sub>O



**Abb. 3:** Organbeteiligung bei Multiorganversagen (MODS)

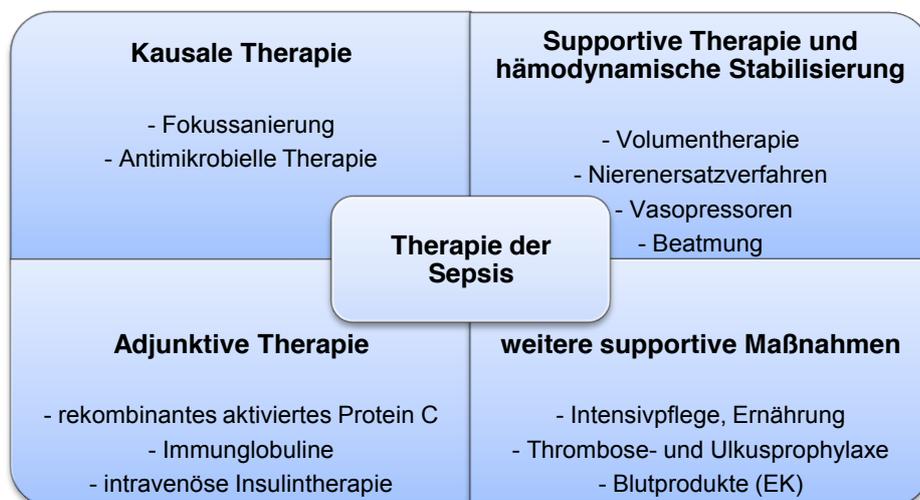
Teil des MODS ist nicht selten ein akutes Nierenversagen (ANV). Körpereigene Katecholamine sowie Zytokine bewirken eine Vasokonstriktion der nephrotischen Gefäße. Hinzu kommt eine teilweise ausgeprägte arterielle Hypotonie, die zu einer

verminderten Nierenperfusion beiträgt. Besonders die Durchblutung der Rindenzone ist im Vergleich zur Markzone abgeschwächt und ursächlich für die Schädigung der Glomeruli und die Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Zu beobachten sind Oligurie bzw. Anurie, Retention harnpflichtiger Substanzen und ein im Verlauf steigendes Kreatinin [Herold, 2010a].

In schweren Schockzuständen sinkt sowohl in der A. hepatica als auch in der V. portae die Durchblutung. Gleichzeitig steigt die Sauerstoffextraktion in den Mucosazellen des Darms, sodass der Sauerstoffgehalt in der V. portae verringert ist. Es kommt somit zu einer Hypoxie des Leberparenchyms und zu Nekrosen der Hepatozyten. Laborchemisch zeigen sich vor allem eine Erhöhung der Transaminasen (ALAT, ASAT) und eine leichte Erhöhung des Bilirubins. Weiterhin ist die Stoffwechselfunktion der Leber eingeschränkt, sodass Ammoniak nicht mehr ausreichend zu Harnstoff umgesetzt werden kann und sich im Körper aufstaut. Damit steigt das Risiko für eine hepatische Enzephalopathie. Auch die Synthese von Plasmaproteinen, insbesondere von Albumin und Gerinnungsfaktoren, ist vermindert, sodass es bei Leberbeteiligung gehäuft zu Ödembildung und Koagulopathie (DIC) kommt. Komplikationen des akuten Leberversagens sind außer gastrointestinalen Blutungen auch Hypoglykämien, akutes Nierenversagen und die Entwicklung von Hirnödemen [Herold, 2010b]. In Abb. 3 ist ein Überblick über die am MODS beteiligten Organe und deren spezifische Schädigungen dargestellt.

### 1.3 Therapie der Sepsis

Da es sich bei der Sepsis um ein sehr vielschichtiges Krankheitsbild handelt, besteht auch die Therapie, die im Folgenden anhand der Leitlinien der DSG erläutert wird, aus mehreren Grundpfeilern (Abb. 4):



**Abb. 4:** Grundpfeiler der Therapie der Sepsis nach den Leitlinien der DSG [Reinhart et al., 2010]

**a) Kausale Therapie**

„Ubi pus, ibi evacua“ („Wo Eiter ist, dort entleere ihn“). Schon Hippokrates erkannte, dass die Sanierung des septischen Fokus die Grundvoraussetzung für eine erfolgversprechende Therapie ist. Neben der Abszessdrainage spielt ebenfalls die Entfernung von infizierten Implantaten wie z.B. zentralen Venenkathetern, Gefäß- und Gelenkprothesen sowie die Eröffnung einer infizierten Wunde eine große Rolle. Diese Maßnahmen sollten so früh wie möglich durchgeführt werden, da längeres Abwarten mit einer erhöhten Letalität korreliert. Weiterhin gehört nach der Abnahme von Blutkulturen die frühzeitige, zunächst kalkulierte Gabe von Antibiotika bzw. Antimykotika zu den initialen Therapiemaßnahmen. Sie sollte möglichst innerhalb der ersten Stunde nach Diagnosestellung erfolgen. Die DSG empfiehlt eine regelmäßige Evaluation und eventuelle Anpassung der antimikrobiellen Therapie aller 48 bis 72 Stunden, um einer Resistenzbildung der Keime vorzubeugen. An dieser Stelle wird zwischen einer Eskalations- und einer Deeskalationstherapie unterschieden. [Rodloff, 2005].

**b) Supportive Therapie und hämodynamische Stabilisierung**

Ziel dieser Therapiemaßnahmen ist die Sicherstellung eines adäquaten Sauerstoffangebotes im Gewebe sowie eines minimalen mittleren arteriellen Blutdrucks von 65 mmHg, um die Perfusion von Gehirn und Niere zu gewährleisten. Erstmaßnahmen sind eine Volumensubstitution, die je nach Bedarf mit kristalloiden oder kolloidalen Lösungen erfolgt sowie der Einsatz von Dobutamin und Blutprodukten (EK, FFP). Für den weiteren Verlauf sind zur Volumensubstitution die kristalloidalen Lösungen (z.B. Ringerlaktatlösung) den kolloidalen Lösungen (HAES- oder Humanalbuminlösung) vorzuziehen. Ist es nicht möglich den MABP mittels Volumenersatz auf mindestens 65 mmHg zu steigern, so wird als Vasopressor der ersten Wahl Noradrenalin und bei bestehendem eingeschränktem Herzzeitvolumen Dobutamin empfohlen. Nierenersatzverfahren stellen bei Patienten im septischen Schock einen wichtigen Bestandteil zur hämodynamischen Stabilisierung dar. Ein frühzeitiger Einsatz einer kontinuierlichen oder intermittierenden Hämodialyse wird daher abhängig von der Kreislauf- und Stoffwechsellage des Patienten und den AKI-Kriterien empfohlen. Da septische Patienten einem erhöhten Risiko von akutem Lungenversagen ausgesetzt sind, ist die frühzeitige Beatmung mit niedrigen Atemzugvolumina und PEEP Teil der supportiven Therapie, um die oxymetrische Sauerstoffsättigung bei mindestens 90% zu halten [Reinhart et al., 2010].

### **c) Adjunktive Therapie**

Das Feld der adjunktiven Therapie ist ständigen Veränderungen unterworfen und bietet Möglichkeiten der Behandlung zusätzlich zur kausalen und supportiven Therapie. Rekombinantes aktiviertes Protein C ist eine mögliche Option, um der übermäßigen Aktivierung der Gerinnungskaskade entgegenzuwirken. Die intravenöse Insulintherapie kann zur Therapie erhöhter Glucosespiegel genutzt werden, wobei jedoch ein erhöhtes Hypoglykämierisiko bedacht werden sollte.

Weiterhin kann die Gabe von Immunglobulinen das Sterberisiko verringern. Dabei sollten sowohl bei Erwachsenen als auch bei Neugeborenen IgM-angereicherte Präparate (i.v. Kombination aus IgG, IgA, IgM) gegenüber reinen i.v. IgG-Präparaten bevorzugt werden, da bei diesen die Risikoreduktion deutlicher ausfiel [Kreymann et al., 2007].

Die Gabe von Glucokortikosteroiden wurde in den letzten Jahren sehr kontrovers diskutiert und ist nach den aktuellen Leitlinien von 2010 nun nicht mehr empfohlen [Reinhart et al., 2010]. Keh et al. zeigten in einer randomisierten, placebo-kontrollierten Studie, dass die Gabe von niedrigdosiertem Hydrocortison über sieben Tage eine Reduktion der 28-Tage-Mortalität und eine kürzere Dauer der Sepsis bei Patienten mit relativer Nebennierenrindeninsuffizienz bringt [Keh et al., 2003]. Die 2008 publizierte CORTICUS-Studie wies dagegen keinen Überlebensvorteil für Patienten mit zusätzlicher Hydrocortisontherapie nach vorangegangenem ACTH-Stimulationstest auf. Es erhöhte sich allerdings das Risiko für Sekundärinfektionen aufgrund der Immunsuppression und das Risiko für Hyperglykämien [Vázquez und Gil, 2008].

### **d) Weitere supportive Maßnahmen**

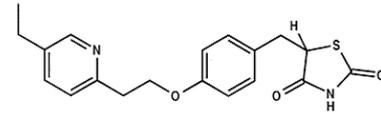
Hierbei spielt die Intensivpflege eine entscheidende Rolle, da der immobilisierte, septische Patient ein erhöhtes Risiko für nosokomiale Infektionen und Dekubitus hat. Desweiteren wird aufgrund der eingeschränkten Mobilität und der sepsisbedingten Gerinnungsstörung die Gabe unfraktionierter oder niedermolekularer Heparine empfohlen. Andere Optionen der Intensivtherapie sind künstliche Ernährung (enteral oder parenteral), Stressulkusprophylaxe sowie bei normalisierter Gewebepfusion die Gabe von Erythrozytenkonzentraten (EK) bei einem Hb  $\leq$  4,4 mmol/l. Dagegen sollte die Gabe von FFP zur Gerinnungsnormalisierung vermieden werden, weil Patienten der ITS danach ein erhöhtes Risiko für Transfusions-assoziiertes Lungenversagen (TRALI) aufweisen. Von kontinuierlichen oder intermittierenden, sedierenden und analgetischen Maßnahmen kann Gebrauch gemacht werden. Eine längere Anwendung von Muskelrelaxanzien ist wegen des gesteigerten Risikos für Paresen nicht üblich [Reinhart et al., 2010].

## 1.4 Medikamentenwahl

Aufgrund der weiterhin hohen Letalität der schweren Sepsis und des septischen Schocks, war es Ziel dieser Arbeit neue Möglichkeiten der adjunktiven Therapie zu finden. Dazu werden im Folgenden die zwei untersuchten Medikamente bezüglich Chemie und Wirkungsweise sowie ihres bisherigen klinischen Einsatzes vorgestellt.

### 1.4.1 Pioglitazon

Pioglitazon zählt chemisch zu der Gruppe der Thiazolidindione und wirkt über eine Stimulation der intrazellulären PPAR $\gamma$ -Rezeptoren (Peroxisomal Proliferator Activated Receptors), indem es



Pioglitazon

[<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=2684>]

den Rezeptor aktiviert und zu einer Konformationsänderung dessen führt. Nach Abspaltung von Korepressoren kann der Rezeptor vom Zytosol in den Zellkern gelangen. Als ligandengesteuerter Transkriptionsfaktor verbindet er sich mit dem Retinoid-X-Rezeptor zu einem Heterodimerkomplex, der sich über die DNA-Bindungsstelle an die DNA anlagert. Diese DNA-Bindungsstelle wird PPAR-response element (PPRE) genannt und hat im günstigsten Fall die Basensequenz AGGTCAnAGGTCAn. Nach Bindung von Koaktivatoren an den Heterodimerkomplex ist dieser befähigt die Transkription von Proteinen des Fett- und Glucosestoffwechsels zu beeinflussen [Lüllmann et al., 2010, Fenske und Husmann, 2003].

**Tab. 2:** Pharmakologische Fakten zu Pioglitazon [Löffler, 2007a, Lüllmann et al., 2010, Burgis, 2008]

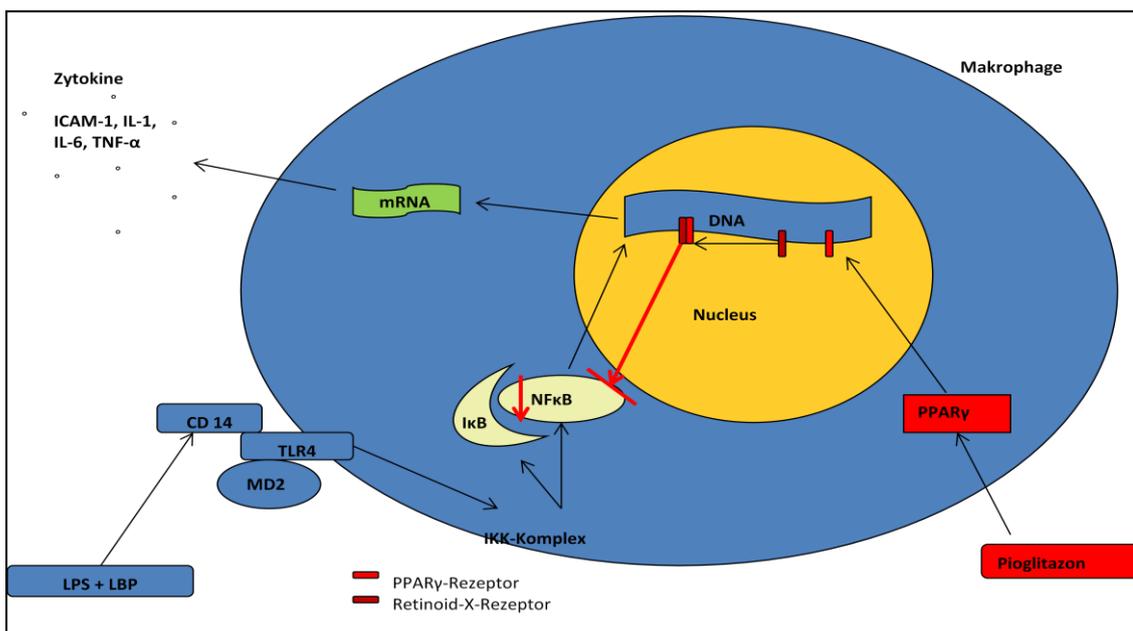
<b>Metabolismus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- gute Bioverfügbarkeit nach oraler Aufnahme</li> <li>- Wirkmaximum nach 6-8 Wochen</li> <li>- in Leber metabolisiert und biliär ausgeschieden</li> </ul>
<b>Wirkung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Förderung der zellulären Fettsäureaufnahme, der mitochondrialen und peroxisomalen Fettsäureoxidation und der Fettsäuresynthese</li> <li>- Senkung von Nüchternblutzucker und HbA<sub>1c</sub> über:               <ol style="list-style-type: none"> <li>a) verstärkte Expression des GLUT4-Transporters</li> <li>b) verminderte Gluconeogenese und gesteigerte Glykolyse</li> </ol> </li> </ul>
<b>Nebenwirkungen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zunahme des subkutanen Fettgewebes mit Gewichtszunahme</li> <li>- erhöhtes Risiko für Blasenkarzinom</li> <li>- Ödembildung (erhöhte Expression Na-Kanälen im Sammelrohr und Verbindungstubulus)</li> <li>- Herzinsuffizienz</li> <li>- Osteoporose</li> </ul>
<b>Kontraindikationen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Herzinsuffizienz, Lebererkrankungen, Schwangerschaft</li> </ul>

Pioglitazon erhielt unter dem Handelsnamen Actos<sup>TM</sup> von Takeda Pharma am 13.10.2000 seine Erstzulassung von der Europäischen Arzneimittel-Agentur für die Behandlung eines unzureichend eingestellten Blutzuckerspiegels. Dabei wird eine Startdosis von 15 oder 30 mg einmal täglich empfohlen, die stufenweise auf 45 mg

einmal täglich gesteigert werden kann. Die Zulassung galt sowohl für die orale Monotherapie als auch für eine orale Zwei- bzw. Dreifachkombinationstherapie mit Metformin oder einem Sulfonylharnstoff. Weiterhin kann es für eine Kombination mit Insulin beim Erwachsenen verwendet werden, wenn der Blutzucker mit Hilfe von Insulin unzureichend eingestellt und Metformin kontraindiziert ist [Gebrauchsinformation zu Pioglitazon der EMA, 2011]. In einem Beschluss vom 28.05.2009 sieht der GBA keinen zusätzlichen Nutzen der Glitazone im Vergleich zu anderen Therapiealternativen für Diabetes mellitus Typ II. Er begründet diesen Beschluss mit dem Überwiegen des Schadenspotentials und fehlender Datenlage zu Langzeiteffekten. Ab dem 01.04.2011 dürfen Glitazone nur noch in medizinisch indizierten Einzelfällen über die GKV verordnet werden [GBA, 2010]. Die Deutsche Diabetes Gesellschaft sieht demgegenüber den Nutzen von Pioglitazon in einer individuellen Diabetesbehandlung und betont in einer Stellungnahme zum Beschluss des GBA die Vorteile bei der Behandlung von Patienten mit Niereninsuffizienz und das fehlende Hypoglykämierisiko [Stellungnahme der DDG, 2010]. Nichtsdestotrotz ist Pioglitazon nach einer Verlängerung der Zulassung durch die EMA am 13.10.2005 weiterhin auf dem europäischen Markt erhältlich. [Gebrauchsinformation zu Pioglitazon der EMA, 2011]

Liu et al. zeigten im Tierversuch mit Ratten, dass unter Vorbehandlung mit Rosiglitazon NF- $\kappa$ B nach LPS-Gabe schwächer aktiviert wird und auch eine geringere Expression von TNF- $\alpha$  und ICAM1 stattfindet. Daraus ergab sich eine deutlich reduzierte Entzündungsreaktion in dem untersuchten Lungengewebe [Liu et al., 2005]. Lee et al. publizierten den Einfluss von Rosiglitazon auf die Nierenfunktion bei Mäusen nach LPS-induzierter Sepsis. Sie fanden eine reduzierte Expression von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  bei den mit Rosiglitazon vorbehandelten Tieren während der Sepsis. Desweiteren sank die Ausprägung der Adhäsionsmoleküle ICAM1 und VCAM1 in tubulären Epithelzellen, sodass weniger Makrophagen und Monozyten in das renale Gewebe einströmen konnten. Diesen anti-inflammatorischen Effekt führten sie auf die Inhibition der NF $\kappa$ B-Aktivierung durch PPAR $\gamma$ -Agonisten zurück [Lee et al., 2005]. In einer experimentellen Studie an Ratten untersuchten Reel et al. den Einfluss von Pioglitazon auf die renale Ischämie bzw. Reperfusion. Dabei zeigten die Tiere, die drei Tage zuvor Pioglitazon per os bekommen hatten, geringere tubuläre Nekrosen und verminderte Entzündungszeichen im Vergleich zur Placebo-Gruppe. Besonders die Expression der Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die eine wichtige Rolle in der akuten Entzündung spielen, war immunhistochemisch in der Pioglitazon-Gruppe vermindert ausgeprägt [Reel et al., 2013]. Hernanz et al. erforschten die Wirkung von Pioglitazon auf den Blutdruck und die PGI<sub>2</sub>-Produktion bei hypertensiven Ratten, die 28 Tage lang Pioglitazon per os

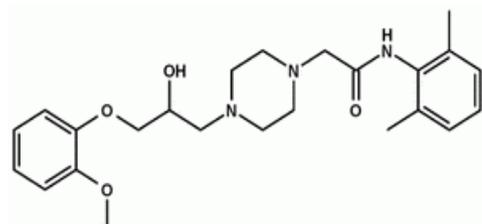
aufgenommen hatten, im Vergleich zu normotensiven Ratten. Eine Senkung des Blutdrucks konnte in keiner der beiden Gruppen gezeigt werden. Jedoch war die COX2-gesteuerte Produktion von PGI<sub>2</sub> erhöht, der oxidative Stress erniedrigt und die NO-Bioverfügbarkeit erhöht, sodass aufgrund verbesserter Vasodilatation ein kardio- protektiver Effekt von Pioglitazon angenommen wurde [Hernanz et al., 2011]. Dieser konnte in einer Studie an Patienten, die sowohl an koronarer Herzkrankheit (KHK) als auch am metabolischen Syndrom litten, bestätigt werden. Wenn diese Personen zusätzlich zur Standardtherapie noch Pioglitazon erhielten, zeigte sich neben einem erniedrigten Körpergewicht, BMI und Hüftumfang auch eine verminderte Insulin- resistenz [Vinnik et al., 2011].



**Abb. 6:** Wirkungsweise von Pioglitazon: Nach Bildung eines Heterodimerkomplexes mit dem Retinoid-X-Rezeptor führt es zu einer verminderten Transkription von NF-kb und damit zu einer geringeren Zytokinexpression

### 1.4.2 Ranolazin

Ranolazin gehört zu den Piperazin-Derivaten, welches einen neuen Wirkmechanismus zur Behandlung der chronischen, stabilen Angina pectoris besitzt, da es zu einer besseren Ventrikelrelaxation führt. Dabei wirkt es zum großen Teil unabhängig von anderen hämo- dynamischen Auswirkungen.

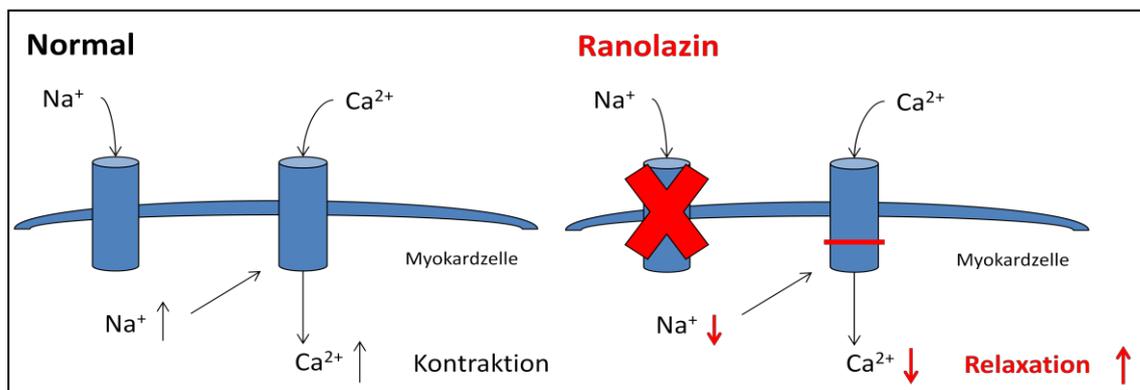


**Abb. 7:** Strukturformel von Ranolazin [http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=29218]

**Tab. 3:** Pharmakologische Fakten zu Ranolazin [Arznei-Telegramm 2009, Reddy et al., 2010]

<b>Metabolismus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Abbau in der Leber über Cytochrom P450 3A (CYP3A) und im Darm</li> <li>- Ausscheidung: 73% über Urin, 24% über Stuhl</li> </ul>
<b>Wirkung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Senkung der intrazellulären <math>\text{Ca}^{2+}</math>-Konzentration im Myokard mit nachfolgend verbesserter Relaxation des Herzmuskels</li> </ul>
<b>Nebenwirkungen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Wechselwirkungen mit CYP3A-Induktoren (z.B. Carbamazepin) oder CYP3A-Inhibitoren (z.B. Erythromycin)</li> <li>- Wechselwirkungen mit Antiarrhythmika möglich</li> <li>- Obstipation, Übelkeit, Erbrechen</li> <li>- Schwäche, Schwindel</li> <li>- QTc-Zeitverlängerung von 5 bis 15 ms</li> <li>- im Bereich der Maximaldosis: Sehstörungen, Lethargien</li> </ul>
<b>Kontraindikationen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dosisanpassung bei älteren Personen, Personen &lt; 60kg, NYHA III bis IV, leichter bis mittlerer Leber- oder Niereninsuffizienz</li> <li>- absolute KI: schweres Leberversagen (Child Pugh Score B und C) und schweres Nierenversagen (<math>\text{GFR} &lt; 30 \text{ ml/min/1,73m}^2</math>)</li> </ul>

Durch Blockade der Natrium-Kanäle am Myokard senkt es den Einstrom von  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Zelle und die Depolarisation wird abgeschwächt. Folge ist, dass die spannungsabhängigen Kalzium-Kanäle (Dihydropyridin-Rezeptoren) in ihrer Aktivität gehemmt werden und weniger  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vom Extrazellulärraum nach intrazellulär strömen. Dadurch werden auch weniger  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus den intrazellulären Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums freigesetzt. Insgesamt ergibt sich somit eine intrazellulär erniedrigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, die zu einer verbesserten Relaxation des Herzmuskels führt [Arznei-Telegramm 2009, Reddy et al., 2010].

**Abb. 8:** Wirkungsweise von Ranolazin: Ranolazin blockiert die Na-Kanäle der Myokardzelle, sodass der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  über spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle sinkt und es zu einer verbesserten Relaxation des Myokards kommt.

Seit Februar 2009 ist Ranolazin auf dem deutschen Markt unter dem Handelsnamen Ranexa® von Berlin-Chemie als Retardtablette in den Dosierungen 375 mg, 500 mg und 750 mg verfügbar. Als Startdosis wird von der EMA die zweimal tägliche Gabe von 375 mg empfohlen, die auf maximal zweimal täglich 750 mg gesteigert werden kann. Indiziert ist das Medikament bei Patienten mit stabiler Angina pectoris, die nicht ausreichend behandelt sind oder antianginöse Medikamente der ersten Wahl wie

Betablocker oder Kalziumantagonisten nicht vertragen. Dabei ist es lediglich zur Zusatzbehandlung, jedoch nicht für eine Monotherapie zugelassen [Gebrauchsinformation zu Ranolazin der EMA, 2012]. Die klinische Wirksamkeit von Ranolazin wurde in den drei randomisierten Doppelblindstudien MARISA, CARISA und ERICA an Patienten mit chronischer Angina pectoris getestet. In der MARISA-Studie zeigte sich 2004 nach Absetzen der bisherigen antianginösen Therapie und unter Monotherapie mit Ranolazin eine signifikante Verlängerung der Zeit bis zum Auftreten pectanginöser Beschwerden im Belastungstest, wobei das Zeitintervall positiv mit der Dosierung von Ranolazin korrelierte. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch die CARISA-Studie bei 823 Patienten, die zwölf Wochen lang zusätzlich zu ihrer Basistherapie zweimal täglich 750 mg oder 1000 mg Ranolazin einnahmen. Neben der mittleren Ausdauer verlängerte sich ebenfalls die Zeit bis zu den pectanginösen Beschwerden im Belastungstest. Weiterhin konnte ca. ein Angina pectoris-Anfall pro Woche verhindert werden. Die Ergebnisse waren dabei unabhängig von der individuellen Basismedikation. Im Jahr 2006 betrachtete die ERICA-Studie 565 Patienten, die trotz Einnahme von täglich 10 mg Amlodipin mindestens drei Angina pectoris-Anfälle pro Woche aufwiesen. Bereits vorher eingenommene, langwirksame Nitrate durften während des Versuchszeitraums von sechs Wochen weiter genommen werden. Es ergab sich eine leichte Senkung der Anfallshäufigkeit und des Nitratverbrauchs. In der CARISA- und ERICA-Studie stellte sich heraus, dass Frauen bezüglich der Zeit bis zu den pectanginösen Beschwerden im Belastungstest nicht profitierten. Keine der Studien ergab jedoch, dass Ranolazin als Ersatz für die bisherige Basistherapie verordnet werden könnte. 2007 untersuchte die MERLIN-TIMI 36-Studie Patienten mit instabiler Angina pectoris und NSTEMI. Die Patienten erhielten direkt nach dem Anfall und im Folgenden für ein Jahr zweimal täglich 1000 mg Ranolazin oder ein Placebo-Präparat. Der primäre Endpunkt war eine Kombination aus kardiovaskulärem Todesfall, Myokardinfarkt und wiederkehrenden Ischämien und wurde durch die Gabe von Ranolazin nicht signifikant verändert. Lediglich bei Patienten mit erhöhten BNP-Spiegeln konnte die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines der Ereignisse leicht gesenkt werden. Bei der Auswertung der EKGs fiel auf, dass es unter Ranolazin-Therapie zu weniger ventrikulären und supraventrikulären Tachykardien kam und die Wahrscheinlichkeit für das Neuaufreten von Vorhofflimmern vermindert wurde. Zusammenfassend könnte Ranolazin künftig als effektive Zusatzmedikation für Patienten mit chronischer Angina pectoris genutzt werden. Im höheren Dosisbereich sollte jedoch der Nutzen mit den unerwünschten Wirkungen abgewogen und auf Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten geachtet werden [Arznei-Telegramm 2009, Reddy et al., 2010].

## **2. Zielstellung**

Ebenso wie die Ursachen sind auch die Veränderungen im Organismus während des septischen Schocks vielfältig. Neben der Makro- und Mikrozirkulation werden vor allem auch diverse Kaskadesysteme beeinflusst, die alle zur Ausprägung des Multiorgan-dysfunktionssyndrom (MODS) beitragen. Die Grundsätze der Therapie in Bezug auf Herdsanierung, schnelle Antibiotikagabe und Volumensubstitution sind seit vielen Jahren sehr ähnlich. Ergänzend zu dieser Basistherapie wird nach neuen Substanzen geforscht, welche die weiterhin hohe Letalität der Sepsis und des septischen Schocks senken könnten. Das Medikament sollte möglichst eine organprotektive, anti-inflammatorische Wirkung besitzen sowie gut verträglich und leicht anwendbar sein. Für die getesteten Medikamente wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

### Pioglitazon:

- 1) Pioglitazon verbessert im LPS-induzierten septischen Schock das Überleben und die hämodynamischen Veränderungen.
- 2) Als PPAR $\gamma$ -Agonist kann es zu einer Downregulation von NF- $\kappa$ B und damit zu einer verminderten Transkription von Zytokinen führen.
- 3) Aufgrund einer sinkenden Mediatorexplosion unter dem Einfluss von Pioglitazon kommt zu einer abgeschwächten Leukozytenmigration.
- 4) Die LPS-induzierte Gewebeschädigung von Herz, Lunge, Leber und Niere wird nach Pioglitazon-Vorbehandlung geringer ausfallen.
- 5) Pioglitazon kann über den PPAR $\gamma$ -Rezeptor die Expression von pro-inflammatorischen Proteinen hemmen und die von anti-inflammatorischen Proteinen fördern.

### Ranolazin:

- 1) Ranolazin erhöht im LPS-induzierten septischen Schock die Überlebenszeit und verbessert die hämodynamischen Veränderungen durch Eindämmung der septischen Kardiomyopathie.
- 2) Ranolazin kann die septische Kardiomyopathie aufgrund seiner relaxierenden und antiarrhythmischen Wirkung abschwächen.
- 3) Die LPS-induzierte Gewebeschädigung der Schockorgane Herz, Lunge, Leber und Niere wird durch eine bessere Mikro- und Makrozirkulation nach Ranolazin-Vorbehandlung geringer ausfallen.
- 4) Aufgrund einer verbesserten Durchblutung der Schockorgane werden weniger pro-inflammatorische Proteine exprimiert und es folgt eine geringere Leukozytenakkumulation mit sinkender MPO-Aktivität.

