

Der mikrovaskuläre Endothelschaden bei Endotoxinämie – Pathogenese, Mechanismen und klinische Bedeutung^{*,1}

Pathogenesis, mechanisms and clinical significance of microvascular endothelial dysfunction during endotoxinemia

M. Czabanka^{1,2}, C. Peter¹, E. Martin¹ und A. Walther¹

¹ Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. E. Martin)

² Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Mannheim (Direktor: Prof. Dr. P. Schmiedek)

► **Zusammenfassung:** Die hohe Sterblichkeitsrate in der Sepsis wird maßgeblich vom Endothelschaden bestimmt. Dabei scheint neben den Leukozyten vor allem den Thrombozyten eine wichtige Rolle bei der Entstehung der mikrovaskulären Hyperpermeabilität zuzukommen. In diesem Zusammenhang umfasst dieser Artikel die pathophysiologische Funktion der Leukozyten, der Mastzellen sowie von Stickstoffmonoxid und beleuchtet zusätzlich die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen. Des Weiteren wird die Rolle der Thrombozyten bezüglich des septischen Endothelschadens dargelegt und den bisher bekannten Erkenntnissen gegenübergestellt. Zuletzt wird die klinische Bedeutung der hier vorgestellten Ergebnisse diskutiert.

Somit soll der folgende Artikel einen Überblick über die endotheliale Dysfunktion bei Endotoxinämie geben und die wesentlichen Mechanismen mit neuen pathophysiologischen Erkenntnissen verknüpfen, um eine zeitgemäße Darstellung der Problematik zu ermöglichen und die Bedeutung für die klinische Therapie zu betonen.

► **Schlüsselwörter:** Endotoxinämie – Endotheliale Hyperpermeabilität – Thrombozyten – Sepsis – Koagulation.

► **Summary:** Mortality rate in sepsis is mainly associated with endothelial damage. In this regard platelets, besides leukocytes, play a major role for the development of microvascular hyperpermeability. This article focuses on the pathophysiologic role of leukocytes, mast cells and nitrogen monoxide and it elucidates the underlying molecular mechanisms. Furthermore, the role of platelets regarding endothelial dysfunction is outlined and combined with the existing understanding of the pathophysiology of septic endothelial dysfunction. Finally, clinical applications of the presented results are discussed.

The following article gives a review of endothelial cell dysfunction during endotoxemia based on basic mechanisms as well as on current insights into sepsis pathophysiology. Therefore, new aspects of this complex pathogenesis are illustrated and subsequently their relevance for clinical sepsis therapy is emphasized.

► **Keywords:** Endotoxemia – Endothelial Hyperpermeability – Platelets – Sepsis – Coagulation.

Einleitung

Der menschliche Körper besitzt ca. 10^{13} Endothelzellen, die zusammen ungefähr 1 kg wiegen und eine Vielzahl an Reaktionen modulieren. Als hochaktive Zellen sind sie beteiligt an der Regulation des Gefäßtonus und Blutflusses, sie spielen eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und nicht zuletzt regulieren sie die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren im Rahmen der Endotoxinämie [1,2,3]. Insbesondere bei der komplexen Pathogenese der Endotoxinämie stehen die Endothelzellen im Mittelpunkt der pathophysiologischen Zusammenhänge und spielen eine zentrale Rolle beim funktionellen Zusammenbruch der Mikrozirkulation.

Endothelschaden und Endotoxinämie – Mechanismen

Im Rahmen einer Endotoxinämie ist die Endothelfunktion sowohl durch strukturelle Veränderungen, wie zytoplasmatische Schwellung, Fragmentationen und Ablösung von der Basalmembran [4,5], als auch durch Dysfunktion entscheidend gestört. Eine vermehrte Expression von prokoagulatorischen Faktoren, wie z.B. dem Tissue-Factor oder dem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1, steht dabei einer verminderten Synthese von antikoagulatorischen Faktoren, wie dem Thrombomodulin oder dem Heparan gegenüber. Weiterhin kommt es zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche, die letztendlich ein Schlüsselfaktor für die gesteigerte Leukozytenadhärenz ist, ein typisches Merkmal der proinflammatorisch aktivierten Mikrozirkulation. Die proinflammatorische Reaktion wird weiterhin durch die gesteigerte Apoptoserate der Endothelzellen, die z.B. durch Lipopolysaccharide induziert wird, im Sinne eines „positiven Feedbacks“ zusätzlich verstärkt [6]. Somit

* Rechte vorbehalten

¹ Überarbeitete, deutschsprachige Version der Übersichtsarbeit aus Current Vascular Pharmacology – Revised German version of the review from Current Vascular Pharmacology

► entsteht ein Circulus vitiosus, der nur durch externe Manipulation unterbrochen werden kann. Die endotheliale Dysfunktion mündet letztendlich in dem Verlust der Barrierenfunktion mit der Entwicklung einer Hyperpermeabilität, die hauptverantwortlich für die Entstehung von Gewebsödemen und Hypotension ist.

Auf molekularbiologischer Ebene führen verschiedene Faktoren zur Entstehung der Hyperpermeabilität. Der wichtigste Mechanismus ist die Bildung von parazellulären Spalten, die auf Aktin-Myosin-Interaktionen als Reaktion auf inflammatorische Mediatoren (IL-1, IL-6, TNF- α) zurückgeführt werden können und zu einer ausgeprägten makromolekularen Extravasation führen [7]. Erst kürzlich konnte diesbezüglich von Hirano et al. ein regulierender Mechanismus beschrieben werden, der dem Hitze-Schock-Protein 27 eine wichtige modulatorische Funktion zuschreibt [8]. Andere Veränderungen wie die Lipopolysaccharid-induzierte verminderte DNA-, RNA- und Proteinsynthese oder die Entstehung von Endothelnekrosen tragen zur Genese der Hyperpermeabilität ebenfalls bei [9].

Leukozyten-Endothel-Interaktion und mehr

Die Adhärenz neutrophiler Granulozyten am Gefäßendothel gilt als Schlüsselereignis für die Zerstörung der endothelialen Integrität mit vermehrter Plasmaextravasation und Transmigration dieser Zellen ins Gewebe. So führt eine Endotoxinämie zu einer

erhöhten pulmonalvaskulären Permeabilität und Neutrophilenakkumulation [10]. Weiterhin zeigen überlebende Tiere eines endotoxininduzierten Schocks einen signifikant niedrigeren Anteil aktivierter und adhärenter Leukozyten [11]. Die Leukozyten-Endothel-Interaktionen lassen sich in drei Stufen gliedern, die in einer bestimmten Reihenfolge ablaufen (Abb. 1). Durch verschiedene inflammatorische Mediatoren kommt es zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Leukozyten-(L-Selektine, PSGL-1) und Endotheloberfläche (P- und E-Selektine), wodurch eine Verlangsamung der Leukozyten erreicht und somit das Rolling ermöglicht wird [12]. Das Rolling ist für die chemotaktische Aktivierung der Leukozyten von größter Bedeutung, da diese dadurch einer Vielzahl an inflammatorischen Mediatoren ausgesetzt werden, wodurch wiederum eine vermehrte Expression von β_2 -Integrinen auf der Leukozytenoberfläche induziert wird [13]. Zusammen mit endothelialen ICAM-1-Rezeptoren ermöglichen diese Moleküle die feste Leukozytenadhärenz, genannt Sticking. Das Sticking ist die Voraussetzung für die Diapedese und Transmigration der Leukozyten [13].

Während dieser Vorgang äußerst charakteristisch für die inflammatorische Aktivierung der Leukozyten ist, kann den adhärenten Leukozyten noch eine weitere wichtige Funktion insbesondere im Rahmen der Endotoxinämie beigemessen werden. So gibt es in der Literatur eine Vielzahl von Arbeiten, die den Leukozyten die Induktion der Endothelschädigung zuschreiben. Dabei scheinen besonders die ►

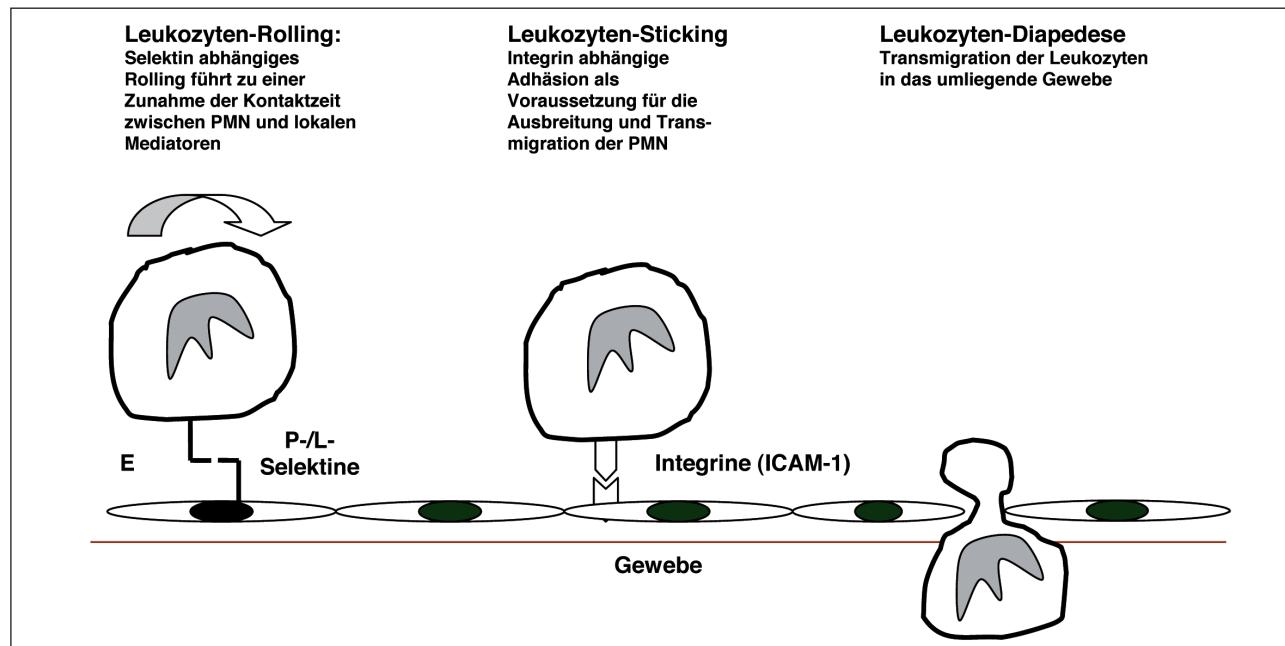


Abb. 1: Schematische Darstellung der Leukozyten-Endothel-Interaktion. Abk.: EC (Endothelzellen), ICAM-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule – 1), PMN (Polymorphonuclear Neutrophils).

