

**Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität  
Marburg in Zusammenarbeit mit der klinischen Pharmakologie am Allgemeines  
Krankenhaus Wien  
Direktor: Prof. Dr. T. Gudermann**

**Auswirkungen einer Blockade des Angiotensin Converting Enzyms  
durch Enalapril auf die Aktivierung von Endothelzellen und  
Leukozyten bei systemischer Entzündung induziert durch  
Lipopolysaccharide**

**Inaugural-Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin**

**dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt**

**von Tanja Dukic**

**Gefördert vom Jubiläumsfond der österreichischen Nationalbank**

**Marburg 2006**

**Dekan: Professor Dr. B. Maisch**

**Referent: 1. Professor Dr. F. Czubayko**

**Korreferent: 2. Professor Dr. U. Kroh**

eingereicht: März /2006

Datum der Promotion: 07.09.2006

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Phillips-Universität Marburg am  
07.09.2006 und gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

## Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	6
1.1	Sepsis	6
1.1.1	Definition/ Klassifikation	6
1.1.2	Pathogenese der Sepsis	8
1.1.2.1	Mediatoren der Sepsis	8
1.1.2.2	Zelluläre Komponenten	13
1.1.2.3	Bedeutung der Adhäsionsmoleküle	14
1.1.3	Folgen der Sepsis	18
1.2	Enalapril	19
1.2.1	Pharmakodynamik	19
1.2.2	Pharmakokinetik	24
1.3	Ziele der Studie	24
1.3.1	Allgemeine Ziele/ Rationale für die Verwendung von Enalapril	24
1.3.2	Spezielle Ziele	25
2	Materialien und Methoden	27
2.1	Probanden	27
2.2	Ethikkommission	28
2.3	Studieneinteilung	29
2.3.1	Design	29
2.3.2	Population	29
2.3.3	Mediaktion	30
2.3.4	Dosierung	30
2.3.5	Studienablauf	31
2.4	Methoden	32
2.4.1	Blutbilder	32

2.4.2	Durchflusszytometrie	32
2.4.2.1	Prinzip	32
2.4.2.2	Bestimmung von CD 11b und CD 54	34
2.4.3	Enzymimmunoassay	34
2.4.4	Analyse der ACE-Aktivität	35
2.4.5	Statistische Analyse	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Plasma ACE-Aktivität	37
3.2	Auswertung der hämodynamischen Veränderungen	38
3.3	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ im Plasma	40
3.4	Ergebnisse der ICAM-1 Expression auf	40
3.4.1	Monozyten	40
3.4.2	Neutrophile Granulozyten	41
3.5	Ergebnisse der CD 11b Expression auf:	42
3.5.1	Monozyten	42
3.5.2	Neutrophile Granulozyten	42
3.6	Ergebnisse der löslichen E-Selektin-Werte im Plasma	43
3.7	Ergebnisse der löslichen ICAM-1 Moleküle im Plasma	45
3.8	Ergebnisse der löslichen VCAM-1 Moleküle im Plasma	46
3.9	Auswertung zellulärer Veränderungen	47
3.9.1	Leukozyten	47
3.9.2	Neutrophile Granulozyten	47
3.9.3	Monozyten	47
3.9.4	Plättchenanzahl	47
4	Diskussion	48
4.1	Rationale für die gemessenen Parameter	48
4.2	Diskussion in Bezug auf den Studienaufbau	49

4.2.1	Kriterien der Probandenauswahl	50
4.2.2	Parameter der ACE-Aktivität	52
4.2.3	Dauer der Enalaprilbehandlung	53
4.3	Verschiedene Krankheitsbilder im Vergleich bei der Einnahme von ACE- Inhibitoren	55
4.3.1	Diabetes mellitus	55
4.3.2	Hypertension	56
4.3.3	LPS-Studien	58
4.4	Diskussion um die Wirkungsweise von Enalapril	60
5	Zusammenfassung	65
	Literaturverzeichnis	66
	Abkürzungsverzeichnis	75
	Abbildungsverzeichnis	77
	Danksagung	78
	Akademische Lehrer	79

# **1 Einleitung**

## **1.1 Sepsis**

### **1.1.1 Definition/ Klassifikation**

Die Sepsis ist ein sehr weit verbreitetes Krankheitsbild, welches in der Medizin weiterhin eine Herausforderung bleibt. Die therapeutischen Möglichkeiten bieten ein noch weites unerkanntes Feld und sie bleiben Ziel der Forschung, da weiterhin hohe Mortalitätszahlen bestehen.

In den USA sind jährlich, im Hinblick auf eine Studie mit insgesamt 6,5 Millionen Patienten, 751.000 Menschen an einer Sepsis erkrankt. 44,5 % der Erkrankten waren vorher gesund. 51,1 % werden auf der Intensivstationen behandelt und 215.000 Menschen von 751.000 Patienten (= 28,6 %) versterben jährlich im Krankenhaus an den Folgen einer Sepsis. Dieses beträgt 9,3 % aller Todesfälle in den USA und somit ist die Sepsis und der septischer Schock die Haupttodesursache auf den nicht-kardiologischen Intensivstationen. Die geschätzten Krankenhauskosten für die Versorgung der Patienten mit Sepsis betragen in den USA circa 17 Milliarden Dollar (5).

In Deutschland ergaben Schätzungen eine Häufigkeit der Erkrankung von 44.000 – 95.000 Patienten im Jahr (76).

Diese Zahlen verdeutlichen, dass weiterhin viele komplexe pathophysiologischen Abläufe der Sepsis, trotz Einsatz maximaler intensivmedizinischer Versorgungsmöglichkeiten, unerkannt bleiben und oft tödlich enden.

Bei dem Krankheitsbild Sepsis existieren verschiedene Grade der Erkrankung. Kommt es in einem Organismus zu einer lokalen Infektion und sind die Erreger im Blut nachweisbar, so spricht man von einer Bakteriämie (3).

Breitet sich eine lokale Infektion systemisch im Blut aus, so spricht man von einer Sepsis, wobei zusätzlich zwei oder mehrere der folgenden Kriterien erfüllt sein müssen (3):

- Hypothermie < 36 C° oder Hyperthermie > 38 C°
- Tachykardie > 90/min
- Tachypnoe > 20/min oder pa CO<sup>2</sup> < 32 torr
- Leukopenie < 4000 Zellen/mm<sup>3</sup>, Leukozytose >12000 Zellen/mm<sup>3</sup>
- oder >10 % stabkernige Granulozyten (3)

Diese Reaktionen sind durch überschießende Reaktionen entstanden. Das Immunsystem versucht am Anfang, durch Abwehrreaktionen die Infektion zu verhindern. Physiologische Kontrollmechanismen werden bei diesem Krankheitsbild in unkontrollierter Form freigesetzt. Dadurch wird nicht nur die Noxe eliminiert, sondern es entstehen Schäden an Organen und Zellsystemen.

Weiterhin besteht das Systemische Inflammatorische Response Syndrom (SIRS). Die Kriterien des SIRS entsprechen einer Sepsis. Im Vordergrund steht jedoch eine systemische Entzündungsreaktion, die durch Infektionen, multiple Traumen, Verbrennungen, Operationen und weitere schwere klinische Erkrankungen entstehen können (3).

Um prognostische Aussagen machen zu können, wurde der Begriff „Sepsis“ wie folgt unterteilt:

#### Sepsis mit Hypotension:

Sepsis, die die systolischen Blutdruckwerte von < 90 mm Hg oder eine Reduktion des Ausgangswertes von > 40 mm Hg beinhalten und eine andere Ursache einer Hypotension ausgeschlossen ist.

#### Schwere Sepsis:

Sepsis, wobei es zusätzlich zu Organdysfunktionen, Minderperfusion und Hypotonie kommen kann. Es treten Durchblutungsstörungen und Minderdurchblutungen auf, welche sich in einer Laktatazidose, Oligurie oder einer akuten Änderung der Bewusstseinslage äußern können.

### Septischer Schock:

Trotz adäquater Volumensubstitution kommt es zum sepsisinduzierten Schock mit Hypotonie. Zusätzlich bestehen Durchblutungsstörungen, die zu Laktatazidose, Oligurie und Veränderung der Bewusstseinslage führen können (3,96).

### Refraktärer septischer Schock:

Definiert durch einen septischen Schock, bei der eine intravenöse Volumengabe oder Vasopressoren (z. B. Dopamin) nicht zu einer raschen Veränderung führt.

### Sepsis mit Multiorganversagen:

Es bestehen die klinischen Kriterien des septischen Schocks mit zusätzlicher Schädigung verschiedener Organe, eine Homöostase ohne Intervention kann nicht aufrechterhalten werden (3,96).

## **1.1.2 Pathogenese der Sepsis**

Auslöser einer Sepsis können Endotoxine, Exotoxine, Pilze, Viren und Bakterien sein. Sie führen an erster Stelle zu einer Aktivierung von Mediatoren, die sich kaskadenartig verstärken. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer morphologischen Zellschädigung, die zu Organschäden und zu einem Multiorganversagen führen kann.

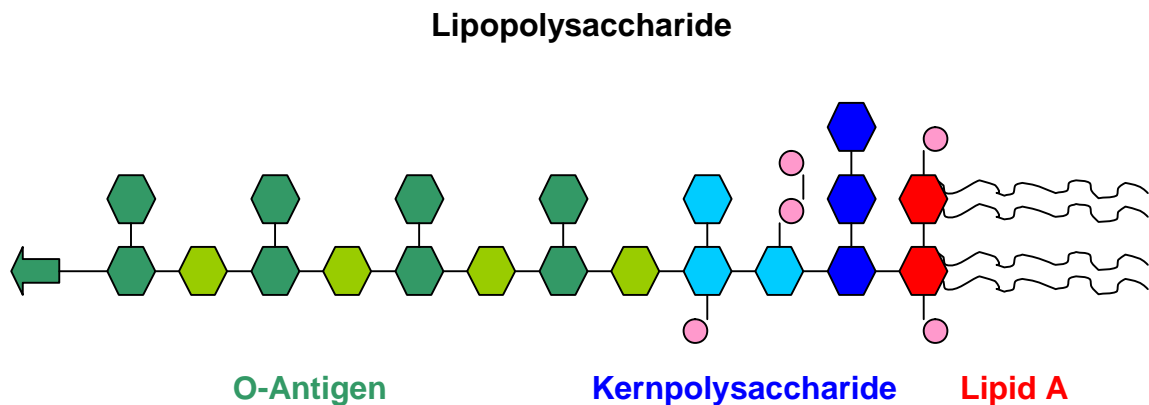
In dieser Studie wollte man den Einfluss von Endotoxinen, genauer von Lipopolysacchariden (LPS), die Bestandteile von Escherichia coli Bakterien sind, betrachten.

### **1.1.2.1 Mediatoren der Sepsis**

- **Lipopolysaccharide**

Lipopolysaccharide kommen in der äußeren Hälfte der Zellhülle von gramnegativen Bakterien vor. Während der innere Teil der Zellwand aus Polysacchariden besteht, weist der äußere Teil als Hauptbestandteil Lipopolysaccharide auf. LPS teilt sich in ein O-Antigen, ein Kernpolysaccharid und ein Lipid A auf. Die eigentliche pathogene Potenz besitzt das Lipid A, welches auch als Membrananker zu anderen Zellen dient.





**Abbildung 1: Molekulare Struktur von LPS (40)**

Wenn gramnegative Bakterien in den menschlichen Körper gelangen, führen sie zur Aktivierung von Zellen des mononukleären phagozytierenden Systems. Diese phagozytieren die Bakterien, Lipopolysaccharide werden freigesetzt und stimulieren die Phagozyten zur Aktivierung von Zytokinen, wie z. B. den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Weiterhin wird der plättchenaktivierender Faktor (PAF), das Komplement und das Gerinnungssystem aktiviert (11,37).

Wie LPS Makrophagen zur Bildung von Zytokinen aktiviert, bleibt noch zum Teil unklar. LPS komplexiert mit dem LPS-bindenden Protein (LBP) und dem Oberflächenprotein CD 14 von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Das Serumglykoprotein LBP verstärkt die Bildung dieses Komplexes. Der *Toll like Rezeptor-4* (TLR-4) ist ein Rezeptor für gramnegativen Lipopolysacchariden von z. B. Makrophagen. TLR-4 bindet an seiner extrazellulären Domäne das MD 2 Adapterprotein, welches einerseits für die richtige Lokalisation von TLR-Rezeptoren an Makrophagen verantwortlich ist, andererseits stabilisiert es die Bindung zwischen dem LPS-Molekül und dem TLR-4 Rezeptor und verstärkt die LPS- induzierte Aktivierung von TLR-4. Die intrazelluläre Domäne von TLR-4 enthält eine so genannte TIR-Region (*Toll/IL-1 receptor homologous region*), die für das Auslösen nachfolgender Signalreaktionen notwendig ist. Das Adapterprotein MyD88 bindet an die TIR-Region und führt zur Rekrutierung von der Proteinkinase IRAK (IL-1R-assoziierte Kinase).

Aktiviertes IRAK verlässt den MyD88-TLR-4 Komplex und verbindet sich vorübergehend mit einem weiteren Adaptermolekül TRAF 6 (*TNF Receptor-Associated Factor 6*). Nach weiteren kaskadenartigen Reaktionsprozessen kommt es

zur Aktivierung von I $\kappa$ B-Kinasen (IKK). Dadurch wird NF- $\kappa$ B aus dem bestehenden Komplex freigesetzt und kann anschließend in den Zellkern übertreten, wo es als Transkriptionsfaktor die Expression von Zytokinen, wie z.B. IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ , induziert (2, 6, 35, 42, 68, 82, 98).

LPS stimuliert über die Ausschüttung von Mediatoren die Expression von Adhäsionsmolekülen, welche anschließend als lösliche Adhäsionsmoleküle, wie zum Beispiel cE-Selektin, im Blut nachgewiesen werden können (45,92).

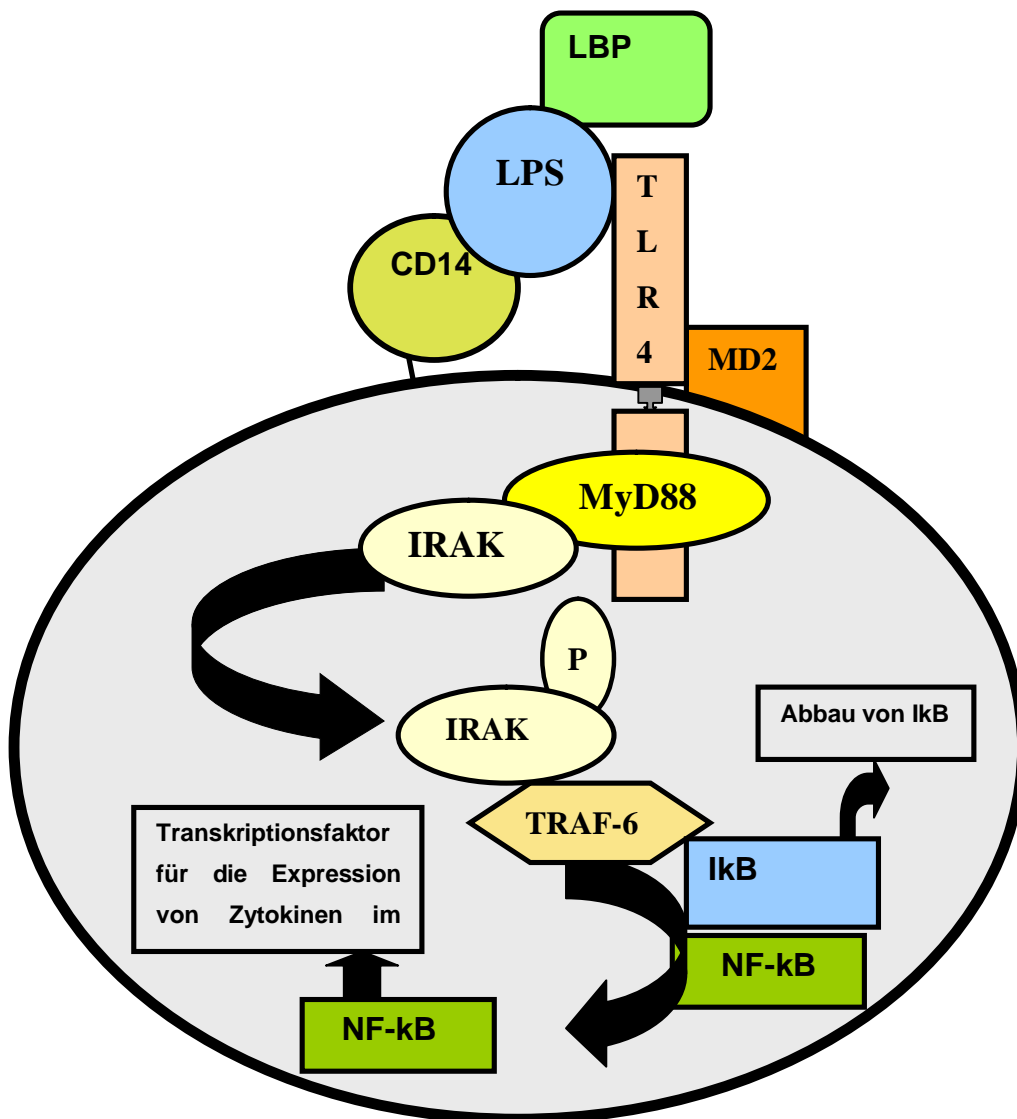


Abbildung 2: Möglicher Rezeptorkomplex und Reaktionsweg von LPS (82)

- **Tumornekrosefaktor- $\alpha$**

Tumornekrosefaktor- $\alpha$  spielt eine zentrale Rolle bei systemischen Entzündungen. Es steigert die Expression und Ausschüttung folgender proinflammatorischer Mediatoren:

Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6, Interleukin-8,  $\gamma$ -Interferon, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, plättchenaktivierender Faktor, Leukotriene, Thromboxan A<sub>2</sub> und Prostaglandine.

TNF- $\alpha$  führt zur Aktivierung des Komplementsystems, des Gerinnungssystems und der Akuten-Phasen-Proteine. Zusammen mit Interleukin-1 $\beta$  und/oder Interleukin-6 induziert es Fieber durch Erhöhung der Körpertemperatur im Hypothalamus.

Makrophagen werden aktiviert und führen zur Freisetzung von Elastase und Superoxyd, weiterhin wird die Lyse von bakteriellen Bestandteilen induziert. TNF- $\alpha$  induziert die Aktivierung des Endothels mit einer vermehrten Freisetzung von Adhäsionsmolekülen und somit eine vermehrte Adhärenz von Leukozyten und Thrombozyten an Endothelzellen. Die Gefäßpermeabilität erhöht sich, Leukozyten, Immunglobulin (Ig) A und Komplementfaktoren strömen vermehrt in das Entzündungsgebiet und gleichzeitig führt es zu einem vermehrten Flüssigkeitseinstrom in das Gewebe. Klinische Symptome sind Hyperventilation, Fieber und Tachykardie. Systemische Folgen können eine Verringerung des Blutvolumen bis hin zum Schock, Hypoproteinämie, Neutropenie mit anschließender Neutrophilie, verbreiterte intravasale Blutgerinnung und multiples Organversagen, bis hin zum Tod sein.

TNF- $\alpha$  ist ein möglicher Parameter zur Beurteilung des Schweregrades der Sepsis (11, 15, 26, 35, 37, 52, 59, 81, 92).

- **Interleukin- 6**

TNF- $\alpha$  bewirkt die Ausschüttung von Interleukin-6 aus Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen. Interleukin-6 bewirkt zum einen eine Aktivierung bzw. Differenzierung der B-Zellen, zum anderen wirkt es synergistisch mit TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auf die Bildung von Akuten-Phasen-Proteinen und der Erhöhung der Körpertemperatur mit Bildung von Fieber. IL-6 besitzt proinflammatorische Wirkungen auf viele Zellarten, wie z. B.

B-Zellen und Fibroblasten und ist mitbeteiligt an der septisch bedingten Hyperkoagulabilität.

Ebenso wie TNF- $\alpha$  führt es zu einer verstärkten Bildung von Adhäsionsmolekülen und eine gesteigerte Diapedese von Leukozyten in das Entzündungsgebiet. Interleukin-6 kann als guter Parameter eingesetzt werden, um den Schweregrad einer Sepsis zu beurteilen (11, 15, 19, 26, 30, 35, 52, 59).

- **Interleukin-1 $\beta$**

Wirkt synergistisch mit Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und Interleukin-6, induziert die Bildung von Proteinen der Akutphase und erzeugt ebenfalls Fieber durch Erhöhung der Körpertemperatur im Hypothalamus. Das Zytokin Interleukin-1 $\beta$  bewirkt die Ausschüttung von Interleukin-6, Interleukin-8, plättchenaktivierender Faktor, Leukotrien, Thromboxan A<sub>2</sub>, Prostaglandine und auch Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .

Es aktiviert T-, und B-Zellen. Adhäsionsmoleküle werden verstärkt gebildet und führen dadurch zu einer vermehrten Adhäsion von Monozyten und Leukozyten an Endothelzellen bzw. eine vermehrte Diapedese dieser Zellen in das Entzündungsgebiet (11, 15, 26, 35, 52, 59).

- **Interleukin- 8**

Interleukin-8 wird durch TNF- $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$  freigesetzt. Die Zielzellen sind Monozyten, Endothelzellen und Leukozyten. Besonders wichtig ist die verstärkte Effektivität von Adhäsionsmolekülen durch verbesserte Bindung von  $\beta_2$ -Integrinen und somit die Hilfe bei der Diapedese der Leukozyten durch das Endothel. Zusätzlich besitzt Interleukin-8 eine chemotaktische Wirkung auf Leukozyten und Monozyten, welche hilft, die Zellen schneller an das Entzündungsgebiet zu locken (11, 15, 26, 35, 37, 52, 59).