### 3. Materialien

#### 3.1 Septic Shock Modell

##### a) Geräte

Ama-digit 15 <sup>th</sup> Thermometer	Amarell GmbH, Kreuzwertheim
Heizkissen HK 5510 weiß	AEG, Winnenden
Lampe, KL1500 compact	Schott, Mainz
Sirecust 1281	Siemens, München
Vortexer Reax top	Heidolph, Schwabach
xtrans pvb (invasives Druckmessgerät)	Codan pvb Medical GmbH, Lehnsahn

##### b) Instrumente

Einwegskalpelle	Medicon Instrumente, Tuttlingen
Klemmen	
- Arterienklemme feines Modell, 13 cm	Medicon Instrumente, Tuttlingen
- Feine Klemme I09	Stryker Osteosynthesis, Freiburg
Pinzetten:	
- Anatomische Pinzette, gerade, 13 cm	Medicon Instrumente, Tuttlingen
- Chirurgische Pinzette, Standard	Medicon Instrumente, Tuttlingen
Scheren	
- Inzisionsschere, gerade, 13 cm	Medicon Instrumente, Tuttlingen
- Mikroschere micro 2000®	Medicon Instrumente, Tuttlingen
- Präparierschere Nelson, gerade, 13 cm	Medicon Instrumente, Tuttlingen
- Sezierschere, feine Spitzen	Plano, Marburg
Spatel	Labotec Labortechnik Vertriebs-GmbH, Wiesbaden

##### c) Kunststoff- und Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie	
Bechergläser (100ml)	Schott, Mainz
Dreiwegehahn Discifix	Braun, Kronberg/Taunus
Intramedic Luer Stab Adapter, steril	Becton Dickinson and Company, Heidelberg
Intramedic Polyethylene Tubing (I.D. 0,58mm; O.D. 0,965mm)	Becton Dickinson and Company, Heidelberg
Kathetereinführkanüle (gelb)	Becton Dickinson and Company, Heidelberg
Kryoröhrchen 1,8ml (2ml), Cryovial®	Simport plastics, Quebec
Monoject Magellan Safty Needles 5/8"	tyco Healthcare, Neustadt (Donau)
Nähmaschinengarn	
Nierenschalen	Eco Medizintechnik Limited, Lauf
Omnifix 40 Solo (1ml, 40 i.u.)	Braun, Kronberg/Taunus
Pipette Reference 200; 1000	Eppendorf, Hamburg
Polyethylene Tubing (Tubus)	Terumo Europe N.V., Eschborn
Stickstoffbehälter Voyager Plus	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf
Syringe (without needle) 10ml	Terumo Europe N.V., Eschborn
Tips 50-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Tubes 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
unsterile Kompressen	Paul Hartmann AG, Heidenheim

##### d) Chemikalien

Actos™ 15 mg Tabletten (Pioglitazon als HCl)	Takeda Pharma, Aachen
BacilloI® AF	Bode Chemie GmbH, Hamburg
Heparin-Natrium (25000 I.U./5ml)	ratiopharm GmbH, Ulm
isotone Kochsalzlösung 0,9%	Braun, Kronberg/Taunus
Lipopolsaccharid von Escherichia coli Serotyp O 127:B8 (gefriergetrocknetes Pulver, phenol-extrahiert)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Narcoren® (Pentobarbital-Natrium) 100 ml	Merial, Hallbergmoos
Ranexa® 375 mg Retardtabletten (Ranalazin)	Berlin Chemie AG, Berlin
Stickstoff (flüssig)	Forschungsabteilung Universitätsklinikum Halle
Xylonest® 2% 10 ml	AstraZeneca, Wedel

### 3.2 Hämatokritbestimmung

Auswertungsschablone zur Hämatokritbestimmung	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Haematokrit Zentrifuge Typ 2010	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Haematokritkapillaren (Länge 75 mm)	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Verschlusskitt für Haematokrit-Kapillaren	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

### 3.3 Histologie

#### a) Geräte

Eindeckautomat Promoter RCM 2000	Medite GmbH, Burgdorf
Färbeautomat Tissue Stainer TST 30	Medite GmbH, Burgdorf
Kamera PowerShot G6	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Microtom Jung RM 2035	Leica Instruments, Bensheim
Mikroskop Axioskop 2 plus	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Paraffinausgießstation Shandon HistoCenter 2	Fisher Thermo Scientific, USA
Shandon Excelsior™ ES Tissue Processor	Fisher Thermo Scientific, USA
Thermocenter TC 40	SalvisLab, Renggli AG, Schweiz
Wasserbad WNB 7	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach

#### b) Chemikalien

2-Propanol	Sigma-Aldrich Co., USA
Aqua dest.	Forschungsabteilung Kardiologie, UKH
Eindeckmedium pertex	Medite GmbH, Burgdorf
Eosin y Solution	Sigma-Aldrich Co., USA
Formaldehydlösung 37 %ig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Giemsa Farbstoff	Sigma-Aldrich Co., USA
Mayers Hämalaunlösung	Merck KG, Darmstadt
Paraplast ®	McCormick Scientific, USA
Roti-Histol ® (Xyloersatz)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rotisol ® (99%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

#### c) Verbrauchsmaterialien

Deckgläser: Menzel-Gläser® 24 x 50 mm	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Einbettkassetten gelb (ohne Deckel)	Resolab Laborbedarf, Bad Oeynhausen
Elka Objektträger (mattrand)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim
Mikrotom-Klingen: Microtome Blades	Leica Instruments, Bensheim

### 3.4 Western Blots und Myeloperoxidase-Bestimmung

#### a) Laborgeräte

Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Electronicrührer Variomag	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Elektrophorese-Kammer	Hoefer Inc., Holliston, USA
Labor-Waage Scaltec SPB 42	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen
Mini-Zentrifuge Qualitron	Krackeler Scientific Inc., USA
pH-Meter CG 837	Schott, Mainz
Photometer S. 250	Secomam, Frankreich
Pipetten Eppendorf Reference 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Polimax 2040	Heidolph, Schwabach
Power PAC 200	Bio-Rad Laboratories Inc., München
Power-Supply	Amersham, GE Healthcare UK
Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg
Transferkammer	IDEA Scientific Company, USA
Ultra-Thurax T25	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Steufen
Ultrazentrifuge (Rotor SS34)	Sorvall, Buckinghamshire
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Schwabach

**b) Kunststoff-, Glas- und Verbrauchsmaterialien**

Einmal-Küvetten 1,5 ml halbmikro	Brand, Wertheim
Glassmesszylinder	Schott Duran, Mainz
Immobilon-P Transfermembran	Millipore, Schwalbach
Model 583 Gel Dryer Filter Papier	Bio-Rad Laboratories Inc., München
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Röntgenkassette	Kodak GmbH, Stuttgart
Rotilabo-Zentrifugenröhrchen Eco 50 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tubes (1 ml)	Eppendorf, Hamburg

**c) Chemikalien**

2-Propanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acrylamide/Bis Solution, 29:1	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Albumin	Roth, Karlsruhe
Amersham ECL Westernblotting Detection Reagents	Amersham, GE Healthcare UK
Amidoschwarz	Fisher Thermo Scientific, USA
Ammonium-Persulfat 10g	Bio-Rad Laboratories Inc., München
Aqua bidest.	Klinikapotheke, Universitätsklinikum Halle (Saale)
BSA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
CHAPS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Complete Mini	F. Hoffmann-La Roche Ltd., Schweiz
Entwickler-/Fixierlösung	Kodak GmbH, Stuttgart
Essiglösung 10%ig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HTAB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaleidoscope Prestained Standards	Bio-Rad Laboratories Inc., München
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver (5%ige Lösung)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natronlauge 0,1 M; Natronlauge-Plätzchen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
o-Dianisidine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Popov-Lösung I, II, III	
Roti-Load 1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure-Lösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS Pulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS Solution 10%ig 250ml	Bio-Rad Laboratories Inc., München
TEMED 50ml	Bio-Rad Laboratories Inc., München
Tris Base	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween	Bio-Rad Laboratories Inc., München

**d) Primärantikörper**

HSP 70/HSC 70 (W27)	sc-24	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
IκB-α (H-4)	sc-1643	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
p38 (A-12)	sc-7972	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
PPARγ (B-5)	sc-271392	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

**e) Sekundärantikörper**

Goat-anti-Mouse IgG-HRP	sc-2005	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Mouse IgG sekundären Antikörper – H&L	ab6728	Abcam, Großbritannien
Rat mab anti-Mouse IgG1	04-6120	Invitrogen/Life Technologies, USA

**3.5 Statische Auswertung und Analyseprogramme**

HP Pavilion Entertainment PC 15"	Hewlett-Packard Company
GIMP 2.8.2	
ImageJ 1.440	National Institute of Health
Microsoft Office 2007 (Excel, Word, Power Point)	Microsoft Corporation

## 4. Methoden

### 4.1 Septic Shock Modell

#### 4.1.1 Versuchstiere und Einteilung der Gruppen

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten mit einem mittleren Gewicht von 250 g und einem Alter von circa 12 Wochen gewählt. Die Tiere stammten aus einer Zuchtreihe des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Während des gesamten Versuchszeitraums lag dabei eine entsprechende Tierversuchsgenehmigung vor. Die Einteilung in die Gruppen erfolgte zufällig und unabhängig von leichten Alters- oder Gewichtsunterschieden. Sie war notwendig, um die hämodynamischen, zellulären und histologischen Effekte der einzelnen Medikamente auf den septischen Schock herauszufinden. Da aus früheren Arbeiten [Liu et al., 2005b, Wu et al., 2011] bekannt war, dass das Outcome einer Versuchsgruppe, die weder Medikament noch LPS bekam, vergleichbar ist mit dem Outcome der Sham-Gruppen, wurde aus Gründen des Tierschutzes auf eine solche Vergleichsgruppe verzichtet. Somit ergaben sich folgende Versuchsgruppen:

**Tab. 4:** Übersicht der Versuchsgruppen

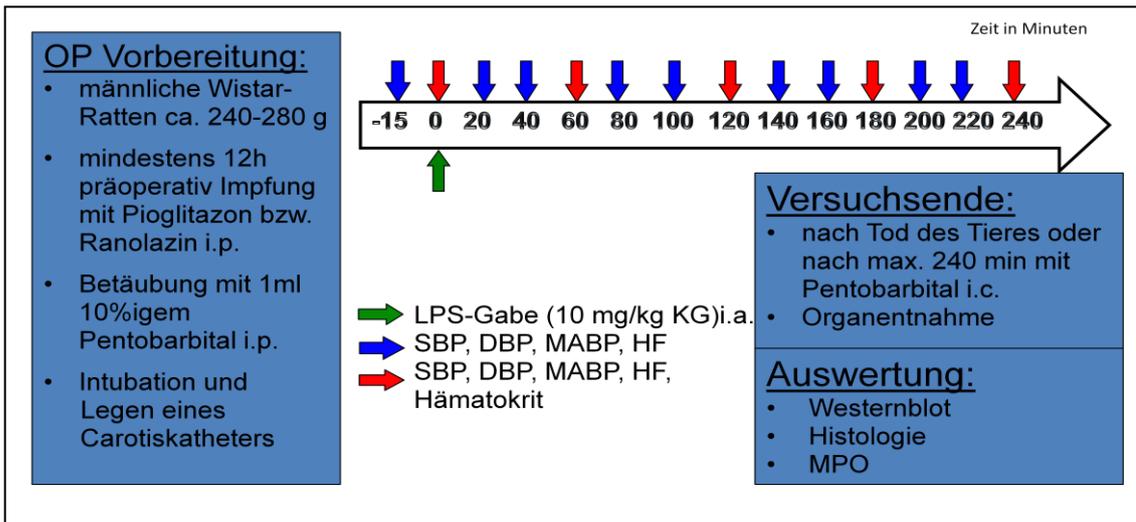
Versuchsgruppe	Medikamenten- bzw. Toxindosierung	Anzahl der Versuchstiere
„Pioglitazon Sham“	- mindestens 12 Stunden präoperativ intraperitoneale Injektion von Pioglitazon in einer Konzentration von 4 mg/kg KG - nach der Stabilisierungsphase nur Gabe von NaCl intraarteriell (i.a.)	5
„Ranolazin Sham“	- mindestens 12 Stunden präoperativ intraperitoneale Injektion von Ranolazin in einer Konzentration von 10 mg/kg KG - nach der Stabilisierungsphase nur Gabe von NaCl i.a.	5
„LPS Shock + Vehicle“	- nach der Stabilisierungsphase i.a. Injektion von LPS in einer Konzentration von 10 mg/kg KG - danach Gabe von NaCl i.a.	10
„LPS Shock + Pioglitazon“	- mindestens 12 Stunden präoperativ intraperitoneale Injektion von Pioglitazon in einer Konzentration von 0,4 mg/kg KG, 4 mg/kg KG bzw. 8 mg/kg KG - nach der Stabilisierungsphase i.a. Injektion von 10 mg/kg KG LPS - danach Gabe von NaCl i.a.	0,4 mg/kg KG: 2 4 mg/kg KG: 11 8 mg/kg KG: 2
„LPS Shock + Ranolazin“	- mindestens 12 Stunden präoperativ intraperitoneale Injektion von Ranolazin in einer Konzentration von 10 mg/kg KG bzw. 20 mg/kg KG - nach der Stabilisierungsphase i.a. Injektion von 10 mg/kg KG LPS - danach Gabe von NaCl i.a.	10 mg/kg KG: 10 20 mg/kg KG: 4

#### 4.1.2 Durchführung

Zunächst erfolgte die Betäubung der Ratten mittels 1 ml 10%igem Pentobarbital intraperitoneal (i.p.). Durch Auslösen eines standardisierten Schmerzreizes sowie einer eventuellen wiederholten Gabe von Pentobarbital i.p. konnte eine ausreichende Narkose sichergestellt werden, wenn keine Reaktion mehr auf den Schmerzreiz erfolgte. Während des gesamten Versuchs wurde die Narkosetiefe auf diese Weise kontrolliert und bei Bedarf erneut Pentobarbital verabreicht. Daraufhin erfolgte eine mediale Längsinzision in der vorderen Halsregion, die mit 10%iger Xylocainlösung lokal betäubt wurde. Das folgende Freipräparieren der Trachea war nötig, um eine quere Tracheotomie durchzuführen. Danach wurde ein Polyethylen-tubus circa 1 cm in die Trachea vorgeschoben und mit Nähmaschinengarn fixiert, um ein Dislozieren oder eine Aspiration zu vermeiden. Desweiteren wurde die linke Arteria carotis communis präpariert und nach kranial abgebunden. Es folgte die Inzision des Gefäßes sowie das Verschieben eines Katheters nach zentral. Dieser Katheter wurde ebenfalls mit Nähmaschinengarn fixiert. Das Operationsgebiet wurde mit befeuchteten, unsterilen Kompressen abgedeckt, um es vor dem Austrocknen zu schützen. Die Tiere wurden im Verlauf der Operation auf Heizdecken gelagert und der Körper mit Aluminiumfolie abgedeckt, um ein Auskühlen und damit verbundene hypothermische Effekte auszuschließen. Die Körpertemperatur wurde stets über ein Thermometer rektal gemessen und zwischen 36°C und 37,5°C gehalten. Nach der Operation schloss sich eine Stabilisierungsphase von 10 Minuten an, auf welche die eigentliche Versuchsphase von maximal 240 Minuten folgte. Der Startzeitpunkt war bei den Tieren, die LPS bekamen, die i.a. Injektion von 10 mg/kg KG LPS. Bei den Kontrolltieren begann die Versuchsphase unmittelbar nach der Stabilisierungsphase. Während der Versuchszeit wurden über den liegenden Carotiskatheter folgende Werte aller 20 Minuten erfasst: systolischer Blutdruck (SBP) in mmHg, diastolischer Blutdruck (DBP) in mmHg, mittlerer arterieller Blutdruck (MABP) in mmHg, die Herzfrequenz (HF) in Schlägen pro min (bpm) und der Pressure Rate Index ( $PRI=(MABP \times HF)/1000$ ). Desweiteren fand stündlich die Abnahme von arteriellem Blut über den Carotiskatheter statt, um den Hämatokrit (HKT in %) zu bestimmen (Abb. 9). Lebte das Tier die gesamte Beobachtungszeit von 240 Minuten wurde es mittels Pentobarbital intracardial am Ende getötet. Der Tod eines Tieres wurde definiert mit dem Auftreten von Pulslosigkeit, einem mittleren arteriellen Blutdruck unter 40 mmHg und einem Atemstillstand.

Nach dem Versuchsende wurde zunächst das Abdomen mit Hilfe einer Präparierschere eröffnet um Leber und Niere zu entnehmen. Danach schlossen sich die Thorakotomie und die Entnahme von Herz und Lunge an. Nach Säuberung der Organe

im Eiswasser wurden diese einzeln in Kryoröhrchen getan und im flüssigen Stickstoff tiefgefroren. Die weitere Lagerung der Proben erfolgte in einem -70°C Tiefkühlschrank.



**Abb. 9:** Aufbau des Experimentes mit einem maximalen Versuchszeitraum von 240 Minuten; alle 20 Minuten wurden systolischer, diastolischer und mittlerer arterieller Blutdruck sowie die Herzfrequenz gemessen; nach maximal 240 Minuten erfolgte die Beendigung des Experimentes mit der Gabe von Pentobarbital intracardial

#### 4.1.3 Hämatokritbestimmung

Der Hämatokrit definiert sich als prozentualer Volumenanteil der Erythrozyten am Gesamtblutvolumen. Durch die Zentrifugation können feste von flüssigen Bestandteilen zunächst getrennt und dann verdichtet werden. Diese Bestimmung erforderte stündlich eine Vollblutentnahme über den Carotiskatheter. Eine zu mindestens dreiviertel mit Blut gefüllte Hämatokritkapillare wurde auf der trockenen Seite mit Verschlusskitt versiegelt und schließlich 5 Minuten zentrifugiert. Mit Hilfe einer Auswertungsschablone konnte der Hämatokrit abgelesen werden.

#### 4.2 Myeloperoxidaseaktivität

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym der neutrophilen Granulozyten und wird in deren Vesikeln gespeichert. Durch die Bildung hochtoxischer Hypochlorit-Ionen (siehe Formel) dient sie im Fall einer bakteriellen Infektion zusammen mit anderen Enzymen und Proteasen der Abtötung von phagozytierten Bakterien:  $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow H_2O + OCl^-$  [Löffler, 2008]. Für die Bestimmung der MPO-Aktivität wurden zuerst ein HTAB-Puffer sowie eine ODI-Solution hergestellt. Beide Lösungen besaßen einen pH-Wert von 6,0. Der gesamte Ansatz wurde auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde auf die -70°C gekühlten Gewebeproben der 10fache Gewicht/Volumen HTAB-Puffer gegeben und die Proben für eine Minute homogenisiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei 4°C und mit 12500 rpm. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und auf Eis gestellt. Für die Bestimmung der MPO-Aktivität

mussten zu 50 µl Probenüberstand 950 µl ODI-Solution in einer Küvette zugesetzt werden. Die Messung im Photometer bei 460 nm schloss sich sofort an. Dabei konnte ein Farbumschlag von hellgelb zu türkisblau zu braun beobachtet und die Extinktionen bei 0, 30, 60, 90 und 120 Sekunden gemessen werden. Entscheidend für die Berechnung der MPO-Aktivität ist die Absorptionsdifferenz zwischen 120 und 60 Sekunden: MPO-Aktivität in U/l =  $(\text{Ext.}_{120''} - \text{Ext.}_{60''}) \times 17,7$ .

### **4.3 Histologie**

Zuerst wurden die tiefgefrorenen Gewebeproben in 4%iger Formalinlösung für mindestens 24 Stunden fixiert. Zur Entwässerung der Gewebeproben wurden diese für ca. 20 Stunden in einen Einbettungsautomat gegeben und dort folgenden Lösungen nacheinander ausgesetzt: einer aufsteigenden Alkoholreihe (80%ig, 96%ig, absoluter Alkohol), einer Xylol-Lösung und drei verschiedenen Paraffinbädern bei 63°C. Die noch heißen Proben wurden in eine Gießwanne mit flüssigem Paraffin gegossen und über einer Kühlplatte als Gewebeblöcke fixiert. Das Zuschneiden zu 5 µm dünnen Gewebeschnitten geschah mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms. Nach der Streckung der Schnitte in 50°C warmen Aqua dest. wurden diese auf Objektträger aufgezogen. Bevor die Proben gefärbt werden konnten, kamen sie für eine Stunde in einen 80°C Umluftheizschrank, um ein Abfließen des Paraffins zu ermöglichen.

Für die Färbung der Gewebeschnitte wurde als erstes die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) gewählt. Dafür wurden die Präparate zweimal in ein Xylolbad gegeben, danach einer absteigenden Alkoholreihe ausgesetzt und noch einmal mit Aqua dest. gewaschen. Nach dieser abgeschlossenen Vorbereitung erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin-Lösung für zweimal zehn Minuten, der sich ein Spülen mit Leitungswasser anschloss. Im nächsten Schritt wurden die Proben einmalig für fünf Minuten in Eosin-Lösung gegeben und danach wieder mit Leitungswasser gespült. Um die Färbung zu fixieren, durchliefen die Gewebeschnitte eine aufsteigende Alkoholreihe mit einem abschließenden Xylolbad, bevor sie zum Eindecken kamen.

Als zweite Färbung wurde die Giemsa-Färbung ausgewählt. Zunächst erfolgte erneut die oben beschriebene Vorbereitung der Proben. Es schloss sich eine 45-minütige Färbung in frisch hergestellter Giemsa-Gebrauchslösung an. Zur Fixierung wurden die Präparate kurz in ein Essigbad, zehn Sekunden in absoluten Alkohol, zehn Sekunden in Isopropanol und abschließend zweimal für fünf Minuten in ein Xylolbad gebracht.

Das Eindecken der gefärbten Gewebeproben auf dem Objektträger führte ein Eindeckautomat aus. Die Beurteilung der Präparate erfolgte mittels eines Lichtmikroskops, mit dem die im Ergebnisteil sichtbaren Bilder angefertigt wurden.

#### **4.4 Bestimmung der Proteinexpression mittels Western Blot**

##### **4.4.1 Proteinextraktion**

100 µg der in Flüssigstickstoff gekühlten Gewebeproben wurden in einem vorgekühlten Mörser zerkleinert und anschließend 1000 µl Lysepuffer sowie 8 µl -20°C kalte Benzoyl-Lösung hinzugegeben. Das optimale Lösen der Proben konnte durch ein Ultraschallbad gewährleistet werden. Bei Raumtemperatur wurde das Lysat eine Stunde stehen gelassen, um es danach bei höchster Umdrehung von 20800 g und bei 4°C für 90 Minuten zu zentrifugieren. Der entstandene Überstand wurde abpipettiert und jeweils 100 µl von diesem in mehrere Tubes portioniert. Folgte im Anschluss nicht die Proteinbestimmung nach Popov, wurden die Proben bei -80°C eingefroren.

##### **4.4.2 Proteinbestimmung nach Popov**

Für die Bestimmung des Gesamtproteingehalts einer Probe nach Popov [Popov et al., 1975] wurden zunächst folgende Lösungen angesetzt:

Lösung I: 0,65 g Amidoschwarz 10B in 50 ml Lösung II

Lösung II: 30 ml Eisessig (100%ige Essigsäure), 450 ml Methanol

Lösung III: Lösung I und Lösung II im Verhältnis 1:10 verdünnen

Die Proteinlösungen (Proben) wurden im Verhältnis 1:20 mit Wasser verdünnt und davon wurden 200 µl in den Test eingesetzt. Um eine Eichkurve zu erstellen, wurde eine BSA (bovines Serumalbumin)-Stammlösung (2 mg/1000 µl) mit Aqua dest. auf 100, 250, 1000 und 1500 µg/ml im Test verdünnt. In original Eppendorf-Tubes wurden 200 µl der Eich- bzw. Probenlösung vorgelegt und durch den Zusatz von Lösung III ein Komplex aus Proteinen und Amidoschwarz 10B ausgefällt. Im Anschluss wurde die Probe 5 Minuten bei 15800 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde dreimal mit Lösung II gewaschen, wobei beim dritten Mal Lösung II im Tube verblieb und nochmals 5 Minuten bei 15800 g zentrifugiert wurde. Nach Lösen des Pellets in 1 ml 0,1 M Natronlauge konnten die Proben in Halbmikro-Küvetten überführt und die Extinktion bei einer Absorption von 620 nm in einem Spektrometer gemessen werden. Die Eichgrade wurde aus den Extinktionen der Eichproben erstellt, sodass die Konzentration der Proben durch Extrapolation an dieser abgelesen werden konnte. Diese Bestimmung des Gesamtproteingehaltes ermöglichte in der Gelelektrophorese das Auftragen von je 50 µg Proteinprobe pro Tasche.

#### 4.4.3 Prinzipien des Western Blots

Der Western Blot ist eine häufig verwendete Form der Proteinanalytik und dient der sensitiven Bestimmung eines Antigens. Er kombiniert die Gelelektrophorese mit einer enzymimmunologischen Detektion. Dabei werden die in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine im elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran übertragen („Blotting“). Die vorher entstandenen Proteinbanden bleiben aufgrund des Ladungswechsels der Proteine bei diesem Vorgang erhalten. Es folgt die Identifizierung der Proteine mit einem spezifischen mono- oder polyklonalen Antikörper. [Löffler et al., 2007b]

#### 4.4.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese stellt eine wichtige Vorstufe zum Western Blot dar. Das verwendete Gelelektrophoreseverfahren nach Laemmli dient der Auftrennung von Proteinen nach Ladung und Größe. Es benötigt ein SDS-Page-System aus zwei Gelen, die sich vor allem im Hinblick auf die Porengröße und den pH-Wert unterscheiden. Im Sammelgel (oben) werden die Proben zunächst konzentriert, bevor sie im Trenngel (unten) getrennt werden. Das SDS denaturiert die Proteine, zerstört ihre Tertiärstruktur und bindet sich so an die Polypeptidketten, dass ihre Eigenladung durch die stark negative Ladung des SDS überdeckt wird. Dadurch wandern diese alle im angelegten elektrischen Feld zur Anode und es erfolgt eine Auftrennung nach der Größe der Proteine. Grund dafür ist, dass die Wanderungsgeschwindigkeit indirekt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes ist. Kleine Proteine laufen demnach weiter durch die Gelmatrix als große Proteine. Nachdem die Auftrennung abgeschlossen ist, können die Proteine durch Detektionsverfahren näher bestimmt werden.

In Vorbereitung auf die Elektrophorese wurden die Gele nach Tab. 6 hergestellt. Nach langsamem Auftauen der extrahierten Protein-Proben wurden diese mit dem Vortexer aufgearbeitet. Um einen Abbau der Proteine in der sich anschließenden fünfminütigen Denaturierung im Thermomixer bei 95°C zu verhindern und um den pH-Wert konstant zu halten, erfolgte eine Zugabe von Roti-Load 1 zur Probe im Verhältnis 1:3.

Nach dem Entfernen der Gelkämme wurden die gebildeten Taschen mit Elektrophoresepuffer gespült und wieder mit diesem gefüllt. Es folgte als Erstes das Auftragen von 10 µl Standard pro Gel und dann das Auftragen der Proben mit Hilfe einer Hamilton-Pipette. Durch die vorangegangene Popov-Bestimmung konnte garantiert werden, dass jede Tasche mit 50 µg Protein gefüllt wurde. Es kamen immer zwei Gele in eine Gelkammer und sowohl die obere als auch die untere Kammer wurde mit 5000 ml Laufpuffer bei einem pH-Wert von 8,3 gefüllt. Nach einer 20-minütigen Anlaufzeit bei 40 mA, bei der sich die Proben an der Trenngelfront sammelten, folgte die circa

vierstündige Auftrennungszeit bei 80 mA in der 17°C temperierten Elektrophoresekammer. Wenn die Proben das Gel durchlaufen hatte, schloss sich der eigentliche Western Blot an.

#### 4.4.5 Western Blot

Für den Western Blot wurden sowohl die PVDF-Membran als auch das Filterpapier zugeschnitten und der Transferpuffer hergestellt. Die Membran wurde kurz in Methanol gespült und anschließend für 20 Minuten in Transferpuffer gelegt. Die im weiteren Verlauf benötigten Schwämme und das Filterpapier wurden ebenfalls in Transferpuffer eingeweicht. Nach Herauslösen des Gels aus der Gelkammer erfolgte der Zusammenbau der Transferkassette wie in Tab. 5 beschrieben.

Es schloss sich die Transferphase über Nacht (mindestens 12 Stunden) bei 0,5 A an, wobei eine Kühlung durch genügend Eis garantiert war. Am nächsten Morgen wurde der Transfer für eine Stunde auf 1 A erhöht.

Um die entstandenen Proteinbandenmuster sichtbar zu machen, folgten daraufhin eine Ponceau-Färbung des Gels sowie das Auftragen der Blockierungslösung und des primären Antikörpers.

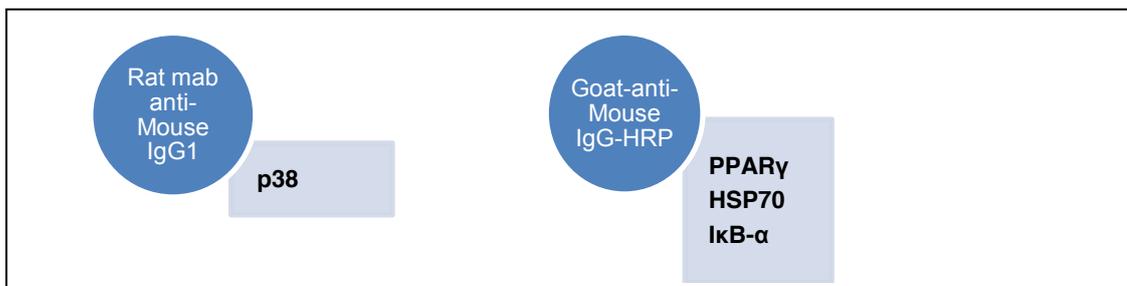
**Tab. 5:** Aufbau der Transferkassette von oben nach unten

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gitter (glatte Seite weg von Elektrode)</li> <li>• Platinelektrode (Kathode)</li> <li>• Gitter</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwamm</li> <li>• Filterpapier</li> <li>• Gel</li> <li>• Transfermembran (luftblasenfrei rollen)</li> <li>• Filterpapier</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwamm</li> <li>• Filterpapier</li> <li>• Gel</li> <li>• Transfermembran</li> <li>• Filterpapier</li> <li>• Schwamm</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gitter</li> <li>• Silberelektrode (Anode)</li> <li>• Gitter</li> </ul>

#### 4.4.6 Nachweis spezifischer Antigene

Die Membran wurde dafür zunächst kurz in TBS-T 0,1% geschwenkt und schließlich mit einer 5%igen Magermilchlösung zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Damit konnten unspezifische Bindungen des Primärantikörpers an freien Bindungsstellen vermieden werden. Dann wurde diese Magermilchlösung abgegossen und nochmals mit TBS-T 0,1% gespült. Es folgte das Auftragen des Primärantikörpers, indem dieser, der Konzentration den Herstellerangaben entsprechend, der 5%igen Magermilchlösung hinzugegeben wurde. Die Membranen wurden zusammen mit der Primärantikörper-Magermilchlösung eingeschweißt und über Nacht im Kühlschrank bei

+4°C inkubiert. Am nächsten Morgen folgte das dreimalige Spülen der Membranen für jeweils 5 Minuten mit TBS-T 0,1% und das Auftragen des passenden Sekundärantikörpers, mit dessen Hilfe die Bindung zwischen Antigen und Primärantikörper sichtbar gemacht werden konnte (Abb. 10). Dieser Sekundärantikörper wurde einer 1%igen Magermilchlösung beigefügt und die Membran mit diesem für 1,5 Stunden geschwenkt. Nach einem weiteren Waschvorgang mit TBS-T 0,1% wurde die Membran mit ECL™-Lösung 1 und 2 (Amersham) aktiviert und so eine nicht-radioaktive Chemilumineszenzreaktion durchgeführt. Die Blot-Membran wurde mit der Proteinseite nach oben zwischen Plastikfolien in eine Röntgenkassette gelegt. Die weitere Filmentwicklung auf speziellen Röntgenfilmen (Hyperfilm™ ECL, Amersham) geschah nach Angaben des Herstellers in der Dunkelkammer. Eine Aufbewahrung der Membranen war durch Einschweißen und Lagerung im Kühlschrank möglich. Nach Entwicklung der Filme konnte, mithilfe von Standardbanden, den Proteinbanden eine entsprechende Proteingröße in kDa zuzuordnen.