► Sekretion von Sauerstoffradikalen, H_2O_2 und Proteasen (z.B. Elastase) eine ausgeprägte Endothelschädigung zu bewirken [14]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Neutrophile die endothelschädigenden Effekte von inflammatorischen Mediatoren, wie z.B. TNF- α , verstärken können [15]. Neben diesen Mechanismen wird außerdem der Leukozytenmigration ein schädigender Einfluss auf die Endothelpermeabilität zugeschrieben [13]. Andererseits findet sich nach Vorbehandlung von Ratten mit Tirilazad, einem potenzen Sauerstoff-Radikalfänger, trotz einer signifikanten Reduktion der Leukozytenadhärenz in einer frühen Phase der Endotoxinämie eine unverändert hohe Plasmaextravasation [16]. Es gibt somit auch leukozytenunabhängige Mechanismen, die zu einer Endothelschädigung führen. Leukozytenadhärenz und Plasmaextravasation imponieren als koexistierende Ereignisse ohne zwingende Kausalität.

Inhibitoren der Leukozyten-Endothel-Interaktion

Zur Untersuchung der leukozytenunabhängigen Mechanismen am endothelialen Zellschaden benutzt man Substanzen, die in der Lage sind, Leukozyten-Endothel-Interaktionen zu inhibieren. Zu diesen Substanzen zählen Fucoidin, monoklonale Antikörper gegen Integrine neutrophiler Granulozyten (Anti-CD 18, Anti-CD 11b), aber auch monoklonale Antikörper gegen L- und P-Selektine.

Fucoidin ist ein sulfatiertes Polysaccharid, das 1950 erstmals aus der braunen Seealge *Fucus vesiculosus* gewonnen wurde und sich quantitativ hauptsächlich aus Fucose und Sulfat mit unterschiedlichen Anteilen von Uronsäure, Galaktose, Mannose und Xylose zusammensetzt [17]. Die antiadhäsive Wirkung von Fucoidin ist auf eine Hemmung der P- und L-Selektin-vermittelten Anheftung neutrophiler Granulozyten an das Gefäßendothel zurückzuführen, indem Fucoidin eine Rezeptorblockade bewirkt [18].

Selektive monoklonale Antikörper gegen L-Selektin oder P-Selektin reduzieren unabhängig davon, ob sie alleine oder in Kombination gegeben werden, das Leukozyten-Rolling um 60%, während Fucoidin in einer Konzentration von 25 mg/kg Körpergewicht zu einer 90% Reduktion des Leukozyten-Rolling führt. Des Weiteren senkt Fucoidin zusätzlich die Anzahl der adhärenten Leukozyten [19].

Die Blockade des CD11/CD18-Rezeptors durch einen monoklonalen Antikörper verhindert die Bindung der rollenden Leukozyten an endotheliale ICAM-1-Adhäsionsmoleküle, besitzt aber keinen Einfluss auf das Leukozyten-Sticking [20,21]. Die Gabe monoklonaler Antikörper zeigt somit keinen

Vorteil gegenüber Fucoidin, welches beide Liganden besetzt und die Leukozyten-Endothel-Interaktion effektiv verhindert.

Leukozytenunabhängige Endothelschädigung bei Endotoxinämie

Eine Blockade der Leukozyten-Endothel-Interaktion mit dem L- und P-Selektin-Inhibitor Fucoidin führt bei Endotoxinämie zu keiner Reduktion der Plasmaextravasation [22]. Zwischen einer mit Endotoxin behandelten Tiergruppe und einer Tiergruppe, die mit Fucoidin und Endotoxin behandelt wurde, ergeben sich hinsichtlich der makromolekularen Endothelschädigung keine signifikanten Unterschiede [22]. Diese Ergebnisse sind in weiteren Versuchsreihen reproduziert und validiert worden [23].

In der Literatur finden sich bei verschiedenen experimentellen Modellen weitere Hinweise bezüglich einer leukozytenunabhängigen Endothelschädigung. Wie bei Ischämie/Reperfusionsversuchen am Mesenterium der Ratte [24] und bei einem Entzündungsmodell mit *Clostridium difficile*-Toxin-A [25] zeigt auch eine intravitalmikroskopische Studie von Bonnardel-Phu et al. in einem Diabetesmodell an der Ratte, dass die Endothelpermeabilität durch die Verabreichung von Pentoxyfyllin, welches die Aktivierung von Leukozyten hemmt, nicht beeinflusst wird [26]. Auch kann durch eine verringerte Aktivität neutrophiler Granulozyten die Entwicklung eines Lungenödems nach Endotoxininfusion nicht verhindert werden [27]. Des Weiteren ist der Anstieg des extravasalen Lungenwassers bei neutropenischen Tieren im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nicht erniedrigt, statt dessen wird aber gleichzeitig ein endotoxininduzierter proteinreicher Lymphfluss beschrieben [28]. Da für Endotoxin eine direkte Aktivierung zirkulierender Leukozyten beschrieben ist, kann durch diese Untersuchungen an neutropenischen Tieren bei unverändert hoher Permeabilität der Gefäße eine leukozytenabhängige Ursache der Endothelschädigung weitgehend ausgeschlossen werden.

Bedeutung von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist entscheidend an der Erhaltung der endothelialen Zellintegrität beteiligt [29]. NO besitzt zytotoxische, tumorizide, antivirale und immunoregulatorische Eigenschaften, beeinflusst die Interaktion zwischen dem Endothel und proinflammatorischen Zellen, hemmt so die Leukozyten-, Monozyten- und Thrombozytenadhäsion und -aggregation und wirkt antiproliferativ. Erhöhte NO-Konzentrationen, wie sie bei pathophysiologischen Zuständen wie Entzündung und Sepsis anzutreffen

► sind, können jedoch auch toxisch auf körpereigene Zellen wirken [30].

Nach vorheriger Blockade der Leukozyten-Endothel-Interaktion mit Fucoidin lässt sich durch den NO-Inhibitor L-NAME bei gleichzeitiger LPS- oder NaCl-Infusion eine signifikante Zunahme der Plasmaextravasation verzeichnen, welche letztendlich nach einem Beobachtungszeitraum von 120 Minuten vergleichbare Werte zu einer L-NAME-unbehandelten Endotoxingruppe erzielt [31].

Dadurch, dass das FITC-Albumin-Leakage in L-NAME-behandelten Gruppen und der L-NAME-unbehandelten Endotoxingruppe vergleichbare Endwerte erreicht, scheinen L-NAME und LPS ihre schädigende Wirkung über den gleichen Mechanismus zu initiieren, zumal eine Kombination beider Substanzen zu keiner Verstärkung der Extravasation führt.

Da sich gleichzeitig durch Applikation des NO-Donators SIN-1 die endothelschädigenden Effekte des NO-Inhibitors L-NAME supprimieren lassen, liegt die Vermutung nahe, dass endogenes NO die endothiale Integrität während leukozytenunabhängiger Versuchsbedingungen reguliert.

Weiterhin reduziert in einem leukozytenunabhängigen Versuchssetting die Gabe des NO-Donators SIN-1 während Endotoxinämie hoch effektiv und signifikant den Anstieg der makromolekularen Plasma-

extravasation gegenüber einer NO-Donator-unbehandelten Endotoxinvergleichsgruppe. Die Plasmaextravasation bei den mit SIN-1 und Fucoidin behandelten Versuchstieren zeigt unter Endotoxinstimulation lediglich einen Anstieg auf das Niveau einer mit physiologischer Kochsalzlösung therapierten Kontrollgruppe. Der frühe Endothelschaden während leukozytenunabhängiger Endotoxinämie ist somit ein NO-moduliertes Ereignis [31].

Endothelprotektive Effekte durch NO

Die endothelprotektiven Effekte von NO lassen sich durch verschiedene pathophysiologische Mechanismen erklären (Abb. 2).