- **$\gamma$ -Interferon**

$\gamma$ -Interferon bewirkt die Freisetzung von Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$  und Interleukin-6. Es wirkt synergistisch mit TNF- $\alpha$  und es besteht eine Interaktion mit verschiedenen Zytokine. Zusätzlich werden Adhäsionsmoleküle vermehrt an den Endothelzellen aktiviert. Es ist sowohl an der Erzeugung von Fieber mit anderen Zytokinen beteiligt, als auch an der Antikörperproduktion.  $\gamma$ -Interferon stellt den

wichtigsten Anreiz der Makrophagenaktivierung dar und fördert die Endozytose und Phagozytose (11, 35, 26, 59).

### 1.1.2.2 Zelluläre Komponenten

- **Monozyten/ Makrophagen**

Makrophagen reifen kontinuierlich aus zirkulierenden Monozyten heran. Sie werden im Falle einer Sepsis durch LPS, TNF- $\alpha$  und  $\gamma$ -Interferon aktiviert (37). CC-Chemokine, wie z. B. das *Human Macrophage Chemoattractant and Activating Factor* (MCAF), locken sie an das Entzündungsgebiet und helfen bei der Diapedese durch Endothelzellen (37). Primäre Aufgaben sind Antigenpräsentation, Phagozytose und Mediatorfreisetzung. Die Mediatorfreisetzung wird durch den LPS-LBP-Komplex und den *Toll Like Receptor-4* (TLR-4) in Verbindung mit dem CD14 – Membranprotein der Monozyten und Makrophagen ausgelöst (2, 6, 35, 42, 68, 82, 98).

Die für die Pathogenese der Sepsis wichtigsten ausgeschütteten Mediatoren sind:

- IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ ,  $\gamma$ -Interferon
- Komplementfaktoren
- Elastase, Kollagenase (lokale Gewebsschädigung)
- *Intercellular-Adhesion-Molecule-1* (ICAM-1),
- *Lymphocyte-Function- Associated-Antigen-1* (LFA-1)
- Prostaglandine, Leukotriene und den plättchenaktivierender Faktor

Aktivierte Makrophagen bilden Sauerstoffradikale, Stickstoffoxid und antimikrobielle Proteine, die bakterizid wirken (37).

- **Neutrophile Granulozyten**

Eine weitere Schlüsselrolle bei der Immunabwehr des Körpers spielen neutrophile Granulozyten. Sie werden entweder direkt durch Endotoxin oder durch Komplementfaktoren, wie z. B. C5a, und durch Zytokine, wie z. B. TNF- $\alpha$ , IL-1 und

IL-6 ausgeschüttet. CXC-Chemokine, wie z. B. das IL-8, regen neutrophile Granulozyten an, die Blutbahn zu verlassen und in das Entzündungsgebiet zu wandern (37). Dort können sie auf der einen Seite von sich aus pathogene Bestandteile phagozytieren. Auf der anderen Seite aktivieren sie verschiedene Mediatoren, wie z. B. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6, indem sie z. B. das LPS-LBP-Molekül indirekt durch das CD14 Molekül und den TLR- Rezeptor binden (2, 6, 35, 42, 68, 82, 98). Die Zytokine lösen die nichtadaptive Reaktionen der Immunantwort aus (37).

Neutrophile Granulozyten synthetisieren zudem ein Gemisch aus toxischen Sauerstoffmetaboliten, Stickoxid, Proteasen (z. B. Elastase, Kollagenase), Phospholipasen und antibakteriellen Proteinen, die nun ebenfalls versuchen, Keime zu eliminieren (37).

### 1.1.2.3 Bedeutung der Adhäsionsmoleküle

Zytokine induzieren eine vermehrte Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche von zirkulierenden Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen. Adhäsionsmoleküle bewirken eine verbesserte Interaktion von z. B. Leukozyten mit Leukozyten oder Leukozyten mit Endothelzellen. Weiterhin können Monozyten und neutrophile Granulozyten durch Hilfe von Adhäsionsmolekülen mit erhöhter Geschwindigkeit in das Entzündungsgebiet gelangen (37).

Es gibt verschiedene Gruppen:

Selektine:

<u>Art der Selektine:</u>	<u>Ort der Exprimierung:</u>
• E-Selektin	Endothelzellen
• P-Selektin	Thrombozyten und Endothelzellen
• L-Selektin	Leukozyten (1, 37)

### Integrine:

- *Lymphocyte-Function-Associated-Antigen-1* (LFA-1 = CD 11a/ CD18)
- *Membrane Attack Complex-1* (Mac-1 = CD 11b/CD 18)
- *Very-Late-Activating-Antigen-4* (VLA -4 = CD94d/CD29)

Diese Integrinarten werden alle von Leukozyten exprimiert (1, 37).

### Ig- Superfamilie:

- *Intercellular-Adhesion-Molecule-1* (ICAM-1 = CD54)
- *Intercellular-Adhesion-Molecule-3* (ICAM-3 = CD 50)
- *Vascular-Cell-Adhesion-Molecule-1* (VCAM-1 = CD106)

Diese Integrinarten werden alle von Endothelzellen exprimiert (1, 37).

Nachdem Endotoxin oder Zytokine, wie z. B. TNF- $\alpha$ , Leukozyten oder Makrophagen aktiviert haben, durchlaufen sie verschiedene Stadien bis sie an den Infektionsort gelangen:

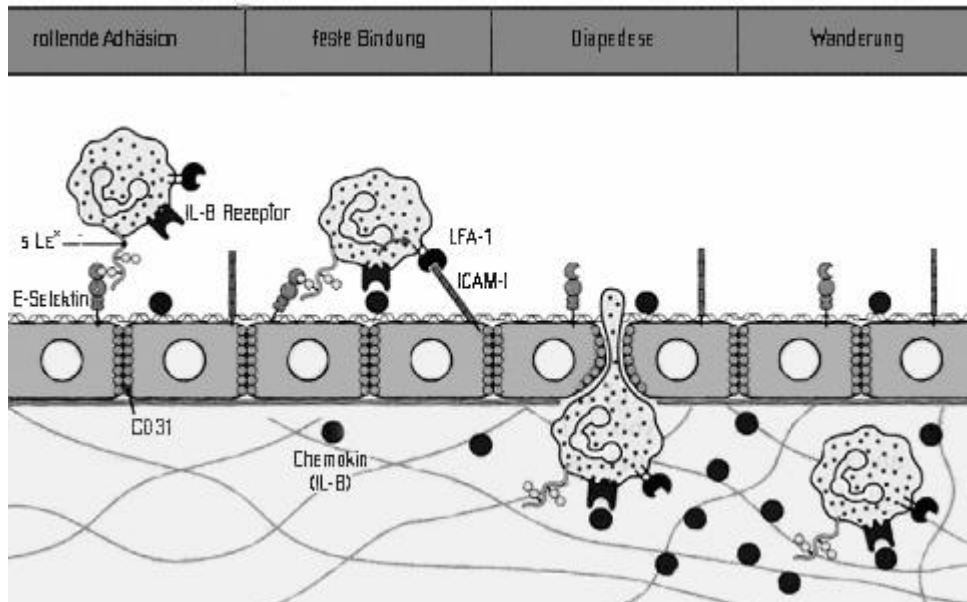
Zuerst rollen die Leukozyten an den Endothelzellen entlang. Anschließend verbindet sich das exprimierte endothelspezifische E-Selektin mit dem Kohlenhydrat-Liganden, der Sialyl-Lewis-Rest, des Leukozyten. Die Expressierung wird ebenfalls durch TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 und Endotoxin aktiviert (38).

Diese Verbindung wird durch den Blutfluss immer wieder gelöst und erneut gebildet. Sie lösen nach einer gewissen Zeit folgende Wechselwirkungen aus. Die Endothelzellen werden durch TNF- $\alpha$ , IL-1 und  $\gamma$ -Interferon aktiviert, das Molekül ICAM-1 zu bilden, während auf den Leukozyten Integrine LFA -1 und Mac-1 als Liganden gebildet werden (37, 38).

Das CXC-Chemokin IL-8 hilft bei der Umwandlung in eine stabile Bindung. Es bewirkt eine Konformationsänderung von LFA -1 und Mac -1, so dass sich die

Adhäsionskapazität erhöht und die ursprünglich runden Leukozyten in eine flachere Form übergehen (37).

Nun folgt die Diapedese durch die Gefäßwand, wobei erneut die Integrine LFA -1 und Mac -1 adhäsive Wechselwirkungen verursachen. Als letzter Schritt wandert der Leukozyt nun zum Infektionsort (37). IL-8 leitet die Leukozyten entlang eines steigenden Konzentrationsgradienten zum Entzündungsherd (37).



**Abbildung 3: Adhäsion, Bindung, Diapedese und Wanderung der Leukozyten zum Infektionsort (42)**

Wie in der Beschreibung der Leukozytenwanderung ersichtlich wird, spielen Adhäsionsmoleküle, wie z. B. E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 eine wichtige Rolle bei der Endothelzellaktivierung und bei der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel. Nach diesen Vorgängen wirken proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-2, Interleukin-6,  $\gamma$ -Interferon, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) und führen zu einer Ablösung von E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1, welches als „shedding“ bezeichnet wird (50). Sie werden nun als cE-Selektin, cVCAM-1 und cICAM-1 bezeichnet und besitzen nur noch die extrazelluläre Struktur des membranständigen Moleküls (38, 71). Die löslichen Adhäsionsmoleküle besitzen ebenfalls bestimmte Funktionen. Sie sind biologisch aktiv.



ICAM-1 bindet an LFA-1 und Mac-1 und kann nach der Vermutung von ROTHLEIN et al. eine erneute Zelladhäsion durch Bindung an den Rezeptor verhindern (38, 71). Mehrere Studien belegen, dass cICAM-1 im septischen Schock, einer komplizierten SIRS und im Multiorganversagen erhöht ist und als Marker für die Leukozytenaktivierung und für die Höhe der Aktivierung der membranständigen Adhäsionsmoleküle benutzt werden kann. Ansonsten ist es jedoch ein relativ unspezifischer Marker und wird lediglich zur Beurteilung der Organdysfunktion herangezogen (10,16, 23, 24, 38, 79 ).

cE-Selektin bindet an den sLeX-Rezeptor von neutrophilen Granulozyten und verhindert somit, dass sich membranständige Adhäsionsmoleküle dort anbinden. Auch hier besteht die Vermutung, dass eine weitere Adhäsion von Leukozyten an das Endothel verhindert wird (16, 38, 50). Es existiert jedoch auch die Theorie, dass cE-Selektin Leukozyten anlockt, um mit den Integrinen LFA-1 oder MAC-1 und dem Liganden des membranständigen E-Selektin in Verbindung zu treten (38).

Weitere Studien belegen ,dass cE-Selektin ebenso bei schwerer Sepsis, septischen Schock und im septischen Multiorganversagen erhöht ist und als Marker für die Endothelschädigung benutzt werden kann. Ebenso scheint die Erhöhung von cE-Selektinen von der Dosis der LPS-Gabe abhängig zu sein (45, 51).

cE-Selektin kann zudem ein relativ frühzeitiger Indikator für den Beginn einer schweren Sepsis sein und prognostisch für den Verlauf und Ausgang der Sepsis benutzt werden (10, 16, 18, 23, 24, 41).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl Makrophagen, als auch neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von Bakterien spielen. Bei dem Krankheitsbild der Sepsis werden jedoch sowohl Zytokine (wichtigstes Beispiel TNF- $\alpha$ ), als auch zelluläre Komponenten zu stark aktiviert, so dass es zu einer eigenen Gefäßschädigung kommt, durch eine zu häufige und starke Leukozytenadhäsion. Es bewirkt den Verlust der Barrierefunktion des Endothels und führt zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität mit Verlust von Plasma und Proteinen. Kommt es zu einem unkontrollierten Eiweißverlust ins Gewebe, entstehen lokale Ödeme und Zellschädigung (11).

Die Erhöhung von Adhäsionsmolekülen und die damit verbundene Leukozytenadhäsion ist mitverantwortlich für die Frühphase der Sepsis und die Entstehung von einem septischen Multiorganversagen.

### 1.1.3 Folgen der Sepsis

Sowohl Endotoxin als auch TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 führen zur Aktivierung des Gerinnungssystems. LPS führt ebenso zur Aktivierung des Kininsystems.

Endotoxin aktiviert direkt den Hageman-Faktor. Es folgt eine Umwandlung zum Faktor XIIa, der in Folge weitere Bildungen von Gerinnungsfaktoren auslöst und somit der intrinsische Teil des Gerinnungssystems aktiviert wird (8). Endotoxin löst jedoch hauptsächlich den Weg der extrinsischen Gerinnung durch gesteigerte Expression des Gewebefaktors (*Tissue-Factor*, TF), der auf der Oberfläche von Monozyten und Endothelzellen exprimiert wird und den aktivierten Faktor VII bindet (47, 48, 94).

Der natürliche Inhibitor von Thrombin und Faktor X ist Antithrombin. Er wird durch die fortlaufende Thrombinbildung schnell verbraucht. Weiterer Inhibitor des Gerinnungssystem ist das Protein C und sein natürlicher Verstärker, das Protein S.

Sie inhibieren den Faktor Va und VIIIa und werden durch Thrombin und einem endotheliale Oberflächeprotein Thrombomodulin aktiviert. Im septischen Geschehen wird die Expression von Thrombomodulin auf Endothelzellen höchstwahrscheinlich durch Zytokineinwirkung, insbesondere TNF- $\alpha$ , herabgesetzt und folglich sinkt auch die Konzentration von Protein C. Dies führt zu einem prokoagulatorischen Zustand (47, 48, 94).

Am Anfang der Thrombinbildung besteht als natürliches gegenregulatorisches System die Fibrinolyse. Dieses wird durch die Aktivität verschiedener Plasminogen-Aktivatoren, t-PA und u-PA, eingeleitet und führt zur Bildung von Plasmin, welches Fibrinpolymere aufspalten kann. Während einer Sepsis wird die Fibrinolyse nach kurzer Zeit durch den Anstieg von Plasminogen Aktivator Inhibitor Type 1 beendet.

Das Ungleichgewicht zwischen Gerinnung und Fibrinolyse wird weiter in den prokoagulatorischen Zustand verschoben und führt zum Entstehen der Disseminierten Intravasalen Gerinnung (47, 48, 94). Es kommt einerseits zur Bildung von Mikrothromben in der Endstrombahn, die zu Schock und ischämischen Gewebsschädigungen an verschiedenen Organen mit möglichen Multiorganversagen führt. Andererseits bewirkt dieser Zustand einem hohen Verbrauch an Gerinnungsfaktoren, bei der sich anschließend eine hämorrhagische Diathese, ebenfalls als Verbrauchskoagulopathie benannt, mit allgemeiner Blutungsneigung und einem erhöhten Blutverlust entwickeln kann. Sekundär entsteht oft eine reaktive Hyperfibrinolyse (31).

Zusätzlich wird durch den Hageman-Faktor Präkallikrein in Plasmakallikrein umgewandelt. Die Protease dieser Umwandlung ist das High-Molecular-Weight-Kininogen, welches dabei Bradykinin abspaltet. Bradykinin aktiviert wiederum EDRF (Endothel-derived hyperpolarization Faktor), welches zur Relaxation von glatten Gefäßmuskelzellen, zur Vasodilatation und zur gesteigerten Kapillarpermeabilität führt (22).

## 1.2 Enalapril

In unserer Studie wurde den Probanden Renitec verabreicht. Renitec ist ein ACE-Hemmer, der aus der Zusammensetzung von Enalaprilmaleat und als Hilfsstoffe Natriumbikarbonat, Maisstärke, Laktose, prägelatinierte Stärke, rotes Eisenoxid, gelbes Eisenoxid und Magnesiumstearat besteht.

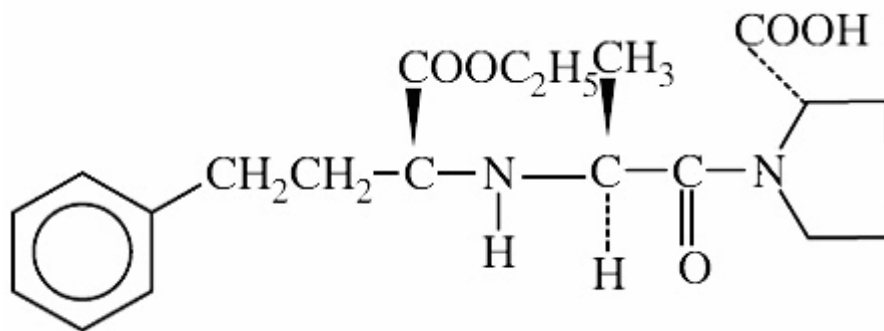


Abbildung 4: Chemische Struktur von Enalapril (41)

### 1.2.1 Pharmakodynamik

Das Angiotensin Converting Enzym ist eine Peptidyl-dipeptidase, welche einerseits die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II katalysiert, andererseits ist das ACE identisch mit der Kininase II und führt zum Abbau des Peptids Bradykinin. Bradykinin stimuliert über den B<sub>2</sub>-Rezeptor die Freisetzung von NO.

Angiotensin (AT) II besitzt mehrere Rezeptoren, von denen AT-II-1 und AT-II-2 am ausführlichsten erforscht wurden. Diese zwei Rezeptoren vermitteln zum Teil gegensätzliche Wirkungen (20).

AT-II-1 kommt ubiquitär vor und bewirkt eine koronare, renale und zerebrale Vasokonstriktion, die Aldosteronfreisetzung, die Natrium-, Wasserretention, eine

positiv inotrope Wirkung am Herzen und die Hypertrophie von Myozyten und glatter Muskulatur.

AT-II-2 befindet sich am Herzen, an den Nebennieren, am Endothel, im Keimgewebe und im zentralen Nervensystem. Dieser Rezeptor führt zur Vasodilatation, weiterhin wird das Zellwachstum gehemmt, die Apoptose induziert und die Angiogenese gestoppt (20).

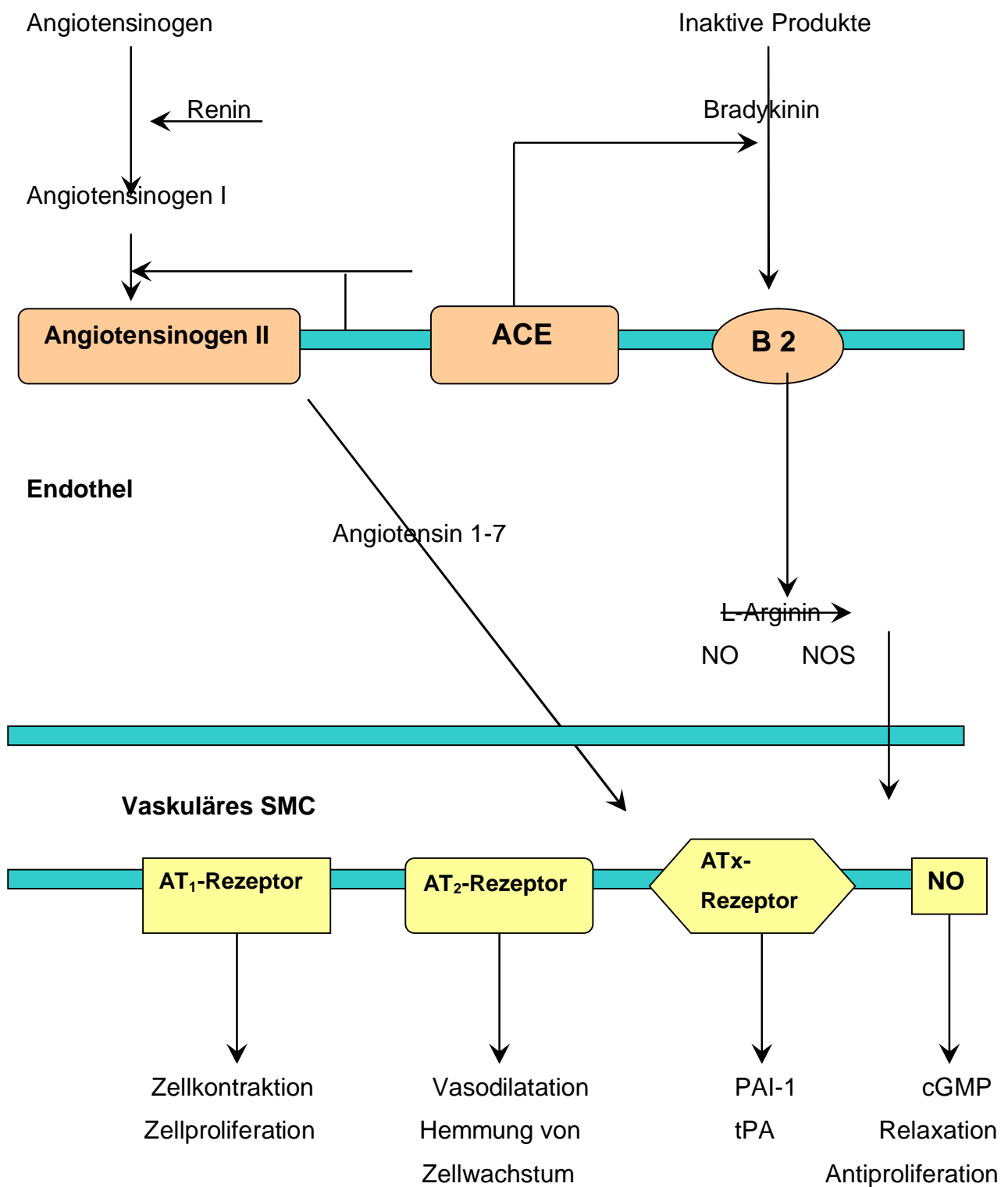
Der ACE-Hemmer blockiert nun kompetitiv die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II. Wird die Bildung von Angiotensin II blockiert, werden beide Rezeptortypen, AT-II-1 und AT-II-2, nicht aktiviert. Als Folge nimmt der arterielle Gefäßwiderstand ab, ebenso die Aldosteronproduktion und die aldosteronabhängige Salz-, und Wasserretention. Weiterhin resultiert eine Abnahme des Sympathikustonus, da der stimulierende Effekt auf das Noradrenalinsystem entfällt. Der Blutdruck wird sowohl kurz-, als auch langfristig bei essentieller und renovaskulärer Hypertonie gesenkt. Langzeiteffekte treten auch bei niedriger Plasminogenaktivität ein. Bei manifester Herzinsuffizienz wird der periphere Gefäßwiderstand gesenkt und die Kapazitätsgefäße werden erweitert. Bei Myokardinsuffizienz senken ACE-Hemmer die Nachlast, die Herzfrequenz nimmt gleichzeitig ab. Ungünstige Umbau-, und Anpassungsvorgänge des Herzen können langfristig bei Postinfarktpatienten vermindert werden und bei einem Teil der Patienten kann die Progression einer Linksherzinsuffizienz verhindert werden (31, 51).