**Abb. 10:** Darstellung der verwendeten Sekundärantikörper (im Kreis) zu ihren entsprechenden Primärantikörpern

#### **4.5 Statistische Auswertung**

Die im Septic Shock Modell erhobenen Daten zu Überlebenszeit, Blutdruck, Herzfrequenz und PRI wurden für jedes Tier einzeln in Microsoft Office Excel 2007 eingegeben. Für die verschiedenen Versuchsgruppen folgten die Ermittlung des Mittelwertes sowie die Prüfung auf Signifikanz mit Hilfe des T-Testes dieses Programms. Die Western Blots wurden eingescannt und die relative Intensität der Banden mithilfe von „Gimp 2“ und „ImageJ“ bestimmt. Die statistische Auswertung dieser Daten sowie die Auswertung der Daten der MPO-Aktivität erfolgte wieder mit Microsoft Office Excel 2007.

Die in dieser Arbeit ersichtlichen Grafiken wurden entweder mit Microsoft Office Word 2007, Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Office Power Point 2007 oder Concept Draw 7 Professional erstellt.

**Tab. 6:** Übersicht über die Zusammensetzung der für die Bestimmung der Protein-expression mittels Western Blot benötigten Lösungen, Puffer und Gele

<b>Lysepuffer</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Menge</b>
Harnstoff	7 M	17,0 g
Thioharnstoff	2 M	6,1 g
CHAPS	4%	1,6 g
TRIS Puffer	40 mM	0,194 g
Complete Mini		4 Tabletten
Auffüllen mit Aqua dest. auf		40 ml
<b>Trenngel</b>		<b>Sammelgel</b>
13,5 ml Acrylamid 30 %ig		2,5 ml Acrylamid 30%ig
5,62 ml Trenngelpuffer		5 ml Sammelgel
450 µl SDS 10%ig		200 µl SDS 10%ig
23,25 ml Aqua dest.		11,3 ml Aqua dest.
2,25 ml APS 1,5%ig (Ammoniumpersulfat)		1 ml APS 1,5%ig
22,5 µl TEMED (N,N,N'N'Tetramethylethylendiamid)		15 µl TEMED
<b>Trenngelpuffer</b>		<b>Sammelgelpuffer</b>
363 g Tris Base (3,0 M)		30 g Tris Base (3,0 M)
1000 ml Aqua destilata		500 ml Aqua destilata
mit konzentrierter HCl auf pH 8,8 einstellen		mit konzentrierter HCl auf pH 6,8 einstellen
Endkonzentration im Gel: 375 mM Tris-HCl		Endkonzentration im Gel: 125 mM Tris-HCl
<b>Elektrophoresepuffer</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Menge</b>
Tris	25 mM	30,29 g
Glycin	192 mM	144 g
SDS	0,1%	10 g
Aqua dest.		1000ml
<b>10x Transferpuffer</b>		<b>Menge</b>
Tris (25 mM)		30,29 g
Glycin (192 mM)		144 g
Aqua dest.		1000 ml
<b>1x Transferpuffer</b>		<b>Menge</b>
Transferpuffer 10x		100 ml
Methanol		200 ml
Aqua dest.		1000 ml
<b>TBS (Tris-Buffer Saline) 10fach</b>		
Tris		12,10 g
NaCl		90 g
Aqua dest.		1000 ml
<b>TBS-T 0,1%</b>		
TBS 10x		100 ml
Aqua dest.		900 ml
Tween		1 ml
<b>Blockierungslösung 5%</b>		
TBS-T 0,1%		100 ml
Magermilchpulver		5 g
<b>HTAB-Puffer</b>		
Hexadecyltrimethylammoniumbromid		250 mg
Aqua dest.		45 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50mM) (0,034g/5ml)		5 ml
<b>ODI-Solution</b>		
o-Dianisidine		8,35 mg
PBS		5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung (10 µl 30%ige H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung + 6 ml Aqua dest)		0,5 ml

## **5. Ergebnisse**

### **5.1 Pioglitazon**

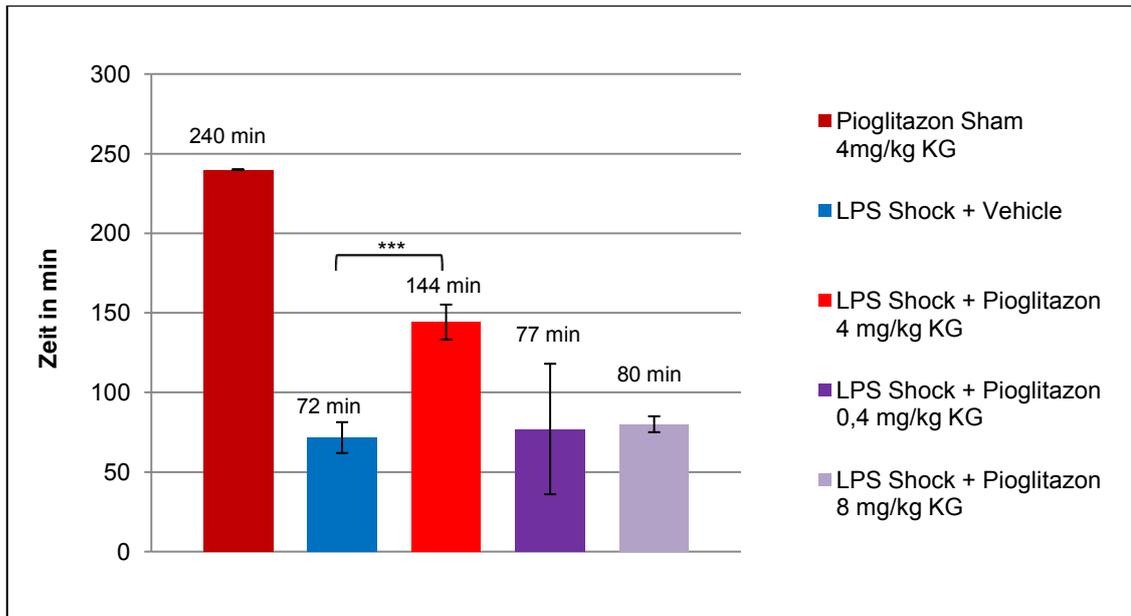
#### **5.1.1 Effekte von Pioglitazon im Septic Shock Modell**

##### **a) Überlebenszeiten**

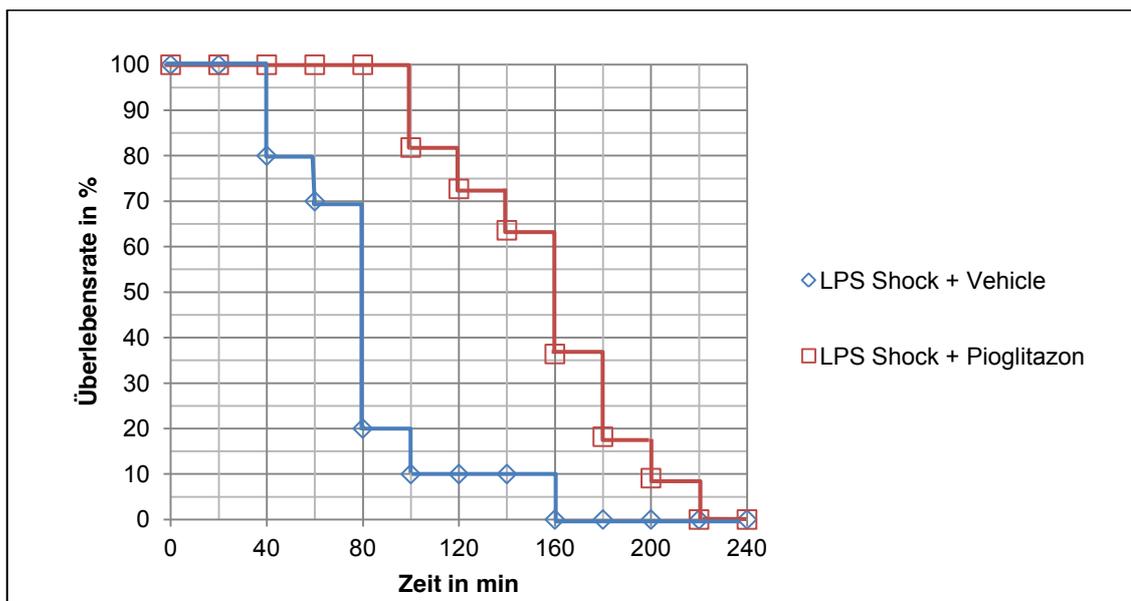
Um zu zeigen, ob Pioglitazon protektiv im septischen Schock wirkt, wurde die Überlebenszeit im Septic Shock Modell als ein entscheidender Parameter herangezogen. Die Überlebenszeit wurde für die Tiere, die nach der zehnmütigen Stabilisierungsphase LPS bekamen, als die Zeit unmittelbar nach der LPS-Gabe bis zum Tod bzw. bis zur letalen, intracardialen Injektion von Pentobarbital nach 240 Minuten definiert. Bei den Sham-Tieren begann die Zeit unmittelbar nach der Stabilisierungsphase von zehn Minuten und endete wie bei den anderen Tieren.

Tiere, die nur LPS und Vehicle (NaCl) während des Versuchs bekamen, überlebten im Mittel knapp 72 Minuten (siehe Abb. 11), wobei die meisten Tiere in der Zeit zwischen 60 und 80 Minuten verstarben. Lediglich ein Tier lebte 144 Minuten. Eine Verlängerung der Überlebenszeit ist erkennbar nach Gabe von Pioglitazon an Tiere, die am folgenden Tag LPS erhielten. Hier kommt es zu einer signifikanten Verdopplung der Überlebenszeit auf 144 Minuten ( $p < 0,001$ ). Die meisten Tiere dieser Gruppe überlebten die ersten zwei Stunden und zwei Tiere sogar die ersten drei Stunden nach der LPS-Injektion. Wie in Abb. 11 ersichtlich wird, brachte weder eine Verdopplung noch eine Reduzierung der Dosis auf ein Zehntel einen Überlebensvorteil, sodass sich die folgende Auswertung der Ergebnisse auf die Dosis 4 mg/kg KG bezieht. Alle Sham-Tiere, die einen Tag zuvor Pioglitazon intraperitoneal erhalten hatten, überlebten den gesamten maximalen Versuchszeitraum von vier Stunden (siehe Abb. 11).

Als Überlebensrate wird der Prozentsatz der Tiere aus der jeweiligen Gruppe verstanden, der zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Injektion von LPS noch am Leben war. Die Kaplan-Meier-Kurve in Abb. 12 macht eine vorübergehende Verbesserung der Überlebensrate deutlich. Zum Zeitpunkt von 80 Minuten nach LPS-Gabe lebten noch alle Tiere der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe, während in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe nur 20% der Tiere noch am Leben waren. Wenngleich alle der LPS + Pioglitazon-Tiere noch innerhalb der maximalen Versuchsdauer verstarben, so ist doch ein klarer lebensverlängernder Effekt erkennbar, da auch 120 Minuten nach LPS-Gabe in dieser Gruppe noch knapp 73% der Tiere am Leben waren. Dahingegen sind von den zehn Tieren, die nur LPS bekamen, zu diesem Zeitpunkt bereits neun verstorben.



**Abb. 11:** Effekt von Pioglitazon auf die Überlebenszeiten im Septic Shock Modell unter Angabe des Standardfehlers; \*\*\* =  $p < 0,001$

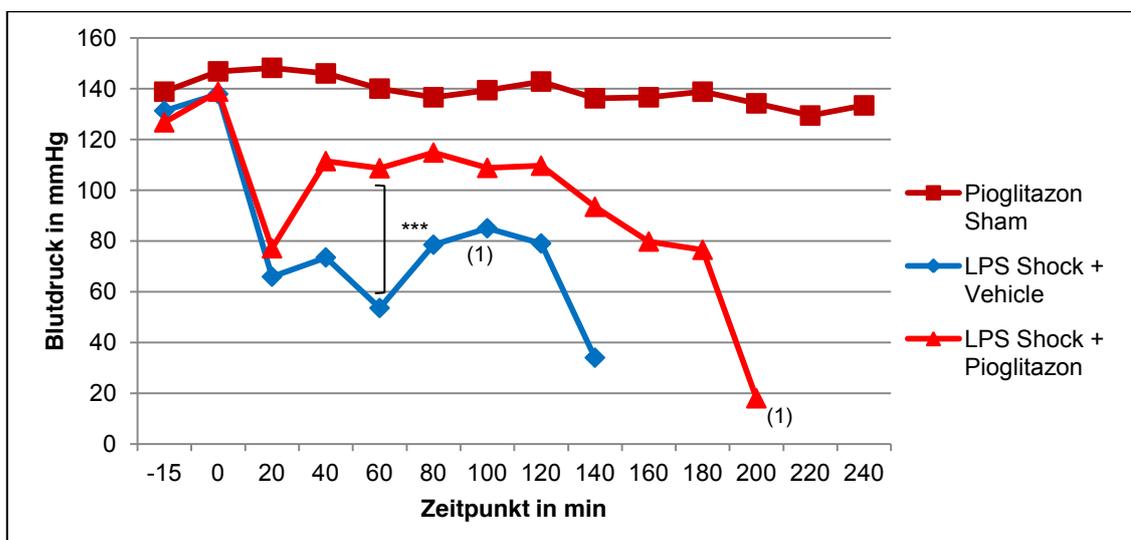


**Abb. 12:** Effekt von Pioglitazon auf die Überlebensraten im Septic Shock Modell (Kaplan-Meier-Kurven)

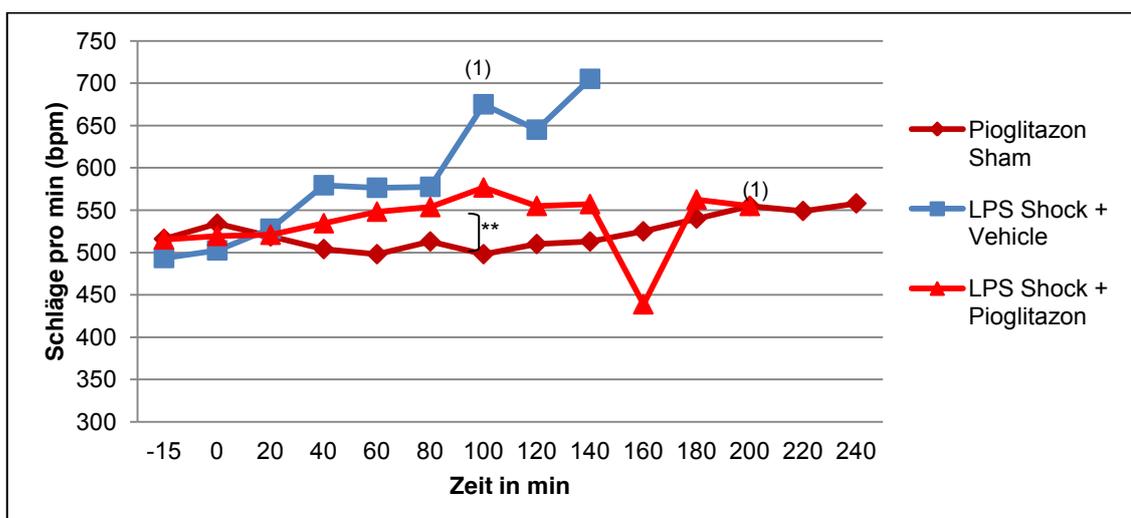
### b) Hämodynamische Veränderungen

Zur Überwachung der hämodynamischen Veränderungen während der Stabilisierungsphase und innerhalb des Versuchszeitraums wurden der systolische, diastolische und mittlere arterielle Blutdruck (MABP) sowie der Pressure Rate Index (PRI) und die Herzfrequenz herangezogen. Die Kurve des MABP der Pioglitazon Sham-Tiere zeigt, dass diese während der gesamten Versuchszeit hämodynamisch stabil waren (Abb. 13). Sowohl in der Kurve der LPS Shock + Vehicle-Tiere als auch in der Kurve der LPS Shock + Pioglitazon-Tiere ist ein initialer Blutdruckabfall nach LPS-Gabe auf einen

MABP von 66 mmHg bzw. 77 mmHg zu erkennen. Jedoch erholen sich die mit Pioglitazon vorbehandelten Tiere deutlich schneller und stärker als die Tiere, die nur LPS + Vehicle bekamen. Nach einer Stunde zeigt sich eine hochsignifikante Verbesserung des MABP auf 109 mmHg gegenüber 54 mmHg ( $p < 0,001$ ). In der zweiten Stunde nach LPS-Gabe bleibt der Blutdruck bei der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe relativ konstant, bevor er danach zu sinken beginnt und das letzte Tier bei 201 Minuten verstirbt. Tiere der LPS Shock + Vehicle-Gruppe, die die mittlere Überlebenszeit von 72 Minuten überlebt haben, weisen eine leichte Verbesserung der Hämodynamik in der zweiten Stunde auf. Sie erreichen jedoch nicht das Niveau der mit Pioglitazon vorbehandelten Tiere.



**Abb. 13:** Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MABP) während des Versuchszeitraums von 240 Minuten; \*\*\*=  $p < 0,001$ , (1) = ab dem Zeitpunkt nur noch ein Tier dieser Versuchsgruppe am Leben

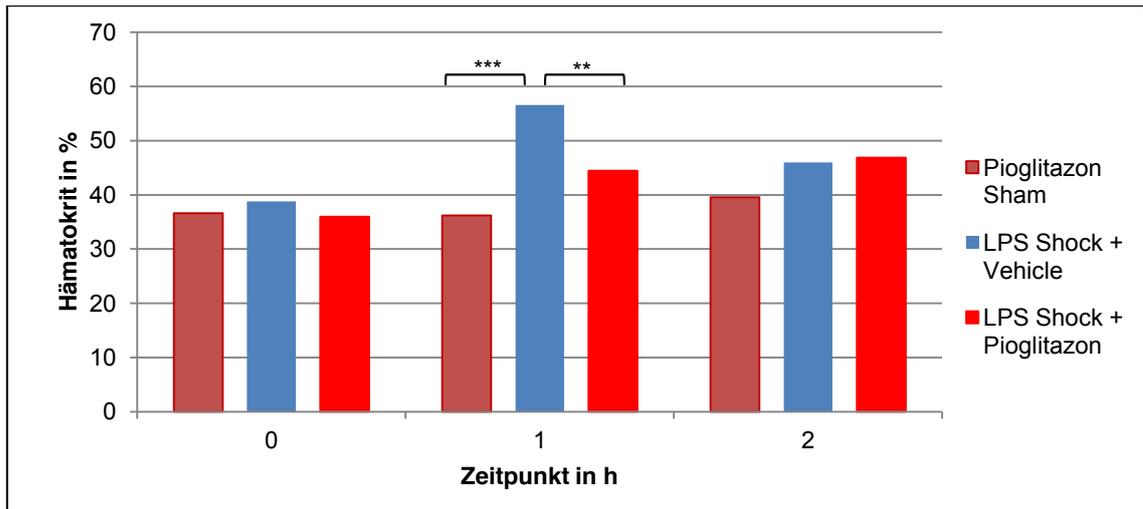


**Abb. 14:** Verlauf der mittleren Herzfrequenz während des Versuchszeitraums von 240 Minuten; \*\*= $p < 0,01$ , (1) = ab dem Zeitpunkt nur noch ein Tier dieser Versuchsgruppe am Leben

Abb. 14 stellt den Verlauf der Herzfrequenz während der Stabilisierungsphase und während des Versuchszeitraums dar. Alle drei Gruppen haben zu Beginn eine vergleichbare Herzfrequenz, die zwischen 493 und 516 bpm liegt. Nach LPS-Gabe steigt die Frequenz in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe am stärksten an auf 580 bpm zum Zeitpunkt von 40 Minuten. Danach stagniert der Verlauf zunächst bis es zu einem sprunghaften Anstieg kommt, der bei 140 Minuten sein Maximum mit 705 bpm erreicht. Zusammen mit dem Verlauf des Blutdrucks, der in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe stetig sinkt, kann dieses als Hinweis auf ein septisches Geschehen gewertet werden. Die Herzfrequenz der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe steigt nach Injektion von LPS ebenfalls an und erreicht bei circa 550 bpm ein höheres Niveau, das zwischen der 60. und 140. Minute vorerst konstant bleibt. Sie ist dabei gegenüber der Herzfrequenz der Pioglitazon Sham-Gruppe signifikant erhöht. Der tiefe Einschnitt bei der 160. Minute ist auf zwei Tiere zurückzuführen, die kurze Zeit später verstorben sind. Danach erlangt die Herzfrequenz der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe wieder ein Niveau von rund 550 bpm. Die Tiere der Pioglitazon Sham-Gruppe zeigen während der 240 Minuten eine leicht ansteigende Tendenz der Herzfrequenz, die aber nie über 560 bpm hinausgeht.

### **c) Hämatokrit**

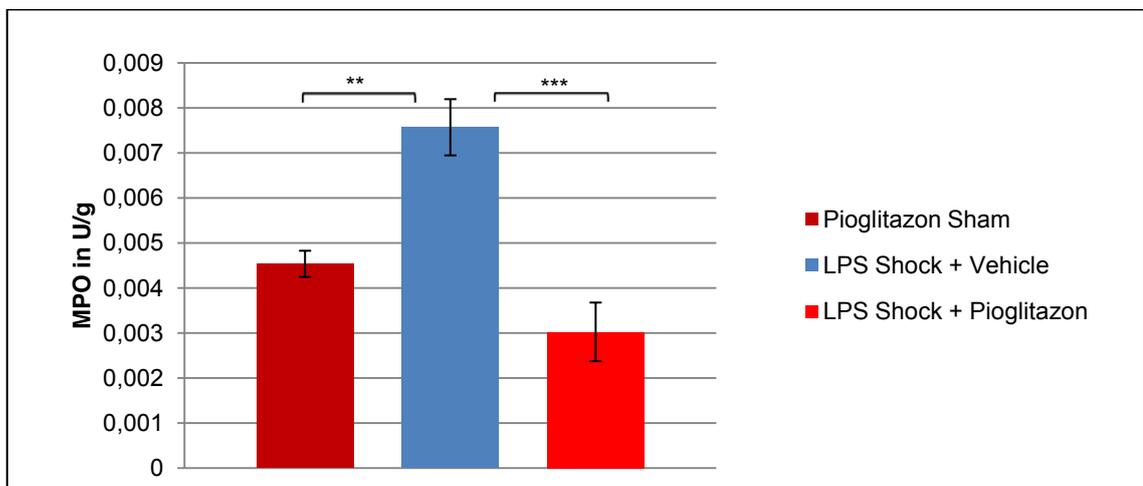
Der Hämatokrit-Verlauf ist innerhalb der jeweiligen Gruppe sehr einheitlich, weist aber im Vergleich der Versuchsgruppen untereinander einige Unterschiede auf. Zu Beginn liegt der Hämatokrit in allen Gruppen zwischen 36% und 40% (Abb. 15). Die LPS Shock + Vehicle-Gruppe weist einen steilen Anstieg des Hämatokrits in der ersten Stunde von 38,8% auf 56,6% auf. Dieser ist mit der Schrankenstörung der Gefäße während des septischen Geschehens und einem damit konsekutiven Strom von intravasaler Flüssigkeit ins Gewebe zu erklären. Nach diesem Maximum fällt der Wert in der zweiten Stunde auf 46%. Der stärkste Hämatokrit-Anstieg bei den LPS Shock + Pioglitazon-Tieren findet ebenfalls in der ersten Stunde statt. Er steigt in dieser Zeit von 36% auf 44,5% und zeigt danach eine moderate Steigerung auf 47,5%, wobei er in der letzten Stunde annähernd konstant bleibt. Für die Pioglitazon Sham-Tiere zeigt sich innerhalb der ersten Stunde ein konstanter Hämatokrit von ca. 36,5%. Dieser steigt in der folgenden Stunde nur leicht auf 39,6% an und bleibt dann bis zum Ende der Versuchszeit konstant. Aufgrund unterschiedlicher Gruppengrößen ist der Hämatokrit-Wert nach der zweiten Stunde nicht mehr vergleichbar, sodass Abb. 15 lediglich diesen Zeitraum darstellt.



**Abb. 15:** Verlauf des Hämatokrit-Wertes innerhalb der ersten zwei Stunden des Versuchszeitraums; \*\*= $p < 0,01$ , \*\*\*= $p < 0,001$

### 5.1.2 Effekte von Pioglitazon auf die Myeloperoxidaseaktivität

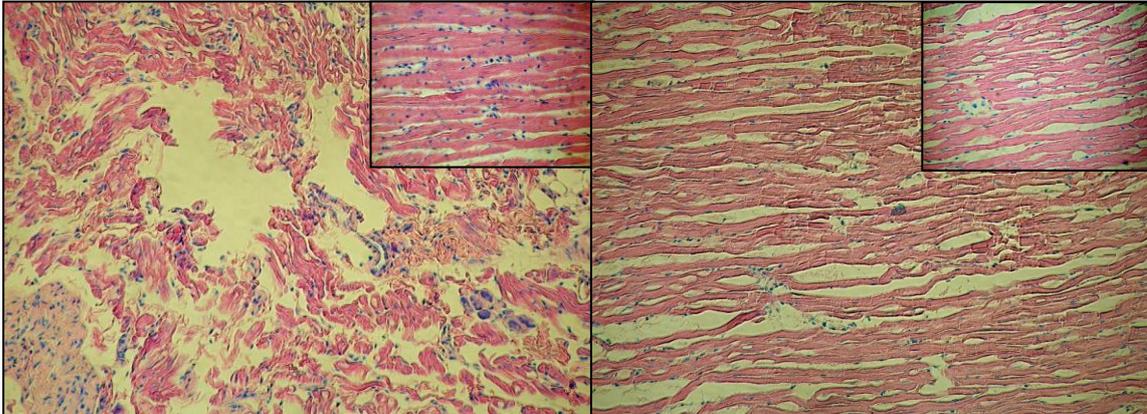
Die Tiere der LPS Shock + Vehicle-Gruppe zeigen im Myokard eine signifikant erhöhte MPO-Aktivität im Vergleich zu den Tieren der Pioglitazon Sham-Gruppe (Abb. 16). Durch eine Vorbehandlung der Tiere, die am folgenden Tag LPS erhielten, mit Pioglitazon sinkt die Aktivität der MPO signifikant gegenüber der LPS Shock + Vehicle-Gruppe und ist auch verglichen mit der Pioglitazon Sham-Gruppe erniedrigt. Eine erhöhte MPO-Aktivität in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe lässt sich auch in der Niere nachweisen. Diese ist in der Gruppe der LPS Shock + Pioglitazon-Tiere und bei den Pioglitazon Sham-Tieren signifikant vermindert, wobei die beiden Werte annähernd gleich sind. In der Lunge ergibt sich eine nahezu übereinstimmende MPO-Aktivität von 0,03 U/g in allen drei Gruppen. Demgegenüber ist die MPO-Aktivität der LPS Shock + Vehicle-Tiere in der Leber signifikant gesteigert im Vergleich zu den Pioglitazon Sham-Tieren, aber identisch mit dem Wert der LPS Shock + Pioglitazon-Tiere.



**Abb. 16:** Effekt von Pioglitazon auf die Myeloperoxidaseaktivität im Myokard unter Angabe des Standardfehlers; \*\*= $p < 0,01$ , \*\*\*= $p < 0,001$

### 5.1.3 Histologische Veränderungen unter dem Einfluss von Pioglitazon

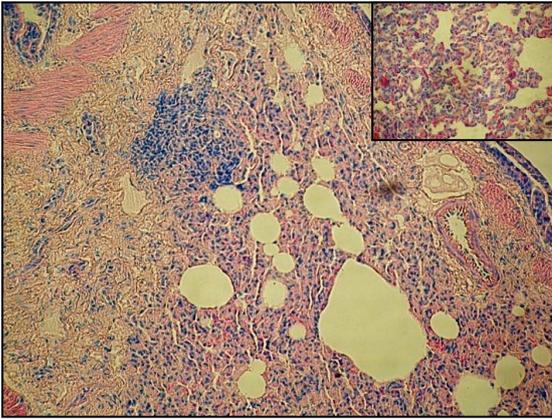
#### a) Myokard



**Abb. 17:** links: Myokardgewebe der LPS Shock + Vehicle-Gruppe, Giemsa-Färbung, großes Bild 200 fache Vergrößerung, kleines Bild 400 fache Vergrößerung; rechts: LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe, Giemsa-Färbung, großes Bild 200 fache Vergrößerung, kleines Bild 400 fache Vergrößerung

Bei der Entnahme des Herzens war makroskopisch in den Gruppen, die LPS erhalten hatten, eine Dilatation der Ventrikel festzustellen. Lichtmikroskopisch betrachtet, zeigt das Myokardgewebe der LPS Shock + Vehicle-Gruppe deutliche Schäden in der Zellstruktur und Gewebeintegrität, wie in Abb. 17 sichtbar ist. Die Zell-Zell-Kontakte mit den Disci intercalares sind nur noch an wenigen Stellen zu erkennen. Desweiteren ist eine starke Leukozyteninfiltration in der Giemsa-Färbung zu erkennen. Das Gewebe der Pioglitazon Sham-Gruppe ist noch gut intakt, sodass auch Glanzstreifen zwischen den Kardiomyozyten und perinukleäre Höfe um die Zellkerne zu sehen sind. Die Akkumulation der Leukozyten ist deutlich geringer ausgeprägt als in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe. Demgegenüber zeigt sich in der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe ein mittelgradiger Zellschaden mit Rissen im Herzmuskelgewebe (Abb. 17). Die Glanzstreifen sind nur vereinzelt erkennbar und die Kardiomyozyten sind, ebenso wie in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe, elongiert, was mit dem makroskopischen Befund der Ventrikeldilatation vereinbar ist. Die Leukozyteninfiltration fällt durch die Vorbehandlung mit Pioglitazon etwas vermindert aus und ist nur etwas stärker als in der Pioglitazon Sham-Gruppe.

## b) Lunge

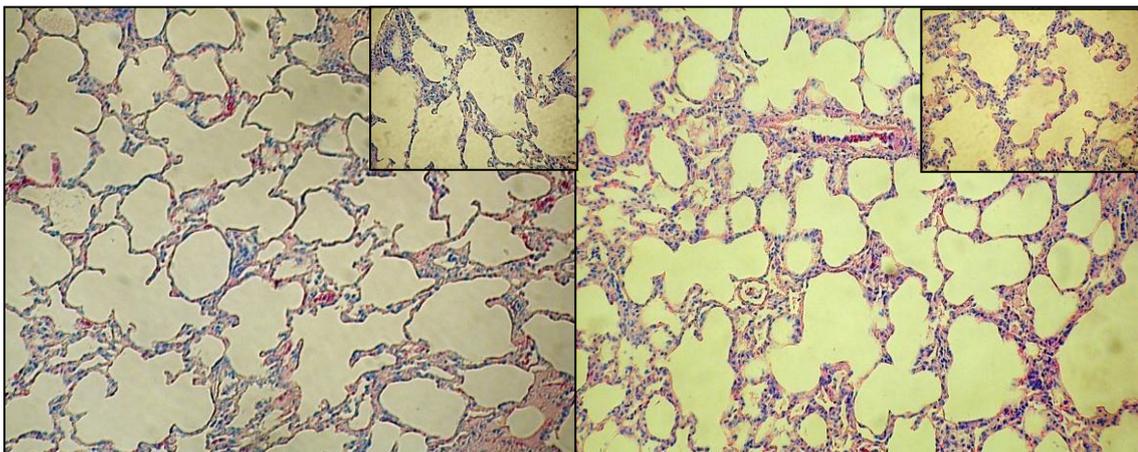


**Abb. 18:** Lungengewebe der LPS Shock + Vehicle-Gruppe, Giemsa-Färbung, großes Bild 200 fache Vergrößerung, kleines Bild 400 fache Vergrößerung

Makroskopisch waren die Lungenflügel zum Entnahmezeitpunkt meistens ohne Auffälligkeiten und nur vereinzelt mit Einblutungen versehen. Abb. 18 zeigt den Schnitt durch das Lungengewebe eines Tieres der LPS Shock + Vehicle-Gruppe. Oben rechts ist ein Bronchus mit peribronchialer Muskulatur und Gefäßen angeschnitten. Es ist eine sehr starke Akkumulation von Leukozyten mit Bildung kleiner Lymphfollikel zu sehen. Die interalveolären Septen sind stark verdickt und die Alveolen geschrumpft.