Viele Arbeiten erklären einen erhöhten Plasmaaustritt über die unter L-NAME-Gabe signifikant zunehmende Anzahl adhärenter und emigrierender Leukozyten [32,33]. Bei einer L-NAME-Superfusion des Rattenmesenteriums findet sich aber erst nach 20-30 min eine signifikante Zunahme der Leukozytenadhäsion [34]. Die initiale Permeabilitätszunahme bei NO-Inhibition unterliegt somit einem leukozytenunabhängigen Mechanismus, was durch die Verwendung monoklonaler Antikörper belegt werden konnte. Die Applikation dieser Antikörper hatte keinen Einfluss auf die ersten 10-15 min der Plasmaextravasation, ▶

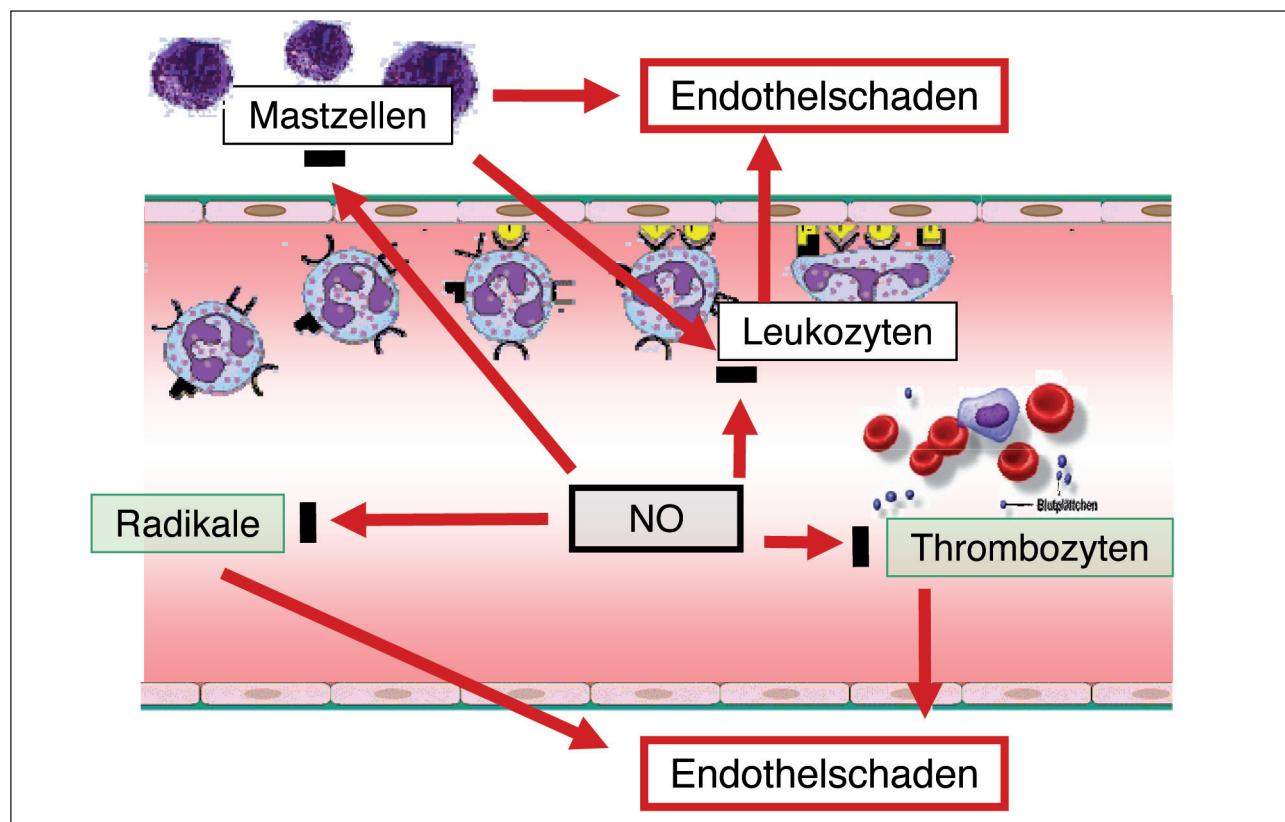


Abb. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Wirkungsmechanismen von NO auf den mikrozirkulatorischen Endothelschaden.

► jedoch konnte eine signifikante Verminderung im weiteren Versuchsverlauf beobachtet werden [34,35,36]. Ebenso reduziert NO die mukosale Permeabilität, die als leukozytenunabhängiges Ereignis bekannt ist [37,38].

Eine weitere Eigenschaft des NO besteht in seiner Funktion als Radikalfänger. Unter Endotoxin- und L-NAME-Gabe werden vornehmlich aktivierte Leukozyten für die Bildung von Oxidantien wie Superoxid und Wasserstoffperoxid verantwortlich gemacht [35,39]. In einem leukozytenunabhängigen Versuchssetting scheiden Leukozyten modellbedingt als Quelle des Superoxids aus. Allerdings findet sich auch eine leukozytenunabhängige Erhöhung des Superoxidspiegels bei Endotoxinämie [35]. Es wäre demnach denkbar, dass NO seine endothelprotektive Wirkung über seine Funktion als Radikalfänger ausübt. Allerdings kann durch die Anwendung von Tirilazad, einem potenzen Sauerstoffradikalfänger, eine endotoxinbedingte Extravasation trotz einer verminderten Leukozytenadhäsion nicht verhindert werden [16]. Eine Beteiligung von Superoxid an der Ausbildung eines leukozytenunabhängigen Endothelschadens bei Endotoxinämie erscheint daher unwahrscheinlich.

Andere Studien erklären sich die endothelprotektive Wirkung des NO über dessen regulatorische Wirkung auf Mastzellen. So bewirkt L-NAME eine Degranulation von Mastzellen in der Nähe von mesenterialen Venolen und Epithelien [35,40,41], wobei die an Epithelien auftretende Permeabilitätserhöhung durch Mastzellstabilisatoren inhibiert werden kann [41]. Im umgekehrten Sinn vermögen NO-Donatoren eine mastzellinduzierte Extravasation vollständig zu hemmen.

Weitere Effekte von NO bestehen in der Hemmung der endothelialen Thrombozytenadhäsion und -aggregation. NO-Inhibition führt zu einer verstärkten Thrombozytenadhäsion am Endothel, was letztendlich eine Endothelschädigung bewirkt [36,42,43]. Somit kommen neben den Mastzellen auch die Thrombozyten als Mediatoren für die endothelprotektiven Effekte von NO in Frage.

Mastzellaktivierung bei experimenteller Endotoxinämie

Neben anaphylaktischen und anaphylaktoiden Reaktionen [44,45], dem Ischämie/Reperfusions-schaden [46], der rheumatoiden Arthritis [47] und der Arteriosklerose [48] kann für viele andere Entzündungsreaktionen eine Beteiligung der Mastzellen nachgewiesen werden.

Gewebsmastzellen entstammen den granulopoetischen Zellen des Knochenmarks und sind eine

Quelle multifunktionaler proinflammatorischer Mediatoren, die teilweise gespeichert in den Mastzellen-Granula vorliegen oder aber nach Mastzellstimulation neu synthetisiert werden. Gewebsmastzellen finden sich besonders in der Haut, dem Respirations-, dem Urogenital- und dem Gastrointestinaltrakt und zeigen dort eine enge anatomische Beziehung zu peripheren Nerven, Lymphgefäßen, der Adventitia kleinerer Blutgefäße, dem lockeren Bindegewebe und der Wandung seröser Höhlen.

Endotoxin kann über die Freisetzung von Superoxid-Anionen und Wasserstoffperoxid [35,41] peritoneale Mastzellen der Ratte aktivieren und zu einer Histamin- und Interleukin-6-Freisetzung führen [49]. Entsprechend zeigt sich bei Endotoxinämie eine über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich zunehmende mesenteriale Mastzellaktivität, die einen gleichsinnigen Kurvenverlauf zur makromolekularen Extravasation von FITC-Albumin (Fluoreszeinisothiocyanat-Albumin) aufweist. Eine Leukozytenblockade mit Fucoidin führt zu keiner Beeinflussung der mesenterialen Mastzellaktivierung [50,51] (Abb. 3).

Einfluss möglicher Mastzellmediatoren auf die leukozytenunabhängige Endothelschädigung bei experimenteller Endotoxinämie

Histamin

Histamin entsteht durch Decarboxylierung aus Histidin mittels einer Pyridoxalphosphat-abhängigen Histidin-Decarboxylase (HDC), wird hauptsächlich in zytoplasmatischen Granula der Mastzellen und basophilen Granulozyten gespeichert, kann aber auch de novo in T-Zellen oder peritonealen Zellen mit Hilfe der HDC gebildet werden. Die Ausschüttung erfolgt nach Stimulation der Mastzellen durch Allergene, Antigen-Antikörper-Komplexe und Substanzen wie Histamin, PAF (Platelet-activating Factor) oder Endotoxin.

Sowohl die topische Applikation als auch die intravenöse Injektion von Histamin verursachen über einen Phospholipase-C-abhängigen Mechanismus einen Anstieg der vaskulären Permeabilität [52]. Der durch Histamin ausgelöste makromolekulare Endothelschaden ist ein biphasisches Ereignis. Während einer einstündigen kontinuierlichen Histamingabe kommt es nach ein bis zwei Minuten zur Zunahme der makromolekularen Plasmaextravasation, die ihr Maximum nach fünf bis fünfzehn Minuten erreicht und nach etwa 30 Minuten wieder zum Ausgangsniveau zurückkehrt. Die genauen Abläufe dieses endothelialen Reparaturmechanismus sind bisher nicht geklärt [53,54,55,56].