ACE-Hemmer haben bisher die größte Effektivität bewiesen, um den Ablauf der verhängnisvollen Kaskade von ischämischer Kardiomyopathie und Hypertension zu fortschreitender Ventrikeldysfunktion, Herzinsuffizienz und Remodeling des Myokards zu unterbrechen.

Langfristig können ACE-Inhibitoren zur Gefäß- und Nephroprotektion eingesetzt werden. Sie führen zur Abnahme des intraglomerulären Drucks, glomerulosklerotische Prozesse werden verlangsamt und es führt zu einer Senkung bei bestehender Proteinurie (31, 36, 51).

Weiterhin wird der Abbau von Bradykinin gehemmt. Bradykinin kann dadurch vermehrt seine Wirkungen im Bereich des Endothels und der Muskulatur entfalten. Seine hauptsächliche Wirkung ist die Vasodilatation. Bradykinin setzt Stickstoffmonoxyd frei, welches eines der stärksten Vasodilatoren am Endothel ist.

Weiterhin werden Prostaglandine und ein sogenannter *endothial derived hyperpolarization factor* (EDHF) freigesetzt, der zur endothelabhängigen Vasodilatation führt. Zudem entsteht eine erhöhte Insulinsensitivität, eine verbesserte Glukoseutilisation und Bradykinin wirkt vasoprotektiv (51, 65, 77). In vergangener Zeit wurde zunehmend die Funktion von Bradykinin mit der verbundenen Ausschüttung von NO definiert. Stickstoffmonoxid inhibiert die Aggregation von Leukozyten und verhindert bei ausreichend bestehender Konzentration die vermehrte Ausschüttung von Zytokinen und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (22, 88). Bradykinin zeigt zudem antithrombogene Eigenschaften. Während Angiotensin II über eine verstärkte Bildung von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1) die Balance in Richtung der Thrombose begünstigt, bewirkt umgekehrt Bradykinin einen Anstieg der Plasmakonzentration von Gewebs-Plasminogen Aktivator (t-PA), der die Fibrinolyse einleitet (22).



**Abbildung 5: Interaktion des Renin-Angiotensin-Systems mit dem L-Arginin/ NO-System (22)**

Verschiedene Studien belegen, dass ACE-Inhibitoren eine Reduktion der Mortalität bei Risikopatienten erreichen können (51). Die *Studies of Left Ventricular Dysfunction* (SOLVD-Studie) belegte eine Mortalitätssenkung bei Patienten mit Herzinsuffizienz in den Stadien II und III der *New York Heart Association* (NYHA) durch ACE-Hemmer von 16 % (86). Bei Patienten nach Herzinfarkt konnte in der *Survival and Ventricular Enlargement Study* (SAVE-Studie) eine Abnahme der Mortalität um 21 %, der Reinfarktquote um 25% und der Progression der Linksherzinsuffizienz um 36 % in der Captoprilgruppe gegenüber der Placebogruppe erzielt werden (85). Ebenso bewies die *Acute Infarction Ramipril Efficacy* (AIRE-Studie) eine signifikante Abnahme der Mortalitätsrate bei Patienten nach Herzinfarkt mit dem ACE-Inhibitor Ramipril gegenüber der Placebogruppe (83). Eine andere Studie verdeutlichte die Vorzüge von Enalapril in der *Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study* (CONSENSUS-Studie). Bereits nach sechs Monaten war die Gesamtmortalität in der Enalapril-Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe um 40 % gesunken, nach einem Jahr lag diese Zahl nur noch bei 31% und am Ende der Studie bei 27 %. Bei der Auswertung der registrierten Daten ergab sich unter Enalapril ein Rückgang der Sterblichkeit um 50 % (84).

Mehrere Studien zeigen die Wirkungsweise von ACE-Inhibitoren bei der Senkung von löslichen Adhäsionsmolekülen in verschiedenen Krankheitsbildern, wie zum Beispiel bei der diabetischen Nephropathie, dem Hypertonus und der chronischen Herzinsuffizienz (4, 21, 27, 40).

Zusätzlich werden hier noch wichtige Nebenwirkungen, die durch Enalapril auftreten können, aufgeführt: Hustenreiz, Schwindel, Hautreaktionen mit Exanthenen oder angioneurotisches Ödem, Fieber, Pruritus, Geschmacksverlust, gastrointestinale Störungen, Nierenfunktionsstörungen mit Proteinurie, Kreatininanstieg und Hyperkaliämie, insbesondere bei niereninsuffizienten Patienten. Initial ist ein starker Blutdruckabfall mit daraus folgenden Ohrensausen, Seh-, und Gleichgewichtsstörungen möglich. Dies tritt insbesondere nach Diuretikavorbehandlung, bei Patienten mit Herzinsuffizienz oder bei bestehenden hohen Salz-, und Wasserverlusten auf (65, 77).

## **1.2.2 Pharmakokinetik**

Enalapril ist ein Prodrug, was in der Leber durch Esterabspaltung in das aktive Enalaprilat umgewandelt wird. Nach oraler Gabe werden bis zu ca. 40 - 60 % Bioverfügbarkeit angegeben.

Bei normaler Nierenfunktion wird ein *Steady-State* der Serumenalaprilatkonzentration nach vier Tagen erreicht.

Die Resorption wird durch die gleichzeitige Aufnahme von Nahrung nicht beeinflusst. Der Wirkungseintritt erfolgt bei einer Einzeldosis nach einer Stunde, das Wirkungsmaximum wird nach 4 - 6 Stunden erreicht und die Wirkungsdauer beträgt ca. 24 Stunden.

Die Plasmaproteinbindung ist unter 50 % und die Plasma ACE-Hemmung wird nach 8 Stunden erreicht.

Enalaprilat kann die Plazentaschranke nicht passieren und eventuell besteht ein geringfügiges Passieren der Blut-Hirn-Schranke.

Außer der Umwandlung von Enalapril zu Enalaprilat gibt es keine weiteren Hinweise im Metabolismus. Enalapril wird hauptsächlich renal eliminiert, wobei bis zu 40 % Enalaprilat und der Rest Enalapril im Urin nachweisbar sind (29, 51, 77).

## **1.3 Ziele der Studie**

### **1.3.1 Allgemeine Ziele/ Rationale für die Verwendung von Enalapril**

Enalapril ist hauptsächlich in seiner Wirkungsweise im kardiologischen Bereich erforscht worden. Mehrere Studien befassten sich mit der Bradykininerhöhung durch ACE-Inhibitoren, in Zusammenhang mit den weiteren Wirkungen von ACE-Inhibitoren. Es wurden neue Therapieansätze bei Patienten mit chronischem Herzversagen, Ischämie nach Myokardinfarkten, Hypertension, Atherosklerose und anderen kardiovaskulären Erkrankungen erforscht (9, 21, 28, 34,69, 93).

Man untersuchte die hämodynamischen und metabolischen Wirkungsweisen von Kininen, Bradykinin und Nitrid Oxid (NO), die in ihren Funktionen voneinander abhängig sind, und mit Angiotensin II in einem natürlichen Gleichgewicht zueinander stehen müssen, damit vaskuläre Schäden vermieden werden (9, 28).

Bradykinin und NO haben vasoprotektive Eigenschaften, die jedoch noch nicht vollständig in ihrer Funktion bekannt sind. Um in diesem Bereich therapeutische Fortschritte zu machen, versuchte man die Wirkungsweise von ACE-Inhibitoren, wie



z. B.. Enalapril, auch im septischen Bereich einzusetzen, die jedoch genauso wichtige Erkenntnisse für die kardiologischen und anderen inflammatorischen Erkrankungen hätten.

In einer vorherigen Studie der klinischen Pharmakologie Wien wurde eine Erhöhung von Adhäsionsmolekülen unter dem Einfluss von LPS festgestellt (39). Die erhöhte Konzentration von Adhäsionsmolekülen ist ein pathogenetischer Faktor, der zu vaskulären Schäden führen kann, und soweit dazu beitragen kann, dass sich ein Multiorganversagen bei septischen Patienten entwickelt.

Verschiedene Studien belegen, dass ACE-Inhibitoren lösliche Adhäsionsmoleküle bei verschiedenen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Hypertonie, in variierenden Patientengruppen verringern können (4, 10, 21, 27, 40, 55).

Auf diesen Erkenntnissen basierend wurde die Hypothese aufgestellt, dass Enalapril eine Erhöhung der Konzentration von Adhäsionsmolekülen bei einer septischen Erkrankung verhindern könnte. In dieser Studie wird die Aktivierung des Endothels und von Leukozyten, induziert durch LPS und vermittelt durch TNF- $\alpha$ , in einem standardisierten menschlichen Modell an Probanden untersucht (80, 92).

### **1.3.2 Spezielle Ziele**

Die speziellen Ziele bestehen darin, den Effekt von 2 ng/kg Endotoxin mittels einer intravenösen Bolus-Injektion, nach Gabe des Placebos oder von Enalapril je nach Gruppeneinteilung, zu verabreichen und am Studientag (6.Tag) verschiedene, nachfolgend aufgeführte Parameter durch bestimmte Untersuchungen zu bestimmen:

- Expression von CD11b und CD54 auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten
- cE-Selektin, cICAM-1 und cVCAM-1
- TNF- $\alpha$
- Subjektive Symptome
- Herzfrequenz und Blutdruck
- Konzentrationswerte von Leukozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten

Die differenten Dosierungen von Enalapril zwischen den Gruppen soll die verschiedenen Parameterwerte und die Wirkungsweise von Enalapril auf die septischen Vorgänge besser erkennen lassen und darstellen.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Probanden

In der Studie wurden 30 männliche Probanden gesucht, im Alter zwischen 19 und 40 Jahren, die gesundheitlich, einschließlich normaler Laborwerte, unauffällig waren.

Folgende Angaben waren Ausschlusskriterien bei der Probandensuche:

- regelmäßiger Gebrauch von Medikamenten oder Alkohol
- Teilnahme an einer klinischen Studie im Zeitrahmen der letzten drei Wochen
- Symptome einer klinisch relevanten Krankheit in den letzten drei Wochen
- Behandlung mit Medikamenten in den letzten drei Wochen
- Bekannte allergische Reaktionen oder Angioödem gegen ACE-Inhibitoren

Den Probanden wurde, nach freiwilliger Zustimmung, eine ausführliche Erläuterung über den Studienablauf bzw. Studienziele schriftlich und mündlich mitgeteilt. Zur rechtlichen Absicherung unterschrieben die Studienteilnehmer die gelesene Probandeninformation und Einverständniserklärung.

Eine ausführliche Voruntersuchung, die zwei bis drei Wochen vor Studienbeginn durchgeführt wurde, hat einen normal gesundheitlichen Zustand des Probanden bestätigt oder führte bei klinisch relevanten Auffälligkeiten ebenfalls zum Ausschluss.

Voruntersuchung: (nüchterner Zustand als Voraussetzung)

- Anamnese von Krankheiten, Operationen im zeitlichen Rückblick
- Beurteilung des Allgemeinzustand und körperliche Untersuchung
- Gewicht und Größe
- Blutdruck und Herzfrequenz
- hämatologischer Status (Hämoglobin, Hämatokrit, WBC, Blutplättchen, a PTT)
- Thrombophilie -Screening (AT III -Mangel, APC-“Resistance”)
- klinische Chemie (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Kreatinin, GPT,  $\gamma$ -GT, Gesamtbilirubin, Gesamteiweiß)
- Hepatitis B, C und HIV-Serologie (Testdurchführung nicht älter als 6 Monate)
- Urinanalyse (WBC, Nitrit, pH, Proteine, Glucose, Ketone, Kreatinin , Bilirubin, Urobilinogen, Blut-, bzw. Hämoglobinbestandteile)
- Drogenscreening anhand einer Urinanalyse (Opiate, Methadon, Kokain, Amphetamin, Benzodiazepine, Cannabinoid )
- 12-Ableitungs-EKG

Nach Beendigung des Studientages hat eine Woche später eine Nachuntersuchung der jeweiligen Probanden stattgefunden. Erneut wurde eine körperliche Untersuchung, ein komplettes Blutbild (einschließlich Leberparameter, Kreatinin-, und Elektrolytwerte), eine Urinanalyse, Blutdruck-, bzw. Herzfrequenzbestimmung und ein EKG-Monitoring durchgeführt. Wichtig waren hier besonders auch die subjektiven Erläuterungen des Probanden über das eigene Wohlbefinden nach Beendigung der Studie bis zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung.

## **2.2 Ethikkommission**

Die Studiendurchführung wurde erst nach Bewilligung der Ethikkommission (EK) am 13. 12. 1999 der medizinischen Universität Wien rechtlich zugelassen (EK# 434/99). Folglich sind die Studienabläufe in Übereinstimmung mit der „Deklaration von

Helsinki“ (1964) bzw. den Richtlinien des EC-GCP und des österreichischen Arzneimittelgesetzes durchgeführt worden.

## 2.3 Studieneinteilung

### 2.3.1 Design

Die Renitec-Studie war randomisiert, doppelblind placebo-kontrolliert und wurde in drei parallelen Gruppen durchgeführt.

### 2.3.2 Population

Jeweils 10 gesunde Männer im Alter von  $31 \pm 5$  (Standardabweichung = SD) und einem Body Maß Index von  $22 \pm 2$  (SD) werden in die Gruppen A, B, C per Zufallsprinzip eingeteilt.

Die Probanden erhalten fünf Tage vor Studienbeginn und am jeweiligen Studientag jeweils eine Tablette, die entweder Enalapril oder ein Placebo beinhaltet. Anhand der Tabelle ist die Aufteilung der Tabletteneinnahme innerhalb der Gruppen zu erkennen.

<b>Gruppe</b>	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 2</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 4</b>	<b>Tag 5</b>	<b>Tag 6/ Studien- tag</b>
<b>A</b>	P	P	P	P	P	P
<b>B</b>	P	P	P	P	P	E
<b>C</b>	E	E	E	E	E	E

P = Placebo E = Enalapril (20 mg)

**Abbildung 6: Aufteilung der Tabletteneinnahme innerhalb der Gruppen**

### 2.3.3 Mediaktion

LPS:

<b>Substanz:</b> National Reference Endotoxin, Escherichia coli; lot g1
<b>Hersteller:</b> USP Convention Inc., Rockville, MD, USA

Enalapril:

<b>Substanz:</b> Enalapril
<b>Firmennahme:</b> Renitec
<b>Hersteller:</b> Merck Sharp & Dome, Ges.m.b.H, Gunoldstrasse 14, A-1190

<b>Substanz:</b>	<b>Firmennahme</b>
<b>Paracetamol:</b>	<b>Mexalen</b>
<b>Glucose 5 %:</b>	<b>Laevosan Gesellschaft/ Infusionsflasche</b>

### 2.3.4 Dosierung

Studenttag:

LPS (Gruppe A, B, C): 2ng/kg intravenös in 10 ml Kochsalz 0,9 % intravenös über zwei Minuten

Renitec (Gruppe B, C): 20 mg oral

Glucose 5 % (Gruppe A, B, C): 3 ml/kg/h intravenös über 8,5 Stunden

Paracetamol (Gruppe A, B, C): 500 mg oral

### 2.3.5 Studienablauf

Die Probanden erhielten fünf Tage vor Studienbeginn und am jeweiligen Studientag vor Beginn der Studiendurchführung eine Tablette, die entweder Enalapril oder ein Placebo beinhaltete, welche nicht optisch zu unterscheiden war.

Jeweils zwei Probanden erschienen am angegebenen Termin um 8.00 Uhr morgens im nüchternen Zustand im Probandenraum der klinischen Pharmakologie. Während des gesamten Studientages, wurde ihnen zuerst ein nicht invasives Monitoring (Hewlett-Packard-System) auf der Brust angebracht, welches Vitalparameter (EKG, Sauerstoffsättigung, Herzfrequenz durchgehend, Blutdruckwerte in 20-minütigen Abständen) aufzeichnete.

In den ersten acht Stunden wurde alle 30 Minuten die Temperatur gemessen. 120 Minuten vor LPS-Verabreichung wurde Blut über eine Verweilkanüle in der Ellenbeuge entnommen (für die Kontrolle der Blut-, und Elektrolytwerte) und anschließend den Probanden das Placebo bzw. das Enalapril (20 mg) in Tablettenform verabreicht.

30 Minuten vor LPS-Gabe bekamen die Studienteilnehmer eine Paracetamol-Tablette (500mg) und zum Zeitpunkt 0 wurde 2ng/kg LPS innerhalb von zwei Minuten als langsame Bolusinfusion verabreicht. Daraufhin erhielten die Probanden eine Infusion 5 %-tiger Glucose (3ml/kg/h) über einen Zeitraum von 8,5 Stunden um eine adäquate Blutglukosekonzentration und Urinausscheidung zu gewähren.

Differentialblutbilder wurden die ersten zwei Stunden alle 15 Minuten bestimmt und danach jede weitere Stunde. Für weitere Analysen (*Enzyme Immuno Assay/* Durchflusszytometrie) wurden stündliche Blutentnahmen angesetzt, in den ersten vier Stunden wurden am entgegengesetzten Arm der LPS-Infusion mit jeweils vier neuen Venenpunktionen Blut entnommen.

Wenn die Probanden keine Beschwerden oder Auffälligkeiten zeigten, konnten Sie nach zehn Stunden die Studie beenden und mussten am nächsten Morgen um 8.00 Uhr den 24-Stunden-Wert mittels erneuter Blutentnahme bestimmen lassen. Nach sieben Tagen wurde eine weitere Blutentnahme durchgeführt.

## **2.4 Methoden**

### **2.4.1 Blutbilder**

Blutproben wurden in Verweilkanülen mit antikoagulierendem Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder Citrat gesammelt (Becton Dickinson, Wien).

Die Proben mit Citratplasma wurden sofort nach der Entnahme bei 2000 Umdrehungen bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und bei - 80 °C bis zur Analyse aufbewahrt.

Die Differentialblutbilder wurden direkt über ein automatisches Zell-Zähler-System gemessen. Das Gerät ist von der Firma Sysmex, Toa-Medical Electronics in Kobe, Japan hergestellt worden. Die Monozytenzahl wurde mit dem Durchflusszytometer gemessen.

Es wurde anhand von vorherigen Untersuchungen festgestellt, dass durch das automatische Zell-Zähler-System fälschlich erhöhte Werte gemessen werden.

### **2.4.2 Durchflusszytometrie**

Die Werte für die Monozyten und Leukozyten-Oberflächenmarker CD11b und CD54 wurden mittels eines FACS Calibur™ Durchflusszytometer ( Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) gemessen.

#### **2.4.2.1 Prinzip**

Die Durchflusszytometrie ist ein Messsystem, welches Partikel verschiedener Qualität, Lichtstreuung und Fluoreszenz in einem Flüssigkeitsstrom mittels optischer Signale analysiert. Zellen mit ähnlich morphologischen Eigenschaften können durch gleichzeitige Messung mehrerer physikalischer und biochemischer Parameter der einzelnen Zelle unterschieden werden.

Dies ist möglich, da an den Zellen spezifische fluoreszenzmarkierte Antikörper mit den entsprechenden Oberflächenantigenen verbunden sind. Sie werden über Mehrfarbenfluoreszenzmessungen differenziert und können dadurch nicht nur gezählt, sondern auch nach ihren Eigenheiten bewertet werden.

Das Gerät besteht aus mehreren Systemen: Flüssigkeitssystem, optisches System und einer Signalverarbeitung. Die Lichtquelle muss eine hohe Intensität, ein Emissionsspektrum im passenden Absorptionsbereich des Fluoreszenzfarbstoffes und eine gleich bleibende Strahlungsenergie aufweisen. Der Argonionenlaser mit der



488 nm-Linie wird dafür in den meisten Routineanwendungen benutzt. Im Flüssigkeitssystem befinden sich Pumpen, die eine kontinuierliche Trägerflüssigkeit durch die Messkammer schleusen. Ein weiteres Flüssigkeitssystem transportiert die Zellen von den Proberöhrchen zur Messkammer. Über eine laminare Strömung (Verwendung von Schläuchen und Küvetten) wird die Zellsuspension erfasst und beschleunigt. Das Signal entsteht, wenn Lichtstrahlen die Partikel erfasst haben. Wichtig ist, dass die Zellen einzeln von einem fokussierten Lichtstrahl getroffen werden. Dies geschieht, indem die Zellen über ein bestimmtes Flusssystem (Erzeugung von Überdruck) und einer Mikrokapillare einzeln den Analysekanal passieren. Trifft nun die Einzelzelle auf den Argonlaserstrahl, entsteht eine Lichtstreuung, die entsprechend der Zellgröße, der Zellmembranstruktur und ihrer Art intrazellulärer Anteile, unterschiedlich ist. Das Licht wird in Vorwärtsstreulicht (*Forward-Side-Scatter*, FSC), welches ein Maß für die Größe der Zelle darstellt und Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*, SSC, 90 %-tiges Streulicht), entspricht der Granularität, gestreut. Es gibt genügend Fluoreszenzfarbstoffe, die zum Nachweis vieler Zelleigenschaften eingesetzt werden und zur Markierung von konjugierten monoklonalen Antikörpern dienen. In dieser Studie wurde der Farbstoff Phycoerythrin (PE) für Anti-CD11b-Antikörper und Anti-CD54-Antikörper verwendet.