Weitlumige Ductus alveolares und Alveolen mit zarten interalveolären Septen bestimmen in den mikroskopischen Präparaten der Pioglitazon Sham-Gruppe das Bild, sodass keine pathologischen Veränderungen feststellbar sind (Abb. 19).

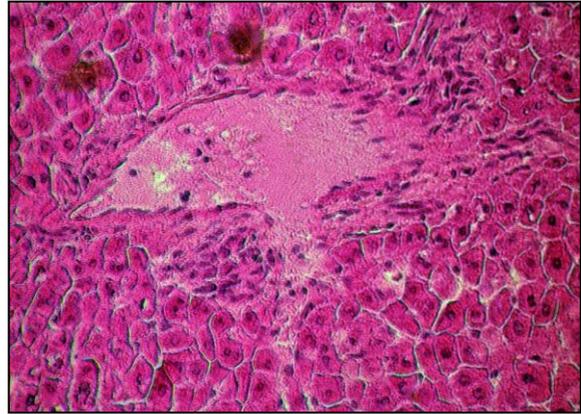
In der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe sind dahingegen die Alveolarwände und die interalveolären Septen etwas verdickt und mehr Leukozyten zu finden im Vergleich zur Pioglitazon Sham-Gruppe (Abb. 19). Jedoch sind die Alveolen deutlich besser belüftet und nicht so sehr verkleinert wie in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe.



**Abb. 19:** links: Lungengewebe der Pioglitazon Sham-Gruppe, Giemsa-Färbung, großes Bild 200 fache Vergrößerung, kleines Bild 400 fache Vergrößerung; rechts: LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe, Giemsa-Färbung, großes Bild 200 fache Vergrößerung, kleines Bild 400 fache Vergrößerung

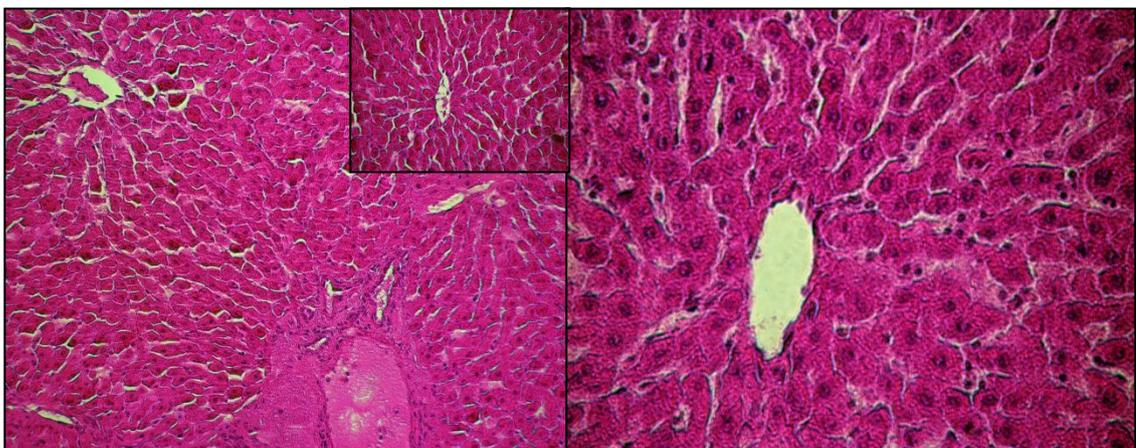
### c) Leber

Die Leber wies als ein wichtiges Schockorgan bereits während der Präparation kurz nach dem Tod des Tieres deutliche Veränderungen auf. Auffällig war eine schwere Leber, die reichlich mit Blut gefüllt war. Auf der Organoberfläche zeigten sich weißliche bis leicht gelbliche Nekrosen. Im histologischen Präparat der LPS Shock + Vehicle-Gruppe (Abb. 20) sind auch in der



**Abb. 20:** Lebergewebe der LPS Shock + Vehicle-Gruppe, HE-Färbung, 400 fache Vergrößerung

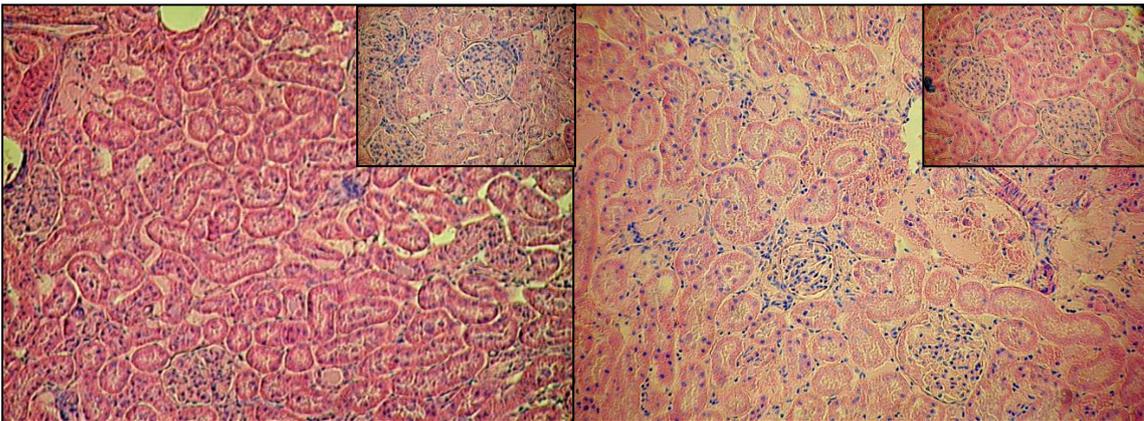
HE-Färbung deutliche Leukozyteninfiltrate sichtbar, die sich um einen Pfortaderast (Vena interlobularis) im periportalen Feld gruppieren. Die Hepatozyten sind stark angeschwollen und weisen nahe der Vena centralis eine Auflösung der Zellmembranen im Sinne einer läppchenzentralen Hepatozytennekrose auf. Weiterhin sind immer wieder größere Einblutungen aufgrund zerstörter Gefäße sichtbar. In dem Präparat der Pioglitazon Sham-Gruppe zeigen sich in Abb. 21 klar abgrenzbare Hepatozyten mit gut definierten Sinusoiden, Zentralvenen und periportalen Feldern. Trotz vereinzelter Einblutungen ist insgesamt ein geringer Schaden der Leber in dieser Gruppe feststellbar. Dahingegen treten in den mikroskopischen Präparaten der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe gelegentlich Hepatozytennekrosen mit Zelllysen nahe der Vena centralis in Erscheinung, die jedoch geringer ausgeprägt sind als in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe. Auch die Einblutungen und die Leukozyteninfiltration sind weniger stark vorhanden, sodass das Organparenchym nach Vorbehandlung mit Pioglitazon einen verminderten Schaden aufweist als ohne Gabe dieses Medikamentes.



**Abb. 21:** links: Lebergewebe der Pioglitazon Sham-Gruppe, HE-Färbung, großes Bild 200 fache Vergrößerung, kleines Bild 400 fache Vergrößerung; rechts: Lebergewebe der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe, HE-Färbung, 400 fache Vergrößerung

#### d) Niere

Vom septischen Schock ist auch oft die Niere betroffen, sodass es zur Ausbildung eines akuten Nierenversagens kommt. Zum Zeitpunkt der Organentnahme waren die Nieren besonders in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe angeschwollen und im Bereich der Nierenrinde waren dunklere Bereiche sichtbar, die ein Korrelat für dort stattgehabte Blutungen sind. Mikroskopisch fallen auch in dieser Gruppe die größten Veränderungen auf. Um die Glomeruli sammeln sich vermehrt Leukozyten und das parietale Blatt der Bowman-Kapsel ist an einigen Glomeruli stark beschädigt, sodass hier von einem Funktionsverlust ausgegangen werden muss (Abb. 22). Als Hinweis auf die im Schock typischen tubulären Nekrosen kann die unscharfe Abgrenzbarkeit der Tubuli mit beginnenden Zelllysen gewertet werden. Im Vergleich dazu sind in der Pioglitazon Sham- und der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe Normalbefunde sichtbar. Die Bowman-Kapsel ist größtenteils intakt und es zeigen sich nur geringfügig mehr Leukozyten nahe der Glomeruli (Abb. 22).



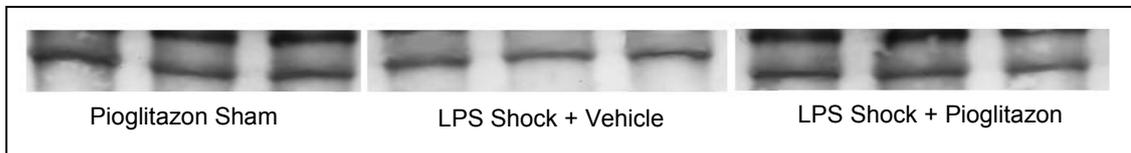
**Abb. 22:** links: Schnitt durch die Nierenrinde der LPS Shock + Vehicle-Gruppe, Giemsa-Färbung, großes Bild 200 fache Vergrößerung, kleines Bild 400 fache Vergrößerung; rechts: LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe, Giemsa-Färbung, großes Bild 200 fache Vergrößerung, kleines Bild 400 fache Vergrößerung

#### 5.1.4 Effekte von Pioglitazon auf die Proteinexpression in den Schockorganen

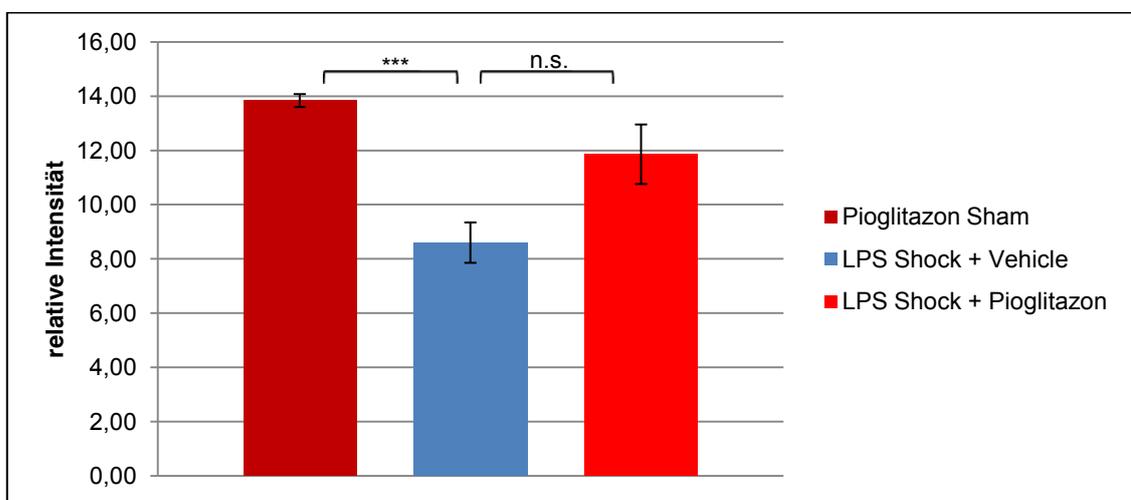
Mithilfe von Western Blots kann eine veränderte Proteinexpression in den verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. Exemplarisch sollen hier einige Unterschiede, die sich durch die Gabe von Pioglitazon bzw. von LPS ergeben haben, dargestellt werden.

Durch die Verwendung von PPAR $\gamma$ -Antikörpern kann im Lungengewebe der mit Pioglitazon vorbehandelten Tiere eine hohe Expression des PPAR $\gamma$ -Rezeptors nachgewiesen werden, die in der Gruppe der Sham-Tiere am höchsten ist (Abb. 23, 24). Dahingegen ist die PPAR $\gamma$ -Expression bei den Tieren, die nur LPS erhielten,

erniedrigt. Ein vergleichbarer Effekt auf die PPAR $\gamma$ -Expression wie in der Lunge ist ebenfalls in der Niere nachweisbar. In der Leber und im Myokard zeigt sich in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe eine hohe Expression der PPAR $\gamma$ -Rezeptoren (relative Intensität 12,9 und 13,9), die jedoch nicht in den Gruppen zu finden ist, die Pioglitazon erhielten.



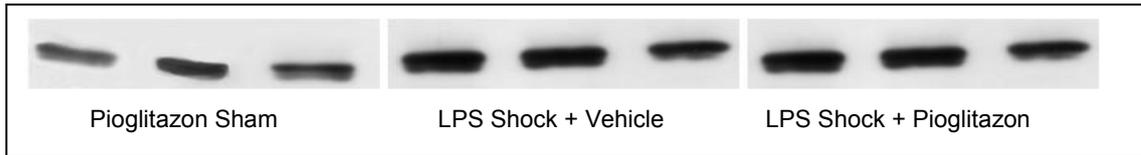
**Abb. 23:** Western Blot: PPAR $\gamma$ -Expression in der Lunge nach Pioglitazon-Gabe im septischen Schock



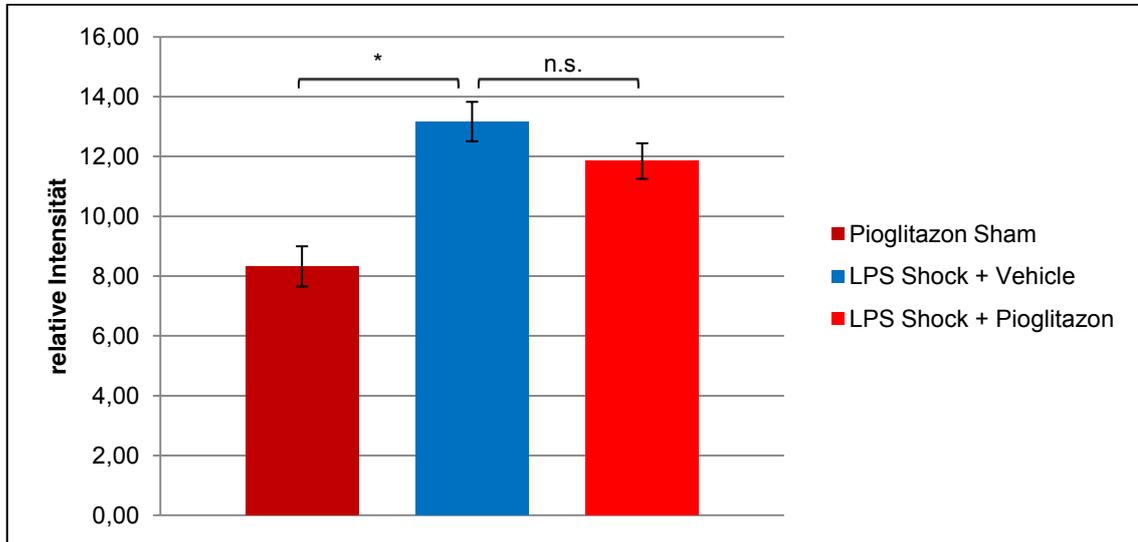
**Abb. 24:** Western Blot: PPAR $\gamma$ -Expression in der Lunge nach Pioglitazon-Gabe im septischen Schock unter Angabe des Standardfehlers; \*\*\*= $p < 0,001$ , n.s. = nicht signifikant

I $\kappa$ B ist im Myokard und in der Leber in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe vermehrt exprimiert, wobei sich im Myokard eine signifikante Steigerung gegenüber der Pioglitazon Sham-Gruppe ergibt (Abb. 25, 26). Eine leichte Verminderung der I $\kappa$ B-Expression ist in der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe sowohl im Myokard als auch in der Leber erkennbar. In der Lunge ergeben sich kaum Unterschiede zwischen den drei Gruppen bezüglich der I $\kappa$ B-Expression.

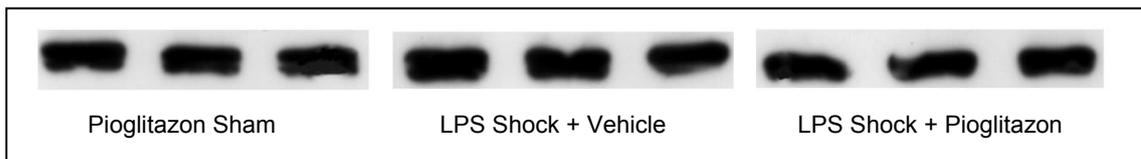
Weiterhin weisen die Western Blots des Myokards eine erhöhte Expression von p38 bei den LPS Shock + Vehicle-Tieren auf mit einer relativen Intensität von 12,4 (Abb. 28). Die Werte der Pioglitazon Sham- und der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe differieren in Bezug auf die p38-Expression nur leicht und sind mit einer relativen Intensität von 10,7 bzw. 10,4 etwas niedriger als die der LPS Shock + Vehicle-Gruppe. In den anderen untersuchten Organen sind keine bzw. sehr geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu erkennen.



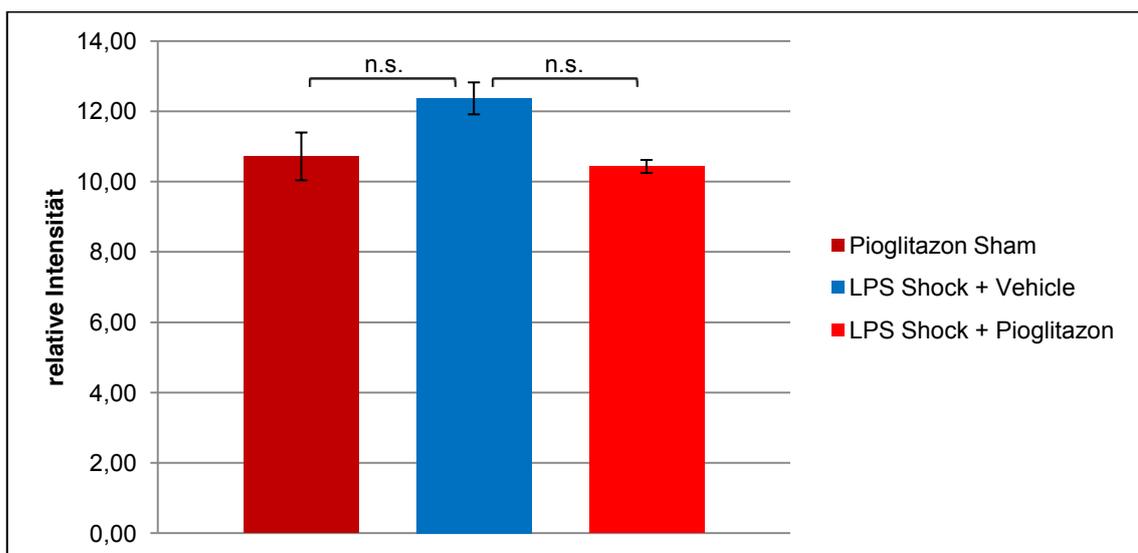
**Abb. 25:** Western Blot: IκB-Expression im Myokard nach Pioglitazon-Gabe im septischen Schock



**Abb. 26:** Western Blot: IκB-Expression im Myokard nach Pioglitazon-Gabe im septischen Schock unter Angabe des Standardfehlers;  $*=p<0,05$ ; n.s. = nicht signifikant



**Abb. 27:** Western Blot: p38-Expression im Myokard nach Pioglitazon-Gabe im septischen Schock



**Abb. 28:** Western Blot: p38-Expression im Myokard nach Pioglitazon-Gabe im septischen Schock unter Angabe des Standardfehlers; n.s. = nicht signifikant

## **5.2 Ranolazin**

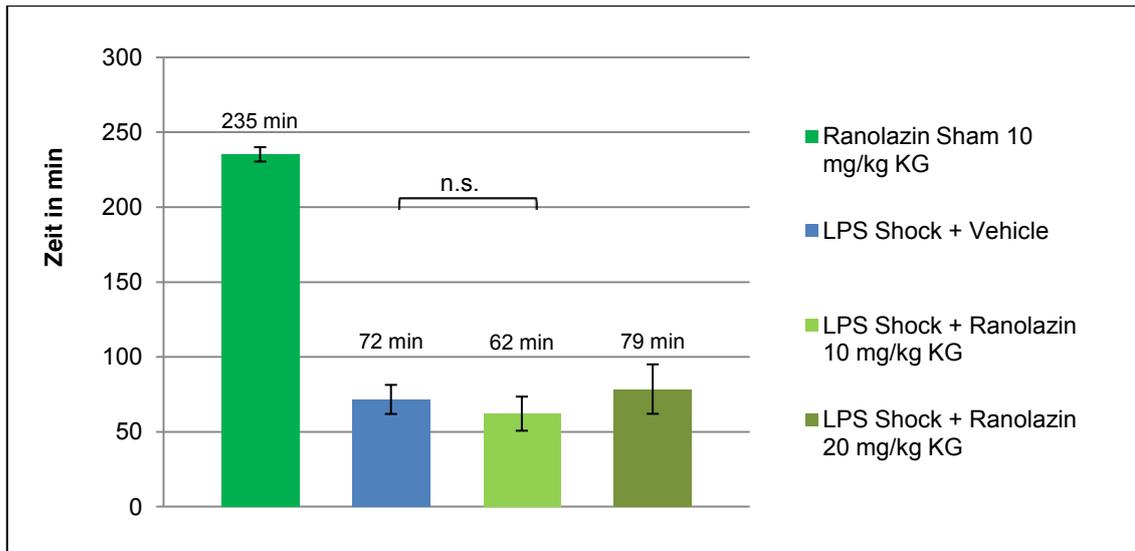
### **5.2.1 Effekte von Ranolazin im Septic Shock Modell**

#### **a) Überlebenszeiten**

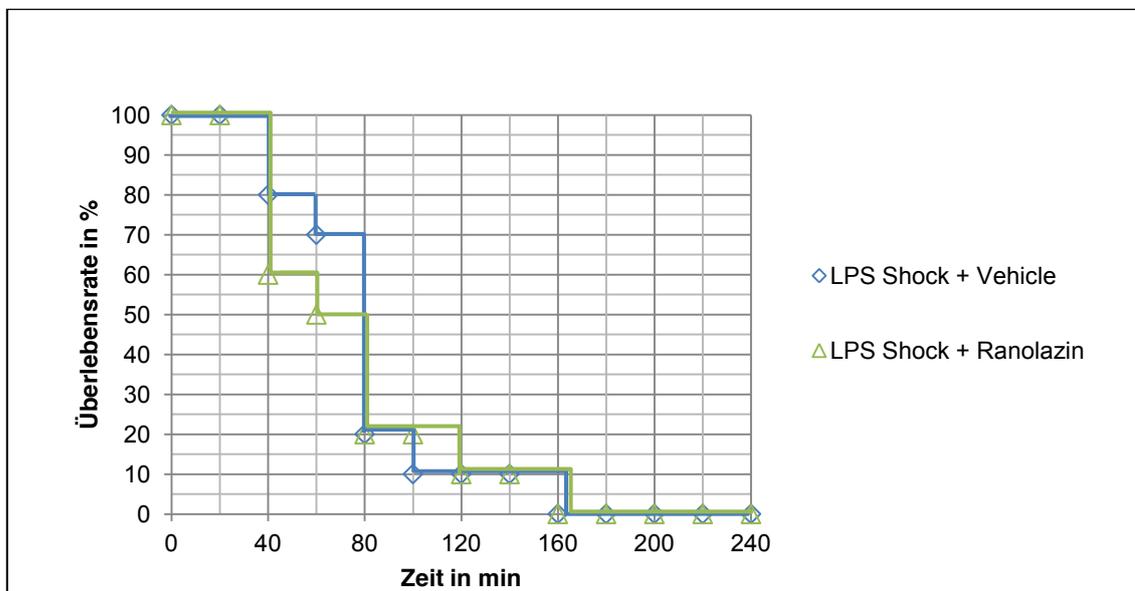
Eine starke Aussagekraft über die protektive Wirkung einer Substanz im septischen Schock wird der Überlebenszeit nach Gabe von LPS zugesprochen. Aus diesem Grund wurde die Zeit ab Ende der zehnminütigen Stabilisierungsphase bzw. ab Injektion von LPS bis zum Tod des Tieres oder bis zur Beendigung des Versuchs nach 240 Minuten durch intracardiale Injektion von Pentobarbital gemessen.

In Abb. 29 sind die Überlebenszeiten der verschiedenen Versuchsgruppen aufgeführt. Die Tiere der LPS Shock + Vehicle-Gruppe, die lediglich LPS und NaCl erhielten, überlebten im Mittel 72 Minuten. Für die mit Ranolazin vorbehandelten Sham-Tiere, die kein LPS bekamen, zeigt sich eine mittlere Überlebenszeit von 235 Minuten, da ein Tier dieser Gruppe bereits nach 216 Minuten verstarb. Wurden die Tiere mittels intraarterieller Gabe von LPS in den septischen Schock versetzt und waren am Vortag mit einer intraperitonealen Injektion von Ranolazin vorbehandelt worden, so ergibt sich mit 62 Minuten mittlerer Überlebenszeit keine Verbesserung im Vergleich zu den LPS Shock + Vehicle-Tieren. Die meisten Tiere dieser Gruppe starben innerhalb der ersten Stunde und nur zwei der zehn Tiere lebten länger als 100 Minuten. Eine Verdopplung der Ranolazin-Dosis auf 20 mg/kg KG führte ebenfalls zu keiner signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit, sondern war für zwei der Versuchstiere noch vor LPS-Gabe letal. Aus diesem Grund beziehen sich die folgenden Ergebnisse auf eine Ranolazin-Dosis von 10 mg/kgKG. Insgesamt konnte keine signifikante Verbesserung der Überlebenszeit gezeigt werden.

Die Kaplan-Meier-Kurve in Abb. 30 veranschaulicht den Prozentsatz der Tiere, die zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Versuchsbeginn noch am Leben waren und zeigt somit die Überlebensraten auf. Es wird ersichtlich, dass die Kurve der LPS Shock + Vehicle-Tiere nahezu parallel verläuft zu der Kurve der LPS Shock + Ranolazin-Tiere. Besonders in den ersten 60 Minuten verstarben sogar mehr Tiere, die zusätzlich zu LPS noch Ranolazin am Vortag bekommen hatten. So sind zum Zeitpunkt 60 Minuten in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe noch 70% der Tiere am Leben, während es in der LPS Shock + Ranolazin-Gruppe nur noch 50% sind. In beiden Gruppen sind spätestens zum Zeitpunkt von 160 Minuten alle Tiere verstorben, sodass keine Verbesserung der Überlebensrate durch Ranolazin erreicht werden konnte.



**Abb. 29:** Effekt von Ranolazin auf die Überlebenszeiten im Septic Shock Modell unter Angabe des Standardfehlers; n.s. = nicht signifikant



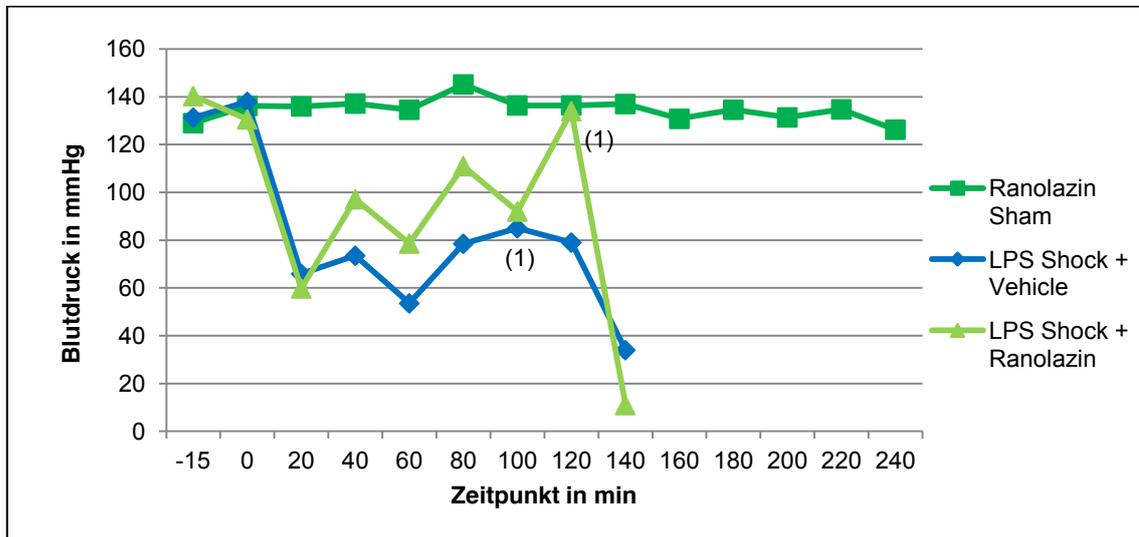
**Abb. 30:** Effekt von Ranolazin auf die Überlebensraten im Septic Shock Modell (Kaplan-Meier-Kurven)

### b) Hämodynamische Veränderungen

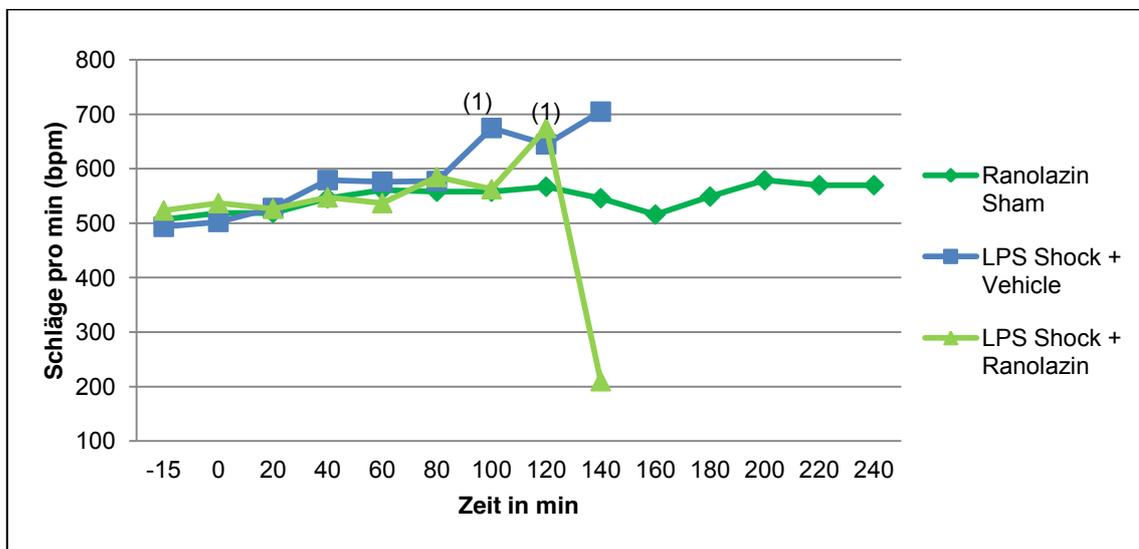
Während der Stabilisierungsphase und während des gesamten Versuchszeitraums erfolgte eine Überwachung der hämodynamischen Parameter. Zu diesen gehörten neben dem systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdruck (MABP) auch die Herzfrequenz und der Pressure Rate Index (PRI).