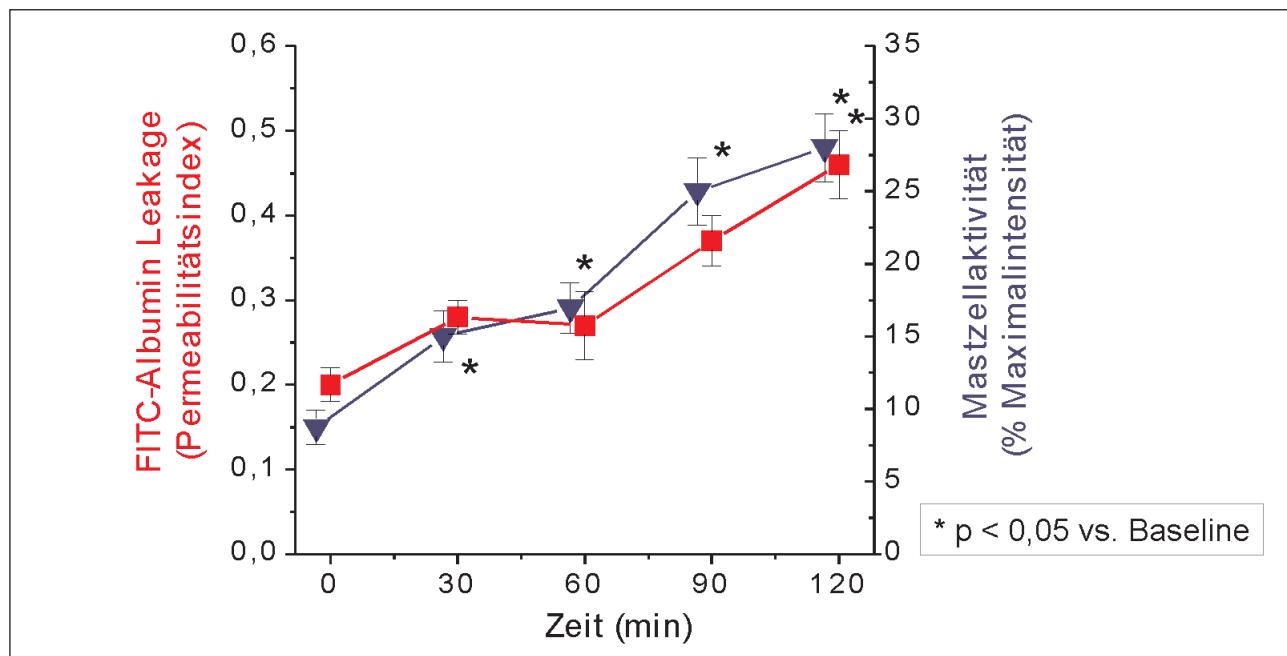


Abb. 3: FITC-Albumin Leakage (rote Kurve) und Mastzellaktivität (blaue Kurve) im Vergleich der zeitlichen Kinetik während 120 Minuten Endotoxinämie. Es zeigt sich eine über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich zunehmende mesenteriale Mastzellaktivität, die einen gleichsinnigen Kurvenverlauf zur makromolekularen Plasmaextravasation (FITC-Albumin Leakage) aufweist (modifiziert nach [50,51]).

► Die späte Phase der histamininduzierten makromolekularen Endothelschädigung wird etwa 90 Minuten nach Beginn der Histaminapplikation beobachtet und kann durch die Gabe von Fucoidin inhibiert werden, was eine ursächliche Beteiligung der Leukozyten vermuten lässt [54].

In eigenen Untersuchen konnte im leukozytenunabhängigen Endotoxinmodell weder durch die alleinige Gabe des H₁-Rezeptorantagonisten Diphenhydramin noch in Kombination mit dem H₂-Rezeptorantagonisten Cimetidin eine signifikante Reduktion des makromolekularen Endothelschadens erzielt werden [57,58].

Histamin besitzt somit in der Pathophysiologie des frühen leukozytenunabhängigen Endothelschadens bei Endotoxinämie nur eine untergeordnete Bedeutung [57,58]. Mögliche histaminbedingte Effekte am Endothelschaden während Endotoxinämie entstehen offensichtlich weniger durch direkte schädigende Einflüsse des Histamins als vielmehr durch die Initiierung des Leukozyten-Rollings über P-Selktin.

Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)

Nach einer Endotoxinbolusinjektion erreichen die PAF-Spiegel nach nur zwei bis fünf Minuten ihren Maximalwert, um dann innerhalb von 20 Minuten wieder auf Ausgangswerte abzufallen [59]. Die PAF-induzierten Effekte sind dabei rezeptorvermittelt.

PAF besitzt neben der Aktivierung von Thrombozyten und der Beeinflussung der Leukozyten-Endothel-

Interaktion bei Endotoxinämie vielfältige biologische Funktionen in Trauma, Schock und Sepsis [60,61]. Zur Untersuchung der PAF-vermittelten Effekte stehen verschiedene PAF-Rezeptorantagonisten zur Verfügung. Prinzipiell ist zwischen synthetischen und natürlichen, kompetitiven PAF-Rezeptorantagonisten zu unterscheiden.

Zu den natürlichen PAF-Rezeptorantagonisten zählen die Ginkgolide. Durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit BN52021 (Ginkgolid B) kann in einem leukozytenunabhängigen Endotoxinmodell die makromolekulare Plasmaextravasation 120 Minuten nach Start der kontinuierlichen Endotoxininfusion gegenüber einer nicht mit Ginkgolid B behandelten Kontrollgruppe signifikant gesenkt werden [51].

Serotonin

Während Endotoxinämie kann durch die Applikation des unspezifischen 5-HT₁-, 5-HT₂- und 5-HT₇-Rezeptorantagonisten Methysergid eine signifikante Reduktion des leukozytenunabhängigen Endothelschadens gegenüber einer nicht mit Methysergid behandelten Vergleichsgruppe beobachtet werden [62]. Die Gabe des selektiveren 5-HT₂-Rezeptorantagonisten Cinanserin wie auch die Gabe des hochselektiven 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten Ketanserin führt gegenüber einer Endotoxinvergleichsgruppe ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion des leukozytenunabhängigen Endothelschadens und zeigt keine signifikanten Unterschiede zu den mit ►

- Methysergid behandelten Tieren. Die serotoninbedingten Effekte am leukozytenunabhängigen Endothelschaden sind somit am ehesten ein 5-HT_{2A}-rezeptorvermitteltes Ereignis [63].

Mastzellen

Einfluss von Histamin-, PAF- und Serotoninrezeptorantagonisten auf die mesenteriale Mastzellaktivierung bei Endotoxinämie

Unter Endotoxinstimulation kann sowohl durch die alleinige Gabe des H₁-Rezeptorantagonisten Diphenhydramin als auch durch die kombinierte Gabe des H₁-Rezeptorantagonisten Diphenhydramin mit dem H₂-Rezeptorantagonisten Cimetidin eine signifikante Reduktion der unter alleiniger Endotoxingabe typischen Mastzellaktivierung erzielt werden [57,58].

Auch der PAF-Rezeptorantagonist BN52021 und die Serotoninrezeptorantagonisten Methysergid und Ketanserin reduzieren signifikant die mesenteriale Mastzellaktivität während Endotoxinämie gegenüber einer unbehandelten Vergleichsgruppe [51,62].

Während die verwendeten PAF- und Serotoninrezeptorantagonisten neben der Reduktion der mesenterialen Mastzellaktivität auch zu einer signifikanten Reduktion des frühen leukozytenunabhängigen Endothelschadens bei Endotoxinämie führen, zeigt sich in den Versuchen mit den Histaminrezeptorantagonisten eine Diskrepanz der Ergebnisse. Weder durch die alleinige Gabe des H₁-Rezeptorantagonisten Diphenhydramin, noch in Kombination mit dem H₂-Rezeptorantagonisten Cimetidin kann eine signifikante Reduktion des endothelialen Leakage erreicht werden [57,58].

Dies stellt keinen grundsätzlichen Widerspruch dar und lässt per se keine valide Aussage über eine mögliche Rolle mesenterialer Mastzellen am frühen leukozytenunabhängigen Endothelschaden zu, da eine gewebespezifische Mastzellheterogenität mit unterschiedlicher Mediatorfreisetzung auf den gleichen Stimulus besteht [64,65]. Weiterhin bewirken verschiedene Mastzellstimuli gewebespezifisch unterschiedliche Verteilungsmuster hinsichtlich der freigesetzten Mastzellmediatoren [64].

Da Mastzellen eine wesentliche Bedeutung in der Pathophysiologie der Leukozyten-Endothel-Interaktion zugesprochen wird [46], besitzen alle oben genannten Rezeptorantagonisten eine potentiell modulierende Wirkung auf das Leukozytenrekruitment bei Endotoxinämie. Dies ist gerade in Bezug auf Serotonin relevant, da eine direkte Beeinflussung der Leukozyten-Endothel-Interaktion nach Mastzellaktivierung durch Serotoninrezeptorantagonisten nicht möglich erscheint [46]. Über eine primäre Modulation der Mastzellaktivität ist damit eine indirekte Wirkung von Serotoninrezeptorantago-

nisten auch auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion denkbar.

Bedeutung mesenterialer Mastzellen für den leukozytenunabhängigen Endothelschaden bei experimenteller Endotoxinämie

Zur Bedeutung mesenterialer Mastzellen am leukozytenunabhängigen Endothelschaden bei experimenteller Endotoxinämie liegen Untersuchungen sowohl mittels Mastzellstabilisation als auch mittels Mastzelldegranulation vor [66].

Bei dem zuletzt genannten Versuchsansatz wurde den Versuchstieren 48 Stunden vor dem eigentlichen Experiment Compound 48/80 (CMP 48/80) eine mastzelldegranulierende Substanz intraperitoneal injiziert [66]. Dieser Zeitpunkt wurde deshalb gewählt, weil die CMP 48/80-induzierte Entzündungsreaktion innerhalb von 24 Stunden auf Ausgangswerte abfällt und die Mastzellgranula für weitere 24 Stunden nicht wieder aufgefüllt werden [67,68].

Die beschriebene CMP 48/80-Behandlung verhinderte eine Mastzellaktivierung während des Beobachtungsintervalls von 120 Minuten Endotoxinämie. Mastzellstabilisation mit Cromolyn reduzierte die Mastzellaktivität auf Werte vergleichbar einer Kontrollgruppe [66]. Allerdings führte weder eine Inhibition der Mastzellaktivierung durch eine dem Versuch 48 Stunden vorausgehende Entleerung der Speichergranula mittels CMP 48/80 noch die Verwendung des Mastzellstabilisators Cromolyn zu einer signifikanten Verminderung der endotoxinbedingten Extravasation [66].