Sie werden vom Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und emittieren Licht mit einem Maximum von 580 nm (PE), wodurch sie deutlich zu unterscheiden sind und von entsprechenden Detektoren erfasst werden können. Der Detektor misst das Vorwärtsstreulicht, das Seitwärtsstreulicht und die Fluoreszenz. Des weiteren trifft die Strahlung lichtaktive Fotodioden, die das Lichtsignal in ein elektrisches Signal umwandeln. Nach logarithmischer Signalverstärkung werden die Daten in einem Lichtmodusrechner aufgenommen und verwertet.

Die Ergebnisse können auf unterschiedliche Weise, wie z. B. einer Histogramm-, oder einer Häufigkeitsverteilung, des weiteren eine korrelierte Zweiparameterdarstellung, wobei die Eigenschaften einer Zelle in Relation zueinander gesehen werden, dargestellt werden. Anschließend grenzt der Operator die vorher analysierten und definierten Zellsignale ein (*Gating*) und erhält so ein exaktes Ergebnis für die hier benötigten Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Um die Zellen mit dem Durchflusszytometer einlesen zu können, müssen sie in Einzelzellsuspension, getrennt vom Plasma und Erythrozyten, bearbeitet werden. Dies wurde bei der Leukozytenfärbung durchgeführt (56, 75).

### 2.4.2.2 Bestimmung von CD 11b und CD 54

Verwendung von Anti-CD11b-Antikörper (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) und Anti-CD54-Antikörper (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)

Prinzip der Leukozytenfärbung für CD11b und CD54:

Zeitraum der Leukozytenfärbung: Zeitpunkt: -120, 0, 120, 240, 360 min nach LPS - Vergabe

50 µl EDTA Blut werden in 3 FACS-Röhrchen gegeben. Dazu gibt man in jeweils ein Röhrchen 5 µl negative Kontrolle (Simultest, Becton Dickinson, Belgien), 10µl einem CD11b PE-konjugiertem monoklonalen Antikörper ( Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) und 10µl einem CD54-PE-konjugiertem monoklonalen Antikörper ( Becton Dickinson, San Jose, CA, USA ). Anschließend werden die Proben bei 4 °C für 20 Minuten inkubiert. Danach werden jeweils 1500 µl FACS™ *Lysing Solution* dazugegeben, gut suspendiert und für weitere 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Man gibt die Proben anschließend in die Zentrifuge und lässt sie 5 Minuten lang, bei 4 °C, 1400 Umdrehungen und zusätzlicher Bremsfunktionseinstellung zentrifugieren. Der Überstand der Proben wird abgegossen und man lässt sie, nachdem man jeweils 2000 µl HBSS dazugegeben hat, erneut für 5 Minuten zentrifugieren (4 °C, 1400 Umdrehungen, + Bremse). Wiederum wird der Überstand abgegossen und 300 µl Zellfix™ (Becton Dickinson, Belgien) dazugegeben, um die Proben maximal für zwei Stunden im Kühlschrank aufbewahren zu können, bis sie mit dem Durchflusszytometer eingelesen werden können.

Es wurden 20000 Zellen im Durchflusszytometer eingelesen. Die Ergebnisse wurden in der Oberflächenexpression von CD11b und CD54 als *Mean Fluorescence Intensity* ( MFI ) präsentiert.

### 2.4.3 Enzymimmunoassay

Die Werte für cE-Selektin, cICAM-1, c-VCAM-1 und TNF- $\alpha$  werden mittels Enzymimmunoassay (EIAs, R&D Systems, Oxon, UK) bestimmt.

Die Parameter-Testkits der untersuchten Adhäsionsmoleküle stammen von R&D Systems, Oxon, UK.

Prinzip:

Der Test wird in Mikrotiterplatten mit Reihen von Vertiefungen durchgeführt. In Mehrkanalspektrometern mit Glasfaseroptik wird die Messung durchgeführt.

Die Mikrotiterplatte ist mit monoklonalen Antikörpern beschichtet, die gegen die jeweils verwendeten Adhäsionsmoleküle ( cICAM-1, cVCAM-1 , cE-Selektin und TNF- $\alpha$ ) gerichtet ist.

100  $\mu$ l Anti-X-HRP Konjugat (X= cICAM-1, cVCAM-1, cE-Selektin und TNF- $\alpha$ ) werden in jede Vertiefung pipettiert. Anschließend gibt man 100  $\mu$ l von der Probe (cICAM-1, cVCAM-1, cE-Selektin und TNF- $\alpha$ ) hinzu. Jeweils ein Adhäsionsmolekül oder TNF- $\alpha$  verbindet sich nun mit dem auf der Seite der Mikrotiterplatte angehefteten Antikörper und auf der anderen Seite mit dem enzymmarkierten monoklonalen Antikörper, die beide spezifisch nur mit diesem Adhäsionsmolekül (cICAM-1, cVCAM-1, cE-Selektin) oder TNF- $\alpha$  reagieren.

Nach 90 Minuten Inkubationszeit werden durch sechsmaliges Waschen mit einer Pufferlösung überschüssige Bestandteile der Probe und des enzymmarkierten Antikörper entfernt.

Um die Anzahl der vorhandenen Komplexe messen zu können, gibt man 100  $\mu$ l einer chromogenen Substratlösung (Tetramethylbenzidin) hinzu, und es entsteht eine Farbreaktion, die der Menge der zu untersuchenden Substanz in der Probe proportional ist.

Bei Raumtemperatur wird für weitere 30 Minuten inkubiert. Diese Reaktion wird durch Zugabe von 100  $\mu$ l einer Stopplösung (Säurelösung) beendet.

Abschließend wird die Absorption des farbigen Endproduktes innerhalb der nächsten halben Stunde bei 450 nm gemessen und ausgewertet.

#### **2.4.4 Analyse der ACE-Aktivität**

Die ACE - Aktivität wurde mit einem Angiotensin - Converting - Enzym - Reagens in einem Hitachi 911 Analysiergerät gemessen (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA).

#### **2.4.5 Statistische Analyse**

In Erwartung einer nicht normalen Verteilung der Daten wurden alle Vergleiche durch nicht parametrische Tests durchgeführt. Für die Statistik wurden alle Daten als *Mean*

(Median) unter Berücksichtigung ihrer 95 %-tigen Konfidenzintervallen. Alle statistischen Vergleiche innerhalb der Gruppen wurden durch Friedman ANOVA und den Wilcoxon Rangtest für post hoc Vergleiche durchgeführt. Um Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen zu beurteilen, wurden eine Kruskal Wallis ANOVA und ein Mann Whitney U - Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  gesetzt.

Die Statistiken wurden mit dem Statistikprogramm STATISTIKA 5.5 von der Firma Statsoft (Tulsa, OK, USA) bearbeitet.

### 3 Ergebnisse

Die nachfolgenden Ergebnisse werden nach den bestehenden Gruppen A, B, C, eingeteilt. Die folgende Skizze soll die Aufteilung der verschiedenen Gruppen wiederholend darstellen:

<b>Gruppe</b>	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 2</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 4</b>	<b>Tag 5</b>	<b>Tag 6/ Studien- tag</b>
<b>A</b>	P	P	P	P	P	P
<b>B</b>	P	P	P	P	P	E
<b>C</b>	E	E	E	E	E	E

P = Placebo E = Enalapril (20 mg)

**Abbildung 7: Aufteilung der Tabletteneinnahme innerhalb der Gruppen**

#### 3.1 Plasma ACE-Aktivität

Die Gruppe C, die fünf Tage vor dem Studientag mit Enalapril behandelt wurde, zeigte eine 80 %-tige Senkung der ACE-Aktivität am Studientag (6. Tag) von ihrem Ausgangswert aus, welcher im Durchschnitt bei 4,8 U/L betrug. Aufgrund der Vorbehandlung hatte die Gruppe C durchschnittlich niedrigere Werte am Studientag als die Gruppe A, welche nur Placebo erhalten hatte und deren ACE-Aktivität nicht gehemmt wurde. Gruppe A hatte am Studientag einen Durchschnittswert von 26,6 U/L. Die bereits niedrigeren Ausgangswerte am Studientag von Gruppe C zeigten aufgrund der erneuten Einnahme von Enalapril im Laufe der nächsten acht Stunden eine weitere Abnahme. Nach 26 Stunden erreichte die Gruppe C annähernd ihren Ausgangswert vom Studienbeginn mit einem Wert von 6,4 U/L. Voraussichtlich wird aufgrund der vermehrten Einnahme von Enalapril über fünf Tage die ACE-Aktivität verzögert weiter ansteigen (Abbildung 9)

Bei den Probanden der Gruppe B, die Enalapril am Studientag verabreicht bekommen hatten, verringerte sich die ACE-Aktivität vier Stunden nach Einnahme und zwei Stunden nach der LPS-Infusion um 95 % (KI: 91 - 99 %). Der Anfangswert

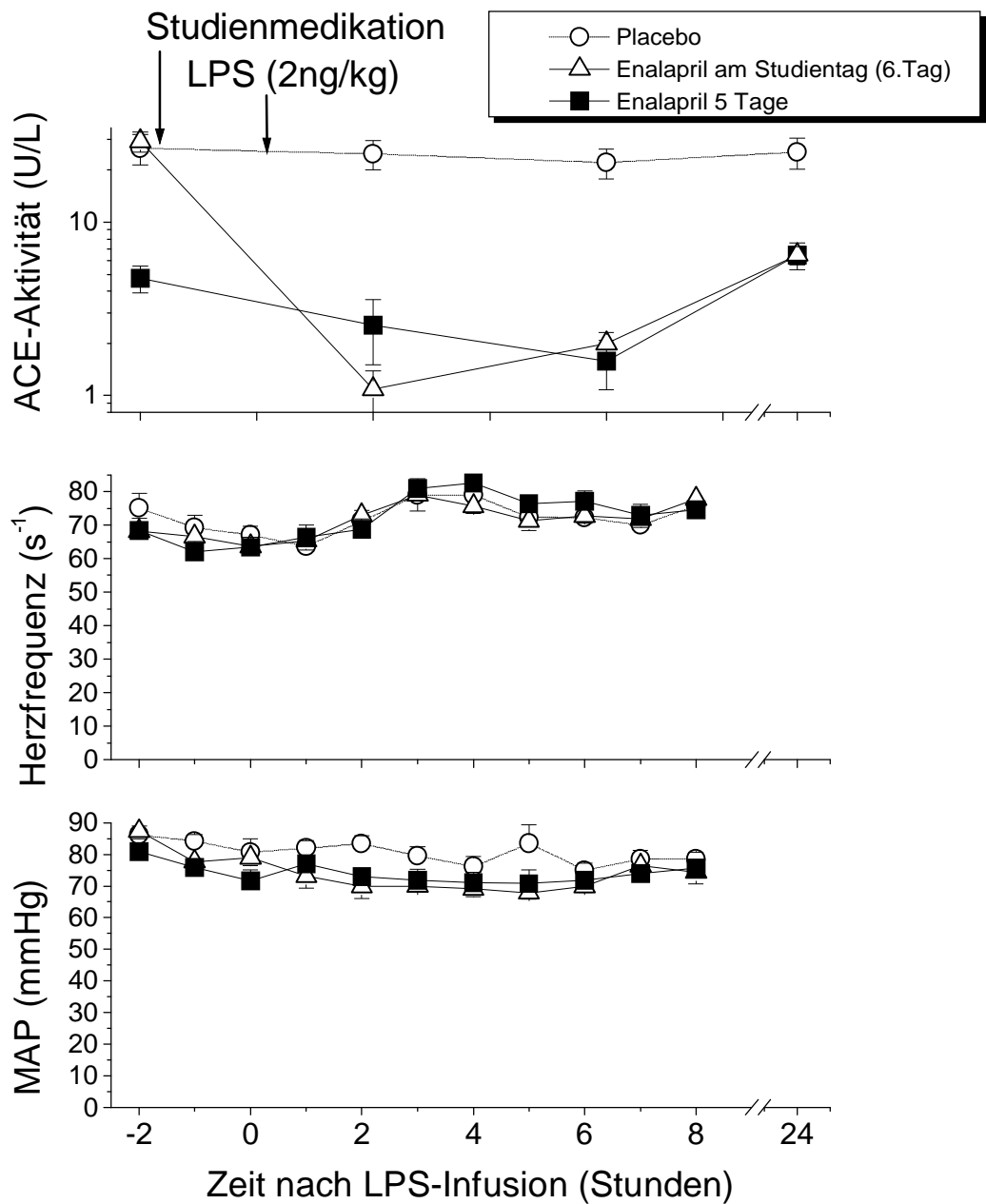
der Gruppe B betrug durchschnittlich 29,2 U/L. Der Durchschnittswert der verringerten ACE-Aktivität betrug 2 U/L mit einem Konfidenzintervall von 1,3 - 2,7. Nach einem durchschnittlichem Wirkungsmaximum von 4 - 6 Stunden stieg die ACE-Aktivität der Gruppe B kontinuierlich wieder an. Da sie nur einmalige mit Enalapril behandelt wurden und die Wirkungsdauer von Enalapril circa 24 Stunden beträgt, werden die Werte höchstwahrscheinlich ihre Ausgangswerte wieder erreicht haben. Gruppe A die über sechs Tage Placebo eingenommen hatten, zeigten keine wesentlichen Veränderungen in ihrer ACE-Aktivität, ihr Durchschnittswert betrug 27 U/L. Die ACE-Aktivität wurde durch das Placebo nicht beeinflusst (Abbildung 9).

### 3.2 Auswertung der hämodynamischen Veränderungen

Die Veränderungen von LPS mit und ohne Enalapril auf Blutdruck und Herzfrequenz waren unter den Gruppen sehr gering.

Die Herzfrequenz hatte im Durchschnitt aller Gruppen einen Wert von  $70 \text{ s}^{-1}$  (KI:  $66 - 75 \text{ s}^{-1}$ ) und sank während der nächsten drei Stunden auf einen Wert von  $64 \text{ s}^{-1}$  (KI:  $62 - 70 \text{ s}^{-1}$ ). Die Herzfrequenz stieg wieder an und hatte nach fünf Stunden einen Durchschnittswert von  $79 \text{ s}^{-1}$  (KI:  $76 - 83 \text{ s}^{-1}$ ). Der systolische Wert aller Gruppen im Durchschnitt betrug zu Beginn (Zeitpunkt 0) 121 mmHg (KI: 119 - 127) und sank innerhalb der nächsten acht Stunden annähernd kontinuierlich auf einen Wert von 108 mmHg (KI: 107 - 115 mmHg). Zehn Stunden nach LPS Infusion hatten die Probanden einen durchschnittlichen systolischen Wert von 115 mmHg (KI: 110-119). Die Diastole von allen Gruppen hatte einen durchschnittlichen Betrag von 64 mmHg (KI: 62 - 69 mmHg) und verringerte sich innerhalb der nächsten sechs Stunden auf einen Wert von 50 mmHg (KI: 48 - 55 mmHg). Nach zehn Stunden war der diastolische Blutdruck bei 58 mmHg (KI: 54 - 61 mmHg). Es gab **keine signifikanten Unterschiede**.

Die Werte der **ACE-Aktivität** und der **hämodynamischen Parameter** sind in nachfolgender Tabelle dargestellt:



**Abbildung 8: Parameterdarstellung von der ACE-Aktivität (Einheit U/L), der Herzfrequenz (Einheit s<sup>-1</sup>) und den mittlerem arteriellen Druck (Mean Arterielle Pressure = MAP) der Gruppen A (○), B (△) und C (■) in der Zeitskala nach der LPS-Infusion**

### **3.3 Tumornekrosefaktor- $\alpha$ im Plasma**

Die TNF-Werte erreichten 90 Minuten nach LPS-Infusion ihr Maximum. Die Placebogruppe (Gruppe A) hatte einen Durchschnittswert von 319 pg/mL (KI: 98 - 440 pg/mL), bei Gruppe B betrug der Wert 345 pg/mL (KI: 191 - 499 pg/mL) und bei Gruppe C 224 pg/mL (KI: 174 - 275 pg/mL).

**Zwischen den Gruppen konnte keine Signifikanz festgestellt werden ( $p = 0,67$  zwischen den Gruppen).**

### **3.4 Ergebnisse der ICAM-1 Expression auf**

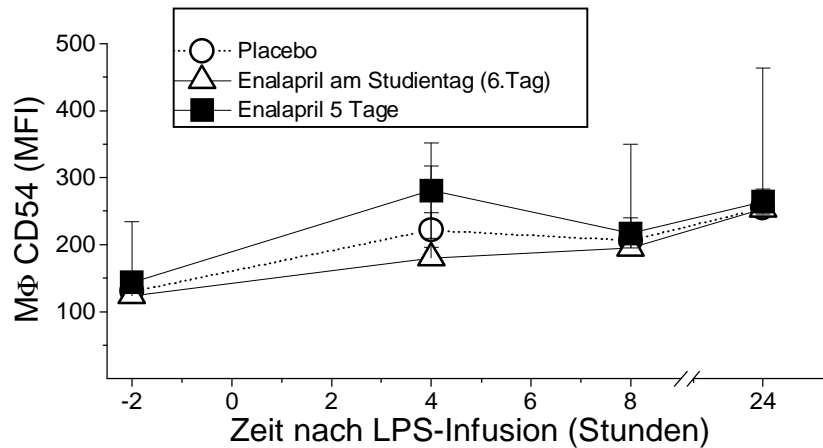
#### **3.4.1 Monozyten**

(Zahlenangaben in Medianwerte ermittelt, Zeitpunkte: 0,120 min., 240 min., 360 min., 24 h):

Zusammenfassend kann man für alle Gruppen (A, B, C;  $n = 30$ ) feststellen, dass die durchschnittliche mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) des CD 54 auf den Monozyten zum Zeitpunkt 0 einen Wert von 129 (KI: 120 - 140 MFI) hatte. Kontinuierlich ist die MFI nach 24 Stunden auf einen maximalen Wert von 233 (KI: 230 - 280 MFI) gestiegen. Im Vergleich zwischen den gemessenen Zeitpunkten (0/120, 0/240 Minuten, 0/360 Minuten und 0/24 Stunden) war durchgehend eine Signifikanz gegeben. Der Wert stieg kontinuierlich von 0/120 Minuten bis zu einem Maximum bei dem Vergleich 0/24 h ( $p \leq 0,05$ ; 0/24 h) an.



## CD54 Expression auf Monozyten



**Abbildung 9: Mittlere Fluoreszenz Intensität von CD54 der Expression von Monozyten der Gruppen A (○), B (△) und C (■) im Zeitintervall nach der LPS-Infusion**

### 3.4.2 Neutrophile Granulozyten

Insgesamt hat die durchschnittliche mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) der CD 54-Zellen auf den neutrophilen Granulozyten für alle Gruppen ( A, B, C; n = 30 ) einen Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 von 25,5 (KI: 24 - 34 MFI) ergeben und stieg nach 360 min. auf einen Maximalwert von 37 MFI (KI: 35 - 44 MFI) an. Der 24-Stunden-Wert ergab einen MFI von 36 (KI: 36 - 46 MFI). Zu jedem Vergleichszeitpunkt (0/120, 0/240 Minuten, 0/360 Minuten und 0/24 Stunden ) wurde ein Signifikanz festgestellt. Das Maximum lag bei  $p = 0,00001$  (0/120 Minuten) vor.

**Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied für die Expression von ICAM-1 auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten bestimmt werden ( $p > 0,05$ ).**

### **3.5 Ergebnisse der CD 11b Expression auf**

#### **3.5.1 Monozyten**

(Zahlenangaben in Medianwerten ermittelt, Zeitpunkte: 0,120 min., 240 min., 360 min., 24 h):

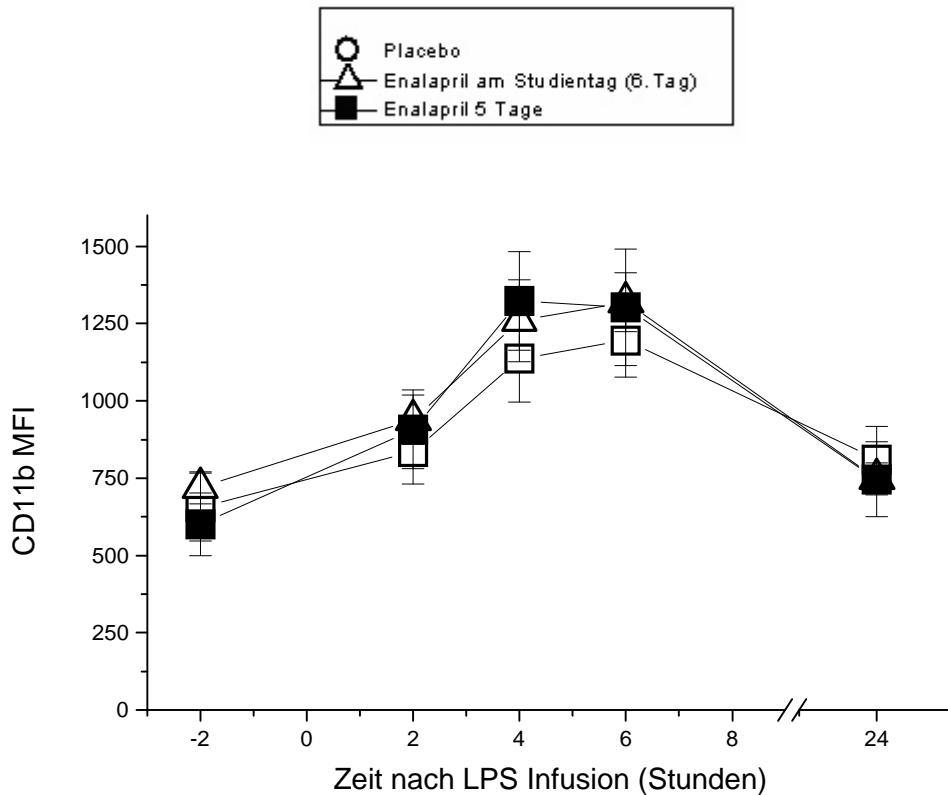
Alle Gruppen (A, B, C; n = 30) der CD11b-Zellen auf den Monozyten hatten zum Zeitpunkt 0 eine durchschnittliche mittlere Fluoreszenz Intensität von 297 (KI: 275 - 408 MFI). Die MFI erhöhte sich maximal nach 240 Minuten auf einen Wert von 1141 (KI: 965 - 1256 MFI). Nach 24 Stunden betrug die MFI 341 (KI: 229 - 434 MFI). Alle Vergleichszeitpunkte (0/120, 0/360 Minuten und 0/24 Stunden), außer 0/24 Stunden, waren signifikant. Das Maximum betrug  $p = 0,00003$  und war während des Vergleichs 0/120 Minuten und 0/240 Minuten gegeben.