Die Gruppe der Ranolazin Sham-Tiere weist einen konstanten Verlauf des MABP innerhalb der gesamten Versuchszeit von 240 Minuten auf (Abb. 31). Tiere, die einen Tag zuvor mit Ranolazin intraperitoneal geimpft wurden, zeigen wie die LPS Shock + Vehicle-Gruppe einen initialen Blutdruckabfall nach LPS-Gabe. Der MABP der LPS Shock + Ranolazin-Gruppe verbessert sich zwar im Vergleich zur LPS-Shock +

Vehicle-Gruppe, schwankt jedoch in den folgenden zwei Stunden stark. Der massive Blutdruckabfall zwischen der 120. und 140. Minute ist darauf zurückzuführen, dass zu diesem Zeitpunkt nur noch ein Tier dieser Gruppe am Leben war und kurze Zeit später verstarb. Es ergeben sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Veränderungen zwischen der LPS Shock + Vehicle- und der LPS Shock + Ranolazin-Gruppe.



**Abb. 31:** Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MABP) während des Versuchszeitraums von 240 Minuten; (1) = ab dem Zeitpunkt nur noch ein Tier dieser Versuchsgruppe am Leben



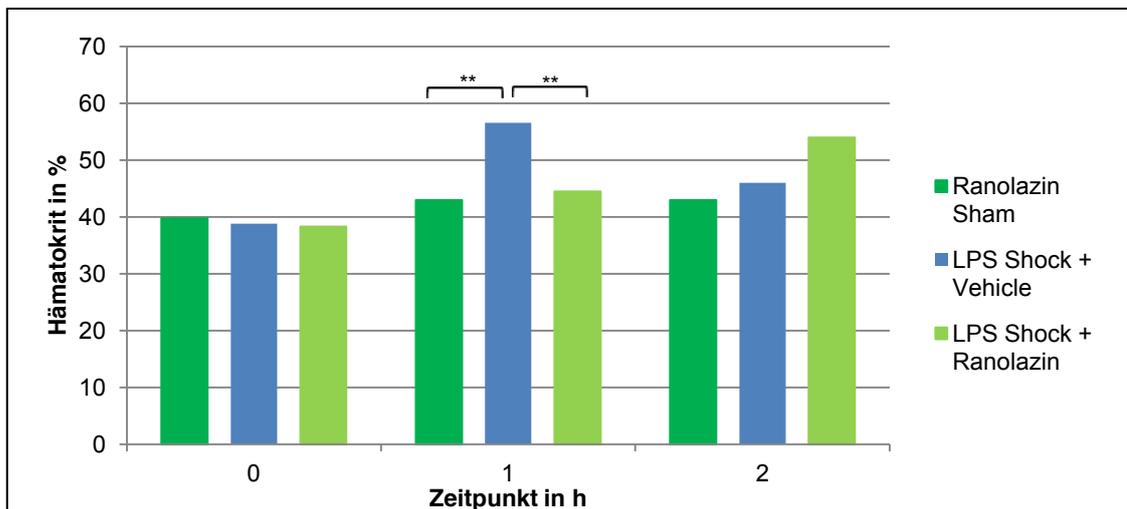
**Abb. 32:** Verlauf der mittleren Herzfrequenz während des Versuchszeitraums von 240 Minuten; (1) = ab dem Zeitpunkt nur noch ein Tier dieser Versuchsgruppe am Leben

Die mittlere Herzfrequenz aller drei Versuchsgruppen ist zu Beginn des Versuchs nahezu gleich und liegt zwischen 493 und 523 bpm. Wie in Abb. 32 ersichtlich, zeigt die Herzfrequenz der Ranolazin Sham-Tiere während der 240 Minuten Versuchszeit nur eine gering ansteigende Tendenz auf 570 bpm. Dagegen ist besonders in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe eine deutliche Steigerung der Herzfrequenz von 493 auf 705

bpm im Verlauf der Versuchszeit zu erkennen, wobei die letzten drei Werte auf ein Tier zurückzuführen sind, das zu diesem Zeitpunkt noch am Leben war. Somit ist keine signifikante Änderung nachweisbar. Eine initiale Steigerung der Herzfrequenz, die mit dem Blutdruckabfall zu diesem Zeitpunkt konform gehen würde, bleibt jedoch aus. Eine stetige Erhöhung der Herzfrequenz kann auch bei den LPS Shock + Ranolazin-Tieren beobachtet werden. Diese fällt allerdings weniger stark aus im Vergleich zu LPS Shock + Vehicle-Gruppe. Auch hier sind die letzten zwei Werte von dem einzigen zu diesem Zeitpunkt noch lebenden Tier dieser Gruppe erfasst worden.

### c) Hämatokrit

Der Hämatokrit, der den Prozentsatz aller zellulären Anteile am Gesamtblutvolumen beschreibt, ist zu Beginn des Versuchszeitraums in allen drei Gruppen vergleichbar und liegt bei knapp 40%. In Abb. 33 ist die Entwicklung des Hämatokrit-Wertes in den ersten zwei Stunden des Versuchszeitraums zu sehen.

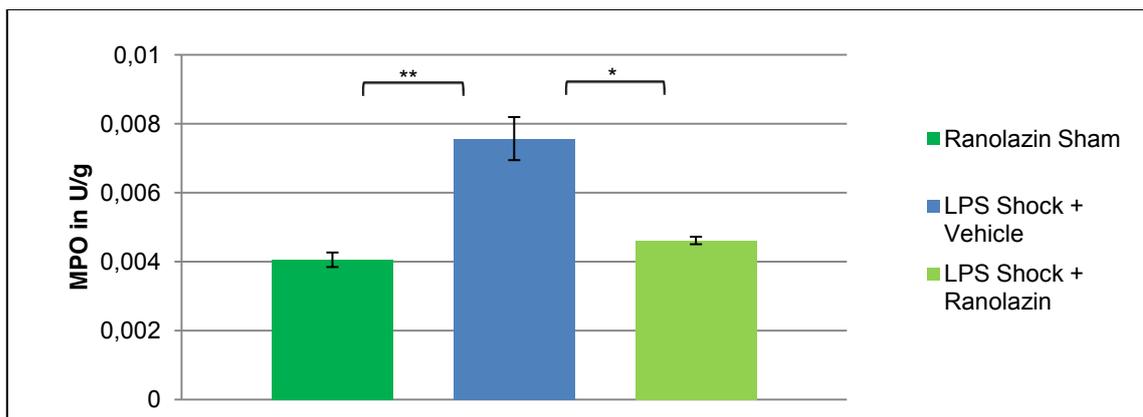


**Abb. 33:** Verlauf des Hämatokrit-Wertes innerhalb der ersten zwei Stunden des Versuchszeitraums; \*\*= $p < 0,01$

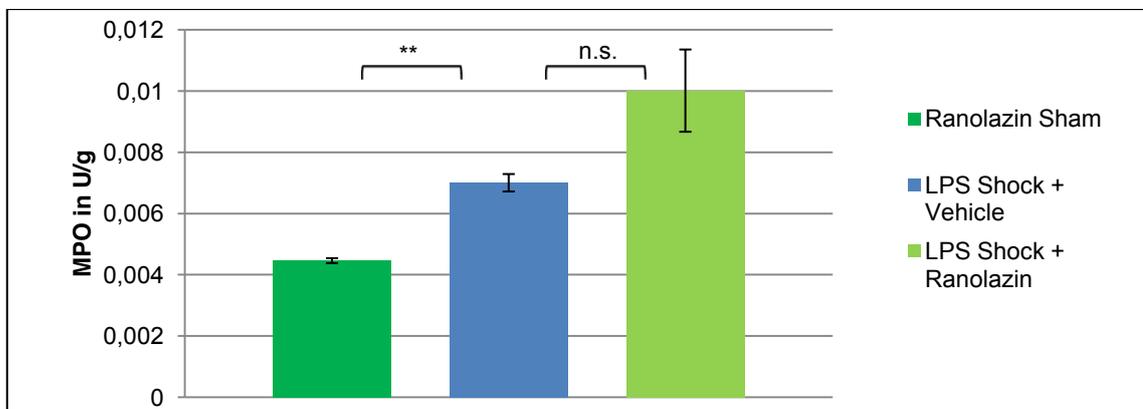
Der Wert steigt in den ersten 60 Minuten in der Ranolazin Sham-Gruppe um 3 Prozentpunkte auf 43% an und verändert sich somit kaum. Dahingegen kommt es in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe in der ersten Stunde zu einem sprunghaften Anstieg des Hämatokrits von 38,8% auf 56,6%, der sich durch den Abstrom von intravasaler Flüssigkeit in das Interstitium infolge der Schrankenstörung beim septischen Schock erklären lässt. Wenngleich der Hämatokrit in der LPS Shock + Ranolazin-Gruppe in diesem Zeitraum ebenfalls von 38,3% auf 44,5% ansteigt, so ist dieser Wert signifikant niedriger als in der Gruppe, die nicht mit Ranolazin vorbehandelt wurde. In der zweiten Stunde ist der Hämatokrit dagegen in der LPS Shock + Ranolazin-Gruppe höher als in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe. Jedoch sind beide Werte jeweils auf nur noch ein lebendes Tier pro Gruppe zurückzuführen und somit keine Signifikanz ermittelbar.

### 5.2.2 Effekte von Ranolazin auf die Myeloperoxidaseaktivität

Da die Myeloperoxidaseaktivität (MPO-Aktivität) ein Maß für die Leukozytenakkumulation ist, kann sie als Surrogat-Parameter für ein entzündliches Geschehen dienen. Im Myokard ist die MPO-Aktivität der LPS Shock + Vehicle-Gruppe signifikant gesteigert im Vergleich zur Ranolazin Sham- bzw. LPS Shock + Ranolazin-Gruppe (Abb. 34). Der Wert der LPS Shock + Ranolazin-Gruppe steigt leicht über das Niveau der Ranolazin Sham-Gruppe. Eine signifikante Erhöhung der MPO-Aktivität der LPS Shock + Vehicle-Gruppe gegenüber der Ranolazin Sham-Gruppe ist auch in der Niere zu finden. Werden die Tiere mit Ranolazin vorbehandelt und erhalten am Folgetag LPS intraarteriell, so erreicht die MPO-Aktivität einen Spitzenwert von 0,01 U/g und liegt deutlich über dem Wert der LPS Shock + Vehicle-Gruppe (Abb. 35). In der Lunge ist die MPO-Aktivität beider mit Ranolazin vorbehandelten Gruppen signifikant erhöht gegenüber der LPS Shock + Vehicle-Gruppe und der Ranolazin Sham-Gruppe. Die MPO-Aktivität der Ranolazin Sham- und der LPS Shock + Vehicle-Gruppe ist in der Leber identisch. Durch Gabe von Ranolazin einen Tag vor LPS-Exposition sinkt die MPO-Aktivität nur minimal.



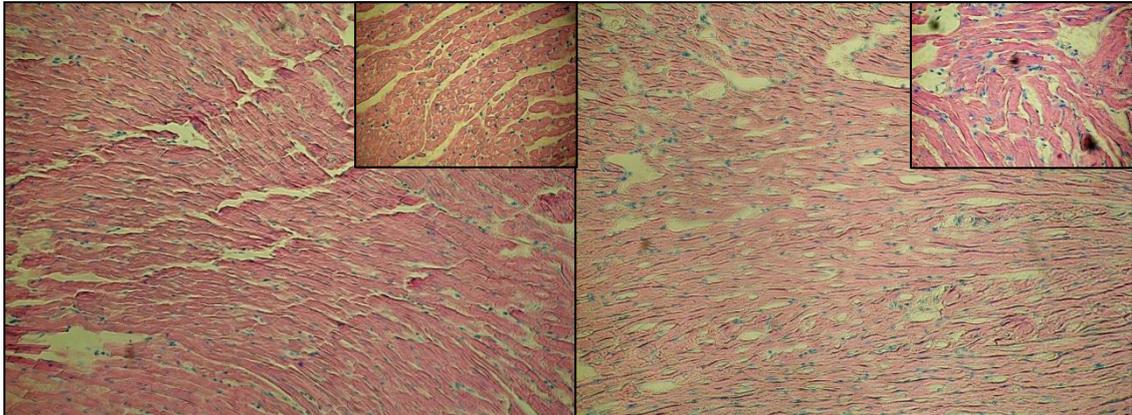
**Abb. 34:** Effekt von Ranolazin auf die Myeloperoxidaseaktivität im Myokard unter Angabe des Standardfehlers; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$



**Abb. 35:** Effekt von Ranolazin auf die Myeloperoxidaseaktivität in der Niere unter Angabe des Standardfehlers; \*\* =  $p < 0,01$ ; n.s. = nicht signifikant

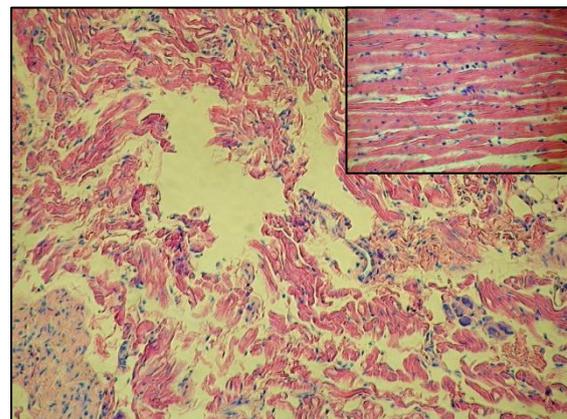
### 5.2.3 Histologische Veränderungen unter dem Einfluss von Ranolazin

#### a) Myokard

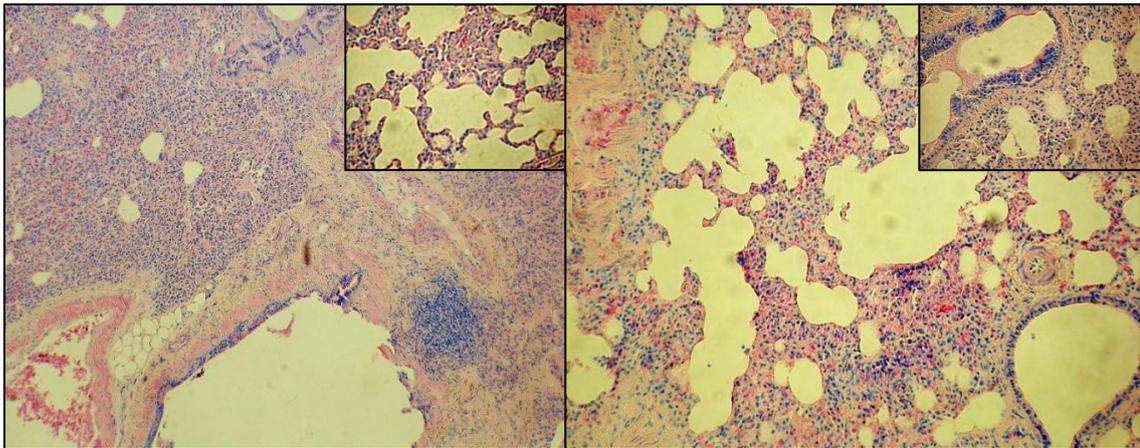


**Abb. 36:** links: Myokardgewebe der Ranolazin Sham-Gruppe, Giemsa-Färbung, großes Bild 200 fache Vergrößerung, kleines Bild 400 fache Vergrößerung; rechts: LPS Shock + Ranolazin-Gruppe, Giemsa-Färbung, großes Bild 200 fache Vergrößerung, kleines Bild 400 fache Vergrößerung

Das Herzmuskelgewebe zeigte in den Gruppen, die LPS intraarteriell erhalten hatten, makroskopisch zum Zeitpunkt der Organentnahme eine Dilatation der Ventrikel auf. Unter dem Lichtmikroskop lässt sich feststellen, dass der Schaden des Myokards in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe deutlich stärker ausgeprägt ist, als in der LPS Shock + Ranolazin-Gruppe (Abb. 36, 37). Die Kardiomyozyten sind elongierter und Disci intercalares zwischen diesen sind aufgrund großer Risse kaum noch erkennbar. In der Giemsa-Färbung zeigt sich jedoch eine nahezu vergleichbare Dichte an Leukozyten im Myokard der LPS Shock + Vehicle- und der LPS Shock + Ranolazin-Gruppe (Abb. 36, 37). Trotzdem ist in den histologischen Präparaten der mit Ranolazin vorbehandelten Tiere ein geringerer Gewebeschaden ersichtlich, da die Verzweigung der Zellverbände besser erhalten ist und teilweise noch perinukleäre Höfe zu sehen sind. In den Präparaten der Ranolazin Sham-Gruppe ist eine erhöhte Leukozytenakkumulation erkennbar, die jedoch geringer ausfällt als in den anderen beiden Gruppen. Die Gewebeintegrität ist in der Sham-Gruppe insgesamt gut bewahrt, sodass im Querschnitt neben den blassen Zellkernen eine Cohnheim-Feldung und im Längsschnitt deutliche Disci intercalares zwischen den Kardiomyozyten vorliegen (Abb. 36).



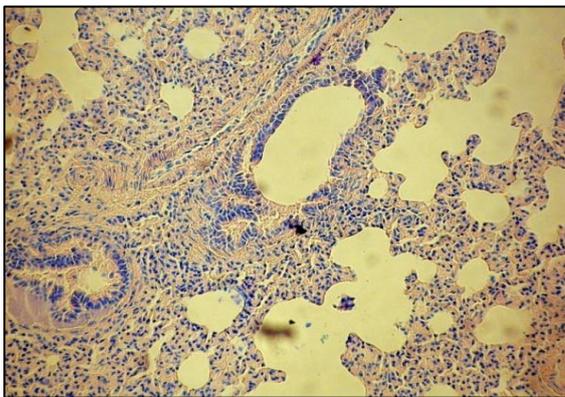
**Abb. 37:** Myokardgewebe der LPS Shock + Vehicle-Gruppe, Giemsa-Färbung, großes Bild: 200 fache Vergrößerung; kleines Bild: 400 fache Vergrößerung

**b) Lunge**

**Abb. 38:** links: Lungengewebe der Ranolazin Sham-Gruppe, Giemsa-Färbung, großes Bild 200 fache Vergrößerung, kleines Bild 400 fache Vergrößerung; rechts: LPS Shock + Ranolazin-Gruppe, Giemsa-Färbung, großes Bild 200 fache Vergrößerung, kleines Bild 400 fache Vergrößerung

Die Lungenflügel waren zum Zeitpunkt der Organentnahme makroskopisch bis auf kleine Einblutungen unauffällig und rosig.

Abb. 39 zeigt das lichtmikroskopische Bild der Lunge der LPS Shock + Vehicle-Gruppe. Es sind mehrere kleine Bronchioli respiratorii angeschnitten, die von zahlreichen Leukozyten umringt sind. Weiterhin imponieren deutlich verdickte interalveoläre Septen mit kleinumigen Alveolen. Von diesem Bild kaum zu unterscheiden ist das Lungenpräparat der Ranolazin Sham-Gruppe in Abb. 38. Es zeigt einen angeschnittenen Bronchus mit peribronchialen Bindegewebe. Eine massive Einwanderung von Leukozyten, die sich teilweise noch stärker darstellt als in den histologischen Präparaten der LPS Shock + Vehicle-Gruppe, dominiert das Bild. Desweiteren finden sich erheblich geschrumpfte Alveolen und angeschwollene Interalveolarsepten. Im Vergleich dazu sind im Präparat der LPS Shock + Ranolazin-

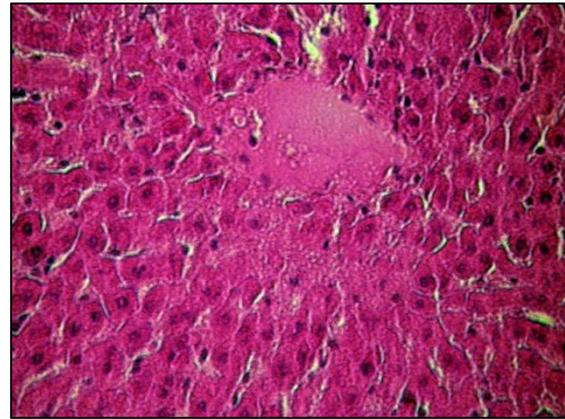


**Abb. 39:** Lungengewebe der LPS Shock + Vehicle-Gruppe, Giemsa-Färbung, 200 fache Vergrößerung

Gruppe die Ductus alveolares mit besser belüfteten Alveolen zu sehen (Abb. 38). Jedoch weist auch dieser Schnitt eine hohe Leukozytendichte mit Bildung kleiner Lymphfollikel und verbreiterte interalveoläre Septen auf.

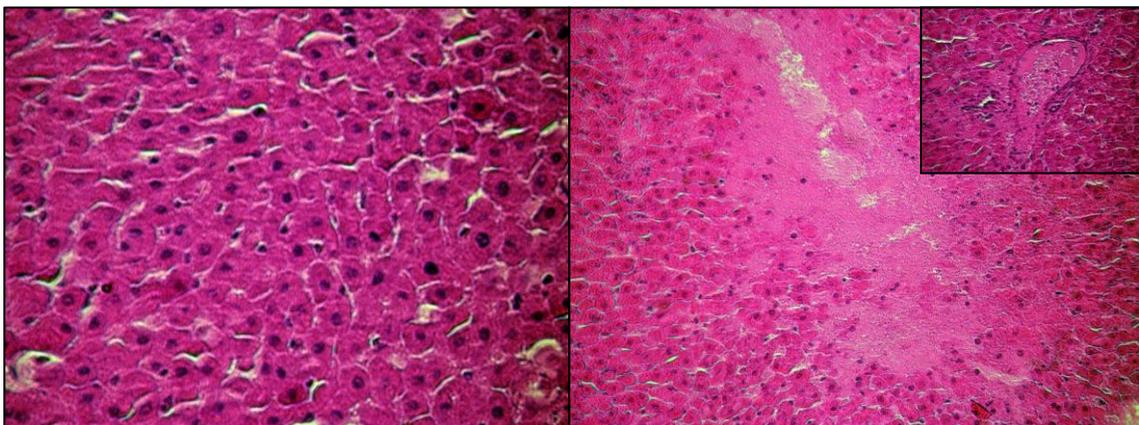
### c) Leber

An der Leber waren makroskopisch während der Entnahme des Organs schwere Schädigungen sichtbar. Neben einem geschwollenen, blutgefüllten Organ mit vereinzelt Einblutungen imponierten besonders weißlich-gelbliche Nekrosen auf der Oberfläche. Diese Veränderungen zeigten sich in allen drei Versuchsgruppen. In Abb. 40 werden die Schäden im histologischen Präparat der LPS



**Abb. 40:** Lebergewebe der LPS Shock + Vehicle-Gruppe, HE-Färbung, 400 fache Vergrößerung

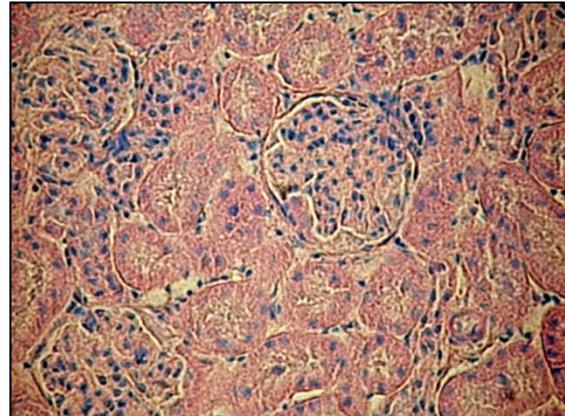
Shock + Vehicle-Gruppe deutlich. Die Gesamtintegrität des Lebergewebes ist nur noch schwer zu erkennen, da die Hepatozyten stark geschwollen sind und es nahe der sichtbaren Vena centralis zu Zellysen kommt. Dadurch sind die Hepatozyten nur noch erschwert voneinander abzugrenzen. Eine solche läppchenzentrale Hepatozytennekrose wird begleitet von Einblutungen und Leukozytenansammlungen. Diese schocktypischen Veränderungen der Leber werden durch die zusätzliche Gabe von Ranolazin kaum beeinflusst. Rechts in Abb. 41 ist das histologische Bild der LPS Shock + Ranolazin-Gruppe zu sehen. Die Kontur der dargestellten Zentralvene ist unterbrochen und die massiven Erythrozytenansammlungen verleihen der Schnittfläche ein monomorphes Bild. Die radiär auf die Zentralvene zulaufenden Leberzellbalken sind angeschwollen und weisen die oben beschriebene läppchenzentrale Hepatozytennekrose auf. Schocktypische Schäden sind in geringerer Form ebenfalls in der Ranolazin Sham-Gruppe vorhanden (Abb. 41). Die Grenzen zwischen den Hepatozyten sind auch hier teilweise unscharf und eine klare Gliederung in radiär verlaufende Leberzellbalken ist kaum ersichtlich.



**Abb. 41:** links: Lebergewebe der Ranolazin Sham-Gruppe, HE-Färbung, 400 fache Vergrößerung; rechts: LPS Shock + Ranolazin-Gruppe, HE-Färbung, großes Bild 200 fache Vergrößerung, kleines Bild 400 fache Vergrößerung

#### d) Niere

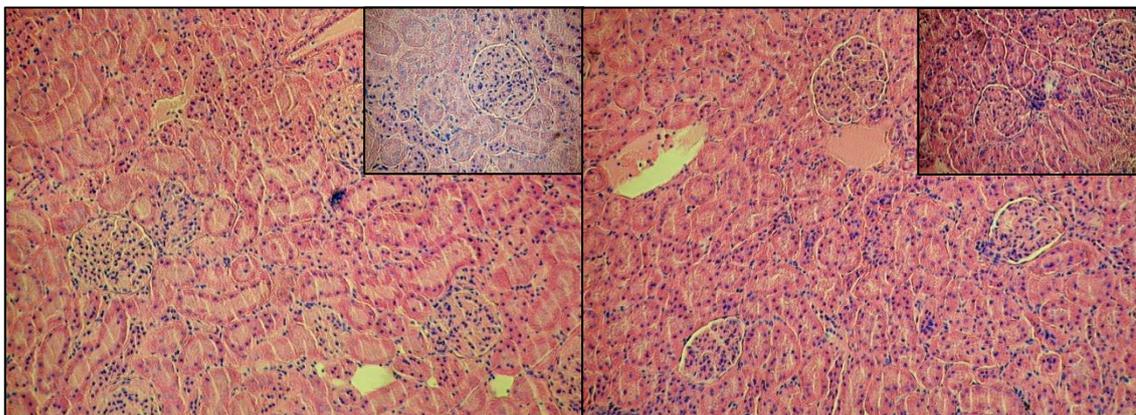
Die Niere war von schockspezifischen Veränderungen betroffen, die mit der Ausbildung eines akuten Nierenversagens einhergehen können. Schon makroskopisch zeigte sich sowohl in der LPS Shock + Vehicle- als auch in beiden Ranolazin-Gruppen ein geschwollenes Organ mit Einblutungen im Bereich der Nierenkapsel. In den lichtmikroskopischen Präparaten der Vehicle-Tiere wurden, wie in Abb. 42 sichtbar,



**Abb. 42:** Schnitt durch die Nierenrinde der LPS Shock + Vehicle-Gruppe, Giemsa-Färbung, 400 fache Vergrößerung

Schäden an den Glomeruli und im Tubulusapparat deutlich. Das parietale Blatt der Bowman-Kapsel ist an vielen Glomeruli unterbrochen, sodass eine Einbuße in der Funktionsfähigkeit dieser wahrscheinlich ist. Die unscharfe Begrenzung der Tubuli renales weist auf Zelllysen und beginnende Nekrosen in diesen Bereichen hin.

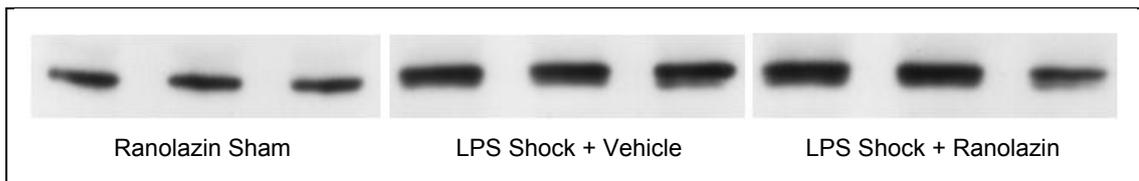
Die mikroskopischen Präparate der LPS Shock + Ranolazin-Gruppe bieten ein ähnliches Bild einer schockgeschädigten Niere wie in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe (Abb. 43). Die Bowman-Kapsel ist oft stark beschädigt und es imponiert eine vermehrte Adhärenz von Leukozyten nahe der Glomeruli. Desweiteren dominieren in der Giemsa-Färbung große Leukozytenansammlungen im gesamten Präparat der LPS Shock + Ranolazin-Gruppe, die mit denen der LPS Shock + Vehicle-Gruppe vergleichbar sind. In der Ranolazin Sham-Gruppe finden sich dagegen nur leichte pathologische Veränderungen bei größtenteils intakten Glomeruli mit erhaltenen Bowman-Kapseln und weniger Zelllysen im Bereich der Tubuli renales.



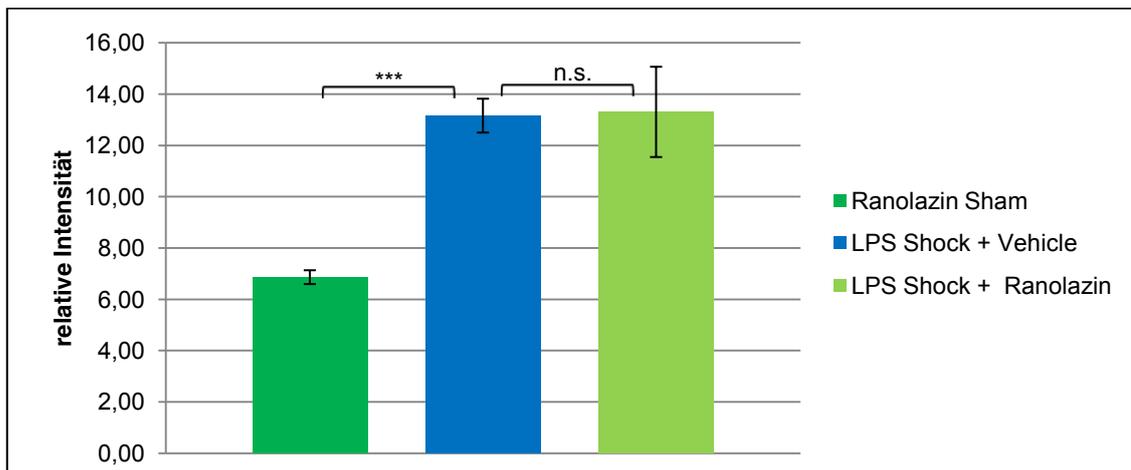
**Abb. 43:** links: Schnitt durch die Nierenrinde der Ranolazin Sham-Gruppe, Giemsa-Färbung, großes Bild 200 fache Vergrößerung, kleines Bild 400 fache Vergrößerung; rechts: LPS Shock + Ranolazin-Gruppe, Giemsa-Färbung, großes Bild 200 fache Vergrößerung, kleines Bild 400 fache Vergrößerung

#### 5.2.4 Effekte von Ranolazin auf die Proteinexpression in den Schockorganen

Um festzustellen, ob unter der Gabe von Ranolazin die Proteinexpression im septischen Schock beeinflusst wird, erfolgte die Anfertigung von Western Blots mit verschiedenen Antikörpern. In Bezug auf die I $\kappa$ B-Expression im Myokard nach Gabe von Ranolazin ergibt sich eine geringe Bandenintensität in der Ranolazin Sham-Gruppe (Abb. 44, 45). Diese relative Intensität ist in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe signifikant erhöht und mit 13,2 annähernd so hoch wie in der LPS Shock + Ranolazin-Gruppe mit 13,3. In der Lunge sind kaum Unterschiede bei der Expression von I $\kappa$ B festzustellen, da alle Werte der relativen Intensität zwischen 10,2 und 12,3 liegen. Für die LPS Shock + Ranolazin-Tiere zeigt sich in der Leber eine signifikant erniedrigte I $\kappa$ B-Expression verglichen mit der LPS Shock + Vehicle-Gruppe, wobei die höchste hepatische I $\kappa$ B-Expression die der Ranolazin Sham-Gruppe ist. Die Ranolazin Sham-Gruppe weist auch in der Niere eine sehr hohe relative Intensität von I $\kappa$ B auf. Demgegenüber ist die Intensität in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe signifikant vermindert und zeigt von allen drei Gruppen in der Niere den geringsten Wert.