Untersuchungen zur LPS-induzierten Plasmaextravasation in Hautgefäß der Ratte konnten eine Verringerung des Endothelschadens durch den Mastzellstabilisator Ketotifen belegen [69]. Eine Erklärung für diese Diskrepanz ist in der Heterogenität der Struktur und Funktion von Mastzellen zu sehen, welche in vitro und in vivo nachgewiesen werden konnte [70,71]. Mastzellen der Haut weisen dabei eine andere Sensitivität auf bestimmte Stimulanten auf als Mastzellen des Mesenteriums. Mesenteriale Mastzellen haben eine untergeordnete Bedeutung für den leukozytenunabhängigen Endothelschaden bei Endotoxinämie. Der frühe Endothelschaden bei Endotoxinämie ist leukozytenunabhängig und mastzellunabhängig. Hinsichtlich der PAF- und serotoninbedingten Effekte auf den leukozytenunabhängigen Endothelschaden während Endotoxinämie müssen mesenteriale Mastzellen als potentielle Quelle dieser Mediatoren ausgeschlossen werden.

Mastzellen besitzen möglicherweise indirekt endothelschädigende Eigenschaften. Dabei wirken Mastzellen nicht direkt mediatorvermittelt am ►

- Endothel, sondern induzieren ihre Wirkung über eine inflammatorische Signaltransduktion oder durch Aktivierung von Leukozyten [46,72].

NO – Endothelprotektion durch verminderte Thrombozytenaktivierung?

Serotonin ist ein potenter Mediator des leukozyten-unabhängigen Endothelschadens in der Frühphase der Endotoxinämie [63]. NO besitzt jedoch keinen direkten Einfluss auf Serotonin, d.h. die Extravasation, die durch exogenes Serotonin hervorgerufen wird, wird durch NO nicht verhindert [73]. Serotonin wird folglich von Systemen freigesetzt, welche wiederum einer Regulation durch NO unterworfen sind.

Unter diesem Gesichtspunkt ist von einer zentralen Rolle der Thrombozyten auszugehen. Eine NO-Inhibition bewirkt einen thrombozytären Abfall der cGMP-Konzentrationen (zyklisches Guanosinmonophosphat), niedrige cGMP-Konzentrationen führen zu einer Up-Regulation von P-Selektin, CD 63 und dem Glykoprotein-(GP)-IIb/IIIa-Komplex. Der GP-IIb/IIIa-Rezeptorkomplex wiederum stellt die zentrale Schnittstelle der Thrombozytenaggregation dar [74,75,76].

Thrombozyten und Endothelschädigung bei experimenteller Endotoxinämie

Das Glykoprotein (GP) IIb/IIIa gehört in die Familie der Integrine (α IIb β 3-Integrin; CD41a/CD61) und ist einer der wichtigsten adhäsiven Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche. Die Wirkungen bekannter physiologischer Thrombozytenaktivatoren wie Thrombin, Kollagen, ADP, Serotonin, Thromboxan A2 und Adrenalin beruhen auf der Aktivierung des Glykoproteins (GP) IIb/IIIa, was gleichzeitig den letzten Schritt vor der Aggregation der Thrombozyten darstellt [76,77]. Abciximab (ReoPro[®]) ist das Fab (7E3)-Fragment des chimeren monoklonalen Mensch-Maus-Antikörpers gegen den thrombozytären GP-IIb/IIIa-Rezeptor [77]. Es zeichnet sich durch eine besonders hohe Bindungssaffinität zum GP-IIb/IIIa-Rezeptor aus.

Nach Blockade der Leukozyten-Endothel-Interaktion mit Fucoidin führt die Gabe von Abciximab bei Endotoxinämie an postkapillären Venolen zu einer signifikanten Reduktion des mikrovaskulären Endothelschadens [23]. Diese Erkenntnis steht im Einklang mit den Resultaten von Pu et al., die mittels immunhistochemischer Darstellung zeigten, dass eine GP-IIb/IIIa-Blockade gegen die endotheliale Dysfunktion bei Endotoxinämie schützt [78].

Während früher Phasen der Sepsis werden Thrombozyten durch Endotoxine aktiviert. Aufgrund der Verwendung des Selektininhibitors Fucoidin erscheint eine Thrombozyten-Leukozyten-Aggregation als Ursache einer Thrombozytenaktivierung und damit der Endothelschädigung ausgeschlossen. Diese wird nämlich als ein P-Selektin-abhängiger Prozess beschrieben [34], da durch die Verwendung monoklonaler Antikörper gegen P-Selektin eine Interaktion zwischen diesen Zellen nach L-NAME-Stimulation an mesenterialen Venolen verhindert wird [34]. Eine Beobachtung, die mit den Berichten korreliert, nach denen Fucoidin selbst eine Thrombozyten-Leukozyten-Adhäsion inhibieren kann.

Einzelne Studien berichten, dass auch die endotheliale Thrombozytenadhäsion initial ein P-Selektin-vermittelter Mechanismus ist. Durch P-Selektin soll es dabei zunächst zu einer lockeren Anheftung kommen, welche später durch Integrine gefestigt wird [79]. In-vitro-Untersuchungen zeigen jedoch auch eine P-Selektin-unabhängige Adhäsion thrombinbehandelter Thrombozyten an Endothelzellen der Vena umbilicalis [80]. Diese Thrombozyten-Endothel-Interaktion wird u.a. durch den thrombozytären GP-IIb/IIIa-Komplex vermittelt.

Es zeigt sich also durchaus, dass selektinunabhängige Mechanismen eine Thrombozytenadhäsion hervorrufen können. Da sich bei Endotoxinämie eine vermehrte Thrombinproduktion findet und es des Weiteren zu einem Fibrinogenanstieg kommt, ist es denkbar, dass LPS darüber eine Thrombozyten-Endothel-Interaktion initiiert [81].

Die GP-IIb/IIIa-rezeptorvermittelte Thrombozytenaktivierung und Thrombozyten-Endothel-Interaktionen imponieren als die zentralen Elemente des leukozytenunabhängigen Endothelschadens bei Endotoxinämie. Auch ohne Blockade der Leukozyten-Endothel-Interaktion führt eine Vorbehandlung von Versuchstieren mit dem GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten Abciximab ebenso wie eine Medikamentengabe 30 Minuten nach Start der kontinuierlichen Endotoxininfusion zu einer signifikanten Reduktion des makromolekularen Endothelschadens im Vergleich zu einer unbehandelten Endotoxingruppe [23]. Abciximab reduziert die Plasmaextravasation auf Werte vergleichbar einer NaCl-Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse beschreiben erstmalig In-vivo-Effekte einer GP-IIb/IIIa-Inhibition auf die mesenteriale Mikrozirkulation bei Endotoxinämie und zeigen eindeutig eine endothelprotektive Wirkung [23]. Die genauen Mechanismen der endothelprotektiven Wirkung der GP-IIb/IIIa-Antagonisten sind zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt, wahrscheinlich trägt jedoch eine Kombination inhibitorischer Effekte auf die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion, wie ▶

► auch die Thrombozyten-Endothel-Interaktion und die Thrombozytendegranulation zu der benefizellen Wirkung der GP-IIb/IIIa-Inhibition bei [78].

Aufgrund der ähnlichen Effekte von Abciximab auf die endotheliale Integrität bei Endotoxinämie in sowohl leukozytenunabhängigen wie auch leukozytenabhängigen Versuchsbedingungen, kommt den Thrombozyten offensichtlich generell die Schlüsselrolle in der Pathophysiologie des Endothelschadens bei Endotoxinämie zu (Abb. 4).

Pathophysiologie des leukozytenunabhängigen Endothelschadens bei experimenteller Endotoxinämie

Die Adhäsion von Thrombozyten an Endothelzellen wird bei verschiedenen Stimuli wie Ischämie/Reperfusion, Zytokinen und Endotoxinen beobachtet. Insbesondere die endothelschädigende Wirkung der Thrombozytenadhäsion ist bekannt [74,82,83]. In der frühen Phase der Sepsis werden Thrombozyten durch Endotoxin [84] und PAF [60] aktiviert. Die Thrombozyten können somit als Verbindungsglied zwischen der Beteiligung von sowohl Serotonin als auch PAF an der Ausbildung eines leukozytenunab-

hängigen Endothelschadens bei Endotoxinämie angesehen werden.

Nach einer zunächst reversiblen Thrombozytenaggregation ist die Aktivierung des Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptors der letzte Schritt vor der festen Aggregation und der Mediatorfreisetzung aus Thrombozyten [76], wobei auch Serotonin freigesetzt wird. Serotonin besitzt eine bedeutende Rolle bei der thrombozytenvermittelten Permeabilitätsverhöhung [85]. Auf den Endothelschaden bei Endotoxinämie übt Serotonin keinen direkten endothelschädigenden Effekt aus, sondern ist in ein pathophysiologisches Kaskadensystem eingebunden, indem es möglicherweise mit den 5-HT₂-Rezeptoren auf der Oberfläche der Thrombozyten interagiert [86]. Freigesetztes Serotonin reagiert im Sinne eines positiven Feedbackmechanismus mit seinen eigenen Rezeptoren auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Thrombozytenaggregation sowie der Freisetzung granulärer Inhaltsstoffe als Antwort auf ansonsten ineffektive Konzentrationen von Agonisten. Somit wird durch die Serotoninfreisetzung eine weiterführende Thrombozytenaggregation und -degranulation gefördert [87,88].