#### **3.5.2 Neutrophile Granulozyten**

Zu Beginn hatte die durchschnittliche mittlere Fluoreszenz Intensität des CD11b auf den neutrophilen Granulozyten aller Gruppen (A, B, C; n = 30) einen Betrag von 720 (KI: 556 - 765 MFI), sie erhöhte sich nach 360 Minuten auf ein Maximum von 1233 (KI: 1112 - 1432 MFI) und fiel nach 24 Stunden auf einen Wert von 786 (KI: 656 - 880 MFI) ab. Alle Vergleichszeitpunkte (0/120, 0/240 Minuten, 0/360 Minuten und 0/24 Stunden ) waren signifikant. Der Wert stieg kontinuierlich bis zu einem Maximum von  $p = 0,000003$  im Vergleich 0/360 Minuten an.

**Sowohl die Expression von CD 11b auf Monozyten, als auch auf neutrophile Granulozyten hat keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ergeben ( $p > 0,05$ ).**

## CD11b Expression auf neutrophile Granulozyten



**Abbildung 10: Mittlere Fluoreszenz Intensität von CD11b Expression auf neutrophile Granulozyten der Gruppen A (o), B (Δ) und C (■) im Zeitintervall nach der LPS-Infusion**

### **3.6 Ergebnisse der löslichen E-Selektin-Werte im Plasma insgesamt für alle Gruppen (A, B, C; n= 30; Zahlenangaben in Medianwerten ermittelt)**

Der Anfangswert betrug 38 ng/mL (KI: 32 - 42 ng/mL) und ist, nachdem er anfangs leicht gesunken ist, nach 360 Minuten auf einen Maximalwert von 173 ng/mL (KI: 294 - 332 ng/mL) gestiegen. Das Maximum betrug in Prozent 425 %. Der 24-Stunden-Wert fiel auf 123 ng/mL (KI: 125 - 160 ng/mL) ab. Im Vergleich der verschiedenen

Zeitpunkte (0/120, 0/240 Minuten, 0/360 Minuten und 0/24 Stunden) war stets eine Signifikanz vorhanden.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestimmt werden ( $p > 0,05$ ).

### Verlaufsdarstellung von cE-Selektin vor und nach der LPS-Infusion von 2 ng/kg

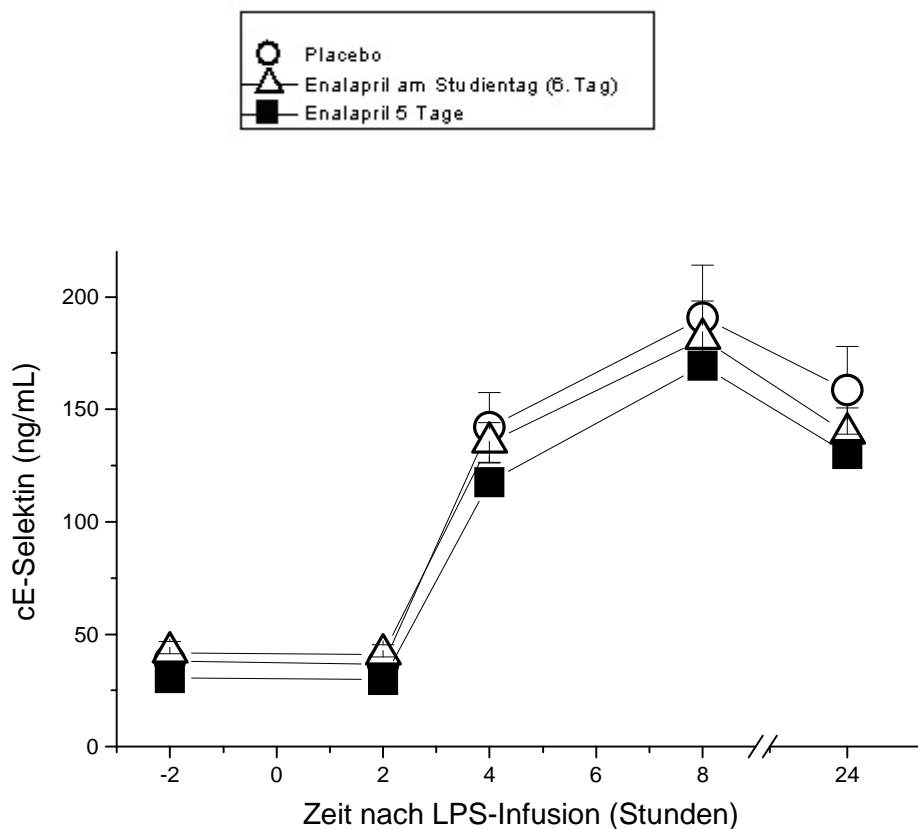


Abbildung 11: Plasmawerte von c E-Selektin der Gruppen A (○), B (△) und C (■) in der Einheit ng/ml dargestellt im Zeitintervall vor und nach der LPS-Infusion

### 3.7 Ergebnisse der löslichen ICAM-1 Moleküle im Plasma insgesamt für alle Gruppen (A, B, C; n = 30; Zahlenangaben in Medianwerten ermittelt):

Zum Zeitpunkt 0 betrug der Anfangswert 180 ng/mL (KI: 170 - 198 ng/mL) und stieg kontinuierlich nach 24 Stunden auf einen Maximalwert von 312 ng/mL (KI: 294 - 332 ng/mL) an. Das Maximum betrug in Prozent 74 %. Im Vergleich der verschiedenen Zeitpunkte (0/120, 0/240 Minuten, 0/480 Minuten und 0/24 Stunden) ist die Signifikanz kontinuierlich bis zu einem Maximum von  $p = 0,000002$  (0/24h) angestiegen.

Zwischen den Gruppen konnte jedoch keine Signifikanz festgestellt werden ( $p > 0,05$ ).

Verlaufsdarstellung von cICAM-1 vor und nach  
der LPS-Infusion von 2 ng/kg

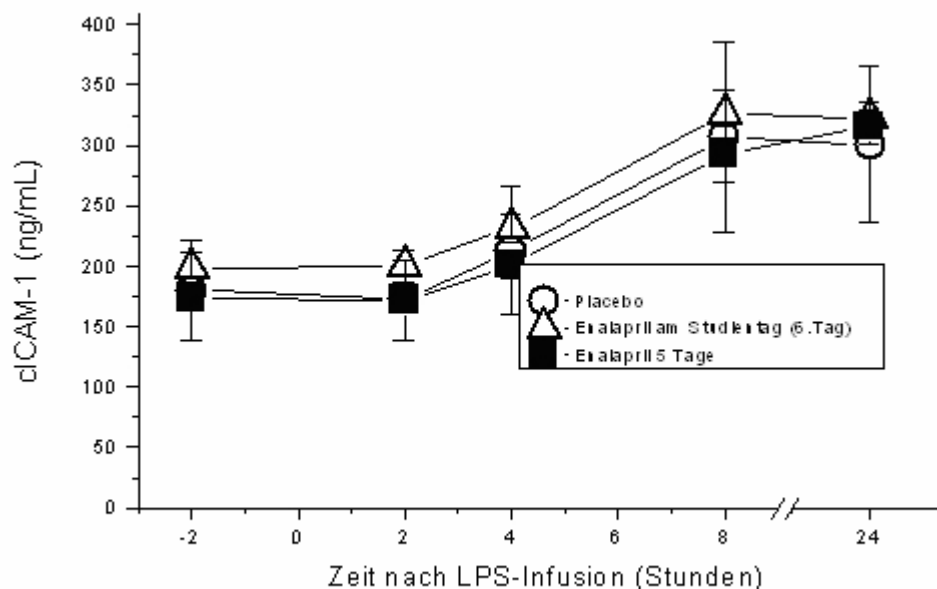


Abbildung 12: Plasmawerte von cICAM-1 der Gruppen A (o), B (Δ) und C (■) in der Einheit ng/ml dargestellt im Zeitintervall vor und nach der LPS-Infusion

### 3.8 Ergebnisse der löslichen VCAM-1 Moleküle im Plasma zusammenfassend für alle Gruppen ( A, B, C; n = 30; Zahlenangaben in Medianwerten ermittelt)

Zum Zeitpunkt 0 betrug der Anfangswert 529 ng/mL (KI: 510 - 614 ng/mL) und stieg kontinuierlich nach 24 Stunden auf einen Maximalwert von 825 ng/mL (KI:771 - 929 ng/mL) an. In Prozent betrug das Maximum 52 %.

Alle Vergleichszeitpunkte, außer 0/480 Minuten, waren signifikant. Sie stiegen kontinuierlich bis zu einem Wert von  $p = 0,0000019$  (0/24 Stunden) an.

Zwischen den Gruppen war keine Signifikanz gegeben ( $p > 0,05$ ).

#### Verlaufsdarstellung von cVCAM-1 vor und nach der LPS-Infusion von 2 ng/kg

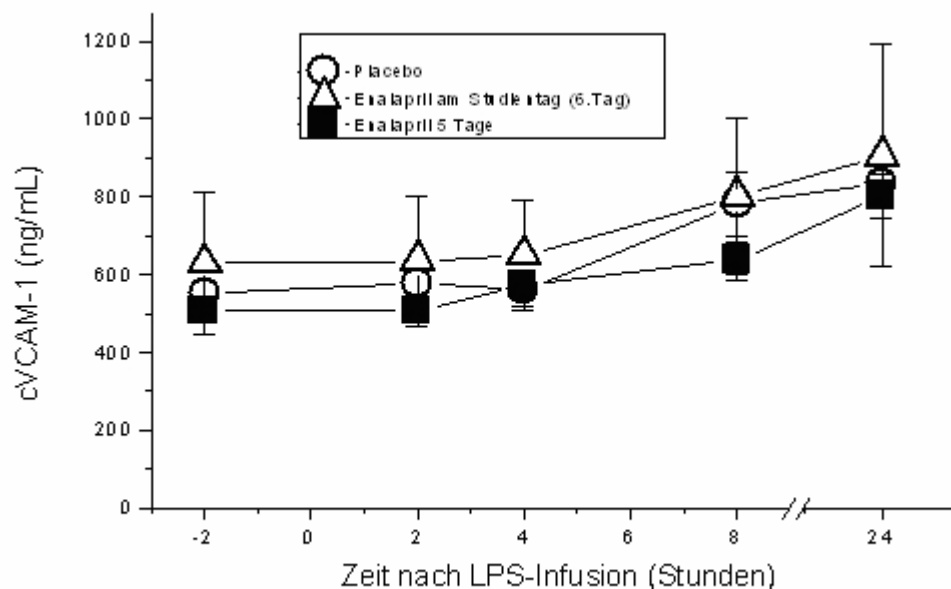


Abbildung 13: Plasmawerte von cVCAM-1 der Gruppen A (o), B (Δ) und C (■) in der Einheit ng/ml dargestellt im Zeitintervall nach der LPS-Infusion

### **3.9 Auswertung zellulärer Veränderungen**

#### **3.9.1 Leukozyten**

Bei allen Gruppen betrug zum Zeitpunkt 0 der Durchschnittswert  $6,1 \times 10^9/L$  (KI:  $5,5 - 6,7 \times 10^9/L$ ). Nach 360 Minuten stieg die durchschnittliche Anzahl aller Gruppen auf einen Wert von  $10,6 \times 10^9/L$  (KI:  $9,7 - 11,5 \times 10^9/L$ ) an.

**Zwischen den Gruppen konnte keine Signifikanz festgestellt werden ( $p > 0,05$ ).**

#### **3.9.2 Neutrophile Granulozyten**

Bei den neutrophilen Granulozyten betrug der Durchschnittswert aller Gruppen zum Zeitpunkt 0  $3,3 \times 10^9/L$  (KI:  $2,9 - 3,3 \times 10^9/L$ ). Wie erwartet zeigten die neutrophilen Granulozyten 90 Minuten nach LPS-Infusion ihr Minimum. Der Durchschnittswert betrug  $1,2 \times 10^9/L$ , bei einem Konfidenzintervall von  $1,0 - 1,4 \times 10^9/L$ . Das Maximum wurde 360 Minuten nach LPS Infusion erreicht, der Wert betrug  $8,8 \times 10^9/L$  (KI:  $7,9 - 9,6$ ). Nach 24 Stunden betrug der Durchschnittswert aller Gruppen  $2,9 \times 10^9/L$  (KI:  $2,6 - 3,3 \times 10^9/L$ ).

**Es konnte zwischen den Gruppen keine Signifikanz bestimmt werden.**

#### **3.9.3 Monozyten**

Die Monozyten von allen Gruppen hatten einen durchschnittlichen Ausgangswert (Zeitpunkt 0) von  $0,5 \times 10^9/L$  (KI:  $0,4 - 0,6 \times 10^9/L$ ) und erreichten nach 360 Minuten ihr durchschnittliches Maximum (alle Gruppen) mit dem Betrag von  $1,0 \times 10^9/L$  (KI:  $0,8 - 1,1 \times 10^9/L$ ).

**Zwischen den Gruppen konnte keine Signifikanz festgestellt werden.**

#### **3.9.4 Plättchenanzahl**

Die Plättchenanzahl verringerte sich in allen Gruppen um 20 % 6 Stunden nach LPS Infusion. Von einem durchschnittlichen Anfangswert von 248 G/L (KI: 233 - 265 G/L) betrug das Minimum 205 G/L mit einem Konfidenzintervall von 191 - 219 G/L.

**Zwischen den Gruppen konnte keine Signifikanz festgestellt werden.**

## 4 Diskussion

Man stellte die Hypothese auf, dass Enalapril die LPS induzierte und von TNF vermittelte Erhöhung der Endothel Aktivität verringern könnte (4, 21, 27). Gemessen wurde anhand der cE-Selektinwerte. Es wurde jedoch keine Signifikanz auf cE-Selektin und bei den anderen gemessenen Parametern durch die Einnahme von Enalapril festgestellt.

### 4.1 Rationale für die gemessenen Parameter

- **Plasmawerte von cE-Selektin, cVCAM-1 und cICAM-1**

Es konnte gezeigt werden, dass eine Infusion von Endotoxin eine Erhöhung von 800-900 % bei cE-Selektin und 100 % bei cICAM-1 bewirkt (13, 46). In kultivierten Endothelzellen ist die Expressierung von E-Selektin und ICAM-1 durch LPS auf ca. 300 % erhöht worden (17). Durch LPS werden E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 von den Endothelzellen gelöst, und es konnte in Studien gezeigt werden, dass cE-Selektin und cICAM-1 bei Patienten mit septischen Schock erhöhte Werte aufweisen (10, 24, 57, 79).

Die Plasmawerte von cE-Selektin, cVCAM-1 und cICAM-1 könnten möglicherweise durch die Wirkungsweise von Enalapril verringert werden, welche zuvor durch die septischen Vorgänge erhöht wurden. Bei anderen Erkrankungen hatten ACE-Inhibitoren dies in bestimmten Studien erfolgreich bewiesen (4, 21, 27, 40).

- **Neutrophile Granulozyten**

LPS ruft eine vorübergehende, dosisabhängige Neutropenie hervor, welche gefolgt ist von einer Neutrophilie (54, 90).

- **Monozytenzahl**

LPS induziert eine Monozytopenie (ca. – 87 % nach 2 Stunden) (13, 90). Monozyten exprimieren den CD14 Rezeptor und den Signaltransduktor den *toll-like receptor* (TRL) für den LPS-LBP-Komplex (2, 68, 78, 82). Dieser Komplex löst eine Ausschüttung von verschiedenen Mediatoren aus, die zum Entstehen einer Sepsis beitragen (2, 35, 42, 68, 98).



- **Leukozytenzahl**

Während einer Sepsis kommt es zu einer schweren Zerstörung des Endothels durch die vermehrte Leukozytenadhäsion und Diapedese. Diese wird ausgelöst durch die bestehenden Adhäsionsmoleküle am Endothel (1, 16). Enalapril soll die Erhöhung der Adhäsionsmoleküle im septischen Geschehen verringern.

- **Messung von TNF- $\alpha$**

Tumornekrosefaktor- $\alpha$  spielt eine zentrale Rolle bei systemischen Entzündungen. Es steigert die Expression und Ausschüttung vieler proinflammatorischer Mediatoren.

Die Erhöhung von cE-Selektin ist z. B. bestimmt durch die LPS induzierte TNF- $\alpha$  Aktivierung (81, 92).

TNF- $\alpha$  führt zu einer verstärkten Bildung von Adhäsionsmolekülen und einer gesteigerten Diapedese von Leukozyten in das Entzündungsgebiet (35, 59, 81, 92).

Eine Studie besagt, dass die Höhe der Leukozytenadhäsion proportional zum TNF- $\alpha$  Spiegel im Plasma ist (60). Die verstärkte Bildung und Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. cE-Selektin soll in dieser Studie durch die Einnahme von Enalapril verringert werden.

- **Enalapril**

Die orale Einnahme von Enalapril variiert im klinischen Gebrauch zwischen 2,5 - 40 mg pro Tag. Die effektive Halbwertszeit von Enalaprilat nach mehrfacher Gabe von Enalaprilmaleat beträgt ca. elf Stunden und nach vier Tagen oraler Einnahme von Enalapril kann nach Erfahrungswerten ein kontinuierlicher Wert im Serum erreicht werden (29). Verschiedene Studien belegen, dass eine Vorbehandlung mit Enalapril mit 20 mg pro Tag für fünf Tage in unserer Studie eine Serumkonzentration von 35 - 45 ng/ml erreichen wird (54, 87). Diese ist notwendig, um in diesem septischen Modell bei unseren Probanden eine Aussagekraft zu erhalten.

#### **4.2 Diskussion in Bezug auf den Studienaufbau**

Da bei den gemessenen Parametern keine signifikante Veränderung durch die Einnahme von Enalapril festgestellt werden konnte, ist ein möglicher Grund der ausgewählte Studienaufbau gewesen.

#### 4.2.1 Kriterien der Probandenauswahl

Die Studie von BOLDT et al. war ein Grund, unsere Hypothese in dieser Studie aufzustellen (10). Dort wurden 40 Patienten, die unter einer Sepsis, schwerer Sepsis oder einem septischen Schock litten, in die Studie eingeschlossen. Ausschlusskriterien waren ein MAP < 70 mmHg, eine bestehende Niereninsuffizienz bei bestehender Serumkreatininkonzentration von > 2,5 mg/dL oder einer Urinausscheidungsmenge von < 20 mL/Stunde. Eine Leberinsuffizienz mit Leberwerten von GOT (Glutamat- Oxalacetat- Transferase) bzw. GPT (Glutamat- Pyruvat- Transaminase) über 40 U/L waren ebenfalls Ausschlusskriterien. Unter intensivmedizinischer Aufsicht mit kontinuierlicher Messung aller lebensnotwendiger Parameter wurden 20 Patienten über fünf Tage mit Enalapril (0,25 mg/h per Infusion = 6 mg/ d) behandelt, die restlichen 20 Patienten erhielten kontinuierlich über eine Infusion ein Placebo mit Kochsalzlösung. Gemessene Parameter waren zum Beispiel Angiotensin II, Thrombomodulin, Endothelin-1, ICAM-1 und VCAM-1. Die löslichen Adhäsionsmoleküle waren in beiden Gruppen am Anfang der Studie erhöht. Während des Studienverlaufes zeigten sich nur in der Placebogruppe ein weiterer Anstieg, der im Vergleich zu den Patienten, die Enalapril eingenommen hatten, signifikant war. Die Gruppe mit der Enalaprileinahme blieben auf einem fast kontinuierlichen Wert und zeigten am Ende der Studie annäherungsweise normale Werte, dies konnte in der Placebogruppe nicht nachgewiesen werden.

Beide Gruppen in der Studie von BOLDT et al. zeigten durchschnittlich am Anfang der Studie einen annähernd gleichen Wert von löslichem E-Selektin. (Enalaprilatgruppe: ~ 85 ng/mL, Kontrollgruppe: ~ 90 ng/mL). In der Enalaprilatgruppe stieg der Wert am ersten Tag auf ~ 90 ng/mL an und senkte sich im Verlauf auf einen Wert von circa 60 ng/mL. Einen deutlichen Unterschied zeigte die Kontrollgruppe. Hier erhöhten sich die Werte auf ein Maximum von circa 190 ng/mL am dritten Tag und senkten sich am fünften Tag auf einen Wert von circa 150 ng/mL. cICAM zeigte bei Studienbeginn in der Enalaprilatgruppe einen durchschnittlichen Wert von circa 450 ng/mL, dieser erhöhte sich am ersten Tag auf 500 ng/mL und senkte sich innerhalb der nächsten vier Tage auf einen Wert von circa 325 ng/mL. Die Kontrollgruppe ohne Einnahme von Enalapril zeigte durchschnittlich einen Anstieg von cICAM von 480 ng/mL auf einen Wert von 850 ng/mL am dritten Tag und am fünften Tag eine Absenkung auf circa 675 mg/mL.

cVCAM zeigte am ersten Tag in der Enalaprilatgruppe einen Wert von 750 ng/mL, im Verlauf senkte sich der Wert kontinuierlich und am fünften Tag bestand ein durchschnittlicher Wert von circa 625 ng/mL. In der Kontrollgruppe bestand ein annähernd gleicher Ausgangswert, doch bestand am dritten Tag ein Maximalwert von 1120 ng/mL und am fünften Tag ein Wert von circa 800 ng/mL.