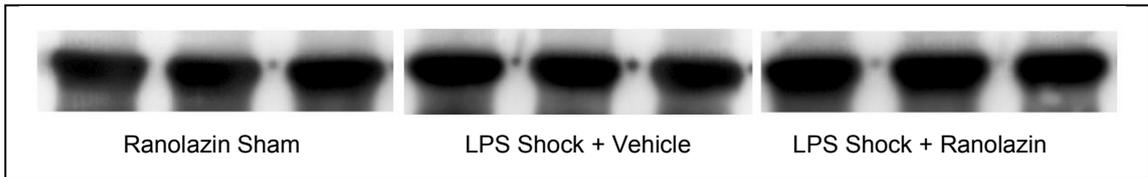
**Abb. 44:** Western Blot: I $\kappa$ B-Expression im Myokard nach Ranolazin-Gabe im septischen Schock



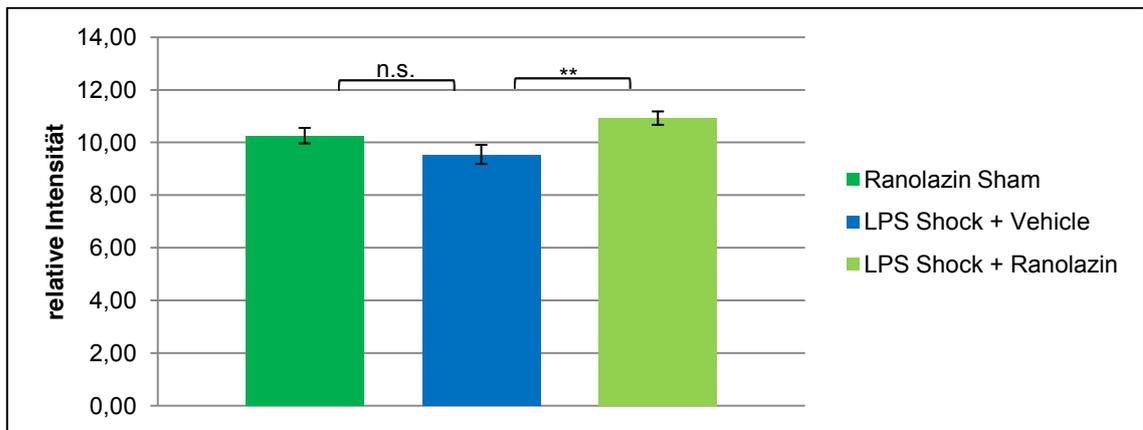
**Abb. 45:** Western Blot: I $\kappa$ B-Expression im Myokard nach Ranolazin-Gabe im septischen Schock unter Angabe des Standardfehlers; \*\*\*= $p < 0,001$ , n.s. = nicht signifikant

Weiterhin konnte im Nierengewebe eine signifikant erhöhte Expression von HSP70 in der LPS Shock + Ranolazin-Gruppe im Vergleich zur LPS Shock + Vehicle-Gruppe nachgewiesen werden (Abb. 46, 47). Im hepatischen Gewebe war kein HSP70-Nachweis möglich. Weder im Myokard noch in der Lunge zeigen sich signifikante

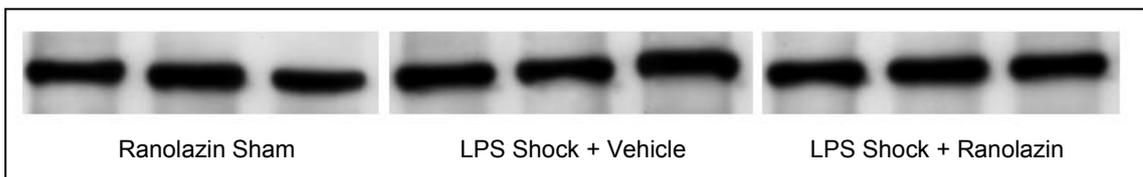
Veränderungen in Bezug auf die HSP70-Expression zwischen den drei Gruppen. Pulmonal findet sich die stärkste Bandenintensität in der LPS Shock + Ranolazin-Gruppe, wohingegen die LPS Shock + Vehicle-Tiere sowie die Tiere, die nur Ranolazin erhielten, eine ungefähr gleiche HSP70-Expression aufweisen (Abb. 48, 49).



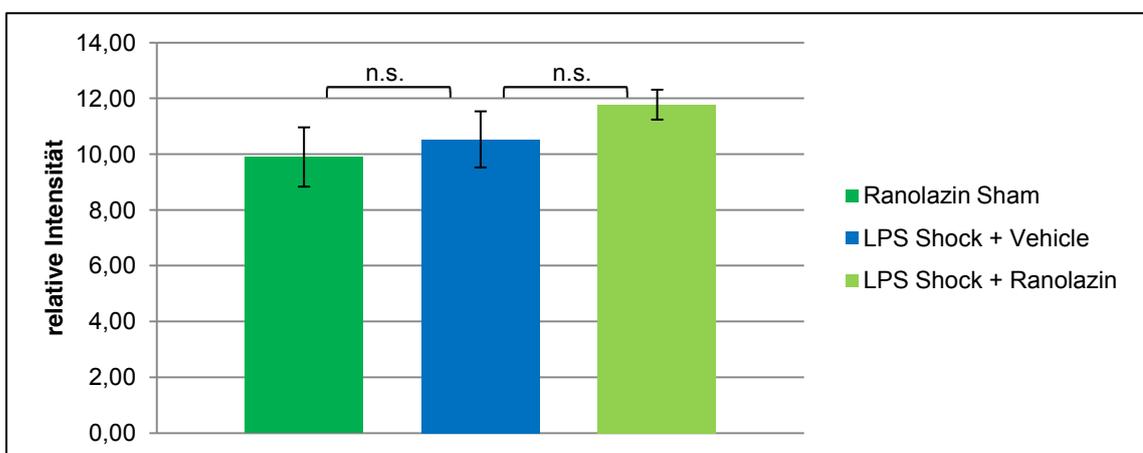
**Abb. 46:** Western Blot: HSP70-Expression im septischen Schock in der Niere nach Ranolazin-Gabe



**Abb. 47:** Western Blot: HSP70-Expression im septischen Schock in der Niere nach Ranolazin-Gabe unter Angabe des Standardfehlers; \*\*= $p < 0,01$ , n.s. = nicht signifikant



**Abb. 48:** Western Blot: HSP70-Expression im septischen Schock in der Lunge nach Ranolazin-Gabe



**Abb. 49:** Western Blot: HSP70-Expression im septischen Schock in der Lunge nach Ranolazin-Gabe unter Angabe des Standardfehlers; n.s. = nicht signifikant

## **6. Diskussion**

### **6.1 Pioglitazon**

#### **6.1.1 Effekte von Pioglitazon im Septic Shock Modell**

##### **a) Überlebensraten und -zeiten**

Um herauszufinden, welchen Einfluss Pioglitazon auf den LPS-induzierten septischen Schock hat, wurden u.a. die Überlebensraten und -zeiten erfasst (siehe Abb. 11, 12 Ergebnisteil). Für die LPS Shock + Pioglitazon-Tiere ist ein deutlicher Überlebensvorteil sichtbar, auch wenn kein Tier dieser Gruppe den gesamten Versuchszeitraum überlebte. Im Gegensatz zur LPS Shock + Vehicle-Gruppe waren zwei Stunden nach LPS-Injektion noch knapp 73% der Tiere am Leben. Dieser Effekt ist auch im Vergleich der Überlebenszeiten zwischen den Gruppen erkennbar. Es zeigte sich für die LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe mit 144 Minuten nach LPS-Gabe eine Verdopplung der Überlebenszeit gegenüber der LPS Shock + Vehicle-Gruppe mit 72 Minuten. Die alleinige Gabe von Pioglitazon ohne LPS resultierte in einem Überleben über den gesamten Versuchszeitraum von vier Stunden. Die signifikant verlängerte Überlebenszeit der LPS Shock + Pioglitazon-Tiere ( $p < 0,001$ ) kann als Hinweis auf einen protektiven Effekt von Pioglitazon im septischen Schock gewertet werden. Eine Vorbehandlung mit Pioglitazon bewirkt eine verminderte Transkription von NF- $\kappa$ B und führt über eine daraus resultierende, geringere Zytokinausschüttung zu einer anti-inflammatorischen Wirkung.

Eine Verbesserung der Überlebensraten nach Pioglitazon-Gabe konnte bereits in anderen tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden. Tsujimura et al. zeigten 2011 am Mausmodell, dass eine siebentägige Gabe von täglich 10 mg/kg KG Pioglitazon intraperitoneal vor Caecum-Ligation und Punktion (CLP) die Überlebensrate signifikant verbesserte gegenüber der Vehicle/CLP-Gruppe (Überlebensraten 35% vs. 11%). Eine Steigerung der Überlebensrate konnte in jener Studie allerdings nicht für die ein- oder dreitägige Vorbehandlung mit Pioglitazon herausgefunden werden [Tsujimura et al., 2011]. In unserer Studie erwies sich eine intraperitoneale Gabe von 8 mg/kg KG Pioglitazon einen Tag vor LPS-Gabe als nicht wirksam, da sich kein Unterschied in der Überlebenszeit herausstellte. Auch eine Senkung der Konzentration auf 0,4 mg/kg KG, die annähernd in tierexperimentellen Studien mit Rosiglitazon verwendet wurde [Liu et al., 2005b], zeigte keine Wirkung. Allerdings wurde Rosiglitazon in diesen Studien intravenös gegeben, sodass es nicht noch über das Peritoneum resorbiert werden musste und folglich eine geringere Konzentration ausreichte, um einen Effekt zu erzielen. Die in unserer Studie gewählte Gabe von 4

mg/kg KG Pioglitazon richtete sich nach Studien, die das Glitazon ebenfalls intraperitoneal verabreichten und eine verringerte Entzündungsreaktion beobachteten [Zingarelli et al., 2003, Haraguchi et al., 2008]. Zingarelli et al. konnten 2003 nachweisen, dass eine intraperitoneale Verabreichung von 5 mg/kg KG Ciglitazon in regelmäßigen Abständen nach CLP die Überlebensrate der Tiere 96 Stunden nach der Operation von 50% auf 65% steigerte. Als Nachteil der intraperitonealen Gabe könnte die individuelle Resorption des Medikamentes über das Peritoneum angeführt werden, die zu möglichen Schwankungen des Wirkspiegels innerhalb der Medikamentengruppe führt.

### **b) Hämodynamische Veränderungen**

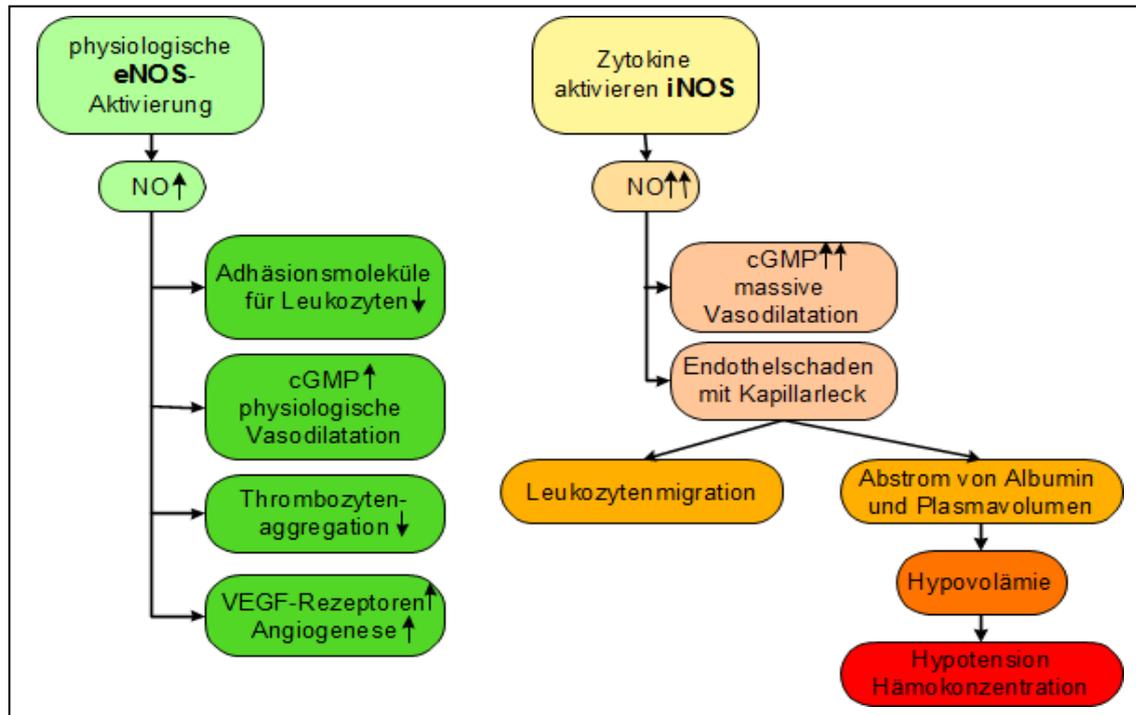
Die arterielle Hypotension stellt ein entscheidendes Merkmal für den septischen Schock dar. Sie entsteht aufgrund der Produktion von Mediatoren wie Zytokinen und Komplementfaktoren, aber auch durch die Ausschüttung vasoaktiver Substanzen wie z.B. reaktiver Sauerstoffverbindungen ( $O_2^-$ ,  $OH^{\cdot}$ , NO). Es resultiert zum einen ein massiver Endothelschaden mit folgendem Kapillarleck und Abstrom intravasaler Flüssigkeit ins Interstitium. Zum anderen kommt es zu einer massiven Vasodilatation im Bereich der peripheren Venen und Venolen, sodass die Hypotension u.a. durch eine absolute und eine relative Hypovolämie bedingt ist.

Ein initialer Blutdruckabfall ist in dieser Studie sowohl in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe als auch in der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe sichtbar. In beiden Gruppen fällt der MABP 20 Minuten nach LPS-Injektion auf 66 mmHg bzw. 77 mmHg ab (siehe Abb. 13 Ergebnisteil). Auffällig ist jedoch, dass sich die Medikamententiere deutlich schneller von diesem Tief erholen und der Blutdruck eine Stunde nach LPS-Gabe signifikant besser ist als in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe ( $p < 0,001$ ). Die alleinige Gabe von Pioglitazon beeinflusst den Blutdruck nicht und er bleibt während der gesamten Versuchszeit stabil. Als Reaktion auf die Hypotonie mit folgendem verminderten Blutrückstrom zum Herzen kommt es zu einer hyperdynamen Kreislaufumstellung mit einer kompensatorischen Tachykardie, da der Organismus versucht das Herzzeitvolumen konstant zu halten. Diese Tachykardie ist in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe deutlich stärker ausgeprägt, obwohl die Herzfrequenz auch in der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe leicht ansteigt. Eine Verbesserung der Hypotension konnten Zingarelli et al. in der bereits oben beschriebenen Studie mit Ciglitazon beobachten. Nach CLP zeigten zwar auch die mit Ciglitazon nachbehandelten Tiere einen leichten Blutdruckabfall, dieser war jedoch nicht so stark ausgeprägt und besser reversibel als in der CLP + Vehicle-Gruppe [Zingarelli et al., 2003]. In der Studie von Haraguchi et al. wiesen die Tiere, die einen Tag vor CLP oder

sechs Stunden nach CLP 5 mg/kg KG Pioglitazon intraperitoneal erhielten, eine verminderte Hypotension auf [Haraguchi et al., 2008]. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Pioglitazon ebenfalls einen positiven Einfluss auf den MABP im hämorrhagischen Schock hat. Bei gleichen Ausgangswerten und einem ähnlichen Blutdruckabfall während des Schocks im Vergleich zur Vehicle-Gruppe konnten in den ersten drei Stunden nach Wiederbelebung signifikant höhere Blutdruckwerte gemessen werden [Chima et al., 2008].

Die beschriebenen Blutdruckveränderungen sind auch auf eine vermehrte NO-Ausschüttung in Folge einer LPS-induzierten Aktivierung der iNOS zurückzuführen, die vor allem in Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen vorkommt. Physiologischerweise wird NO in geringen Konzentrationen von den eNOS aus L-Arginin hergestellt und wirkt über diverse Mechanismen schützend auf die Endothelien. Durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase führt es zur Produktion von cGMP, welches seinerseits die glatte Muskulatur der Gefäßwand relaxiert. Weiterhin werden unter dem Einfluss von NO weniger Adhäsionsmoleküle für Leukozyten exprimiert, sodass deren Migration in das Interstitium und den subendothelialen Raum vermindert ist. NO hemmt die Thrombozytenaggregation und kann mit Lipidperoxyldradikalen reagieren, weshalb es für eine geringere Oxidation von LDL sorgt. Diese Reaktionsfreudigkeit von NO nutzen vor allem Makrophagen, um Bakterien abzutöten. Auch die Angiogenese wird durch NO positiv beeinflusst, indem es einerseits vermehrt durch einen VEGF-Stimulus freigesetzt wird und auf der anderen Seite eine erhöhte Expression des VEGF-Rezeptors induziert (Abb. 50). Diese Wirkmechanismen von NO spielen in allen Situationen eine Rolle, in denen es zu einer Minderperfusion des Gewebes kommt. Aus diesem Grund ist vor allem die NO-Produktion durch die eNOS von entscheidender Bedeutung für den Schutz der Gefäßwand [Naseem, 2005]. In einer tierexperimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte eNOS-Aktivität mit einer verbesserten hämodynamischen Stabilität korrelierte. Ratten, die nur mittels CLP in den septischen Schock versetzt wurden, wiesen dabei eine deutlich erniedrigte eNOS-Expression auf als Placebo-Tiere und waren instabiler [Pessoa de Souza et al., 2012]. Im septischen Schock wird jedoch die iNOS durch Zytokine wie TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 und -6 verstärkt aktiviert und sorgt für eine exzessive Produktion von NO. In solch hohen Konzentrationen schädigt NO die Endothelien und bewirkt einen vermehrten Abfluss von Albumin und Plasmavolumen über das Kapillarleck ins Interstitium. Daraus resultieren neben einer Vasodilatation und einem Blutdruckabfall auch ein steigender Hämatokrit und eine vaskuläre Hyporeaktivität gegenüber Vasokonstriktoren (Abb. 50). Bereits mehrere Studien wiesen darauf hin, dass die übermäßige iNOS-Aktivierung für diese hämodynamischen Veränderungen

verantwortlich ist [Filep et al. 1997, Hallemeesch et al., 2003, Karimi et al., 2006]. Obwohl die Hypotension im lebensgefährlichen septischen Schock bei zwei Patienten durch die Gabe von NOS-Inhibitoren ( $N^G$ -Methyl-L-Arginin und  $N^G$ -Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester) zumindest zeitweise aufgehoben werden konnte, ist der klinische Einsatz wegen eventueller schädlicher Effekte kritisch abzuwägen [Petros et al., 1991].



**Abb. 50:** Gegenüberstellung der physiologischen eNOS-Aktivierung, die einen schützenden Effekt auf die Gefäße hat und der iNOS-Aktivierung durch Zytokine während eines entzündlichen Geschehens

Dass auch PPAR $\gamma$ -Agonisten einen positiven Effekt auf den Blutdruck aufweisen, wird auf ihre Fähigkeit die Transkription von NF- $\kappa$ B zu beeinflussen, zurückgeführt. Im LPS-induzierten septischen Schock bei Ratten hemmte Rosiglitazon die Induktion von intrapulmonaler iNOS sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Dieser Effekt ließ sich mit dem spezifischen PPAR $\gamma$ -Antagonisten GW9662 aufheben und ist ein sicherer Hinweis darauf, dass die iNOS-Aktivität über NF- $\kappa$ B reguliert werden kann [Liu et al., 2005a]. Ding et al. wiesen in ihrer tierexperimentellen Studie am Mausmodell nach, dass besonders die Endothel-spezifische Form von NF- $\kappa$ B einen hohen Stellenwert in der Hämodynamik der Sepsis hat. In transgenen Mäusen, die den NF- $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B überexprimierten, verursachte entweder eine Injektion von LPS oder eine CLP eine signifikant geringere Hypotension, eine erniedrigte aortale iNOS- und TNF- $\alpha$ -Expression sowie eine erhöhte aortale eNOS-Expression. Somit konnte nachgewiesen werden, dass mithilfe einer spezifischen Blockade des endothelialen NF- $\kappa$ B eventuell eine neue Therapieoption der Sepsis zur Verfügung steht [Ding et al., 2009].

Aus den oben aufgeführten Erkenntnissen und den Ergebnissen unserer Studie lässt sich schlussfolgern, dass Pioglitazon die hämodynamischen Veränderungen im septischen Schock positiv beeinflussen kann, da es zu einer geringeren Expression von NF- $\kappa$ B mit konsekutiv niedrigerer iNOS-Aktivierung führt.

### **c) Hämatokrit**

Um die Hypovolämie im septischen Schock quantifizieren zu können, erfolgte in dieser Arbeit die stündliche Messung des Hämatokrits bis zum Versterben der Tiere. Somit konnten Hinweise für das Ausmaß der Gefäßwandpermeabilität und der Endothelschädigung gewonnen werden. Innerhalb der ersten Stunde nach LPS-Gabe kam es in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe zu einem massiven Anstieg des Hämatokrits von 38,8% auf 56,6%. In der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe zeigte sich dagegen ein vergleichsweise moderater Anstieg des Hämatokrits von 36,0% auf 44,4% in der ersten Stunde nach Injektion des LPS. Während der nächsten zwei Stunden der Versuchszeit stagnierte der Hämatokrit weitestgehend und stieg nur noch leicht auf 47,5% an.

Das Phänomen der Hämokonzentration im Endotoxin-induzierten Schock bei Ratten deckt sich mit Beobachtungen in tierexperimentellen Versuchen, die bereits in den 80er Jahren gemacht wurden [Cook et al., 1985, Matera et al., 1988, Neilson et al., 1989]. Nielsen et al. konnten 2009 bei Schweinen mit Meningokokkensepsis ebenso einen Anstieg des Hämatokrits auf über 50% und einen verminderten Gehalt von Plasmaalbumin nachweisen [Nielsen et al., 2009]. Besonders im arteriellen Gefäßschenkel kommt es aufgrund des initialen Blutdruckabfalls zunächst zu einer Störung der Mikrozirkulation mit schlechterer Verformbarkeit der Erythrozyten und Leukozyten. Es resultiert eine verminderte Durchblutung im nachfolgenden Gebiet mit einer geringeren arteriovenösen Sauerstoffdifferenz. Die Folge ist eine Gewebehypoxie mit anschließender Laktatazidose. Diese ist ihrerseits ein starker Reiz für eine Vasodilation der arteriellen Widerstandsgefäße [Lehr et al., 2000, Müller-Werdan und Schuster, 2005b]. Zusätzliche Komponenten sind eine verstärkte Permeabilität der Kapillaren, welche in einem großen Maße durch die exzessive NO-Produktion mittels der iNOS bedingt ist sowie eine Vasokonstriktion der postkapillären Venolen. Auf diese Weise wird der kapilläre Filtrationsdruck erhöht und es kommt zum Verlust von Plasmavolumen in den extravasalen Raum. Neben einer Hypovolämie resultiert auch eine Hämokonzentration mit Anstieg des Hämatokrits und der Blutviskosität [Filep et al., 1997, Lehr et al., 2000].

Die Auswirkung einer Behandlung mit Pioglitazon auf den Hämatokrit im septischen Schock wurde bisher kaum untersucht. Aus anderen Arbeiten ist jedoch bekannt, dass die alleinige Therapie mit Pioglitazon z.B. im Rahmen einer Diabetesbehandlung zu

einem Absinken des Hämatokrits führt, der nicht mit einer Zunahme des Gesamtwassergehaltes des Körpers erklärt werden kann. Berria et al. beobachteten über 16 Wochen Patienten mit Diabetes mellitus Typ II, die entweder Placebo oder Pioglitazon bekamen. Sie erkannten einen signifikanten Abfall des Hämatokrits um 2,4 Prozentpunkte bei kaum verändertem Gesamtwassergehalt und schlossen somit ein Absinken des Hämatokrits aufgrund von Wasserretention aus [Berria et al., 2007]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Borsting et al. in einer Studie mit Rosiglitazon-vorbehandelten Mäusen. Diese wiesen einen signifikant geringeren Hämatokrit mit einem jedoch deutlich erhöhten Wassergehalt im abdominalen Fettgewebe auf. Sie untersuchten zusätzlich, ob Pioglitazon die Expression des spannungsunabhängigen ENaC, der im Colon und im distalen Nephron vorkommt, beeinflusst. Ihre Western Blots ergaben, dass die ENaC $\alpha$ - and ENaC $\beta$ -mRNA sowie die ENaC $\gamma$ -Protein-expression in der Nierenrinde durch Pioglitazon reduziert wird. Folglich kann der erniedrigte Hämatokrit nicht mit einer verstärkten Wasserrückresorption erklärt werden [Borsting et al., 2012]. Dahingegen untersuchten Chen et al. an einem in vivo-Modell die Wirksamkeit eines neuen PPAR $\gamma$ -Agonisten, der allerdings kein Thiazolidindion wie Pioglitazon ist. Sie konnten nach elftägiger, oraler Vorbehandlung mit RWJ-348260 in verschiedenen Dosierungen einen Anstieg des Hämatokrits beobachten, der positiv korrelierte mit einer höheren Dosierung [Chen et al., 2005].

Zusammengefasst scheint die Wirkung der Glitazone auf die Wasserretention und den Hämatokrit noch unklar zu sein. Entscheidend im septischen Schock ist jedoch, dass sie die Downregulation der NF- $\kappa$ B-Transkription veranlassen und somit zu einer verminderten TNF- $\alpha$  und IL-6-Ausschüttung und zu einer geringeren iNOS-Aktivität führen. Somit wird nicht nur die septische Hypotension verbessert [Liu et al., 2005a, Zingarelli et al., 2003, Reynolds et al., 2002], sondern auch gleichzeitig ein starkes Ansteigen des Hämatokrits durch einen geringeren Endothelschaden verhindert.

### **6.1.2 Effekte von Pioglitazon auf die Myeloperoxidaseaktivität**

Die Schädigung von Geweben und Organen im Rahmen eines septischen Geschehens geht mit der Akkumulation von neutrophilen Granulozyten als vorherrschende Entzündungszellen in diesen Geweben einher. Sie ist besonders durch den bereits beschriebenen Endothelschaden bedingt, der eine Migration von Leukozyten über die geschädigte Gefäßwand und eine Chemotaxis an den Ort der Entzündung erlaubt. Die MPO ist das Hauptenzym der neutrophilen Granulozyten. Daher kann die MPO-Aktivität als Surrogatmarker für die Stärke der Akkumulation dienen. In dieser Studie zeigt sich der Einfluss von LPS und Pioglitazon auf die Leukozytenakkumulation am deutlichsten im Myokard. Hier ist die MPO-Aktivität am höchsten in der LPS Shock +

Vehicle-Gruppe und kann durch Vorbehandlung der Tiere mit Pioglitazon signifikant gesenkt werden ( $p < 0,001$ ). Dies könnte als Hinweis für einen kardioprotektiven Effekt von Pioglitazon gewertet werden. Ein vergleichbarer Effekt konnte auch im Gewebe der Niere beobachtet werden. Dass PPAR $\gamma$ -Agonisten die MPO-Aktivität im septischen Schock positiv beeinflussen können, zeigten auch Haraguchi et al. 2008. Eine Behandlung von Mäusen mit Pioglitazon senkte die MPO-Aktivität in Lunge und Leber. Dabei war das Ergebnis unabhängig davon, ob die Tiere das Glitazon vor der CLP oder erst danach erhielten [Haraguchi et al., 2008]. Zingarelli et al. konnten ebenfalls eine Reduktion der MPO-Aktivität in Lunge, Leber und Darm nach Vorbehandlung der Tiere mit Ciglitazon vor CLP nachweisen [Zingarelli et al., 2010]. Liu et al. wiesen vergleichbare Ergebnisse in der Lunge nach, wenn die Ratten vor einem LPS-induzierten Schock mit Rosiglitazon geimpft wurden [Liu et al., 2005a]. Für die MPO-Aktivität in der Lunge ergaben sich in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen. Das Ergebnis korreliert jedoch nicht mit der histologischen Untersuchung der Lunge. In der Giemsa-Färbung waren deutlich weniger Leukozyten in den Pioglitazon-vorbehandelten Gruppen im Vergleich zur LPS Shock + Vehicle-Gruppe festzustellen, die mehr mit den Ergebnissen der oben genannten Studien übereinstimmen.

Alles in allem ist davon auszugehen, dass Pioglitazon aufgrund der Downregulation der NF- $\kappa$ B-Aktivität zu einer geringeren Zytokinausschüttung im septischen Schock führt. Daraufhin ist neben der bereits genannten Endotheldysfunktion ebenfalls die Migration von Leukozyten vermindert. Das lässt sich anhand der niedrigeren MPO-Aktivität in Geweben der LPS + Pioglitazon-Tiere im Vergleich zur LPS + Vehicle-Gruppe zeigen.

### **6.1.3 Histologische Veränderungen unter dem Einfluss von Pioglitazon**

#### **a) Myokard**

Da die septische Kardiomyopathie eine große Rolle im septischen Schock spielt, fand auch eine histologische Aufarbeitung des Herzmuskels statt, um den Zellschaden verifizieren zu können. Dieser war in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe am größten, denn hier zeigte sich die makroskopisch sichtbare Ventrikeldilatation in einer Elongation der Kardiomyozyten und in zerstörten Zell-Zell-Kontakten. Das Myokard wirkte zerrissen und in der Giemsa-Färbung war eine deutliche Leukozytenakkumulation erkennbar. Dahingegen war die Gewebeintegrität nach Vorbehandlung der Tiere mit Pioglitazon viel besser erhalten, wenngleich auch hier eine Elongation der Kardiomyozyten und eine mittelgradige Ansammlung von Leukozyten stattgefunden haben. Alleinige Behandlung der Tiere mit Pioglitazon ohne Gabe von LPS hatte nur

einen geringen Einfluss auf das Myokard, sodass kaum geschädigter Herzmuskel sichtbar war. Diese histologischen Erkenntnisse gehen konform mit den Ergebnissen der MPO-Analyse. In denen zeigt sich eine signifikante Erhöhung ( $p < 0,001$ ) der MPO-Aktivität in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe gegenüber der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe. Somit ist davon auszugehen, dass Pioglitazon die Akkumulation von Leukozyten und damit das entzündliche Geschehen im Myokard deutlich reduzieren konnte. Auch bezüglich der Proteinexpression lassen sich die Ergebnisse bestätigen. Die Expression von I $\kappa$ B und p38 konnten im Myokard unter dem Einfluss von Pioglitazon deutlich gesenkt werden, was in einer verminderten Zytokinausschüttung und Apoptose resultiert. Liu et al. belegten diesen positiven Effekt von Pioglitazon auch an neonatalen Kardiomyozyten von Ratten. Wurden die Zellen mit Pioglitazon vorbehandelt und oxidativem Stress ausgesetzt, exprimierten sie aufgrund einer geringeren NF- $\kappa$ B-Aktivität deutlich weniger TNF- $\alpha$  als Zellen ohne Medikament [Liu et al., 2009]. Insgesamt kann ein kardioprotektiver Effekt des Pioglitazons im septischen Schock geschlussfolgert werden.