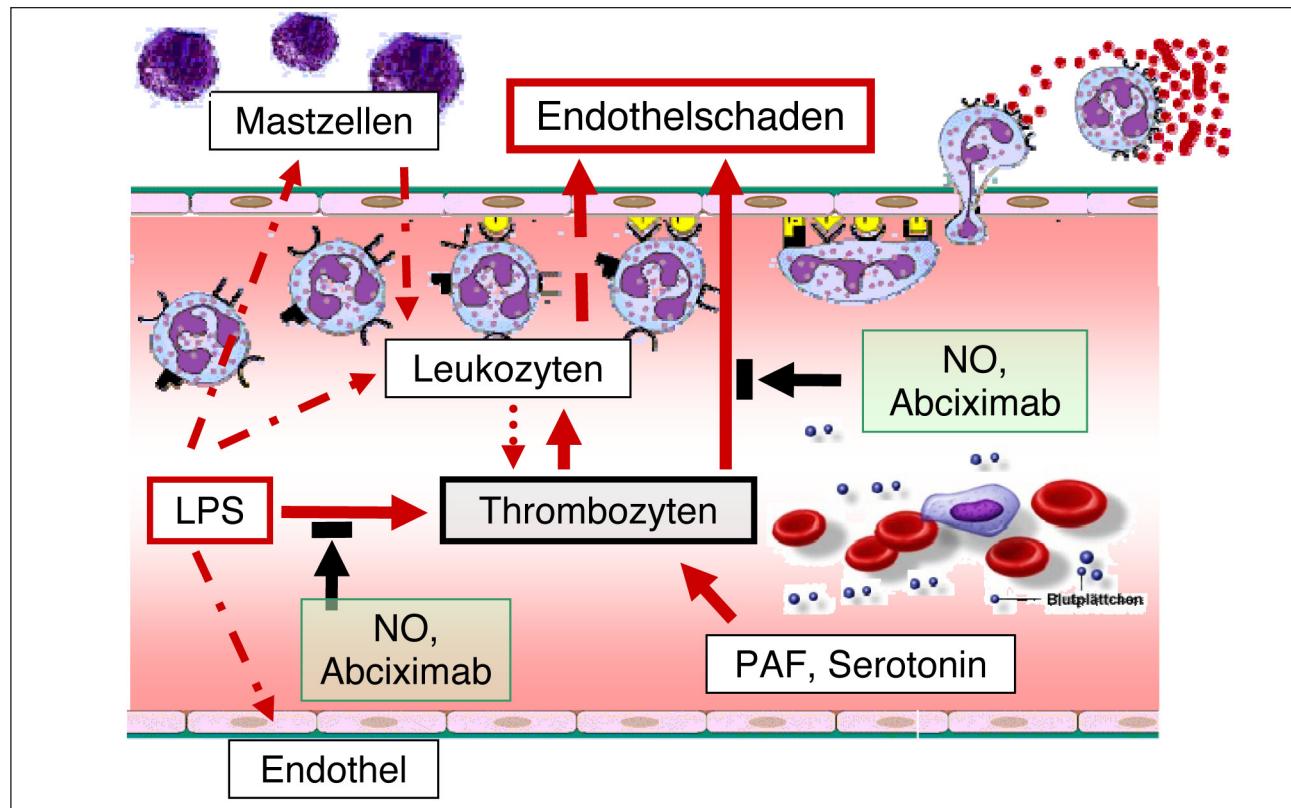


Abb. 4: Potentieller Mechanismus zur Endothelschädigung bei Endotoxinämie (stark vereinfachte Darstellung). LPS bewirkt eine Aktivierung vor allem der Leukozyten und der Thrombozyten. Die Leukozyten-Endothel-Interaktion trägt in späten Phasen der Endotoxinämie zur Endothelschädigung bei, wobei bekannt ist, dass Leukozyten für nur 40-50% der L-NAME-induzierten späten Phase der Extravasation ursächlich sind. NO-Donatoren und der GP-IIb/IIIa-Antagonist Abciximab besitzen über Interaktionen mit den Thrombozyten in der Frühphase endothelprotektive Effekte.

► NO reguliert den leukozytenunabhängigen Endothelschaden bei Endotoxinämie am ehesten über die cGMP-abhängige Expression von Adhäsionsmolekülen. Eine wesentliche Bedeutung besitzt dabei der thrombozytäre GP-IIb/IIIa-Komplex, durch dessen Blockade der frühe Endothelschaden bei Endotoxinämie signifikant reduziert werden kann [23]. Die Aktivierung des Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptors stellt die gemeinsame Endstrecke der Thrombozytenaktivierung dar und unterstreicht somit die zentrale Rolle der Thrombozyten im Hinblick auf die endothiale Dysfunktion bei früher Endotoxinämie.

Von der Pathophysiologie zur klinischen Anwendung

Die Aufklärung pathophysiologischer Zusammenhänge dient vornehmlich dem Ziel, neue therapeutische Ansätze für die klinische Behandlung zu erschließen. Das Vollbild der Sepsis stellt nach wie vor ein äußerst ernstes Krankheitsbild dar, dessen Therapie zwar in den letzten Jahren Fortschritte verzeichneten konnte, jedoch noch weiterführender Impulse bedarf, um das Outcome der Patienten zu verbessern und damit die hohe Mortalitätsrate zu verringern.

Die hohe Sterblichkeitsrate in der Sepsis wird maßgeblich vom Endothelschaden bestimmt. Mittels der sogenannten „Orthogonal Polarization Spectral-Technik“ ist es möglich die Mikrozirkulation bei Sepsis-Patienten in-vivo darzustellen [89]. Dieses Imagingverfahren erlaubt diebettseitige Visualisierung der Mikrozirkulation, indem Gewebe von einer Lichtquelle bestrahlt wird und nur das von dem Gewebe reflektierte depolarisierte Licht aufgezeichnet und ausgewertet wird. Mittels dieser Technik konnte erstmals am Menschen demonstriert werden, dass die Anzahl kontinuierlich perfundierter Kapillaren bei Sepsispatienten eingeschränkt ist [89]. Weiterhin zeigte sich, dass diejenigen Patienten, die eine Sepsis überleben, frühzeitig durch eine Verbesserung der mikrovaskulären Perfusion charakterisiert werden können, während diejenigen Patienten, die letztendlich an der Sepsis versterben, keine Verbesserung der mikrovaskulären Perfusion erfahren [90].

Der Zusammenbruch der Mikrozirkulation ist dabei eng mit der Aktivierung des Gerinnungssystems verknüpft. Durch eine akute generalisierte Aktivierung des Gerinnungssystems kommt es zur Bildung von Mikrothromben durch intravaskuläre Fibrinablagerungen und es entstehen diffuse Hämorrhagien durch den vermehrten Verbrauch an Thrombozyten [91].

In Anbetracht dieser Tatsache erscheint eine therapeutische Intervention, die sowohl die Inflammation als auch das Gerinnungssystem zum Ziel hat, als vielversprechende Therapieoption. Insbesondere den natürlich vorkommenden Antikoagulanzien wird ein potentes antiinflammatorisches Potential zugeschrieben [92,93], weshalb diese Substanzen in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse sind.

Vor diesem Hintergrund wurden bereits mehrfach natürlich vorkommende Antikoagulanzien, wie z.B. Antithrombin III (ATIII), rekombinant-humane aktivierte Protein C (rhAPC) und Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in klinischen Studien getestet. Bezuglich ATIII wurden bisher sieben Studien durchgeführt, die keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Überlebensrate aufzeigten konnten [94,95,96]. Auch die Subgruppenanalyse konnte keine Vorteile für eine ATIII-Therapie aufzeigen.

Im Gegensatz dazu konnten Bernard et al. in einer Phase-III-Studie zeigen, dass die Verwendung von rhAPC signifikant die 28-Tage-Mortalität bei Sepsispatienten reduziert [97]. Dabei besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Letalitätsrisiko der Patienten und der Effizienz der rhAPC-Therapie: so scheint rhAPC lediglich bei Sepsispatienten mit einem hohen Letalitätsrisiko von Vorteil zu sein (APACHE II Score > 25), während es bei Patienten mit niedrigem Risiko sogar schaden kann. Auf molekularbiologischer Ebene konnte nachgewiesen werden, dass rhAPC neben den bekannten anti-koagulatorischen Effekten eine Vielzahl von zellulären Reaktionen inhibiert, die in das inflammatorische System eingreifen. So inhibiert aktivierte Protein C vor allem die nukleäre Translokation von NF_κB und interferiert somit mit der zellulären Produktion von inflammatorischen Zytokinen, einer Schlüssel-funktion für die Entstehung der Inflammationsreaktion [98]. Weiterhin blockiert rhAPC Leukozyten-Endothelinteraktionen durch eine Inhibition des Selektinmechanismus.

Bezuglich TFPI wurden bisher zwei klinische Studien durchgeführt, die ebenfalls keinen Vorteil für die TFPI-Therapie aufzeigten konnten [99,100].

Bei allen Studien gibt es jedoch den Kritikpunkt, dass die gleichzeitige Verwendung von Heparin die Ergebnisse verfälscht haben könnte [96]. Die Analyse der Patienten, die kein Heparin gleichzeitig zur Studientherapie erhalten haben, ergab ein wesentlich besseres Ergebnis für die jeweilige Studientherapie [96]. Demnach scheint der klinische Nutzen dieser Therapieansätze noch nicht geklärt und es werden weitere klinische Studien benötigt, um diese Fragen aufzuklären.

► Zieht man nun eine zentrale Rolle der Thrombozyten in der Pathophysiologie der Sepsis in Betracht, erscheint eine antithrombozytäre Intervention als gleichzeitig antikogulatorische als auch antiinflammatorische Maßnahme denkbar. In diesem Zusammenhang konnte experimentell demonstriert werden, dass eine verstärkte Thrombozyten-Leukozyten-Adhäsion und -Sequestration zum Auftreten einer Organdysfunktion führt, da Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate den mikrovaskulären Blutfluss verschlechtern [101]. Weiterhin gibt es in der Tat klinische Hinweise auf eine gestörte überschießende Aktivierung der Thrombozyten im Rahmen einer Sepsis. Es konnte aufgezeigt werden, dass bei Sepsispatienten, wahrscheinlich aufgrund einer vorangegangenen starken Thrombozytenaktivierung mit der konsekutiven Genese von Mikrothromben, die Thrombozytenfunktion vermindert ist [102]. In einem solchen Szenario ist es durchaus denkbar, dass man durch eine Modulation der Thrombozytenfunktion gleichzeitig eine Verbesserung der Mikrozirkulation erreichen könnte. Sicherlich erscheint dieser Aspekt einer antithrombozytären Therapie noch weit entfernt von der klinischen Anwendung, insbesondere im Hinblick auf schwerwiegende potentielle Blutungskomplikationen.