Drei Patienten in der Enalaprilatgruppe und sechs Patienten in der Kontrollgruppe entwickelten während der Studiendauer eine schwere Sepsis. Zwei Patienten der Enalaprilatgruppe und fünf Patienten in der Kontrollgruppe entwickelten während der Studiendauer einen septischen Schock. Plasmakonzentrationen von Kreatinin ergaben innerhalb der beiden Gruppen keine wesentliche Unterschiede und keiner der Patienten entwickelte ein akutes Nierenversagen. Die Überlebensrate zeigte keinen signifikanten Betrag zwischen den zwei Gruppen (10).

Im Vergleich zu dieser Studie kann im Studiendesign festgestellt werden, dass in unserer Studie gesunde Probanden teilgenommen hatten. Ob ACE-Inhibitoren bei Intensivpatienten, die metabolische, respiratorische und kardiologische Dysfunktionen aufweisen, andere Wechselwirkungen in Bezug auf den Einfluss von Adhäsionsmolekülen besitzen, bleibt weitgehend offen.

Man hat festgestellt, dass bei septischen Patienten lösliche Adhäsionsmoleküle erhöht sind und sie zum Teil prognostische Aussagekraft besitzen (10, 16, 23, 38, 79).

Obwohl in der Studie von BOLDT et al. und in dieser Studie vergleichbare Höchstwerte von cE-Selektin in den Placebogruppen bzw. Kontrollgruppen bestanden hatten, waren die Ergebnisse in den anderen Gruppen (B und C) nicht mit den Patienten von BOLDT et al., die schwer krank waren, vergleichbar (10). Bei BOLDT et al. zeigte die Patientengruppe mit der Behandlung mit Enalapril einen annähernd gleichen Wert im Verlauf und am fünften Tag einen Normalwert. In unserer Studie stiegen die Werte der Enalaprilatgruppe ähnlich wie die Placebogruppe auf einen Durchschnittswert von 173 ng/mL und waren so deutlich über dem Normwert. Bei den Patientengruppen von BOLDT et al. waren die Adhäsionsmoleküle zu Beginn der Studie schon leicht erhöht, in unserem Model wurden erst durch die Gabe von LPS die Vorgänge zu Erhöhung der Adhäsionsmoleküle aktiviert.

Zudem hat die Verlaufsbeobachtung, um die Wirkungsweise von Enalapril zu analysieren, nur fünf Tage bei BOLDT et al. andauert. Wie der weitere Verlauf der

Adhäsionsmoleküle sein würde ist unbekannt. Dies wäre insofern wichtig, um einzuschätzen, wie lange die Werte der Adhäsionsmoleküle durch Enalapril gesenkt werden konnten. BOLDT besagt jedoch selbst in seiner Studie, dass die Patientengruppen viel zu klein waren, um eine Aussage zu machen, inwiefern Enalapril eine Sepsis oder den Schweregrad einer Sepsis beeinflussen kann. Die Werte der Adhäsionsmoleküle konnten zwar statistisch gesenkt werden, doch bei diesem komplexen Krankheitsbild kann man nicht davon ausgehen, dass Enalapril durch Verbesserung der Endothelläsion, auch im Krankheitsverlauf eine positive Bedeutung hat. Gewissermaßen sind auch in dieser Studie von BOLDT et al. weiterführende Studien notwendig, um bei schwerkranken Patienten mit Sepsis eine detaillierte Aussage im Hinblick auf die Einnahme von Enalapril zu machen.

Ebenso besteht ein deutlicher Unterschied, in welchem Ausmaß die Sepsis besteht. Unsere Studie hat versucht, bei gesunden Probanden Entstehungsmechanismen des septischen Krankheitsbildes annähernd darzustellen und zu beobachten. Verschiedene Sepsisformen konnten in unserem klinischen LPS-Modell nicht vollständig dargestellt werden.

Unterschiede in der Funktionsweise des Endothels und der Dauer der Entzündung zwischen jungen, männlichen und gesunden Patienten und schwer, kranken, sowohl männlichen als auch weiblichen Patienten, könnte ebenso eine Erklärung sein, dass Enalapril sich unterschiedlich auf die löslichen Adhäsionsmoleküle auswirkt.

#### **4.2.2 Parameter der ACE-Aktivität**

Die Zeitdauer der Behandlung war sowohl in dieser Studie, als auch in der Studie von BOLDT et al. identisch (10). BOLDT et al. stellten eine Abnahme der löslichen Adhäsionsmoleküle schon nach einem Tag fest. In dieser Studie wurde eine Standarddosis von 20 mg/Tag Enalapril verabreicht und man erreichte eine 95 %-tige Senkung der ACE-Aktivität. Man kann nach Veröffentlichungen im Bereich der Pharmakokinetik annehmen, dass das Maximum nach einer Studie der Enalapril Konzentration nach einer Stunde ungefähr 100 µg/L betragen hat.

Im Gegensatz haben BOLDT et al. 6 mg/d Enalaprilat verabreicht, nannten aber keine Werte der ACE-Aktivität und der renalen Funktion der Patienten. So ist es schwierig, die Konzentrationen und die Wirkung von Enalapril zwischen den Studien genau zu vergleichen. Die Patienten hatten in der Studie von BOLDT et al. teilweise erhöhte Werte des Serumkreatinins und man kann nicht genau feststellen, ob es

während dieser Studie zu einer Konzentrationsakkumulierung des Enalaprilats durch eine eingeschränkte Nierenfunktion gekommen ist.

#### **4.2.3 Dauer der Enalaprilbehandlung**

Ein anderer Ansatzpunkt den Studienaufbau zu verbessern, wäre die Dauer der Medikamenteneinnahme zu verändern. JILMA et al. führten eine Studie durch, in welcher hypertensive Patienten mit aktuell erhöhten Werten von Adhäsionsmolekülen zum einen mit Enalapril, zum anderen mit Losartan für acht Wochen behandelt wurden. Vorher bestand bei diesen Patienten noch keine medikamentöse Therapie gegen die Hypertension (40). 32 hypertensive Patienten nahmen an dieser Studie teil, die Hälfte der Gruppe erhielt Enalapril über acht Wochen, die andere Patientengruppe bekam Losartan, ebenfalls für acht Wochen. Zielblutdruck während der Studie war ein Blutdruckwert von 160/90 mmHg. Enalapril wurde am Anfang mit 2,5 mg/Tag verabreicht und über eine Woche auf 5 mg erhöht. In der zweiten Woche wurde 10 mg/Tag und in der dritten Woche 20 mg/Tag verabreicht. Sofern der Blutdruck weiterhin über 160/90 mmHg bestand, wurde gegebenenfalls fortführend 40 mg/Tag Enalapril eingenommen. Losartan wurde mit 50 mg/Tag für vier Wochen verabreicht und bei bestehender Hypertonie auch in den darauf folgenden Wochen auf 100 mg /Tag erhöht.

Neunzehn männliche und dreizehn weibliche hypertensive Patienten wurden mit einem Altersdurchschnitt von  $59 \pm 13$  Jahren in die Studien eingeschlossen. Ausgeschlossen wurden Patienten, die gleichzeitig kardiovaskuläre, cerebrovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus, Malignome oder beeinflussende chronisch inflammatorische Erkrankungen aufwiesen. Ausschlusskriterien waren zusätzlich die Einnahme von Aspirin oder Warfarin. Die zweite Gruppe bestand aus 32 normotensiven gesunden Probanden, sowohl weiblichen als auch männlichen Geschlechts und mit einem Altersdurchschnitt von  $58 \pm 14$  Jahren. Zusätzlich bestand eine weitere Gruppe von 32 gesunden Probanden, die jedoch einen Altersdurchschnitt von 27 Jahren aufwiesen (Alter zwischen 19-35 Jahren), da bei der gesunden Gruppe (Gruppe 2) aufgrund des fortgeschrittenes Alters arteriosklerotische Gefäßveränderungen nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnten. Auch die gesunden Probanden haben aufgeteilt jeweils Enalapril oder Losartan für acht Wochen erhalten (40).

Enalapril konnte signifikant cE-Selektine um 13 % senken, cICAM um 15 % und cVCAM um 19 %. Losartan besitzt in diesem Studienmodell keine Signifikanz (40).

Man könnte annehmen, dass in unserer Studie Enalapril bei verlängerter Einnahme ebenso einen signifikanten Einfluss auf die Adhäsionsmoleküle hat. Wiederum muss man beachten, dass es sich auch in dieser Studie nicht um septische Patienten handelte, sondern um hypertensive Patienten, die vorher schon bestandene Konzentrationserhöhungen von Adhäsionsmolekülen aufwiesen.

Die oben genannte Studie von JILMA et al. und von BOLDT et al. gibt jedoch weiteren Anlass, dass gewisse Pathomechanismen bei Patienten mit erhöhten Adhäsionsmolekülen, sowohl bei einer Hypertension, als auch gegebenenfalls bei einer Sepsis durch eine längere Einnahme von Enalapril eine Wirkung zeigen.

Eine fünftägige Einnahme des Medikaments könnte zu kurz sein, um ein signifikantes Ergebnis zu erreichen. Die Gruppe B und C in unserer Studie könnte in einer weiteren Studie verändert eingeteilt werden. Der Unterschied zwischen einer einmaligen und einer Einnahme von sechs Tagen zeigt keinen relevanten Unterschied in der Bedeutung der Pathogenese, wenn eine verlängerte Einnahme vermutlich benötigt wird. Um die benötigte Zeitspanne festzustellen, könnte beispielsweise Gruppe B eine vierwöchige Einnahme und Gruppe C eine achtwöchige Einnahme beinhalten. Dies wäre im Vergleich zu der Studie von JILMA et al. zusätzlich sinnvoll, um festzustellen, ob Enalapril bei gesunden Probanden ebenfalls eine Wirkung zeigt.

Warum eine verlängerte Einnahme von Enalapril oder eines ACE-Hemmers notwendig ist, um erhöhte Adhäsionsmoleküle zu senken, muss in weiteren Studien geklärt werden. Eine Studie von PEETERS et al zeigt, dass in einer in vitro Studie pharmakologische Mengen von ~ 220 mg/L Captopril notwendig waren, um eine durch LPS induzierte Erhöhung von Adhäsionsmolekülen zu senken (63). Eine Menge von 80 mg Captopril /Tag war ex vivo nicht ausreichend, um die Mediatoren von TNF- $\alpha$  und Interleukin-6 im septischen Modell, induziert durch LPS, zu senken (63).

Wenn ein ACE-Hemmer möglicherweise indirekt wirkt und die miteinander gekoppelten Ablaufvorgänge nicht kurzfristig funktionieren können, ergibt sich eine weitere Vermutung, warum eine Einnahme von mehreren Wochen notwendig ist.

### **4.3 Verschiedene Krankheitsbilder im Vergleich bei Einnahme von ACE-Inhibitoren**

#### **4.3.1 Diabetes mellitus**

ANDERSEN et al. untersuchten in einer Studie Patienten, die an Diabetes mellitus Typ I leiden und zusätzlich eine diabetische Nephropathie besitzen. Es bestanden fünf Behandlungsperioden, jede davon dauerte acht Wochen und in dieser Zeit wurden 16 Patienten in die Studie zur Auswertung eingeschlossen. 29 gesunde Probanden bestanden in der Kontrollgruppe. In der achtwöchigen Behandlungszeit wurde entweder ein Placebo, Losartan mit einer Menge von 50 mg oder 100 mg /Tag oder Enalapril mit einer Menge von 10 mg oder 20 mg /Tag verabreicht. Untersucht wurden die Adhäsionsmoleküle von cE-Selektin, cICAM-1 und cVCAM-1, die im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe bei den Patienten schon zu Anfang erhöht waren. Eine circa zehnpromtente signifikante Senkung von cVCAM-1 und cE-Selektin wurde durch die Einnahme von Enalapril erreicht. Die Konzentrationen von cICAM-1 konnten nicht durch die Einnahme von Enalapril beeinflusst werden (4). Diese Studie belegt, dass die Einnahme von Enalapril über acht Wochen mit einer täglichen Menge von 10 bzw. 20 mg/Tag signifikant die löslichen Adhäsionsmoleküle von cE-Selektin und c-VCAM-1 senkt.

Eine andere Studie von GASIC et al. zeigte bei elf Patienten mit nicht insulinabhängigem Diabetes mellitus und bestehender Mikroalbuminurie, dass durch die Einnahme von Fosinopril mit einer Menge von 10 mg/ Tag über zwölf Wochen die löslichen Adhäsionsmoleküle von cVCAM um 19 % gesenkt werden konnten (27). Erhöhte cVCAM Moleküle sind pathognomonisch für Diabetes mellitus mit Mikroangiopathie. Die Behandlung zeigte keine signifikanten Ergebnisse bei der Senkung von cE-Selektin und cICAM. Zu Beginn der Studie waren alle diese drei Adhäsionsmoleküle im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe deutlich erhöht.

Eine Studie von SCHALKWIJK et al. zeigte eine Senkung von cE-Selektin sowohl bei der gesunden Kontrollgruppe, als auch bei der Patientengruppe, die an Diabetes mellitus Typ I seit circa 13,8 (2 - 30) Jahre, davon sieben Patienten zusätzlich an einer Mikroalbuminurie, leiden. Beide Gruppen haben Quinapril über fünf Wochen mit einer täglichen Menge von 10 mg eingenommen. Andere Endothelmarker waren durch die Einnahme nicht beeinflusst.

In dieser Studie ist es auffallend, dass die löslichen Adhäsionsmoleküle von cE-Selektin ebenfalls signifikant bei gesunden Probanden gesenkt werden konnten (73).

#### **4.3.2 Hypertension**

RUIZ-ORTEGA et al. belegen in einer Studie, dass bei Patienten mit Hypertension erhöhte Werte von Adhäsionsmolekülen bestehen, beschreibt jedoch auch eine erhöhte Anziehungskraft auf Adhäsionsmoleküle bei geschädigtem Endothel (72).

FERRI et al. führten eine Studie bei Patienten mit Hypertension ohne bestehende Adipositas durch und untersuchten bei einer zwölfwöchigen Einnahme von Enalapril, ob die löslichen Adhäsionsmoleküle von cE-Selektin, cVCAM-1 und cICAM-1 gesenkt werden konnten. Die erste Gruppe bestand aus 16 Patienten mit essentieller Hypertension, die gleichzeitig eine gestörte Glukosetoleranz und eine Hyperlipidämie hatten. Die zweite Gruppe beinhaltete 25 Patienten mit zusätzlicher gestörter Glukosetoleranz zur essentiellen Hypertension. Die dritte Gruppe bestand aus 28 Patienten mit essentieller Hypertension und Hyperlipidämie, die vierte Gruppe jedoch aus 28 Patienten mit essentieller Hypertension, die keine metabolischen Dysfunktionen aufwiesen. Zusätzlich wurden bei 22 gesunden Probanden die untersuchten Parameter gemessen. Alle Gruppen mussten vor Studienbeginn eine einwöchige, gewichtsadaptierte Diät einhalten und waren vorher nicht medikamentös aufgrund ihrer Hypertension behandelt worden. Zehn bis zwölf Stunden vorher, wurde eine Fastenzeit eingehalten, danach wurde den Gruppen jeweils 75 g D-Glukose verabreicht. Am Abend wurde beginnend 5 mg Enalapril gegeben. In der zweiten Woche wurde 10 mg/ Tag und ab der vierten Woche 20 mg/ Tag verabreicht. Diese Dosierung wurde für die weiteren Wochen eingehalten, wenn der diastolische Blutdruckwert nicht über 95 mm Hg bestand. Patienten, die stattdessen ein Placebo erhalten haben, wurden zur Blutdrucksenkung mit 50 mg Losartan/ Tag oder mit 25 mg Hydrochlorothiazid behandelt.

Patienten, aller Gruppen, die 20 mg/ Tag Enalapril erhalten haben, zeigten die größte Abnahme von löslichen Adhäsionsmolekülen:

##### **cE-Selektin:**

- 52,5 % nach sechs Wochen
- 80,2 % nach zwölf Wochen

##### **cICAM-1:**

- 40,5 % nach sechs Wochen



- 55,7 % nach zwölf Wochen

**cVCAM-1:**

- 30,2 % nach sechs Wochen

- 39,4 % nach zwölf Wochen

Die geringste Abnahme wurde bei Patienten erreicht, die 5 mg/Tag Enalapril erhalten haben:

**cE-Selektin:**

- 28,1 % nach sechs Wochen

- 56 % nach zwölf Wochen

**cICAM-1:**

- 26,1 % nach sechs Wochen

- 38,5 % nach zwölf Wochen

**cVCAM-1:**

- 16,7 % nach sechs Wochen

- 25,7 % nach zwölf Wochen

Eine weitere wichtige Erkenntnis in dieser Studie ist, dass statistisch keine signifikanten Unterschiede in der Therapielänge bei den löslichen Adhäsionsmolekülen von cICAM-1 und cVCAM-1 sich ergab. Jedoch zeigte cE-Selektin nach zwölf Wochen im Vergleich zu sechs Wochen eine weitere statistisch signifikante Abnahme durch Enalapril. Die Abnahme der Adhäsionsmoleküle korrelierte nicht mit einer gleichzeitig stattgefundenen Blutdruckabnahme. Patienten, die zusätzlich Hydrochlorothiazid erhalten haben, zeigten keine verstärkte Senkung. Die Dosierung der Enalaprilmenge zeigte in einem Zeitraum von sechs bis zwölf Wochen eine Relevanz, inwieweit die löslichen Adhäsionsmoleküle abnehmen. In dieser Studie besteht die Vermutung, dass die Wirkung durch die verminderte Konzentration von Angiotensin bedingt ist (25).

Ob die Erhöhung der Adhäsionsmoleküle durch Diabetes mellitus oder Hypertension andere Pathomechanismen aufweisen oder ähnliche Abläufe beim septischen Krankheitsbild bestehen, muss weiter und detaillierter untersucht werden. Der Vergleich unter diesen Krankheitsbildern ist generell schwierig, ebenso gewisse molekularbiologische Abläufe zwischen unterschiedlichen Krankheitsbildern zu übertragen. Es bleibt bis heute ungeklärt, auf welche Art und Weise ein ACE-Hemmer die Senkung von Adhäsionsmolekülen bewirkt.

Ein gewisser Ansatz, dass ein ACE-Inhibitor Einfluss auf die Verminderung von Adhäsionsmolekülen besitzt, welche durch verschiedene Krankheitsbilder aktiviert und die Konzentrationen erhöht wurden, bleibt weiterhin bestehen. Detaillierte Studien müssen zusätzlich klären, welcher Art von ACE-Inhibitor und in welcher Dosierung die besten Wirkungen erzielt werden.

#### **4.3.3 LPS-Studien**

MIYOSHI et al. haben bei der nachfolgend aufgeführten, tierexperimentelle Studie versucht darzustellen, das Angiotensin II an der LPS-induzierten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen bei Ratten unter dehydrierenden Bedingungen mitbeteiligt ist (53).

Die unter dehydrierenden Bedingungen durchgeführte Studie hatte Ratten 24 Stunden vor Studienbeginn kein Trinkwasser verabreicht. Salmonella typhosa Endotoxin wurde zur LPS-Herstellung genutzt. In zusammenfassender Form wurde den Ratten 2 µg/kg LPS injiziert, 30 Minuten davor wurde 20 mg/kg Lisinopril verabreicht. Gleichzeitig bestand eine Gruppe von Ratten, die statt Lisinopril ein Placebo erhalten haben und eine Kontrollgruppe, die sowohl kein LPS, als auch kein Lisinopril erhalten haben. Anschließend wurden die Ratten so präpariert, dass in der Leber das IL-1β mRNA und das IL-1β Protein gemessen werden konnten (53).

Zusätzlich wurden eine Stunde vor und zwei bzw. vier Stunden nach der LPS-Injektion Blutabnahmen durchgeführt, um die Plasmakonzentrationen von IL-1β und Interleukin-6 zu bestimmen. Wichtige Ergebnisse im Hinblick auch auf diese Studie sind, dass zum einen eine Vorbehandlung mit Lisinopril die deutlich erhöhten Werte von IL-1β mRNA und IL-1β Protein, durch LPS induziert, zwei und vier Stunden nach LPS Gabe, signifikant gesenkt werden konnten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine einzelne Gabe von LPS, in der oben beschriebenen Dosierung einen signifikanten Anstieg nach zwei und vier Stunden nach LPS-Verabreichung von IL-1β und IL-6 erzeugt. Diese konnten signifikant durch die Vorbehandlung mit Lisinopril gesenkt werden und mittels mehrfach wiederholter Messungen mit ANOVA dargestellt werden (53).

Diese Studie hatte durch Vorkenntnisse aus in vitro Studien gezeigt, dass Angiotensin II durch LPS produzierenden Zytokine mitbeteiligt ist (63, 74). Zytokine werden über den Transkriptionsfaktor NF-κB reguliert und induziert. Diese Abläufe werden durch die Anwesenheit von Angiotensin II verstärkt aktiviert (43, 53). Man

kann vermuten, dass die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, welches durch LPS induziert wird, zusätzlich durch Angiotensin II verstärkt wird. Um dies jedoch zu beweisen, müssen noch weiterführende Studien durchgeführt werden.

Zu beachten ist, dass eine Vielzahl von Mediatoren ebenfalls Zytokine aktivieren können und dies nicht nur über Angiotensin vermittelt wird.

Weiterhin können Unterschiede bestehen, welches LPS aus welchem Bakterium im pharmakologischen Modell benutzt wird. Auch hieraus würden sich verschiedene Grade der Aktivierung von Zytokinen ergeben (53).

Ein weiterer wichtiger Ansatz in dieser Studie ist, diese ebenfalls unter euhydrierenden Bedingungen durchzuführen, doch dies wird wahrscheinlich dazu führen, dass man sehr hohe Dosierungen von LPS benutzen muss.