## **b) Lunge**

Die histologischen Unterschiede waren in der Lunge besonders kräftig ausgeprägt. Besonders in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe konnten die entzündlichen Veränderungen, wie sie im Rahmen des ALI bzw. ARDS auftreten, beobachtet werden: eine deutliche Verdickung der Inter-alveolarsepten mit kleinlumigen Alveolen und massiver Leukozytenakkumulation bis hin zur Bildung kleiner Lymphfollikel. Die Schädigung des Endothels und damit der irreversible Verlust von Gasaustauschfläche sind pathognomisch für ein ALI. Dahingegen war in der Lunge der LPS Shock + Pioglitazon-Tiere eine wesentlich geringere Ausprägung dieser Merkmale zu sehen. Das korreliert auch mit einer niedrigeren I $\kappa$ B-Expression in den Western Blots der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe gegenüber denen der LPS Shock + Vehicle-Gruppe. Zu vergleichbaren Ergebnissen sind auch Liu et al. gekommen, die bei vorheriger Gabe von Rosiglitazon im septischen Schock eine deutliche Reduktion der interalveolären Wandverdickung, des interstitiellen Ödems und der Leukozytenansammlung sehen konnten. Dieser Effekt ließ sich mit dem PPAR $\gamma$ -Antagonisten GW9662 rückgängig machen [Liu et al., 2005a]. In einer Immunhistochemie der Lunge für das Adhäsionsmolekül ICAM-1 zeigten Liu et al. eine erhöhte Intensität im pulmonalen Gewebe der LPS-Vehicle-Gruppe und eine klar verminderte Intensität in der ROSI-LPS-Gruppe [Liu et al., 2005b]. Mit diesen Erkenntnissen lässt sich auch die verringerte Leukozytenakkumulation in der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe in unserer Studie erklären, da ICAM-1 die Chemotaxis der Leukozyten in das entzündliche

Gewebe vermittelt. Chima et al. untersuchten den Einfluss des PPAR $\gamma$ -Agonisten Ciglitazon auf die pulmonale Inflammation im hämorrhagischen Schock. Bei Rückgabe des zuvor entnommenen Blutes und danach stündlich verabreichten sie Ciglitazon intraperitoneal. In der histologischen Untersuchung der Lunge konnte eine drastische Abnahme der oben aufgeführten Entzündungszeichen erkannt werden [Chima et al., 2008]. Grommes et al. induzierten bei Mäusen ein ALI, indem sie das LPS in Form eines Aerosols verabreichten und mit Hilfe von Fluoreszeinen den alveolaren, interstitiellen und intravasalen Leukozytengehalt sowie den Proteingehalt einer BAL bestimmten. Es war eine deutliche Reduktion der Leukozyten sowie eine verringerte Degranulation und Adhäsion dieser sichtbar, sodass die Autoren Pioglitazon eine mögliche Rolle in der Behandlung des ALI zusprachen [Grommes et al., 2012]. Wenngleich in dieser Arbeit die Ergebnisse der MPO-Analyse nicht mit den eindeutigen histologischen Veränderungen der Lunge korrelieren, so ist von einem antiinflammatorischen Effekt des Pioglitazons auszugehen.

### **c) Leber**

Die Ausbildung einer Schockleber ist sowohl auf die verschlechterte Durchblutung im septischen Schock als auch auf eine direkte Schädigung des Leberparenchyms durch das Toxin zurückzuführen. Charakteristisch ist die auf die Hypoxie folgende läppchenzentrale Nekrose, die zum Verlust der Organfunktion führt. Diese Nekrosen sind histologisch in den Präparaten der LPS Shock + Vehicle-Gruppe stark ausgeprägt und werden von Zelllysen besonders im Bereich der Zentralvenen begleitet. Weiterhin finden sich immer wieder diffuse Einblutungen aufgrund zerstörter Gefäße.

Enomoto et al. konnten in einer tierexperimentellen Studie beweisen, dass Pioglitazon bei LPS-induziertem Leberschaden die Blutserumwerte der Transaminasen und die TNF- $\alpha$ -Sekretion aus den Kupffer-Zellen deutlich reduziert [Enomoto et al., 2005]. Einen protektiven Effekt des PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon wiesen Kuboki et al. für den ischämieinduzierten Leberschaden nach. Dabei wurde bei Mäusen die Durchblutung der Leber partiell mittels eines Clips unterbunden, der nach 90 Minuten wieder entfernt wurde. Es zeigte sich bei den Tieren, die mit Rosiglitazon vorbehandelt wurden, ein deutlich reduzierter ischämischer Leberschaden als bei den unbehandelten Tieren. Dagegen konnte bei PPAR $\gamma$ -negativen Mäusen eine verstärkte Schädigung der Leber beobachtet werden im Vergleich zum Wildtyp [Kuboki et al., 2008]. Alles in allem kann aus den Ergebnissen dieser und anderer Studien geschlossen werden, dass PPAR $\gamma$  ein wichtiger endogener Regulator ist und als Ansatzpunkt für eine Leberprotektion im septischen Schock angesehen werden kann.

**d) Niere**

Das im Rahmen des MODS auftretende, akute Nierenversagen ist u.a. bedingt durch die arterielle Hypotonie und die konsekutive, autoregulatorische Vasokonstriktion renaler Gefäße. Somit kommt es zu einer verminderten Durchblutung und damit zur Schädigung des renalen Gewebes besonders im Bereich des Cortex renalis. Sichtbar wird der Schaden anhand von tubulären Nekrosen, die in dieser Studie besonders in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe deutlich waren. Desweiteren zeigte sich in der Giemsa-Färbung eine, im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen, erhöhte Akkumulation von Leukozyten bei den LPS Shock + Vehicle-Tieren. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen von Lee et al., die eine verminderte immunhistochemische Expression von ICAM-1 und VCAM-1 bei Rosiglitazon-vorbehandelten Tieren im septischen Schock nachweisen konnten. Diese beiden Adhäsionsmoleküle sind entscheidend für die Chemotaxis von Leukozyten. Werden sie vermindert exprimiert, so können auch weniger Leukozyten in das Gewebe migrieren und es resultiert eine geringere Entzündungsreaktion [Lee et al., 2005]. Für Pioglitazon konnten Reel et al. einen protektiven Effekt in der durch Ischämie induzierten Nierenschädigung nachweisen. Die Expression von Matrix-Metalloproteasen, die als Enzyme in der Vermittlung der Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle spielen, sank unter Pioglitazon-Behandlung und es wurden weniger tubuläre Nekrosen in dieser Gruppe beobachtet [Reel et al., 2013]. Weiterhin konnte in einer Studie an diabetischen Ratten gezeigt werden, dass Pioglitazon im Ischämie-/Reperfusion-Experiment schützend auf das Nierengewebe wirkt und die Serumwerte von TNF- $\alpha$  und der Superoxiddismutase sinken [Tawfik, 2012]. Von Taguchi et al. ist ebenfalls ein renoprotektiver Effekt von Pioglitazon in hyperurikämischen Ratten nachgewiesen wurden. Unter Therapie der Tiere mit Pioglitazon bildeten sich weniger Kristalle in der Niere und es kam zu einem verminderten oxidativen Stress und Zelluntergang [Taguchi et al., 2012].

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass Pioglitazon als PPAR $\gamma$ -Agonist bei unterschiedlichen entzündlichen Prozessen der Niere protektiv auf das Gewebe und damit auch auf die Nierenfunktion wirkt. Für die Überprüfung, ob es das ANV im septischen Schock abschwächen oder gar verhindern kann, sind in der Zukunft weitere Studien erforderlich.

#### **6.1.4 Effekte von Pioglitazon auf die Proteinexpression im septischen Schock**

##### **a) PPAR $\gamma$ -Expression**

Der PPAR $\gamma$ -Rezeptor liegt intrazellulär und ist in der Lage über Bindung an die DNA und Bildung eines Heterodimerkomplexes die mRNA-Expression verschiedener Proteine zu beeinflussen. In dieser Studie konnten wir in der Lunge und in der Niere eine verminderte Expression des PPAR $\gamma$ -Rezeptors in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe gegenüber der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe nachweisen. Einen vergleichbaren Effekt im Bronchialepithel und in der Aorta thoracica konnten Zingarelli et al. in einer Studie mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Ciglitazon beobachten. Bei Ratten wurde mittels CLP eine polymikrobielle Sepsis induziert und Ciglitazon mehrfach post-interventionell verabreicht. Dabei sank die Expression von PPAR $\gamma$  zeitabhängig deutlich in der LPS + Vehicle-Gruppe und war eine Stunde nach CLP am niedrigsten. Eine Vorbehandlung mit Ciglitazon führte zu einer Heraufregulation der PPAR $\gamma$ -Expression auf das normale Maß [Zingarelli et al., 2003].

Bereits aus früheren Studien ist bekannt, dass inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 die Expression der mRNA des PPAR $\gamma$ -Rezeptors herabregulieren können [Hill et al., 1997, Tanaka et al. 1999], was die erniedrigte Expression von PPAR $\gamma$  in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe erklärt. Ist der Rezeptor jedoch vermehrt exprimiert, wie in der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe, so kann er über zwei Mechanismen zu einer geringeren Zytokinproduktion führen. Einmal über eine Downregulation der mRNA von NF- $\kappa$ B und zum anderen über eine physikalische Interaktion mit dem IKK-Komplex, woraufhin dieser gehemmt wird [Chima et al., 2008]. Beides hat zur Folge, dass weniger NF- $\kappa$ B in den Zellkern gelangt und somit auch die Produktion von Zytokinen verringert wird. Damit wird nicht nur die Entzündungsreaktion eingedämmt, sondern auch eine Hemmung des PPAR $\gamma$ -Rezeptors durch Zytokine unterdrückt.

##### **b) I $\kappa$ B-Expression**

Das Protein I $\kappa$ B liegt intrazellulär gebunden an NF- $\kappa$ B vor und kann durch den aktivierten IKK-Komplex abgespalten, ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut werden. Das freie NF- $\kappa$ B gelangt daraufhin in den Zellkern und ist in der Lage die vermehrte Zytokinproduktion im septischen Schock anzuregen. Diese Studie zeigte eine erhöhte Expression von I $\kappa$ B in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe im Myokard, in der Leber und in der Lunge gegenüber der LPS Shock + Pioglitazon-Gruppe. Ein solches Ergebnis ist mit einer vermehrten Freisetzung von I $\kappa$ B im Zuge des septischen Geschehens zu erklären, sodass es zwischenzeitlich in einer höheren Konzentration

intrazellulär vorliegt. In der Literatur finden sich dagegen widersprüchliche Ergebnisse, die auf eine erniedrigte I $\kappa$ B-Konzentration in den Vehicle-Gruppen hinweisen. Die Autoren erklären dies mit einem erhöhten Abbau des Proteins, nachdem es von NF- $\kappa$ B abgespalten wurde und fanden gleichzeitig eine erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivität [Chima et al., 2008, Lee et al., 2005, Zingarelli et al., 2003]. Ein vergleichbarer Effekt konnte in dieser Arbeit lediglich in der Niere beobachtet werden.

### **c) p38-Expression**

Die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) liegt in ihrer inaktivierten Form im Zytoplasma vor und muss zunächst selbst durch andere MAPK-Kinasen phosphoryliert werden. Wird sie auf diese Weise aktiviert, kann sie in den Zellkern gelangen, dort selbst verschiedene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und damit Einfluss auf die Proteinexpression nehmen. Besonders Zytokine, Hormone, Hitzeschock und anderer Zellstress aktivieren die p38-MAPK, was neben Zelluntergang auch eine verstärkte Entzündungsreaktion zur Folge hat [Pearson et al., 2001]. Aus diesem Grund kann sie im septischen Schock auch in einer erhöhten Konzentration nachgewiesen werden. Dieser Effekt ließ sich in dieser Studie im Myokard nachweisen. Hier war die p38-Expression in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe am höchsten und konnte durch Pioglitazon leicht vermindert werden. In den anderen Organen war eine solche Tendenz nicht zu beobachten. Bisher war der hemmende Effekt von Pioglitazon auf die p38-Expression besonders auf der neuralen Ebene untersucht wurden. Ji et al. beobachteten, dass Pioglitazon in der LPS-induzierten Entzündung der Mikroglia ligandenabhängig die p38-Expression senkt und damit auch die Produktion von Zytokinen hemmt [Ji et al., 2010]. Desweiteren konnten Xing et al. einen protektiven Einfluss von Pioglitazon auf dopaminerge Zellen nachweisen, wenn diese LPS ausgesetzt wurden. Sie begründeten dies mit einer verminderten, aktivierenden Phosphorylierung von p38 unter Pioglitazon-Gabe. In der gleichen Studie zeigte sich auch eine geringere iNOS-Expression in der Mikroglia, sodass die Entzündungsreaktion in diesen Zellen schwächer ausgeprägt war [Xing et al., 2008].

Die Ergebnisse der Western Blot-Untersuchungen und der anderen Analysen zusammengefasst, ist davon auszugehen, dass Pioglitazon anti-inflammatorische Effekte auf die Gewebe von Herz, Lunge, Leber und Niere im LPS-induzierten septischen Schock hat. Die Studie ergab sowohl einen positiven Einfluss auf die Überlebenszeit und die Hämodynamik als auch eine Eindämmung der Entzündungsreaktion, die histologisch und auf Ebene der Proteinexpression gesichert werden konnte.

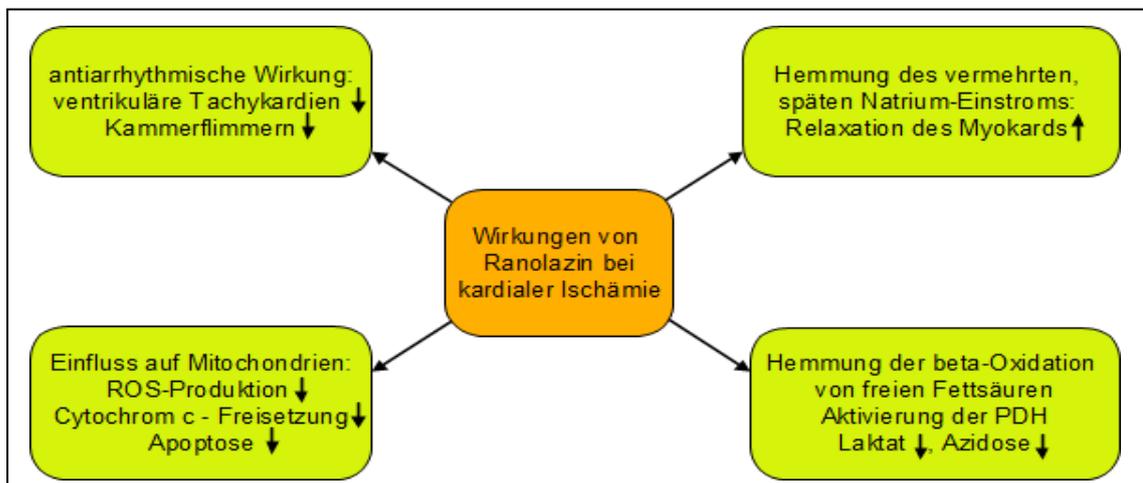
## 6.2 Ranolazin

### 6.2.1 Effekte von Ranolazin auf das Überleben und die Hämodynamik im Septic Shock Modell

Eine verlängerte Überlebenszeit im septischen Schock gilt als ein Hinweis auf einen positiven Einfluss eines Medikamentes auf das Entzündungsgeschehen. Für Ranolazin konnte in den hier gewonnenen Ergebnissen ein solcher Effekt nicht beobachtet werden, da sich trotz Vorbehandlung der Tiere mit Ranolazin einen Tag vor LPS-Gabe keine Änderung der Überlebenszeit im Vergleich zu den LPS Shock + Vehicle-Tieren zeigte. Aus früheren, tierexperimentellen Studien im Ischämie-/Reperusionsmodell war bekannt, dass Ranolazin die Größe des Infarktareals und die Ausschüttung von Troponin T reduzieren kann [Zacharowski et al., 2001]. Desweiteren ist für Ranolazin mehrfach eine antiarrhythmische Wirkung in Bezug auf ventrikuläre Tachykardien und Kammerflimmern nachgewiesen worden. So konnten Dhalla et al. zeigen, dass diese Arrhythmien sowohl während kurzer, kardialer Ischämie mit Reperfusion als auch bei prolongierter Ischämie ohne Reperfusion durch Ranolazin verringert werden können. Im Vergleich zu den Vehicle-Tieren beobachteten sie auch eine dosisabhängige Reduktion der Mortalität nach Ranolazin-Gabe [Dhalla et al., 2009]. Aufgrund dieser Erkenntnisse gehörte die Verbesserung der Überlebenszeit im septischen Schock zu den Grundthesen dieser Arbeit, da die septische Kardiomyopathie mit nachfolgender Myokarddepression ein wesentlicher Bestandteil des MODS ist.

Während Phasen kardialer Ischämie ist der späte  $\text{Na}^+$ -Einstrom erhöht, weil der betreffende Ionenkanal ( $I_{\text{Na}}$ ) unvollständig deaktiviert wird. Dies hat zur Folge, dass sich die intrazelluläre Kalzium-Konzentration ebenfalls erhöht und somit eine verstärkte diastolische Wandspannung mit Kompression der Koronargefäße und konsekutiv verschlechterter Durchblutung resultiert [Chaitman, 2006]. Dass Ranolazin genau diesen verstärkten  $\text{Na}^+$ -Einstrom durch Blockade des betreffenden Ionenkanals hemmen kann, zeigten mehrere tierexperimentelle Studien im Ischämie-/Reperusionsmodell bzw. an isolierten Rattenherzen [Chaitman, 2006, Wasserstorm et al., 2009, Wang et al. 1999]. Aldakkak et al. untersuchten den Einfluss von Ranolazin auf den mitochondrialen Metabolismus während kardialer Ischämie, da Mitochondrien eine zentrale Rolle bei der Zelldysfunktion spielen. Sie können sowohl ROS produzieren als auch von diesen angegriffen werden und darauf folgend eine Nekrose bzw. Apoptose der Zelle auslösen. Es ergaben sich Hinweise auf eine verminderte Produktion von ROS und eine geringere Freisetzung von Cytochrom c, wenn Ranolazin eine Stunde vor Ischämieinduktion gegeben wurde. Cytochrom c dient im Mitochondrium als Radikalfänger, kann jedoch nach Schädigung der Mitochondrien auch ins Zytosol

übertreten und dort die Apoptose initiieren [Aldakkak et al., 2011]. Während einer kardialen Ischämie ist Ranolazin in der Lage einen Switch im Zellstoffwechsel und der ATP-Gewinnung zu veranlassen. So wird die  $\beta$ -Oxidation freier Fettsäuren, die unter ischämischen Bedingungen in erhöhten Konzentrationen im Herz vorkommen, gehemmt und die Pyruvatdehydrogenase (PDH) vermehrt aktiviert. Damit kann die ATP-Gewinnung stärker über die Glucoseoxidation erfolgen, sodass weniger Laktat anfällt als bei der Verstoffwechslung von freien Fettsäuren und die entstehende Azidose des Gewebes reduziert werden kann [Zacharowski et al., 2001, Clarke et al., 1993, 1996]. Abb. 51 fasst die aufgeführten Fakten zusammen. Die zitierten Studien wurden alle im Hinblick auf die Wirkung bei kardialer Ischämie durchgeführt, die in der Sepsis eine große Rolle spielt, jedoch scheinen andere Parameter entscheidender für das Überleben im septischen Schock zu sein. Weiterhin erfolgten diese Studien an isolierten Tierherzen oder es wurde Ranolazin p.o. bzw. kurz vor Ischämieinduktion i.v. gegeben.



**Abb. 51:** Übersicht über bisherige Erkenntnisse bezüglich der Wirkung von Ranolazin bei kardialer Ischämie, die als Grundlage für theoretische Überlegungen hinsichtlich der Wirkung im septischen Schock dienen

Ferner konnte die Vorbehandlung mit Ranolazin vor Induktion des septischen Schocks die Hämodynamik der Tiere nicht entscheidend verbessern. Der initiale Blutdruckabfall nach LPS-Gabe verläuft gleich mit dem der LPS Shock + Vehicle-Tiere. Die darauf folgenden stark schwankenden Blutdruckwerte sind damit zu erklären, dass sich zum jeweiligen Messzeitpunkt ein Teil der noch lebenden Tiere kurz vor dem Tod befand. Die mittlere Herzfrequenz stieg während des Versuchszeitraums nur leicht an, war jedoch nahezu unverändert. In bisher durchgeführten klinischen Studien bezüglich der chronischen Angina pectoris (CARISA und MARISA) und in einer tierexperimentellen Studie an Sildenafil-vorbehandelten Hunden zeigten sich keine hämodynamischen Veränderungen nach Ranolazin-Gabe [Chaitman et al., 2004a, b, Zhao et al., 2006]. Insgesamt scheint Ranolazin im LPS-induzierten septischen Schock keine positive Auswirkung auf die Überlebenszeit oder die Hämodynamik zu haben.

### **6.2.2 Effekt von Ranolazin auf die Myeloperoxidaseaktivität und die histologischen Veränderungen im septischen Schock**

Mittels der Analyse von MPO-Aktivität in den Schockorganen sowie mittels histologischer Untersuchungen sollte nachgewiesen werden, ob Ranolazin diese Parameter im septischen Schock günstig beeinflussen kann. Die MPO-Aktivität konnte lediglich im Myokard durch Ranolazin gesenkt werden, sodass hier eine geringere Leukozytenakkumulation vermutet werden kann. Dieses Ergebnis korreliert jedoch nur in bedingtem Maße mit den histologischen Präparaten des Myokards. Wenngleich eine besser erhaltene Gewebeintegrität zu sehen ist, zeigen sich in der Giemsa-Färbung eine nur leicht abgeschwächte Leukozytenakkumulation in der Ranolazin Sham- und LPS Shock + Ranolazin-Gruppe im Vergleich zur LPS Shock + Vehicle-Gruppe. Ebenso weisen die histologischen Präparate der Lunge eine hohe Dichte an Leukozyten in allen drei Versuchsgruppen auf, sodass diese Studie keinen pulmonalprotektiven Effekt von Ranolazin im septischen Schock nachweisen konnte. Die auch in der Sham-Gruppe massive Gewebeschädigung korreliert mit dem klinischen Fall eines Patienten mit chronischer Angina pectoris und Niereninsuffizienz, bei dem die zusätzliche tägliche Gabe von 500 mg Ranolazin eine Belastungsdyspnoe auslöste [Goswami et al., 2010]. In der Leber zeigte sich ein leicht verringerter Zellschaden im septischen Schock, wenn die Tiere mit Ranolazin vorbehandelt wurden. Eine Hemmung der Fettsäureoxidation mit einer konsekutiv niedrigeren Laktatazidose könnte dafür ursächlich sein. Dieser Effekt von Ranolazin ist an isolierten Rattenlebern bereits von Mito et al. nachgewiesen worden [Mito et al., 2010]. Die histologischen Präparate der Niere lassen erkennen, dass Ranolazin den LPS-induzierten Gewebeschaden nur bedingt eingrenzen kann, da sich trotz Vorbehandlung mit dem Medikament viele Leukozytenansammlungen sowie zerstörte Glomeruli finden. Ranolazin allein führt jedoch nicht zu einer Gewebeschädigung wie z.B. in der Lunge. In der Literatur finden sich gegensätzliche Berichte. Einen positiven Einfluss auf die glomeruläre und tubuläre Funktion hatte Ranolazin bei der am Schweinmodell durchgeführten renalen Autotransplantation, wenn es den Tieren vor Organentnahme intravenös gegeben und während der 24-stündigen Lagerung der Inkubationslösung zugesetzt wurde [Lodge et al., 1990]. Deng et al. konnten einen leichten antagonistischen Effekt von Ranolazin auf den  $\alpha_1$ -Rezeptor und auf die Kalzium-Kanäle in isolierten, intrarenalen Arterien von Ratten nachweisen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich eine verbesserte Durchblutung der Niere unter Ranolazin vermuten [Deng et al., 2012]. Auf der anderen Seite kam es bei einem Patienten mit chronischer Nierenkrankheit, der wegen einer KHK u.a. Simvastatin einnahm, nach der zusätzlichen Gabe von 500 mg Ranolazin täglich zu einer Rhabdomyolyse der unteren

Extremität mit einer stark erhöhten CK. Nach Absetzen beider Medikamente verbesserte sich die Symptomatik rasch [Hylton und Ezekiel, 2010]. Da dieser Effekt erst nach Hinzufügen von Ranolazin auftrat, ist von einer Wechselwirkung im Cytochrom P450 (CYP3A4) auszugehen, über den beide abgebaut werden. Es ist insofern eine wichtige Nebenwirkung, weil Ranolazin und Simvastatin oft von der gleichen Patientengruppe eingenommen werden.

Unsere histologischen Analysen und die der MPO lassen erkennen, dass Ranolazin kaum einen protektiven Effekt im LPS-induzierten septischen Schock auf die untersuchten Organe hat.

### **6.2.3 Effekt von Ranolazin auf die Proteinexpression im septischen Schock**

Mittels einer Untersuchung der I $\kappa$ B-Expression sollte nachgewiesen werden, ob Ranolazin über diesen Weg die Entzündungsreaktion im septischen Schock beeinflusst. Das im Normalzustand an I $\kappa$ B gebundene NF- $\kappa$ B kann, wenn es während einer Entzündungsreaktion von I $\kappa$ B abgespalten wurde, eine vermehrte Transkription von Zytokinen auslösen. I $\kappa$ B würde vermehrt freigesetzt und müsste damit in der LPS Shock + Vehicle-Gruppe erhöht sein. Dieses lässt sich auch im Myokard der beobachten, allerdings beeinflusst die Vorbehandlung mit Ranolazin die hohe Freisetzung von I $\kappa$ B nicht. Lediglich in der Leber sinkt der Wert signifikant in der LPS Shock + Ranolazin-Gruppe gegenüber der LPS-Shock + Vehicle-Gruppe. Eine Analyse der HSP70-Expression in den Geweben der Schockorgane sollte zeigen, welchen Einfluss Ranolazin auf den Zellstress hat. HSP70 hat neben einer Housekeeping-Funktion auch die Aufgabe besonders bei zellulärem Stress die Proteinaggregation zu verhindern, sodass es in der Sepsis vermehrt vorliegen müsste. Das hier untersuchte HSP70/HSC70 spielt weiterhin bei der Hämatopoese eine Rolle in der Zytokin-vermittelten Regulation des pro-apoptischen Bim, einem Mitglied der Bcl-2-Familie [Matsui et al., 2007]. In keinem der Schockorgane zeigte sich eine abgeschwächte HSP70-Expression in der LPS Shock + Ranolazin-Gruppe gegenüber der LPS Shock + Vehicle-Gruppe, sondern stets eine erhöhte Expression. Aus diesem Grund ist nicht davon auszugehen, dass Ranolazin eine Verminderung des Zellstress bewirkt.

In der Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich kein Hinweis auf einen protektiven Effekt von Ranolazin im LPS-induzierten septischen Schock erkennen. Dieser war aufgrund einer möglichen Eindämmung der septischen Kardiomyopathie im Vorfeld erwartet wurden. Nach ausführlicher Literaturrecherche ist diese die erste, zu einem solchen Thema durchgeführte Studie.

### **6.3. Limitationen der Studien**

Die vorliegende Studie fand auf der Basis eines etablierten Tiermodells statt, dass in einer ähnlichen Form bereits erfolgreich in anderen tierexperimentellen Studien verwendet wurde [Lee et al., 2005, Reel et al., 2013]. Jedoch sind diese Ergebnisse nicht vollständig von der Ratte auf den Menschen übertragbar. Weiterhin lässt die aus Gründen des Tierschutzes begrenzte Anzahl der Versuchstiere in den einzelnen Gruppen kleinere Schwankungen offen. Für das Modell wurden nur männliche Tiere verwendet, was eine Aussage über den möglichen Einfluss von Östrogenen auf das Outcome erschwert und in einer weiteren Studie untersucht werden sollte. Bezüglich der Übertragung der Ergebnisse in den klinischen Alltag ist anzumerken, dass die Medikamente vor Induktion des septischen Schockes gegeben wurden. Dagegen erscheint der Patient in der Klinik oft schon mit den Symptomen und die Medikamente werden somit erst bei bereits stattfindender Sepsis verabreicht. Es ist nicht sicher, ob ein Medikament wie Pioglitazon, das die Transkription und damit die Proteinexpression beeinflusst, ausreichend schnell in diesem kritischen Zustand des Patienten wirken kann. Für die Induktion des septischen Schockes nutzten wir das in gram-negativen Bakterien enthaltene LPS, das in ca. einem Drittel aller Fälle ursächlich dafür ist [Hauber und Zabel, 2009]. Ein septischer Schock beim Menschen ist allerdings auch durch das in gram-positiven Bakterien enthaltene  $\alpha$ -Toxin, durch Pilze oder zum Teil polymikrobiell bedingt. Um eine polymikrobielle Sepsis zu simulieren, ist es möglich in folgenden Studien eine Caecum-Ligation und Punction (CLP) durchzuführen, die einen Darmverschluss mit Perforation nachahmt.

Wenngleich bekannt ist, dass Pioglitazon als PPAR $\gamma$ -Agonist über die Inhibition von NF- $\kappa$ B wirkt, kann ein bisher unbekannter Einfluss auf die Genregulation von Proteinen im septischen Schock nicht sicher ausgeschlossen werden. Die Wirkmechanismen von Ranolazin wurden größtenteils in Hinblick auf die kardialen Effekte bei Ischämie und unseres Wissens noch nicht bezüglich der Wirkung im septischen Schock untersucht. Aus diesem Grund war ein Vergleich mit anderen Studienergebnissen erschwert.

Mögliche Messfehler bei der Analyse der MPO und der Western Blots wurden versucht über die Bildung des Mittelwertes aus jeweils drei ähnlichen Versuchstieren pro Gruppe, zu minimieren. Für die Auswertung der histologischen Präparate wurden ebenso jeweils drei pro Versuchsgruppe und pro Organ angesehen und repräsentative Bilder angefertigt. Jedoch blieb die Beurteilung subjektiv, da kein standardisiertes Protokoll vorlag.

#### **6.4 Ausblick**

Unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Pioglitazon einen insgesamt protektiven Effekt auf Herz, Lunge, Leber und Niere im septischen Schock hat. Somit scheint eine Anwendung dieses Medikamentes für eine Verbesserung des Überlebens durchaus möglich. Weitere tierexperimentelle Studien sollten versuchen die Dosis sowie die Applikationsart und -zeit zu optimieren, um eine Grundlage für klinische Studien zu schaffen. Hierbei sollte auch die Wirksamkeit der Gabe von Pioglitazon bei anderen Erregern sowie nach Induktion der Sepsis getestet werden, da diese Situationen dem klinischen Alltag näher kommen würden.

Für Ranolazin hingegen scheint ein positiver Einfluss sowohl auf das Überleben als auch auf die Entzündungsreaktion im septischen Schock nicht vorhanden zu sein, da es die septische Kardiomyopathie nach unseren Erkenntnissen kaum beeinflusst. Nachfolgende Studien zu diesem Medikament sollten sich mehr auf die bisher erfolgreiche Anwendung im Ischämie-/Reperusionsmodell konzentrieren.