Andererseits gibt es alternative experimentelle Ansätze, die ebenfalls einen positiven Effekt im Rahmen einer Sepsis haben könnten. So zeigen neue experimentelle Untersuchungen einen protektiven Effekt auf den mikrovaskulären Endothelschaden für die selektiven Serotonin-Rezeptorantagonisten Methysergide und Ketanserin bei leukozytenabhängiger Endotoxinämie [103]. Dieser Effekt wurde bereits bei leukozytenunabhängiger Endotoxinämie beschrieben [62]. Diese Substanzen scheinen über Serotonininhibition eine Thrombozytenaktivierung zu unterdrücken und letztendlich endothelprotektiv zu wirken und könnten somit eine Alternative zur direkten Thrombozyteninhibition darstellen. Eine Einschätzung des Blutungsrisikos unter diesen Substanzen ist anhand der bisher vorliegenden Daten nicht möglich. Es bedarf demnach weiterer experimenteller Studien, um die Möglichkeit einer Modulation der Thrombozytenfunktion als neuen Therapieansatz in der Sepsis zu untersuchen.

Literatur

1. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3527-3561.
2. Wolinsky H. A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherosclerosis. *Circ Res* 1980;47:301-311.
3. Bombeli T, Mueller M, Haeberli A. Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb Haemost* 1997;77:408-423.
4. Vallet B, Wiel E. Endothelial cell dysfunction and coagulation. *Crit Care Med* 2001;29:S36-41.
5. Bevilacqua MP, Gimbrone MA, Jr. Inducible endothelial functions in inflammation and coagulation. *Semin Thromb Hemost* 1987;13:425-433.
6. Bannerman DD, Sathyamoorthy M, Goldblum SE. Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. *J Biol Chem* 1998;273:35371-35380.
7. Grega GJ, Adamski SW. The role of venular endothelial cells in the regulation of macromolecular permeability. *Microcirc Endothelium Lymphatics* 1988;4:143-167.
8. Hirano S, Rees RS, Yancy SL, Welsh MJ, Remick DG, Yamada T, et al. Endothelial barrier dysfunction caused by LPS correlates with phosphorylation of HSP27 in vivo. *Cell Biol Toxicol* 2004;20:1-14.
9. Gartner SL, Sieckmann DG, Kang YH, Watson LP, Homer LD. Effects of lipopolysaccharide, lipid A, lipid X, and phorbol ester on cultured bovine endothelial cells. *Lab Invest* 1988;59:181-191.
10. Uchiba M, Okajima K, Murakami K. Effects of various doses of antithrombin III on endotoxin-induced endothelial cell injury and coagulation abnormalities in rats. *Thromb Res* 1998;89:233-241.
11. Barroso-Aranda J, Zweifach BW, Mathison JC, Schmid-Schonbein GW. Neutrophil activation, tumor necrosis factor, and survival after endotoxic and hemorrhagic shock. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;25 Suppl 2:S23-29.
12. Kubes P, Kanwar S. Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event. *J Immunol* 1994;152:3570-3577.
13. Kubes P, Ward PA. Leukocyte recruitment and the acute inflammatory response. *Brain Pathol* 2000;10:127-135.
14. Astiz ME, Rackow EC. Septic shock. *Lancet* 1998;351:1501-1505.
15. Bannerman DD, Goldblum SE. Direct effects of endotoxin on the endothelium: barrier function and injury. *Lab Invest* 1999;79:1181-1199.
16. Schmidt H, Schmidt W, Muller T, Böhrer H, Bach A, Gebhard MM, et al. Effect of the 21-aminosteroid tirlazad mesylate on leukocyte adhesion and macromolecular leakage during endotoxemia. *Surgery* 1997;121:328-334.
17. Percival E, Percival R. Part I. The isolation and purification of fucoidin from brown seaweeds. *J Chem Soc* 1950;145:717-720.
18. Patankar MS, Oehninger S, Barnett T, Williams RL, Clark GF. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *J Biol Chem* 1993;268:21770-21776.
19. Kubes P, Jutila M, Payne D. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 1995;95:2510-2519.
20. Arfors KE, Lundberg C, Lindbom L, Lundberg K, Beatty PG, Harlan JM. A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo. *Blood* 1987;69:338-340.
21. Lindbom L, Xie X, Raud J, Hedqvist P. Chemoattractant-induced firm adhesion of leukocytes to vascular endothelium in vivo is critically dependent on initial leukocyte rolling. *Acta Physiol Scand* 1992;146:415-421.
22. Walther A, Weihrauch M, Schmidt W, Gebhard MM, Martin E, Schmidt H. Leukocyte-independent plasma extravasation during endotoxemia. *Crit Care Med* 2000;28:2943-2948.
23. Walther A, Czabanka M, Gebhard MM, Martin E. Glycoprotein IIb/IIIa-inhibition and microcirculatory alterations during experimental endotoxemia. - An intravital microscopic study in the rat. *Microcirculation* 2004;11:79-88.
24. Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN. Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circ Res* 1994;74:376-382.
25. Kurose I, Pothoulakis C, LaMont JT, Anderson DC, Paulson JC, Miyasaka M, et al. Clostridium difficile toxin A-induced microvascular dysfunction. Role of histamine. *J Clin Invest* 1994;94:1919-1926.
26. Bonnardel-Phu E, Vicaut E. [Role of oxidative stress in permeability changes observed in the microcirculation of diabetic rats in vivo]. *J Mal Vasc* 2000;25:115-121.
27. Windsor AC, Mullen PG, Fowler AA, Sugerman HJ. Role ►