Eine tierexperimentelle Studie von NIIMI et al. zeigte, dass eine durch LPS induzierte Erhöhung von TNF- $\alpha$  und IL-6, durch Enalapril mit einer einmaligen Dosis signifikant gesenkt werden konnten (58). Das Experiment wurde in zwei Bereiche aufgeteilt. Zum einen wurde unter standardisierten Bedingungen acht Wistar-Ratten 12 mg/kg Angiotensin II pro Stunde für vier Stunden verabreicht und anschließend wurden die Werte von TNF- $\alpha$  und IL-6 mRNA gemessen. Der zweite Teil beinhaltete, dass die Ratten in vier Gruppen aufgeteilt wurden. Gruppe I bekam destilliertes Wasser zu trinken und war die Kontrollgruppe. Gruppe II trank ebenfalls destilliertes Wasser und hat nach 20 Minuten 1 mg LPS (*Escherichia coli* O127; B8) intraperitoneal verabreicht bekommen. Gruppe III hat 10 mg/kg peroral Enalapril erhalten, Gruppe IV bekam 10 mg/kg einen AT-1 Rezeptor Antagonist (TCV-116). Gruppe III und IV haben beide dieselbe Menge wie Gruppe II LPS erhalten. Zwei und vier Stunden später wurden die Werte von TNF- $\alpha$ , IL-6, Renin und Angiotensinogen mRNA bestimmt. Zusätzlich wurden weiteren Ratten 0,1 und 0,5 mg derselben LPS Art verabreicht um dosisabhängig zu erkennen, ob unterschiedliche Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-6 mRNA aktiviert wurden (58).

Angiotensin II aktivierte 1,9-fach TNF- $\alpha$  und 2,1-fach IL-6 mRNA. Enalapril hat signifikant die Werte von TNF- $\alpha$ , welche in der Niere über Genexpression gebildet wurden, nach vier Stunden senken können. IL-6 wurde jeweils nach zwei und vier Stunden durch Enalapril signifikant gesenkt. LPS hat je nach Dosierung unterschiedlich stark TNF- $\alpha$  und IL-6 mRNA aktiviert und zeigte vier Stunden nach Applikation von 1 mg LPS einen 2,8-fachen Anstieg von TNF- $\alpha$  und einen 3,3-fachen Anstieg von IL-6 mRNA (58).

Wichtige Erkenntnisse in diese Studie sind, dass eine einzelne Dosis in vivo eine Suppression der wichtigsten Mediatoren TNF- $\alpha$  und IL-6 der Sepsis zur Folge hatte. LPS erhöht zusätzlich durch die Aktivierung von Angiotensin II die Menge von der in der Niere gebildeten Gene für TNF- $\alpha$  und IL-6 (58).

PEETERS et al. konnten in ihrer Studie nur eine Suppression von Zytokinen erreichen, wenn suprapharmakologische Mengen von Captopril verabreicht wurden (58). In dieser Studie konnte in vivo, jedoch im Tiermodell, mit einer einzigen Dosis von Enalapril eine Wirkung erzielt werden.

#### **4.4 Diskussion um die Wirkungsweise von Enalapril**

Das ACE Molekül ist identisch mit der Kininase II, welches den Abbau von Bradykinin bewirkt. Weiterhin führt es zu einer erhöhten Ausschüttung des Angiotensin II. Bradykinin führt zur endothelialen Freisetzung von NO, Prostazyklin und dem EDHF (*endothelial derived hyperpolarization factor*), welches eine Gefäßdilatation zur Folge hat (22).

Die Wirkungsweise von Angiotensin und Bradykinin wurden vorwiegend bei Patienten mit Hypertension, Arteriosklerose, koronare Herzkrankheit und Postinfarktpatienten erforscht (21, 22, 25, 27, 32, 40, 73). Doch auch hier sind wichtige Erkenntnisse entdeckt worden, die helfen können, die Wirkungsweise des ACE-Inhibitors im septischen Krankheitsbild zu verstehen. Jedoch ist die Wirkung eines ACE-Inhibitors nach einer länger bestehenden Einnahme beschrieben worden. Vorgänge bei denen z. B ein ACE-Inhibitor arteriosklerotische Prozesse aufhalten bzw. verbessern konnte, sind erst nach Wochen aufgetreten (4, 21, 25, 27, 32, 40, 73).

Angiotensin II ist ein potenter Stimulator des oxidativen Stresses in der Gefäßwand (22). Wird der Angiotensin II Type 1(AT<sub>1</sub>) Rezeptor aktiviert, führt dies zur Produktion von dem ROS (*reactive oxygen species*) System in der Gefäßwand, welches über ein wichtiges Sauerstoffradikal-produzierendes Enzym in der Gefäßwand, der NADPH-Oxidase katalysiert wird (12, 22, 72). Oxidativer Stress führt nun zur vermehrten Aktivierung von NF- $\kappa$ B und dieser Transkriptionsfaktor verursacht eine vermehrte Bildung und Ausschüttung von E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1 und MCP-1 (monozytäres chemotaktisches Peptid). Weiterhin wird der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und Interleukin-6 vermehrt ausgeschüttet, die wichtige Signalkaskaden auslösen, die

als proinflammatorisch, proliferativ und proarteriosklerotisch anzusehen sind. (12, 22, 72, 62).

Eine vermehrte Konzentration von Sauerstoffradikalen und eine gesteigerte Aktivität von NF- $\kappa$ B führt zu einer verminderten biologischen Bioverfügbarkeit von NO. Dabei führt eine gesteigerte NADPH-Oxidase, zur Bildung von Peroxynitrit (Reaktionsprodukt von NO und Superoxid) und diese bedingt eine vermehrte Oxidierung der NO-Synthase-Kofaktors Tetrahydrobiopterin. Diese Abläufe führen zu einer „Entkopplung“ der endothelialen NO-Synthase und somit wird nicht nur Stickstoffmonoxyd produziert, sondern auch in höherer Masse Sauerstoffradikale. (12, 22, 72, 66). Es konnte gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  über eine Destabilisierung der für die endotheliale NO-Synthase kodierenden mRNA zu einer verminderten Expression der NOS-III führt. In der Endothelzelle kommt nur die NOS-III vor, eine Isoform der NO-Synthase, die für die Bildung von Stickstoffmonoxid zuständig ist. (49, 99).

Eine Studie von RAHMAN et al. belegt, dass ROS zu einer vermehrten Ausschüttung von TNF- $\alpha$  führt und dieser über eine vermehrte Aktivierung von dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, eine vermehrte Ausschüttung von E-Selektin, bedingt (67).

Zudem belegen weitere Studien eine durch Angiotensin erhöhte Expression von E-Selektin auf dem Endothel und eine erhöhte Konzentration von Leukozyten (62, 44). Angiotensin II aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, obwohl nicht vollständig geklärt ist, ob auf direktem oder indirektem Wege (12). Eine tierexperimentelle Studie, von BRASIER et al. durchgeführt, konnte zeigen, dass bei einer einmaligen Dosis von Endotoxin aus Bakterien eine fünffach erhöhte Bildung des Angiotensinogen durch die Genexpression von mRNA verursacht wurde (12, 70) und Angiotensinogen nach acht Stunden nach Endotoxingabe dreifach erhöht im Blutkreislauf zu messen war (61). Es wurde zudem festgestellt, dass 70 % aller Patienten mit schwerer Infektion eine zweifach erhöhte Konzentration von Angiotensinogen im Blut besitzen (12, 33). Dies konnte darauf hinweisen, dass im septischen Geschehen Angiotensin vermehrt aktiviert ist und es über oben beschriebene mögliche Kaskaden zur vermehrten Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen kommt.

Es bestehen auch Vermutungen, dass Angiotensin z. B. bei Arteriosklerose nicht nur über das Renin-Angiotensin-System aktiviert wird, sondern auch unabhängig über

ein lokales System im Gefäßsystem aktiviert wird, welches lokal den Kreislauf über das Angiotensin II zu inflammatorischen Prozessen weiterführt (12).

Ein weiterer Grund, dass ein ACE-Inhibitor eher über verminderte Bildung von Angiotensin bei der Reduzierung von Adhäsionsmolekülen mitwirkt, ist, dass auch selektive Angiotensin Typ-1 Rezeptorinhibitoren diese Wirkungen in Studien bewiesen haben und auf diesem Wege kein Einfluss auf das Kininsystem, vermehrter Bradykininkonzentration und erhöhter NO,- und Prostazyklinausschüttung besteht (12).

Im Gegensatz dazu deuten viele Studien auf die Bedeutung von vermehrter NO-Verfügbarkeit hin (12, 40, 64, 72, 88). Endothelzellen besitzen den Bradykinin Typ 2 Rezeptor und auf diesem Wege werden vermehrt NO freigesetzt (14).

RUIZ-ORTEGA berichtet über Studien, in denen Endothelläsionen eine durch Angiotensin II vermittelte erhöhte Migration-, und Adhäsionsaktivität von Leukozyten an das erkrankte Endothel in vivo und in vitro herbeiführen (72).

ACE-Inhibitoren wirken auf die Endothelläsion auf zwei Wegen, da sie die Gegenspieler Angiotensin II und NO beidseitig beeinflussen (22). Jedoch zeigte auch eine in vitro Studie das Prostazyklin ( $PGI_2$ ) eine Hemmung der Leukozytenmigration bewirkt und diese Abläufe werden ebenfalls durch den ACE-Inhibitor beeinflusst (88, 96).

PENG et al. zeigen in einer Studie, dass NO in höheren Konzentrationen die Aktivierung von NF-kB inhibiert (96), diese These wurde in vielen weiteren Studien bestätigt (22, 66, 90, 93, 95). NO stabilisiert den NF-kB Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  insofern, dass es die Dephosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  verhindert und auf diesem Wege wird vermutet, dass NF-kB inhibiert wird (64, 100). Weiterhin schützt das Stickstoffmonoxid vor vermehrter Sauerstoffradikalbildung, welches proinflammatorische Wirkungen zeigt (22, 64). PENG et al. vermutet, dass NO die Adhäsionsmoleküle cICAM-1, cVCAM-1 und eE-Selektin in der Anzahl verringert und zusätzlich das IL-6 inhibiert (64). Jedoch reicht die endogene NO Ausschüttung nach Meinung von PENG et al. nicht aus, sondern man vermutet auch die Notwendigkeit von exogenem NO (64).

Eine Studie von WALTHER et al. zeigt ebenso die Bedeutung von Stickstoffmonoxid während einer Endotoxämie. NO schützt das Endothel, während der Leukozytenadhäsion in der septischen Kaskade. Doch auch hier sind weitere Studien notwendig, um genaue Entstehungsmechanismen aufzudecken (95).

DREXLER et al. sehen die Grundlage für eine Endotheldysfunktion in einer verminderten NO-Verfügbarkeit, wie diese zum Beispiel durch vermehrte Angiotensin II Bildung bedingt sein kann (22). DREXLER et al zeigt in durchgeführten Studien, dass eine verminderte Konzentration von NO beim Kaninchen, sowohl in vitro als auch in vivo, eine Zunahme der Leukozytenadhäsionsneigung bewirkt (22):

Weiterhin wurde in einem Tierversuch von Mäusen in einem *knockout* - Modell von DREXLER et al. beschrieben, dass durch Inaktivierung der NO - Synthase, deutlich erhöhte Leukozytenadhäsionen stattgefunden haben (22).

In einem weiteren Tiermodell von DREXLER et al., konnte bei Cholesterin - gefütterten Kaninchen gezeigt werden, dass eine Überexpression der NO-Synthase zu einer deutlicheren Konzentrationserniedrigung von Adhäsionsmolekülen , wie z. B ICAM-1 und VCAM-1, führt (22). Man vermutet, dass eine chronische Inhibierung von NO zu einem vermehrten oxidativen Stress führt und auf diesem Wege NF-kB deutlich erhöht ist und proinflammatorische Zytokine verstärkt induziert werden (22, 90).

Zusammenfassend könnte dies auch eine Erklärung für die Wirkungsweise bei Enalapril bedeuten, da durch den ACE- Hemmer erst mal grundlegend erhöhte Konzentrationen von NO entstehen und zusätzlich erniedrigte Konzentrationen von Angiotensin II bestehen. Es bleiben jedoch viele detaillierte Fragen offen, auf welchem Wege dies genau funktioniert.

Erhöhte Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und von NF-kB sind beides Faktoren, die wesentlich zur Sepsis beitragen. Könnten diese Werte vermindert werden, nimmt man an, die Prognose einer Sepsis verbessern zu können. Es ist noch nicht vollständig geklärt worden, welche genaue Wertigkeit besteht, wenn man die Konzentration von NF-kB vermindert, aber eine therapeutische Bedeutung gibt Anlass zu weiteren Untersuchungen.

Zusammenfassend hat man durch verschiedene Studien gesehen, dass ACE - Inhibitoren Wirkungen bei verschiedenen Krankheitsbildern bewiesen haben, lösliche Adhäsionsmoleküle zu senken und proinflammatorische Vorgänge zu minimieren, jedoch in unterschiedlicher Zeitdauer und bei verschiedenen ACE-Inhibitoren (10, 21, 25, 27, 32, 40, 73).

Im Hinblick auf Patienten, die an Sepsis erkrankt sind, bleiben noch viele Fragen offen, in welcher Art und Weise ein ACE-Inhibitor eine Verbesserung erzielen könnte. Ansätze, die dafür sprechen sind vorhanden, doch beruhen sie zur Zeit auf

suprapharmakologische Dosierungen, tierexperimentelle Studien oder wie bei BOLDT et al., bei Patienten, mit bestehenden komplexen Krankheitsbildern, so dass eine klare Aussage auch zur Zeit nicht zu machen ist (10, 58, 63, 74). Es bleibt meiner Meinung nach offen, auf welche Wirkungsweise ein ACE-Inhibitor die Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen zusätzlich minimieren kann. Wenn in nachfolgenden Studien belegt werden kann, auf welche Weise ein ACE-Inhibitor signifikant Adhäsionsmoleküle senken kann, bleibt in weiterführenden Studien zu klären, ob die Gefahr bei Sepsis einen hypodynamischen Schock zu erlangen, verstärkt wird bzw. ab welcher Dosierung und Dauer der ACE-Inhibitoreinnahme. Bei einer Sepsis sind die zeitlichen pathologischen Abläufe in einem weit aus schnellerem Fortschreiten vorhanden, als zum Beispiel einer Arteriosklerose.

Studien zeigen jedoch, dass die Wirkung von ACE-Inhibitoren auf die Absenkung von Adhäsionsmolekülen bei Krankheitsbildern, wie zum Beispiel der Hypertension erst nach mehreren Wochen eintritt (25, 27, 40). Meiner Meinung nach sind Ansätze zur Anwendung eines ACE-Inhibitors bei einer Sepsis vorhanden. Jedoch könnte eine wochenlange Therapiedauer bei einer Sepsis zu lange sein, um dennoch frühzeitig in das Kaskadensystem der Sepsis einzugreifen ohne neu induzierte, schwerwiegende Komplikationen zu bewirken.



## 5 Zusammenfassung

In dieser Studie untersuchte man die Auswirkungen eines ACE-Inhibitors Enalapril in einer LPS induzierten, TNF $\alpha$  vermittelten systemischen Entzündung und betrachtete, ob eine Verminderung der erhöhten Adhäsionsmoleküle während einer Sepsis durch Enalapril gesenkt werden könnte.

30 männliche Probanden, die ein Alter von durchschnittlich  $31 \pm 5$  (SD) und einen Body Maß Index von  $22 \pm 2$  (SD) hatten, wurden in einer randomisierten, doppelblind placebo-kontrollierten Studie per Zufall in drei parallele Gruppen (A, B, C) unterteilt.

Die Probanden waren einschließlich normaler Laborwerte gesund und dies wurde durch eine Voruntersuchung gesichert.

Gruppe A erhielt sechs Tage ein Placebo, Gruppe B fünf Tage ein Placebo und am 6. Tag (Studientag) 20 mg Enalapril und Gruppe C sechs Tage 20 mg Enalapril.

Man konnte anhand von gemessenen Parametern, wie zum Beispiel cE-Selektin, cICAM-1, cVCAM-1, TNF- $\alpha$  und zelluläre Parameter, keine signifikante Veränderung durch Enalapril feststellen. Dies bedeutet, dass eine kurzfristige Hemmung der ACE-Aktivität durch Enalapril in dieser Dosierung keinen positiven Einfluss auf die LPS induzierte, TNF- $\alpha$  vermittelte Aktivierung von Endothel, Leukozyten und der Adhäsionsmoleküle während einer Endotoxinämie hat.

## Literaturverzeichnis:

- 1 Adams D. A., Shaw S., **Leukocyte endothelial interactions and regulation of leukocyte migration**, *The Lancet, Review article*, (343), 1994, S. 831 - 835
- 2 Akira S., **Toll-like receptors: lessons from knockout mice**, *Biochem. Soc. Trans.*, (28), 2000, S. 551 - 556
- 3 American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine Consensus Conference, **Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis**, *Crit. Care Med.*, (20), 1992, S. 865 - 867
- 4 Andersen S., Schalkwijk C. G., Stehouwer C. D., Parving H. H., **Angiotensin II blockade is associated with decreased plasma leukocyte adhesion molecule levels in diabetic nephropathy (letter)**, *Diabetes Care*, (23), 2000, S. 1031 - 1032
- 5 Angus D.C., Linde-Zwirble W.T., Lidicker J., et al.: **Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care**, *Crit. Care Med.*, (29), 2001, S. 303 - 1310.
- 6 Beutler B., **Tlr 4: central component of the sole mammalian LPS sensor**, *Curr. Opin. Immunol.*, 2000, S. 12 - 20
- 7 Blann A.D., Lip G.Y., **Raised levels of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in the plasma of patients with ischemic heart disease and hyperlipidaemia**, *Arteriosclerosis*, (141), 1998, S. 177 - 178
- 8 Böcker W., Denk H., Heitz P. U., **Pathologie, 7. Allgemeine Kreislauf-Pathologie**, *Urban & Schwarzenberg*, S. 223 - 224
- 9 Bönner G., **The Role of Kinins in the antihypertensive and cardio protective effects of ACE Inhibitors**, *Drugs*, (54), (5), 1997, S. 23 - 30
- 10 Boldt J., Müller M., Kuhn G., Linke L. C., Hempelmann G., **Circulating adhesions molecules in the critically ill: A comparison between trauma and sepsis patients**, *Intensive Care Med*, (22), 1996, S. 122 - 128
- 11 Bone R.C., **Review: The Pathogenesis of Sepsis**, *Annals of Internal Medicine*, (115),( 6), 1991, S. 457 - 467
- 12 Brasier A.R., Recinos A., Eledrisi M.S., **Vascular Inflammation and the Renin-Angiotensin System**, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2002, (22; 8), S. 1257 - 1266
- 13 Brown N. J., Agirbasli M., Vaughan D. E., **Comparative effect of angiotensin-**

- converting enzyme inhibition and Angiotensin II type 1 receptor antagonism on plasma fibrinolytic balance in humans, *Hypertension*, (34), 1999, S.285 - 290**
- 14 Charles D., Harrison S., Harrison D. G., **The interaction of nitric oxide, bradykinin, and the angiotensin II type 2 receptor: lessons learned from transgenic mice, *Clin. Invest.*, 1999, (194;8), S. 1013 - 1014**
- 15 Claasen M., Diehl V., Kochsiek K., **Innere Medizin, Urban Schwarzenberg, 1999, Kapitel 7, S. 97 - 99**
- 16 Cowley H. C., Heney D., Gearing A. J. H., Hemingway I., Webster N. R., **Increased circulating adhesion molecule concentrations in patients with the systematic inflammatory response syndrome: A prospective cohort study, *Crit. Care Med.*, (22), (4), 1994, S. 651 - 657**
- 17 Cronstein B. N., Kimmel S. C., Levin R. I., Martiniuk F., Weissmann G., **A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1, *Proc. Natl. Acad Sci U.S.A.*, (89), 1992, S. 9991 - 9995**
- 18 Cummings C. J., Sessler C. N., Beall L. D., Fisher B. J., Best A. M., Fowler A. A., **Soluble E-selektin levels in sepsis and critical illness. Correlation with infection and hemodynamic dysfunction, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, (156), 1997, S. 431 - 437**
- 19 Damas P., Ledoux D., Nys M., Vrindts Y., de Groote D., Franchimont P., Lamy M., **Cytokine serum level during severe sepsis in human, IL-6 as a marker of severity, *Ann Surg*, (215), 1991, S. 356 - 362**
- 20 von Herrath D., Thimme W., **Angiotensin-II-Rezeptor-Blocker, *Der Arzneimittelbrief*, 2001, Band 35, S. 476 - 480**
- 21 Drexler H., Kurz S., Jeserich M., Münzel T., Hornig B., **Effect of Chronic Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition on Endothelial Function in Patients with Chronic Heart Failure, *Am J Cardiol*, (76), 1995, 13E - 18E**
- 22 Drexler H., Landmesser U., **Endothelfunktionen und kardiovaskuläre Erkrankungen, *Unimed Verlag*, 2. Auflage 2003, Kapitel 2 - 5, 10, 14.2**
- 23 Egerer K., Rohr U., Krausch D., Kox W., **Die zirkulierenden Adhäsionsmoleküle cICAM-1 und cE-Selektin bei Patienten mit Sepsis, *Der***