## **7. Zusammenfassung**

Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Studie war es, ein Medikament für die adjunktive Therapie des septischen Schocks zu finden, da dieser in Deutschland die dritthäufigste Todesursache darstellt und mit einer Letalität von über 50% eine enorme medizinische Bedeutung hat [Engel et al, 2007, Moerer et al., 2009]. Dafür wurden zwei verschiedene Medikamente mit unterschiedlichen Wirkmechanismen gewählt und separat getestet. Das erste Medikament Pioglitazon ist ein PPAR $\gamma$ -Agonist und kann als Transkriptionsfaktor die Transkription von NF- $\kappa$ B herabregulieren, sodass es zu einer verringerten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine kommt. Ranolazin, als zweites Medikament, greift hingegen am Natrium-Kanal der Myokardzellen an und führt zu einer verbesserten Relaxation des Herzmuskels. Dieser Effekt könnte die septische Kardiomyopathie positiv beeinflussen, wurde allerdings noch in keiner Studie erforscht. Bisher erfolgte die Anwendung als Zusatzmedikament in der Therapie der chronischen Angina pectoris. Je Medikament wurden drei Versuchsgruppen gebildet: eine Sham-Gruppe, eine LPS Shock + Vehicle-Gruppe und eine LPS Shock + Medikament-Gruppe. Die i.p. Gabe des Medikamentes erfolgte jeweils mindestens 12 Stunden vor Induktion des septischen Schocks. Vor LPS-Gabe i.a. wurden die Tiere mittels Pentobarbital betäubt und darauf für maximal vier Stunden in Hinblick auf Überlebenszeit und Hämodynamik nachbeobachtet. Nach dem Tod des Tieres wurden Herz, Lunge, Leber und Niere entnommen. Nachfolgend fanden Analysen der Myeloperoxidase-Aktivität sowie der Proteinexpression mittels Western Blot statt und es wurden histologische Präparate in zwei verschiedenen Färbungen angefertigt.

Für Pioglitazon ergab sich eine signifikante Verdopplung der Überlebenszeit ( $p < 0,001$ ) und eine temporäre Verbesserung der hämodynamischen Parameter. Desweiteren konnte in den histologischen Präparaten v.a. in der Lunge der mit Pioglitazon vorbehandelten Tiere eine geringere Gewebeschädigung und Leukozytenakkumulation beobachtet werden. Der Nachweis für eine verringerte MPO-Aktivität erfolgte besonders in der Niere und im Myokard. Diese Ergebnisse gehen konform mit Hinweisen auf eine geringere Expression pro-inflammatorischer Proteine wie z.B. p38 im Western Blot, sodass die gewonnenen Erkenntnisse auf einen protektiven Einfluss von Pioglitazon im septischen Geschehen deuten. Dagegen konnte die Gabe von Ranolazin die Auswirkungen des septischen Schocks kaum positiv beeinflussen. Es zeigte sich weder eine Verbesserung der Überlebenszeit oder Hämodynamik noch waren auf der Ebene der Proteinexpression oder histologisch in den Schockorganen eindeutige Hinweise für einen protektiven Effekt vorhanden, weshalb dieser für Ranolazin nahezu ausgeschlossen werden kann.

## **8. Literaturverzeichnis**

**Alberts B** (2002): *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York; 2002:898–899

**Aldakkak M, Camara AK, Heisner JS, Yang M, Stowe DF** (2011): Ranolazine reduces Ca<sup>2+</sup> overload and oxidative stress and improves mitochondrial integrity to protect against ischemia reperfusion injury in isolated hearts. *Pharmacol Res.* 2011 Oct; 64(4):381-92

**Ammann P, Fehr T, Minder EI, Gunter C, Bertel O** (2001): Elevation of troponin I in sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2001; 27(6):965-969

**Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR** (2001): Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001 Jul; 29(7):1303-10.

**Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA** (1997): The Effects of Ibuprofen on the Physiology and Survival of Patients with Sepsis. *N Engl J Med* 1997; 336:912-18

**Berria R, Glass L, Mahankali A, Miyazaki Y, Monroy A, De Filippis E, Cusi K, Cersosimo E, Defronzo RA, Gastaldelli A** (2007): Reduction in hematocrit and hemoglobin following pioglitazone treatment is not hemodilutional in Type II diabetes mellitus. *Clin Pharmacol Ther.* 2007 Sep; 82(3):275-81

**Bodmann KF, Vogel F** (2001): Antimikrobielle Therapie der Sepsis. *Chemother J* 2001; 10:43–56

**Bone RC** (1996): Sir Isaak Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med.* 1996 Jul; 24(7): 1125-28.

**Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA** (1992): Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992; 101:1644–55

**Borsting E, Cheng VP, Glass CK, Vallon V, Cunard R** (2012): Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists repress epithelial sodium channel expression in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Mar 1; 302(5):F540-51

**Boussekey N, Cantrel J, Debrabant LD, Langlois J, Devos P, Meybeck A, Chiche A, Georges H, Leroy O** (2010): Epidemiology, Prognosis, and Evolution of Management of Septic Shock in a French Intensive Care Unit: A Five Years Survey. *Crit Care Res Pract* 2010, Article ID 436427

**Brinkmann, Madea** (2004): *Handbuch gerichtliche Medizin*. 1. Aufl. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2004, S. 261

**Chaitman BR** (2006): Ranolazine for the treatment of chronic angina and potential use in other cardiovascular conditions. *Circulation* 2006; 113(20):2462-72

**Chaitman BR, Pepine CJ, Parker JO, Skopal J, Chumakova G, Kuch J, Wang W, Skettino SL, Wolff AA, Combination Assessment of Ranolazine In Stable Angina (CARISA) Investigators** (2004a): Effects of ranolazine with atenolol, amlodipine, or diltiazem on exercise tolerance and angina frequency in patients with severe chronic angina. *JAMA* 2004 Jan 21; 291(3):309-16.

**Chaitman BR, Skettino SL, Parker JO, Hanley P, Meluzin J, Kuch J, Pepine CJ, Wang W, Nelson JJ, Hebert DA, Wolff AA, MARISA Investigators** (2004b): Anti-ischemic effects and long-term survival during ranolazine monotherapy in patients with chronic severe angina. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Apr 21; 43(8):1375-82

- Chen X**, Osborne MC, Rybczynski PJ, Zeck R, Yang M, Xu J, Zhou L, Cryan E, Tang Y, Demarest KT (2005): Pharmacological profile of a novel, non-TZD PPAR $\gamma$  agonist. *Diabetes Obes Metab.* 2005 Sep; 7(5):536-46
- Chima RS**, Hake PW, Piraino G, Mangeshkar P, Denenberg A, Zingarelli B (2008): Ciglitazone ameliorates lung inflammation by modulating the inhibitor  $\kappa$ B protein kinase/nuclear factor- $\kappa$ B pathway after hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 2008 Oct; 36(10):2849-57
- Clarke B**, Spedding M, Patmore L, McCormack JG (1993): Protective effects of ranolazine in guinea-pig hearts during low-flow ischaemia and their association with increases in active pyruvate dehydrogenase. *Br J Pharmacol.* 1993 July; 109(3):748-750
- Clarke B**, Wyatt KM, McCormack JG (1996): Ranolazine increases active pyruvate dehydrogenase in perfused normoxic rat hearts: evidence for an indirect mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28:341-350
- Cohen J** (2002): The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002 Dec 19-26; 420(6917):885-91
- Cook JA**, Wise WC, Halushka PV (1985): Protective Effect of Selective Leukotriene Antagonist in Endotoxemia in the Rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1985 Nov; 235(2):470-74
- Daugaard M**, Rohde M, Jäättelä M (2007): The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 581 (2007):3702-10
- Deng CY**, Kuang SJ, Rao F, Yang H, Fang XH, Shan ZX, Li XH, Zhou ZL, Lin QX, Yang M, Wu SL, Yu XY, Lin SG (2012): Effect of ranolazine on rat intrarenal arteries in vitro. *Eur J Pharmacol.* 2012 May 15; 683(1-3):211-16
- Dhalla AK**, Wang WQ, Dow J, Shryock JC, Belardinelli L, Bhandari A, Kloner RA (2009): Ranolazine, an antianginal agent, markedly reduces ventricular arrhythmias induced by ischemia and ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009 November 1; 297:H1923-H1929
- Ding J**, Song D, Ye X, Liu SF (2009), A Pivotal Role of Endothelial-Specific NF- $\kappa$ B Signaling in the Pathogenesis of Septic Shock and Septic Vascular Dysfunction. *J Immunol* 2009; 183:4031-38
- Eduard Burgis** (2008): Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pharmakologie, 4. Aufl. Urban & Fischer Verlag, München/Jena, 2008, S. 429
- Engel C**, Brunkhorst FM, Bone H-G, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K (2007): Epidemiology of sepsis in Germany: Results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007; 33:606-18
- Enomoto N**, Takei Y, Yamashima S, Ikejima K, Kitamura T, Sato N (2005): Protective effect of pioglitazone against endotoxin-induced liver injury through prevention of Kupffer cell sensitization. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005 Dec; 29(12):216S-19S
- Fenske D**, Husmann M (2003): Glitazone: PPAR-Rezeptoren vermitteln vielfältige Effekte. *Pharmazeutische Zeitung* 2003; 23. Ausgabe, GOVI-Verlag, Mainz
- Ferguson N**, Fan E, Camporota L, Antonelli M, Anzueto A, Beale R, Brochard L, Brower R, Esteban A, Gattinoni L, Rhodes A, Slutsky AS, Vincent JL, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ranieri VM (2012): The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. *Intensive Care Med* 08/2012; 38(10):1573-82

- Filep** JG, Delalandre A, Beauchamp M (1997): Dual Role for Nitric Oxide in the Regulation of Plasma Volume and Albumin Escape During Endotoxin Shock in Conscious Rats. *Circ Res* 1997; 81:840-47
- Goswami** R, Van De Car D, Schmader KE, Bashore TM, Sketch MH Jr (2010): Ranolazine-related dyspnea on exertion. *Am J Geriatr Pharmacother* 2010 Feb; 8(1):73-76
- Grommes** J, Mörgelin M, Soehnlein O (2012): Pioglitazone attenuates endotoxin-induced acute lung injury by reducing neutrophil recruitment. *Eur Respir J* 2012 Aug; 40(2):416-23
- Hallemeesch** MM, Janssen BJA, de Jonge MJ, Soeters PB, Lamers WH, Deutz NEP (2003): NO production by cNOS and iNOS reflects blood pressure changes in LPS-challenged mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:E871-75
- Haraguchi** G, Kosuge H, Maejima Y, Suzuki JI, Imai T, Yoshida M, Isobe M (2008): Pioglitazone reduces systematic inflammation and improves mortality in apolipoprotein E knockout mice with sepsis. *Intensive Care Med* 2008; 34:1304-12
- Hauber** HP, Zabel P (2009): Pathophysiologie und Keimpektrum der Sepsis. *Internist* 2009; 50:779-87
- Hernanz** R, Martín A, Pérez-Girón JV, Palacios R, Briones AM, Miguel M, Salaces M, Alonso MJ (2011): Pioglitazone treatment increases COX-2-derived prostacyclin production and reduces oxidative stress in hypertensive rats: role in vascular function. *Br J Pharmacol* 2012 June; 166(4):1303-19.
- Herold** G: Innere Medizin. Köln, 2010; a: S. 605-609; b: S. 538-39
- Hill** MR, Young MD, McCurdy CM, Gimble JM (1997): Decreased expression of murine PPAR gamma in adipose tissue during endotoxemia. *Endocrinology* 1997 Jul; 138(7):3073-76
- Ho** PJ, Chou CK, Yeh SF (2012): Role of JNK and p38 MAPK in Taiwanin A-induced cell death. *Life Sciences* 2012; 91(25-26):1358-65
- Hylton** AC, Ezekiel TO (2010): Rhabdomyolysis in a patient receiving ranolazine and simvastatin. *Am J Health Syst Pharm* 2010 Nov 1; 67(21):1829-31
- Ji** H, Wang H, Zhang F, Li X, Xiang L, Aiguo S (2010): PPAR $\gamma$  agonist pioglitazone inhibits microglia inflammation by blocking p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Inflamm Res* 2010; 59(11):921-29
- Karimi** G, Fatehi Z, Gholamnejad Z (2006): The role of nitric oxide and protein kinase C in lipopolysaccharidemediated vascular hyporeactivity. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2006; 9:119-23
- Keh** D, Boehnke T, Weber-Cartens S, Schulz C, Ahlers O, Bercker S, Volk H-D, Doecke W-D, Falke KJ, Gerlach H. (2003): Immunologic and hemodynamic effects of "low-dose" hydrocortisone in septic shock: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Feb 15; 167(4):512-20
- Kreymann** KG, de Heer G, Nierhaus A, Kluge S (2007): Use of polyclonal immunoglobulins as adjunctive therapy for sepsis or septic shock. *Crit Care Med*. 2007 Dec; 35(12):2677-85
- Kuboki** S, Shin T, Huber N, Eismann T, Galloway E, Schuster R, Blanchard J, Zingarelli, Lentsch AB (2008): Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Protects Against Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. *Hepatology*. 2008 Jan; 47(1):215-24
- Lee** S, Kim W, Kang KP, Moon S, Sung MJ, Kim DH, Kim HJ, Park SK (2005): Agonist of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , rosiglitazone, reduces renal injury and dysfunction in a murine sepsis model. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2005 June; 20(6):1057-65

- Lehr HA**, Bittinger F, Kirkpatrick CJ (2000): Microcirculatory dysfunction in sepsis: a pathogenetic basis in therapy?. *J of Pathology* 2000; 190(3):373-86
- Leon-Rosales SP**, Molinar-Ramos F, Dominguez-Cherit G et al. (2000): Prevalence of infections in intensive care units in Mexico: A multicenter study. *Crit Care Med* 2000; 28:1316–21
- Létienné R**, Vié B, Puech A, Vieu S, Le Grand B, John GW (2001): Evidence that ranolazine behaves as a weak beta1- and beta2-adrenoceptor antagonist in the rat cardiovascular system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001 Apr; 363(4):464-71
- Liu D**, Zeng BX, Zhang SH, Wang YL, Zeng L, Geng ZL, Zhang SF (2005a): Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ - agonist, reduces acute lung injury in endotoxemic rats. *Crit Care Med* 2005 Oct; 33(10):2309-16
- Liu D**, Zeng BX, Zhang SH, Yao SL (2005b): Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , reduces pulmonary inflammatory response in a rat model of endotoxemia. *Inflamm Res* 2005; 54:464–70
- Liu J**, Xia Q, Zhang Q, Li H, Zhang J, Li A, Xiu R (2009): Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 and pioglitazone inhibit hydroxyl peroxide-induced TNF-alpha and lipopolysaccharide-induced CXC chemokine expression in neonatal rat cardiac myocytes. *Shock* 2009 Sep; 32(3):317-24
- Lodge JP**, Lam FT, Perry SL, Giles GR (1990): Ranolazine - a new drug with beneficial effects on renal preservation. *Transplantation* 1990 Nov; 50(5):755-59
- Löffler**, Petrides, Heinrich (2007): *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Aufl. Springer Verlag, Heidelberg, 2007; a: S. 649; b: S. 63, 138
- Löffler** (2008): *Basiswissen Biochemie*, 7. Aufl. Springer Verlag, Heidelberg, 2008, S. 382
- Lüllmann H**, Mohr K, Hein L (2010): *Pharmakologie und Toxikologie*, 17. Aufl. Thieme Verlag, Stuttgart, 2010, S. 448
- Martin GS**, Mannino DM, Eaton S, Moss M (2003): The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003 Apr 17; 348(16):1546-54
- Matera G**, Cook JA, Hennigar RA, Tempel GE, Wise WC, Oglesby TD, Halushka PV (1988): Beneficial effects of a 5-lipoxygenase inhibitor in endotoxic shock in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1988 Oct; 247(1):363-71
- Matsui H**, Asou H, Inaba T (2007): Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70. *Mol Cell* 2007 Jan 12; 25(1):99-112
- Mito MS**, Constantin J, de Castro CV, Yamamoto NS, Bracht A (2010): Effects of ranolazine on fatty acid transformation in the isolated perfused rat liver. *Mol Cell Biochem* 2010 Dec; 345(1-2):35-44
- Moerer O**, Schmid A, Hofmann M et al. (2002): 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; 28:1440–46
- Moerer O.**, Quintel M. (2009): Definition, Epidemiologie und ökonomische Aspekte der Sepsis bei Erwachsenen. *Internist* 7/2009; 50:788–98
- Muckart DJ**, Bhagwanjee S (1997): American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine consensus conference definitions of systemic inflammatory response syndrome and allied disorders in relation to critically injured patients. *Crit Care Med* 1997; 25(11): 1789-95

- Müller-Werdan U**, Schuster HP (2005): Abriss der Pathophysiologie als Grundlage der Therapie. In: Werdan K, Schuster HO, Müller-Werdan U, Sepsis und MODS, 4. Aufl. Springer Verlag, Heidelberg, 2005; a: S. 38-41; b: S. 47-57
- Naseem KM** (2005): The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med* 2005 Feb-Apr; 26(1-2):33-65
- Neilson IR**, Neilson KA, Yunis EJ, Rowe MI (1989): Failure of tumor necrosis factor to produce hypotensive shock in the absence of endotoxin. *Surgery* 1989 Aug; 106(2):439-43
- Nielsen EW**, Hellerud BC, Thorgersen EB, Castellheim A, Pharo A, Lindstad J, Tønnessen TI, Brandtzaeg P, Mollnes TE (2009): A new dynamic porcine model of meningococcal shock. *Shock* 2009 Sep; 32(3): 302-9
- Pearson G**, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001 Apr; 22(2):153-83
- Pessoa de Souza ACC**, Volpini RA, Shimizu MH, Sanches TR, Camara NOS, Semedo P, Rodrigues CE, Seguro AC, Andrade L (2012): Erythropoietin prevents sepsis-related acute kidney injury in rats by inhibiting NF- $\kappa$ B and upregulating endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012 Jan; 302:1045–54
- Petros A**, Bennett D, Vallance P (1991): Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991; 338:1557–58
- Popov N**, Schmitt M, Schulzeck S, Matthies H (1975): *Acta biol. med. germ.* 34, S. 1441-46
- Reddy BM**, Weintraub HS, Schwartzbard AZ (2010): Ranolazine, A New Approach to Treating an Old Problem. *Tex Heart Inst J.* 2010; 37(6):641-47
- Reel B**, Guzeloglu M, Bagriyanik A, Atmaca S, Aykut K, Albayrak G, Hazan E (2013): The effects of PPAR- $\gamma$  agonist pioglitazone on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *J surg res* 2013; 182(1):176-84
- Reinhart K**, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Gründling M, John S, Kern W, Kreymann G, Krüger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stüber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K und Welte T (2010): Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis, Empfehlungen der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V.; 1. Revision der S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI); *Ger Med Sci* 2010 Jun 28; 8:1-68
- Reynolds K**, Novosad B, Hoffhines A, Gipson J, Johnson J, Peters J, Gonzalez F, Gimble F, Hill M (2002): Pretreatment with troglitazone decreases lethality during endotoxemia in mice. *J Endotoxin Res* 2002; 8:307–14
- Rodloff AC** (2005): Antimikrobielle Therapie. In: Werdan K, Schuster HO, Müller-Werdan U, Sepsis und MODS, 4. Aufl. Springer Verlag, Heidelberg, 2005, S. 171-72
- Salvo I**, de Cian W, Musicco M, Langer M, Piadena R, Wolfler A, Montani C, Magni E (1995): The Italian Sepsis Study: Preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock, *Intensive Care Med* 1995; 21(2):244-49
- Sands KE**, Bates DW, Lanken PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, Parsonnet J, Panzer R, Orav EJ, Snydman DR (1997): Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA* 1997; 278:234-40

- Schoenberg** MH, Nüssler AK, Beger HG (1995): Sauerstoffradikale und Stickstoffmonoxid in der Sepsis. *Chirurg* 1995; 66:18-26
- Schottmüller** H (1914): Wesen und Behandlung der Sepsis. *Verh Dtsch Ges Inn Med* 1914; 31:257
- Schuster** HP, Müller-Werdan U (2005): Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen. In: Werdan K, Schuster HO, Müller-Werdan U, Sepsis und MODS, 4. Aufl. Springer Verlag, Heidelberg, 2005; a: S. 4; b: S.10
- Silva** E, Pedro MA, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M (2004): Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care* 2004; 8:R251-60
- Taguchi** K, Okada A, Yasui T, Kobayashi T, Ando R, Tozawa K, Kohri K (2012): Pioglitazone, a peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  agonist, decreases renal crystal deposition, oxidative stress and inflammation in hyperoxaluric rats. *J Urol* 2012 Sep; 188(3):1002-11.
- Tanaka** T, Itoh H, Doi K, Fukunaga Y, Hosoda K, Shintani M, Yamashita J, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Sawada N, Saito T, Inoue G, Nishimura H, Yoshimasa Y, Nakao K (1999): Down regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by inflammatory cytokines and its reversal by thiazolidinediones. *Diabetologia*. 1999 Jun; 42(6):702-10.
- Tawfik** MK (2012): Renoprotective activity of telmisartan versus pioglitazone on ischemia/reperfusion induced renal damage in diabetic rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012 May; 16(5):600-09
- Tsujimura** Y, Matsutani T, Matsuda A, Kutsukake M, Uchida E, Sasajima K and Tamura K (2011): Effects of Pioglitazone on Survival and Omental Adipocyte Function in Mice with Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture. *J Surg Res* 2011 Dec; 171(2):e215-21
- Van Aken** H, Reinhart K, Zimpfer M, Welte T (2007): *Intensivmedizin*, 2. Aufl. Thieme Verlag, Stuttgart, 2007; a: S. 835-841; b: S. 872-74
- Vázquez** AL, Gil CL (2008): Use of glucocorticoids in the treatment of severe sepsis: another example of the law of the pendulum?. *Emergencias* 2008; 20:226-28
- Wang** JX, Maruyama K, Murakami M, Endo T, Komatsu H, Akahane M (1999): Antianginal effects of ranolazine in various experimental models of angina. *Arzneimittelforschung* 1999 Mar; 49(3):193-99
- Wasserstrom** JA, Sharma R, O'Toole MJ, Zheng J, Kelly JE, Shryock J, Belardinelli L, Aistrup GL (2009): Ranolazine Antagonizes the Effects of Increased Late Sodium Current on Intracellular Calcium Cycling in Rat Isolated Intact Heart. *J Pharmacol Exp Ther* 2009 Nov; 331(2):382-91
- Wu** WT, Lee CC, Lee CJ, Subeq YM, Lee RP, Hsu BG (2011): Rosiglitazone ameliorates endotoxin-induced organ damage in conscious rats. *Biol Res Nurs* 2011 Jan; 13(1):38-43
- Xing** B, Xin T, Hunter RL, Bing G (2008): Pioglitazone inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase is associated with altered activity of p38 MAP kinase and PI3K/Akt. *J. of Neuroinflammation* 2008 Jan 18; 5:4
- Zacharowski** K, Blackburn B, Thiemermann C (2001): Ranolazine, a partial fatty acid oxidation inhibitor, reduces myocardial infarct size and cardiac troponin T release in the rat. *Eur J Pharmacol* 2001 Apr 20; 418(1-2):105-10.
- Zhao** G, Messina E, Xu X, Ochoa M, Serpillon S, Shryock J, Belardinelli L, Hintze TH (2006): Ranolazine, a novel anti-anginal agent, does not alter isosorbide dinitrate- or sildenafil-induced changes in blood pressure in conscious dogs. *Eur J Pharmacol* 2006 Jul 17; 541(3):171-76

**Zingarelli B, Sheehan M, Hake PW, O'Connor M, Denenberg A, Cook JA (2003):** Peroxisome Proliferator Activator Receptor- $\gamma$  Ligands, 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-Prostaglandin J2 and Ciglitazone, Reduce Systemic Inflammation in Polymicrobial Sepsis by Modulation of Signal Transduction Pathways, *J Immunol* 2003 Dec; 171(12):6827-37

**Zweier JL, Wang P, Samouilov A, Kuppusamy P (1995):** Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat Med* 1995; 1:804-09

### **Internetquellen:**

Arznei-telegramm 2009:

<http://www.arznei-telegramm.de/register/L8888WT.pdf> am 27.02.2012, 17.36 Uhr

Gemeinsamer Bundesausschuss gemäß §91 SGB V (2010):

<http://www.g-ba.de/downloads/34-215-342/18-2010-06-17-NB-Glinide%20und%20Glitazone.pdf> am 27.01.2012, 14.13 Uhr

Gebrauchsinformationen zu Pioglitazon der EMA (2011):

[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000285/human\\_med\\_000624.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000285/human_med_000624.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp) am 26.05.2011, 11.12 Uhr

Gebrauchsinformationen zu Ranolazin der EMA (2012):

[http://www.emea.europa.eu/docs/de\\_DE/document\\_library/EPAR\\_Product\\_Information/human/000805/WC500045937.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_Product_Information/human/000805/WC500045937.pdf) am 26.02.2012, 18.02 Uhr

Stellungnahme der DDG (2010):

[http://www.diabetesde.org/fileadmin/users/Patientenseite/PDFs\\_und\\_TEXTE/Stellungnahmen\\_Positionspapiere/2010/diabetesDE\\_DDG\\_Stellungnahme\\_Verordnungsausschluss\\_Pioglitazon\\_1.4.2010.pdf](http://www.diabetesde.org/fileadmin/users/Patientenseite/PDFs_und_TEXTE/Stellungnahmen_Positionspapiere/2010/diabetesDE_DDG_Stellungnahme_Verordnungsausschluss_Pioglitazon_1.4.2010.pdf) am 26.05.2011, 11.16 Uhr

Strukturformel Pioglitazon:

<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=2684> am 26.01.2013, 13.34 Uhr

Strukturformel Ranolazin:

<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=29218> am 26.01.2013, 13.36 Uhr

## 9. Thesen

- 1) Das Septic Shock Modell ist für die Erforschung der Wirkung eines Medikamentes im septischen Schock geeignet.
- 2) Die Gabe von Pioglitazon vor Induktion des septischen Schocks mit LPS verdoppelt die mittlere Überlebenszeit.
- 3) Mit Pioglitazon vorbehandelte Tiere weisen aufgrund einer Downregulation der Transkription von NF- $\kappa$ B eine geringere Entzündungsreaktion mit signifikant besserer Hämodynamik nach LPS-Gabe auf.
- 4) Die Gabe von Pioglitazon kann die im LPS-induzierten septischen Schock vorhandene Schrankenstörung des Endothels abschwächen und führt damit zu einem geringeren Anstieg des Hämatokrits.
- 5) Pioglitazon kann im septischen Schock die Leukozytenakkumulation im Myokard und in der Niere verringern, sodass es zu einer erniedrigten Myeloperoxidaseaktivität in diesen Geweben kommt.
- 6) Lichtmikroskopisch ist in den Organen Herz, Lunge, Leber und Niere eine verminderte Gewebeschädigung nach Pioglitazon-Vorbehandlung sichtbar.
- 7) Pioglitazon führt zu einer verstärkten Expression des PPAR $\gamma$ -Rezeptors und kann damit die erhöhte Produktion von Zytokinen im septischen Schock eindämmen.
- 8) Die durch Pioglitazon bedingte Downregulation von NF- $\kappa$ B und die verminderte Spaltung von I $\kappa$ B und NF- $\kappa$ B bewirken eine verringerte Transkription der mRNA pro-inflammatorischer Zytokine.
- 9) Die vorliegenden Erkenntnisse zum positiven Nutzen von Pioglitazon im LPS-induzierten septischen Schock sollten zunächst in weiteren tierexperimentellen und im Verlauf auch in klinischen Studien näher untersucht werden.
- 10) Ranolazin hat im LPS-induzierten septischen Schock weder die Überlebenszeit noch die hämodynamischen Veränderungen positiv beeinflussen können.
- 11) Die gewebeschädigende Wirkung von LPS und die nachfolgend hohe Leukozytenakkumulation kann durch die zusätzliche Gabe von Ranolazin kaum abgeschwächt werden.
- 12) Ranolazin bewirkt auf der Ebene der Proteinexpression keine Veränderung im septischen Schock und hat damit keinen Einfluss auf die hohe Produktion pro-inflammatorischer Zytokine.
- 13) Nach den hier gewonnenen Erkenntnissen bringt die Anwendung von Ranolazin im LPS-induzierten septischen Schock keinen Nutzen.

## **Lebenslauf**

**Name:** Tina Putzschke, geb. Streufert

**Anschrift:** Streiberstr. 21  
06110 Halle (Saale)

**Geburtsdatum, -ort:** 09. Februar 1988, Halle (Saale)  
**Familienstand:** verheiratet

---

### **Schulbildung:**

1994-1998	Grundschule
1998-2000	Ganztagsschule „Heinrich-Heine“
2000-2007	Giebichenstein-Gymnasium „Thomas Müntzer“
2007	Abitur mit 1,0

---

### **Studium:**

WS 2007/08 bis WS 2013/14	Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
09/2009	1. Staatsexamen (Physikum) mit 2,0
10/2009-07/2012	studentische Hilfskraft auf der Septischen Unfallchirurgie am BG-Klinikum Bergmannstrost
10/2013	2. Staatsexamen mit 2,0
11/2013	Approbation als Ärztin

---

### **Praktisches Jahr:**

08/2012-12/2012	Carl-von-Basedow-Klinikum Merseburg, Klinik für Orthopädie/Unfallchirurgie und Allgemeinchirurgie
12/2012-03/2013	Kantonsspital Bruderholz (Basel), Frauenklinik
03/2013-07/2013	Universitätsklinikum Halle, Departement für Innere Medizin, Klinik für Gastroenterologie/Pneumologie

---

### **Famulaturen:**

03/2010	Universitätsklinikum Halle, Klinik für Urologie
07/2010	Praxis für Gynäkologie und Geburtshilfe
08/2010	Universitätsklinikum Halle, Klinik für Kardiologie
02/2011	BG-Kliniken Bergmannstrost, unfallchirurgische Notfallambulanz
03/2011	Kreis Krankenhaus Mittweida, Frauenklinik
08/2011	Scarborough Regional Hospital, Trinidad und Tobago, Notaufnahme und Geburtshilfe

Halle, 25.11.2014

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

### **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen genutzten Gedanken und Fakten sind als solche gekennzeichnet. Weiterhin habe ich für die inhaltliche Gestaltung der Arbeit nicht die Hilfe eines Promotionsberaters beansprucht. Dritte haben von mir weder mittelbar noch unmittelbar geldwerte Leistungen bekommen, die im Zusammenhang mit dieser Dissertation stehen.

Ich versichere, dass diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form sowohl im In- als auch im Ausland noch keiner Promotionsbehörde vorgelegt wurde.

Halle, 25.11.2014

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

### **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich bestätige hiermit, dass ich bisher noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Halle, 25.11.2014

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

### **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst herzlich bei Prof. Dr. med. Buerke für die Überlassung des Themas zur eigenständigen Bearbeitung sowie für seine Unterstützung bei der Verwirklichung der Experimente und bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. med. Werdan, der mir durch konstruktive Kritik und Anregungen geholfen und entsprechende Räumlichkeiten zur Durchführung der Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Bei Prof. Dr. med. Marsch und seinen Mitarbeitern bedanke ich mich sehr für ihre Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Präparate. Auch Frau Schulz gilt ein großes Dankeschön für Ihre Hilfe und die vielen Ratschläge während der Laborarbeit. Ein weiterer Dank geht an die Tierpflegerinnen des Zentrums für medizinische Grundlagenforschung.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Ehemann Frederic bedanken. Du hast mich immer wieder motiviert und hattest viel Geduld mit mir. Danke dafür!

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, dass sie immer hinter mir standen. Ohne eure Hilfe wäre dieses Studium gar nicht möglich gewesen.