- of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome. *Br J Surg* 1993;80:10-17.
28. Basadre JO, Singh H, Herndon DN, Stothert J, Traber LD, Horn K, et al. Effect of antibody-mediated neutropenia on the cardiopulmonary response to endotoxemia. *J Surg Res* 1988;45:266-275.
29. Kubes P, Kanwar S, Niu XF, Gaboury JP. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *Faseb J* 1993;7:1293-1299.
30. Esteve AG, Jordan J. Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail. *Ann N Y Acad Sci* 2002;962:207-211.
31. Walther A, Barth C, Gebhard MM, Martin E. Role of nitric oxide in leukocyte-independent endothelial damage during experimental endotoxemia. *Shock* 2003;20:286-291.
32. Sacks T, Moldow CF, Craddock PR, Bowers TK, Jacob HS. Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. An *in vitro* model of immune vascular damage. *J Clin Invest* 1978;61:1161-1167.
33. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:4651-4655.
34. Kurose I, Kubes P, Wolf R, Anderson DC, Paulson J, Miyasaka M, et al. Inhibition of nitric oxide production. Mechanisms of vascular albumin leakage. *Circ Res* 1993;73:164-171.
35. Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Aw TY, Specian RD, Granger DN. Microvascular responses to inhibition of nitric oxide production. Role of active oxidants. *Circ Res* 1995;76:30-39.
36. Kubes P, Granger DN. Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am J Physiol* 1992;262:H611-5.
37. Kubes P. Nitric oxide modulates epithelial permeability in the feline small intestine. *Am J Physiol* 1992;262:G1138-1142.
38. Alican I, Kubes P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *Am J Physiol* 1996;270:G225-237.
39. Cerwinka WH, Cooper D, Kriegstein CF, Ross CR, McCord JM, Granger DN. Superoxide mediates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H535-541.
40. Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN. Effects of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis on postcapillary venules. *Am J Physiol* 1995;268:H2224-2231.
41. Kanwar S, Wallace JL, Befus D, Kubes P. Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. *Am J Physiol* 1994;266:G222-229.
42. Nguyen BL, Saitoh M, Ware JA. Interaction of nitric oxide and cGMP with signal transduction in activated platelets. *Am J Physiol* 1991;261:H1043-1052.
43. Packham MA, Nishizawa EE, Mustard JF. Response of platelets to tissue injury. *Biochem Pharmacol* 1968;Suppl:171-184.
44. Muller-Werdan U, Werdan K. Der anaphylaktische Schock. *Anaesthesist* 1997;46:549-563.
45. Wershil BK, Wang ZS, Gordon JR, Galli SJ. Recruitment of neutrophils during IgE-dependent cutaneous late phase reactions in the mouse is mast cell-dependent. Partial inhibition of the reaction with antiserum against tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 1991;87:446-453.
46. Kubes P, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions evoked by mast cells. *Cardiovasc Res* 1996;32:699-708.
47. Bridges AJ, Malone DG, Jicinsky J, Chen M, Ory P, Engber W, et al. Human synovial mast cell involvement in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Relationship to disease type, clinical activity, and antirheumatic therapy. *Arthritis Rheum* 1991;34:1116-1124.
48. Atkinson JB, Harlan CW, Harlan GC, Virmani R. The association of mast cells and atherosclerosis: a morphologic study of early atherosclerotic lesions in young people. *Hum Pathol* 1994;25:154-159.
49. Leal-Berumen I, Conlon P, Marshall JS. IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994;152:5468-5476.
50. Walther A, Schmidt H, Schmidt W, Martin E. Microvascular permeability alterations and mast cell activation during endotoxemia. *Crit Care Med* 1998;26:A 133-137.
51. Walther A, Yilmaz N, Schmidt W, Bach A, Gebhard MM, Martin E, et al. Role of platelet-activating factor in leukocyte-independent plasma extravasation and mast cell activation during endotoxemia. *J Surg Res* 2000;93:265-271.
52. Paul W, Douglas GJ, Lawrence L, Khawaja AM, Perez AC, Schachter M, et al. Cutaneous permeability responses to bradykinin and histamine in the guinea-pig: possible differences in their mechanism of action. *Br J Pharmacol* 1994;111:159-164.
53. Majno G, Shea SM, Leventhal M. Endothelial contraction induced by histamine-type mediators: an electron microscopic study. *J Cell Biol* 1969;42:647-672.
54. Gimeno G, Carpenter PH, Desquand-Billiaud S, Hanf R, Finet M. Histamine-induced biphasic macromolecular leakage in the microcirculation of the conscious hamster: evidence for a delayed nitric oxide-dependent leakage. *Br J Pharmacol* 1998;123:943-951.
55. Clough G, Michel CC, Phillips ME. Inflammatory changes in permeability and ultrastructure of single vessels in the frog mesenteric microcirculation. *J Physiol* 1988;395:99-114.
56. Fox J, Galey F, Wayland H. Action of histamine on the mesenteric microvasculature. *Microvasc Res* 1980;19:108-126.
57. Walther A, Jäger M, Secchi A, Schmidt W, Bach A, Martin E, et al. Effects of histamine-1 receptor antagonism on leukocyte-independent plasma extravasation during endotoxemia. *J Crit Care* 2001;16:24-31.
58. Walther A, Jäger M, Secchi A, Schmidt W, Martin E, Schmidt H. Role of combined histamine-1- and histamine-2-receptor antagonism in leukocyte-independent plasma extravasation during endotoxemia. *Intern J Surg Invest* 2001;3:393-399.
59. Salari H, Demos M, Wong A. Comparative hemodynamics and cardiovascular effects of endotoxin and platelet-activating factor in rat. *Circ Shock* 1990;32:189-207.
60. Ayala A, Chaudry IH. Platelet activating factor and its role in trauma, shock, and sepsis. *New Horiz* 1996;4:265-275.
61. Schmidt H, Ebeling D, Bauer H, Böhrer H, Gebhard MM, Martin E. Influence of the platelet-activating factor receptor antagonist BN52021 on endotoxin-induced leukocyte adherence in rat mesenteric venules. *J Surg Res* 1996;60:29-35.
62. Walther A, Yilmaz N, Schmidt W, Bach A, Gebhard MM, Martin E, et al. Methysergide attenuates leukocyte-independent plasma extravasation during endotoxemia. *J Crit Care* 2001;16:121-126.
63. Walther A, Peter C, Secchi A, Gebhard MM, Martin E, Schmidt H. Selective Serotonin Receptor Antagonism and Leukocyte-Independent Plasma Extravasation during Endotoxemia. *Microvasc Res* 2002;63:135-138.
64. Theoharides TC, Kops SK, Bondy PK, Askenase PW. Differential release of serotonin without comparable histamine under diverse conditions in the rat mast cell. *Biochem Pharmacol* 1985;34:1389-1398.
65. Galli SJ. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med* 1993;328:257-265.
66. Walther A, Jäger M, Schmidt W, Secchi A, Gebhard MM, Martin E, et al. Influence of mast cells on leukocyte-independent plasma extravasation during endotoxemia. *Microvasc Res* 2001;62:79-82.
67. Tannenbaum S, Oertel H, Henderson W, Kaliner M. The biologic activity of mast cell granules. I. Elicitation of inflammatory responses in rat skin. *J Immunol* 1980;125:325-335.
68. Klein LM, Lavker RM, Matis WL, Murphy GF. Degranulation of human mast cells induces an endothelial antigen central to leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:8972-8976.
69. Iuvone T, Den Bossche RV, D'Acquisto F, Carnuccio R, Herman AG. Evidence that mast cell degranulation, histamine and tumour necrosis factor alpha release occur in LPS-induced plasma leakage in rat skin. *Br J Pharmacol* 1999;128:700-704.
70. Katz HR, Stevens RL, Austen KF. Heterogeneity of mammalian mast cells differentiated *in vivo* and *in vitro*. *J Allergy Clin Immunol* 1985;76:250-259.
71. Kitamura Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol* 1989;7:59-76.
72. Costa JJ, Harris AG, Delano FA, Zweifach BW, Schmid- ►

- **Schonbein GW.** Mast cell degranulation and parenchymal cell injury in the rat mesentery. *Microcirculation* 1999;6:237-244.
- 73. Gaboury JP, Niu XF, Kubes P.** Nitric oxide inhibits numerous features of mast cell-induced inflammation. *Circulation* 1996; 93:318-326.
- 74. Cerwinka WH, Cooper D, Kriegstein CF, Feelisch M, Granger DN.** Nitric oxide modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H1111-1117.
- 75. Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, et al.** Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med* 1999;189:1255-1264.
- 76. Topol EJ, Byzova TV, Plow EF.** Platelet GPIIb-IIIa blockers. *Lancet* 1999;353:227-231.
- 77. Tam SH, Sassoli PM, Jordan RE, Nakada MT.** Abciximab (ReoPro, chimeric 7E3 Fab) demonstrates equivalent affinity and functional blockade of glycoprotein IIb/IIIa and alpha(v)beta3 integrins. *Circulation* 1998;98:1085-1091.
- 78. Pu Q, Wiel E, Corseaux D, Bordet R, Azrin MA, Ezekowitz MD, et al.** Beneficial effect of glycoprotein IIb/IIIa inhibitor (AZ-1) on endothelium in *Escherichia coli* endotoxin-induced shock. *Crit Care Med* 2001;29:1181-1188.
- 79. Xiao Z, Theroux P, Frojmovic M.** Modulation of platelet-neutrophil interaction with pharmacological inhibition of fibrinogen binding to platelet GPIIb/IIIa receptor. *Thromb Haemost* 1999;81:281-285.
- 80. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM.** Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalpha. *J Exp Med* 1998;187:329-339.
- 81. Li N, Soop A, Sollevi A, Hjemdahl P.** Multi-cellular activation in vivo by endotoxin in humans--limited protection by adenosine infusion. *Thromb Haemost* 2000;84:381-387.
- 82. Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO, Wagner DD.** Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood* 1998;91:1318-1324.
- 83. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, et al.** Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998;92:507-515.
- 84. Csako G, Suba EA, Elin RJ.** Endotoxin-induced platelet activation in human whole blood in vitro. *Thromb Haemost* 1988;59:378-382.
- 85. De Clerck F, Van Gorp L, Beetens J, Reneman RS.** Platelet-mediated vascular permeability in the rat: a predominant role for 5-hydroxytryptamine. *Thromb Res* 1985;38:321-339.
- 86. Walther A, Peter C, Yilmaz N, Schmidt W, Martin E, Schmidt H.** Influence of serotonin-receptor antagonism on mast cell activation during endotoxemia. *Pathophysiology* 2002;8:161-165.
- 87. De Clerck FF, Janssen PA.** Amplification mechanisms in platelet activation and arterial thrombosis. *J Hypertens Suppl* 1990;8:S87-93.
- 88. De Clerck F, Janssen PA.** 5-Hydroxytryptamine and thromboxane A2 in ischaemic heart disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1990;1:201-209.
- 89. De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL.** Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:98-104.
- 90. Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, Creteur J, Vincent JL.** Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2004;32:1825-1831.
- 91. Franchini M, Lippi G, Manzato F.** Recent acquisitions in the pathophysiology, diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation. *Thromb J* 2006;4:4-8.
- 92. Riewald M, Ruf W.** Science review: role of coagulation protease cascades in sepsis. *Crit Care* 2003;7:123-129.
- 93. Oelschlager C, Romisch J, Staubitz A, Stauss H, Leithauer B, Tillmanns H, et al.** Antithrombin III inhibits nuclear factor kappaB activation in human monocytes and vascular endothelial cells. *Blood* 2002;99:4015-4020.
- 94. Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, et al.** Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *Jama* 2001;286:1869-1878.
- 95. Fourrier F, Chopin C, Huart JJ, Runge I, Caron C, Goudemand J.** Double-blind, placebo-controlled trial of antithrombin III concentrates in septic shock with disseminated intravascular coagulation. *Chest* 1993;104:882-888.
- 96. Minneci PC, Deans KJ, Cui X, Banks SM, Natanson C, Eichacker PQ.** Antithrombotic therapies for sepsis: a need for more studies. *Crit Care Med* 2006;34:538-541.
- 97. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al.** Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699-709.
- 98. Esmon CT.** Role of coagulation inhibitors in inflammation. *Thromb Haemost* 2001;86:51-56.
- 99. Abraham E, Reinhart K, Svoboda P, Seibert A, Olthoff D, Dal Nogare A, et al.** Assessment of the safety of recombinant tissue factor pathway inhibitor in patients with severe sepsis: a multicenter, randomized, placebo-controlled, single-blind, dose escalation study. *Crit Care Med* 2001;29:2081-2089.
- 100. Abraham E, Reinhart K, Opal S, Demeyer I, Doig C, Rodriguez AL, et al.** Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *Jama* 2003;290:238-247.
- 101. Kirschenbaum LA, Adler D, Astiz ME, Barua RS, Saha D, Rackow EC.** Mechanisms of platelet-neutrophil interactions and effects on cell filtration in septic shock. *Shock* 2002;17:508-512.
- 102. Ludahl TH, Petersson J, Fagerberg IH, Berg S, Lindahl TL.** Impaired platelet function correlates with multi-organ dysfunction. A study of patients with sepsis. *Platelets* 1998;9:223-225.
- 103. Walther A, Petri E, Peter C, Czabanka M, Martin E.** Selective Serotonin-Receptor Antagonism and Microcirculatory Alterations during Experimental Endotoxemia. *J Surg Res*; [in press].

Korrespondenzadresse:

Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Walther
Klinik für Anästhesiologie
Universitätsklinikum Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 110
69120 Heidelberg
Deutschland
Tel.: +49 6221 56 6355
Fax: +49 6221 56 33819
E-Mail: Andreas.Walther@med.uni-heidelberg.de