- Anästhesist*, (46), 1997, S. 592 - 598
- 24 Endo S., Inada K., Kasai T., Takakuwa T., Yamanda Y., Koike S., Wakabayashi G., Niimi M., Taniguchi S., Yoshida M., **Levels of Soluble Adhesion Molecules and Cytokines in Patients With Septic Multiple Organ Failure**, *Journal of Inflammation*, (46), 1996, S. 212 - 219
- 25 Ferri C., Desideri G., Balconcini R., Bellini C., De Angelis C., Mazzocchi C., Santucci A., **Early activation of vascular endothelium in nonobese, nondiabetic essential hypertensive patients with multiple metabolic abnormalities**, *Diabetes*, 1998, (47), S. 660 - 667
- 26 Fong Y., Moldawer L. L., Shires G.T., Lowry S. F., **The biologic characteristics of cytokines and their implications in surgical injury**, *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, (170), 1990, S. 363 - 370
- 27 Gasic S., Wagner O. F., Fasching P., Ludwig C., Veitl M., Kapiotis S., Jilma B., **Fosinopril decreases levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in borderline hypertensive type II diabetic patients in microalbuminuria**, *Am. J. Hypertens.*, (12), 1999, S. 217 - 222
- 28 Gibbons G. H., **Cardioprotective Mechanisms of ACE-Inhibition, The Angiotensin II-Nitric Oxide Balance**, *Drugs*, (54), (5), 1997, S. 1 - 11
- 29 Gomez H. J., Cirillo V. J., Irvin J. D., **Enalapril: A Review of Human Pharmacology**, *Drugs*, (30), (1), 1985, S. 13 - 24
- 30 Heinrich P., Castell J., Andus T., **Interleukin 6 and the acute phase response**, *Biochemical Journal*, (265), 1990, S. 621 - 636
- 31 Herold G., **Innere Medizin**, Köln, 2000, S. 107 - 108
- 32 Hernandez-Presa M., Bustos C., Ortego M., Tunon J., Ortega L., Egido J., **Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis**, *Circulation*, 1997, (95), S. 1532 - 1541
- 33 Hoj N., Knudsen F., **Angiotensinogen is an acute-phase protein in man**, *Scand J Clin Lab Invest.*, 1987, (47), S. 175 - 178
- 34 Hornig B., Drexler H., **Endothelial Function and Bradykinin in Humans**, *Drugs*, (54), (5), 1997, S. 42 - 47
- 35 Horn D. L., Opal S. M., Lomastro E., **Antibiotics, Cytokines, and Endotoxin: A Complex and Evolving Relationship in Gram-Negative Sepsis**, *Scand J*

- Infect Dis Suppl*, (101),1996, S.9 - 13
- 36 Hitzenberger G., **Wiener Medizinische Wochenschrift**, **ACE-Hemmer aus der Sicht des klinischen Pharmakologen**, 1996, Heft 11
- 37 Janeway C. A., Travers P., **Immunologie**, Spektrum Akademischer Verlag, 1997, Kapitel 7/ 9, S.276-281, S. 345 - 362
- 38 Johnstone A. P., Turner M. W., **Immunochemistry 1/2**, **Oxford University Press**, 1997, Kapitel 7, S. 182 - 183
- 39 Jilma B., Blann A., Pernersdorfer T., Stohlawetz P, Eichler H., Vondrovec B., Amiral J., Richter V., Wagner O.F., **Regulation of adhesion molecules during human endotoxaemia. No acute effects of aspirin**, *Am J Respir. Crit Care Med*, (159), 1999, S. 857 - 863
- 40 Jilma B., Li-Saw-Hee F. L., Wagner O. F., Beevers D. G., Lip G. Y., **Effects of enalapril and losartan on circulating adhesion molecules and monocyte chemotactic protein-1**, *Clin Sci (Lond)*, (103), (2), 2002, S. 131 - 136
- 41 Kayal S., Jais J. P., Chaudiere J., Labrousse J., **Elevated circulating E-selektin, intercellular adhesion molecule-1, and von Willebrand Factor in patients in severe infection.**, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*, 1998, S. 776 - 784
- 42 Kirkland T., Lecturcq D., Moriaty A., Lee J., Ulevitch R., Tobias P., Finley F., **Analysis of Lipopolysaccharide binding by CD 14**, *J Biol Chem*, (268), 1993, S. 818 - 823
- 43 Kranzhofer R., Browatzki M., Schmidt J., Kubler W., **Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-  $\kappa$ B in human monocytes**, *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, (257), S.826 - 828
- 44 Krejcy K., Eichler H. G., Jilma B., Kapiotis S., Woltz M., Zanaschka G., Gasic S., Schütz W., Wagner O., **Influence of angiotensin II on circulating adhesion molecule and blood leukocyte count in vivo**, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1996, (74), S. 9 - 14
- 45 Kuhns D. B., Alvord W. G., Gallin J. I., **Increased circulating cytokines, cytokines antagonists, and E-selektin after intravenous administration of endotoxin in humans**, *J. Infect. Dis*, 1995, S. 145 - 152
- 46 Kuhns D. B., Long P. D., Gallin J.I., **Loss of L-Selektin (CD 62L) on human neutrophils following exsudation in vivo**, *Cell Immunol*, (164), 1995, S. 306 - 310

- 47 Levi M., ten Cate H., van der Poll T., van Deventer S. J. H., **Pathogenesis of Disseminated Intravascular Coagulation in Sepsis**, *JAMA*, (270), 1993, No.8
- 48 Levi M., van der Poll T., ten Cate H., van Deventer S. J. H., **The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia**, *European Journal of Clinical Investigation*, (27), 1997, S. 3 - 9
- 49 Liao J.K., Shin W.S., Lee W.Y., Clark S.L., **Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase**, *J. Biol. Chem.*, 1995, (270), S. 319 - 324
- 50 Lobb R., Chi-Rosso G., Leone D.R., **Expression and functional characterization of a soluble form of endothelial-leukocyte adhesion molecule-1**, *J Immunol*, (147),1991, S. 124 - 129
- 51 Lohr K., Keppler B., **Innere Medizin, Kompendium für Studium und Klinik**, *Ullstein Medical Verlagsgesellschaft mbH & Co.*, Wiesbaden, 2.Auflage, 1999, S. 8 - 9
- 52 Martich G. D., Boujoukos A. J., Suffredini A. F., **Response of Man to Endotoxin**, *Immunobiol.*, (187), 1993, S. 410 - 411
- 53 Miyoshi M, Nagata K., Imoto T., Goto O., Ispida A., Watanabe T., **ANG II is involved in the LPS-induced production of proinflammatory cytokines in dehydrated rats**, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003, (284), Issue: 4, S.1092 - 1097
- 54 Mombouli J. V., **ACE inhibition, endothelial function and coronary artery lesions. Role of kinins and nitric oxide**, *Drugs*, (54), (5), 1997, S. 12 - 22
- 55 Napoleone E., Di S. A., Camera M., Tremoli E., Lorenzet R., **Angiotensin-converting enzyme inhibitors down regulates tissue factor synthesis in monocytes**, *Circ.Res.*, (86), 2000, S. 139 - 143
- 56 Nebe C.T., **Durchflussszytometrische Messtechnik und Datenauswertung**, *Infusionsther. Transfusionsmed.*, (23), 1996, S. 111 - 113
- 57 Newman W., Beall L. D., Carson C. W., et al., **Soluble E-Selektin is found in supernatants of activated endothelial cells and is elevated in the serum of patients with septic shock**, *J Immunol*, (150), 1993, S. 664 - 654
- 58 Niimi R., Nakamura A., Yanagawe Y., **Suppression of Endotoxin-Induced Renal Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-6 mRNA by Renin-Angiotensin System Inhibitors**, *Jpn. J. Pharmacol.*, 2002, (88), S.139 - 145

- 59 Oberholzer A., Oberholzer C., Moldawer L. L., **Cytokine signalling – regulation of the immune response in normal and critically ill state**, *Crit Care Med, Scientific Reviews*, (28), (4), 2000, N3 - N12
- 60 O'Dwyer S. T., Michie H. R., Ziegler T. R., Revhaug A., Smith R. J., Wilmore D. W., **A single dose of endotoxin increases intestinal permeability in healthy humans**, *Arch Surg*, (123), 1988, S. 1459 - 1464
- 61 Okamoto H., Hatta A., Itoh N., Ohashi Y., Arakawa K., Nakanishi S., **Acute phase responses of plasma angiotensinogen and t-kininogen in rats**, *Biochem. Pharmacol.*, 1987, (36), S. 3069 - 3073
- 62 Pastore L., Tessitore A., Martinetti S., Toniato E., Alesse E., Bravi C., Ferri C., Desideri G., Gulino A., Santucci A., **Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo**, *Circulation*, (100), S. 1646 - 1652
- 63 Peeters A. C., Netea M. G., Kullberg B. J., Thien T., van der Meer J. W., **The effect of renin-angiotensin system inhibitors on pro- and anti-inflammatory cytokine production**, *Immunology*, (94), 1998, S. 376 - 379
- 64 Peng H.B., Libby P., Liao J.K., **Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B**, *J Biol chem.*, 1995, (270), S. 14214 - 14219
- 65 Pichler M., Klein K., Pachinger O., **Wiener Medizinische Wochenschrift, Blockade des Renin-Angiotensin-Systems: ACE-Hemmer und Angiotensin-II-Rezeptorblocker**, 1996, Heft 11
- 66 Pueyo M.E., Gonzalez W., Nicoletti A., Savie F., Arnal J.F., Michel J.B., **Angiotensin II stimulates Endothelial Vascular Cell Adhesion Molecule-1 via Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation Induced by Intercellular Oxidative Stress**, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2000, (20;3) S. 645 - 651
- 67 Rahman A., Kefer J., Bando M., Niles W.D., Malik A.B., **E-selectin expression in human endothelial cells by TNF- $\alpha$ -induced oxidant generation and NF- $\kappa$ B activation**, *Am J Physiol*, 1998, (275; 3), S. 533 - 544
- 68 Read R., Wyllie D., **Toll receptors and sepsis**, *Curr Opin Crit Care*, (7), (5), 2001, S. 371 - 375
- 69 Remme W. J., **Bradykinin-Mediated Cardiovascular Protective Actions of ACE Inhibitors, A New Dimension in Anti-Ischaemic Therapy?**, *Drugs*, (54),

- (5), 1997, S. 59 - 70
- 70 Ron D., Brasier A.R., Wright K.A., Tate J.E., Habener J.F., **An inducible 50-Kilodalton NF kappa B-like protein and a constitutive protein both bind the acute-phase response element of the angiotensinogen gene**, *Mol Cell Biol.*, 1990, (10), S.1023 - 1032
- 71 Rothlein G., Manolfi E. A., Czaikowski M., Marlin S. D., **A form of circulating ICAM-1 in human serum**, *J Immunol*, (147),1991, S. 3788 - 3793
- 72 Ruiz-Ortega M., Lorenzo O., Ruperez M., Esteban V., Suzuki Y., Mezzano S., Plaza J.J, Edigo J., **Role of the Renin-Angiotensin System in Vascular Diseases, Expanding the Field**, *Hypertension*, 2001, (38), S. 1382 - 1388
- 73 Schalkwijk C.G., Smulders R.A., Lambert J., Donker A.J.M., Stehouwer C.D.A., **ACE-Inhibition modulates some endothelial functions in healthy subjects and in normotensive type 1 diabetic patients**, *Eur J Clin Invest.*, 2000, (10), S. 853 - 60
- 74 Schindler R., Dinarello C.A., Koch K.M., **Angiotensin-converting-enzyme inhibitors suppress synthesis of tumor necrosis factor and interleukin 1 by human peripheral blood mononuclear cells**, *Cytokine*, 1995, (7), S.526 - 533
- 75 Schleicher P., **Grundzüge der Immundiagnostik und Immuntherapie**, Hippokrates Verlag Stuttgart, 1997, S. 93 - 99
- 76 Schmid A., Burchardi H., Clouth J. et al.: **Burden of illness imposed by severe sepsis in Germany**, *Eur. J. Health Econom*, (3), 2002, S. 77 - 82
- 77 Scholz H., Schwabe U., **Taschenbuch der Arzneibuchbehandlung, Angewandte Pharmakologie**, Urban & Fischer, S. 340 - 342/ 497 - 498
- 78 Schumann R. R, Rietschel E. T, Loppnow H, **The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin**, *Med Microbiol. Immunol (Berlin)*, (183), 1994, S. 279 - 297
- 79 Sessler C. N., Windsor A. C., Schwartz M., Watson L., Fisher B. J., Sugerman H. J., Fowler A. A., **Circulating ICAM-1 Is Increased in Septic Shock**, *Am J Resp Crit Care Med*, (151), 1995, S. 1420 - 1427
- 80 Suffredini A. F., Hochstein H. D., McMahon F. G., **Dose related inflammatory effects of intravenous endotoxin in humans: evaluation of a new clinical lot of Escherichia coli:113 endotoxin**, *J. Infec Dis.*, 1999, S. 1278 - 1282



- 81 Suffredini A. F., Reda D., Banks S. M., Tropea M., Agosti J. M., Miller R., **Effects of recombinant dimeric TNF receptor on human inflammatory responses following intravenous endotoxin administration**, *J. Immunol.*, (155), 1995, S. 5038 - 5045
- 82 Tapping R. I., Akashi S., Miyake K., Godowski P. J., Tobias P. S., **Toll-Like Receptor 4, But not Toll-Like Receptor 2, Is a Signalling Receptor for Escherichia and Salmonella Lipopolysaccharides**, *The Journal of Immunology*, (165), 2000, S. 5780 - 5787
- 83 The AIREX Study Investigators, **Follow-up study of patients randomly allocated or placebo for heart failure after acute myocardial infarction: AIRE Extension study**, *Lancet*, (349), 1997, S. 1493 - 1497
- 84 The CONSENSUS Trial Study Group, **Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS)**, *N. Engl. J. Med.*, 316, 1987, S.1429 – 1435
- 85 The SAVE Investigators, **Effect of captopril on mortality in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial**, *N Engl J Med*, (327), 1992, S. 669 - 677
- 86 The SOLVD Investigators, **Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure**, *N Engl J Med*, (325), 1991, S. 293 - 302
- 87 Todd P. A., Goa K. L., **Enalapril. A reappraisal of its pharmacology and therapeutic use in hypertension**, *Drugs*, (43), 1992, S. 346 - 381
- 88 Tsao P.S., Buitrago R, Chan J.R., Cooke J.P., **Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1**, *Circulation*, 1994, S. 1682 – 1689
- 89 Ulmer A.J., Rietschel E.Th., Zähringer U., Heine H., **Lipopolysaccharide:Structure, Bioactivity, Receptors and Signal Transduction**, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, (14), (76), 2002, S. 53 - 68
- 90 Usui M., Egashira K., Tomita H., Koyanagi M., Katoh M., Shimokawa H., Takeya M., Yoshimura T., Matsushima K., Takeshita A., **Important Role of Local Angiotensin II Activity Mediated via Type 1 Receptor in the Pathogenesis of Cardiovascular Inflammatory Changes Induced by Chronic Blockade of Nitric Oxide Synthases in Rats**, *Circulation*, 2001, (101; 3), S. 305 - 310

- 91 van der Poll T., Calvano S. E, Kumar A., et al., **Endotoxin induces down regulation of tumor necrosis factor receptors on circulating monocytes in humans**, *Blood*, (86), 1995, S. 2754 - 2759
- 92 van der Poll T., Coyle S. M., Levi M., et al., **Effect of recombinant dimeric tumor necrosis factor receptor on inflammatory responses to intravenous endotoxin in normal humans**, *Blood* , 1997, 89: 3727 - 3734
- 93 Vanhoutte P. M., Boulanger C. M., Mombouli J. V., **Endothelium- Derived Relaxing Factors and Converting Enzyme Inhibition**, *Am J Cardiol*, (76), 1995, 3E - 12E
- 94 Vervloet M. G., Thijs L. G., Hack C. E., **Derangements of Coagulation and Fibrinolysis in Critically Ill Patients with Sepsis and Septic Shock**, *SEMINARS IN THROMBOSIS AND HEMOSTASIS*, (24), (1)
- 95 Walther A., Barth C., Gebhard M. M., Martin E., **Role of Nitric Oxide in Leukocyte-Independent Endothelial Damage During Experimental Endotoxemia**, *Shock*, 2003, (20; 3), S. 286 - 291
- 96 Weksler B.B., Knapp J.M., Jaffe E.A., **Prostacyclin synthesised by cultured endothelial cells modulates polymorphonuclear leukocyte function**, *Blood*, 1977, (50), S. 282
- 97 Werdan K., Schuster H.-P.: **Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen**, 3. Auflage, Springer 2000, Kapitel 1/2, S. 1 - 72
- 98 Wright S. D., Ramos R. A., Tobias P. S., Ulevitch R. J., Mathison J. C., **CD14, a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS Binding Protein**, *Reports*, 1990, S. 1431 - 1433
- 99 Yoshizumi M., Perrella M.A., Burnett J.C. Jr., Lee M.E., **Tumor necrosis factor down regulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life**, *Circ. Res.*, 1993, (73), S. 205 - 209
- 100 Zhengwu S., Andersson R., **NF- $\kappa$ B Activation and Inhibition: A Review**, *Shock*, 2002, (18;2), S. 99 - 106

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>Angiotensin-Converting-Enzyme</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance between Groups</i>
APC	Antigenpräsentierende Zelle
AIRE	<i>Acute Infarction Ramipril Efficiency</i>
AK	Antikörper
AT	Antithrombin
cE-Selektin	<i>soluble E-Selektin</i>
cICAM	<i>soluble Intercellular Adhesion Molecule</i>
cVCAM-1	<i>soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
CONSENSUS	<i>Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study</i>
EC-GCP	<i>European Committee- Good clinical practice</i>
EDHF	<i>endothelial derived hyperpolarization factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	<i>Enzyme Immuno Assay</i>
EK	Ethikkommission
EKG	Elektrokardiogramm
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FSC	<i>Forward Side Scatter</i>
$\gamma$ -GT	gamma Glutamyl-Transferase
GOT	Glutamat- Oxalacetat-Transferase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxides</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
Ig	Immunglobuline
I $\kappa$ B	I kappa B
IKK	I kappa B Kinase
IL	Interleukin
IRAK	IL-1R-assozierte Kinase
KI	Konfidenzintervall

LBP	LPS-bindendes Protein
LFA	<i>Lymphocyte-Function-Associated-Antigen</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	<i>Membrane Attack Complex</i>
MAP	<i>Mean Arterielle Pressure</i>
MCAF	<i>Human Macrophage Chemoattractant and Activating Factor</i>
MCP-1	monozytäres chemotaktisches Peptid
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NF-kB	Nuclear Factor-kappa B
NO	Nitric Oxide
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PE	Phycoerythrin
aPTT	<i>Activated Partial Thromboplastin Time</i>
SAVE	<i>Survival and Ventricular Enlargement Study</i>
SD	Standardabweichung
SEM	<i>Standard Error of Mean</i>
SIRS	Systemische Inflammatorische Response Syndrom
sLeX	sialyl-Lewis-X
SOLVD	<i>Studies of Left Ventricular Dysfunction</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
TIR-Region	<i>Toll/IL-1 Receptor Homologous Region</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRAF 6	<i>TNF Receptor-Associated Factor 6</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VLA	<i>Very-Late-Activating-Antigen</i>
WBC	<i>White Blood Cells</i>
x	Mittelwert

## Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1:	Molekulare Struktur von LPS	9
Abbildung 2:	Möglicher Rezeptorkomplex und Reaktionsweg von LPS	10
Abbildung 3:	Adhäsion, Bindung, Diapedese und Wanderung der Leukozyten zum Infektionsort	16
Abbildung 4:	Chemische Struktur von Enalapril	19
Abbildung 5:	Interaktion des Renin-Angiotensin-Systems mit dem L-Arginin/ NO-System	22
Abbildung 6:	Aufteilung der Tabletteneinnahme innerhalb der Gruppen	29
Abbildung 7:	Aufteilung der Tabletteneinnahme innerhalb der Gruppen	37
Abbildung 8:	Parameterdarstellung von der ACE-Aktivität, der Herzfrequenz und dem mittlerem arteriellen Druck der Gruppen A (○), B (Δ) und C (■) in der Zeitskala nach der LPS-Infusion	39
Abbildung 9:	Mittlere Fluoreszenz Intensität von CD54 der Expression von Monozyten der Gruppen A (○), B (Δ) und C (■) im Zeitintervall nach der LPS-Infusion	41
Abbildung 10:	Mittlere Fluoreszenz Intensität von CD11b Expression auf neutrophile Granulozyten der Gruppen A (○), B (Δ) und C (■) im Zeitintervall nach der LPS-Infusion	43
Abbildung 11:	Plasmawerte von c E-Selektin der Gruppen A (○), B (Δ) und C (■)	44
Abbildung 12:	Plasmawerte von cICAM-1 der Gruppen A (○), B (Δ) und C (■)	45
Abbildung 13:	Plasmawerte von cVCAM-1 der Gruppen A (○), B (Δ) und C (■)	46

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. B. Jilma für die Überlassung des Dissertationsthemas und zusammen mit meiner Betreuerin Frau Dr. med. C. Marsik und Frau Dr. U. Derhaschnig für die freundliche und intensive Unterstützung bei der Ausfertigung der Arbeit in Wien.

Weiterhin möchte ich mich sehr bei Herrn Professor Dr. F. Czubyko bedanken, der mir bei der weiteren Vervollständigung der Arbeit in Deutschland stets mit hilfreichen Ratschlägen und Unterstützung zur Verfügung stand und mir dabei sehr geholfen hat.

Ich bedanke mich zudem bei den Mitarbeitern des Forschungslabors der Abteilung für Pharmakologie, für Ihre Hilfe bei der Anleitung und Aufarbeitung der Laborbestimmungen, insbesondere Frau C. Drucker.

Zum Abschluss möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, denen ich diese Arbeit widme, da sie mir durch Ihre unermüdlichen Unterstützung ermöglicht haben, mein Medizinstudium und zudem den Aufenthalt für zwei Auslandssemester in Wien, durchzuführen.

## **Akademische Lehrer**

Prof. Dr. med. Czubayko, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Phillips-Universität Marburg

Prof. Dr. med. Jilma, Klinische Pharmakologie, Abteilung Hämatologie und Immunologie, Allgemeines Krankenhaus Wien, Medizinische Universität Wien

Dr. med. Marsik, Klinische Pharmakologie, Abteilung Hämatologie und Immunologie, Allgemeines Krankenhaus Wien, Medizinische Universität Wien