

**Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin,
Citalopram und Sarpogrelate auf die Hämostase in
der sub-akuten Endotoxinämie in männlichen
Wistar-Ratten**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Maren Oude Lansink

geboren in Gronau (Westf.)

Institut für Physiologische Chemie
der
Universität Duisburg-Essen

2015

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2012 bis September 2015 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot am Institut für Physiologische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 16.12.2015

Gutachter:	Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot
	Prof. Dr. Christian Mayer
Vorsitzender:	Prof. Dr. Maik Walpuski

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Theoretische Grundlagen	2
2.1	Sepsis	2
2.2	Melatonin	6
2.3	Serotonin	11
2.3.1	Serotoninwiederaufnahmehemmer Citalopram	13
2.3.2	Serotoninantagonist Sarpogrelate	16
3.	Ziel der Arbeit	18
4.	Material und Methoden	19
4.1	Chemikalien und Materialien	19
4.2	Geräte	21
4.3	Versuchstiere	22
4.4	Versuchsgruppen	22
4.5	Versuchsdurchführung	24
4.5.1	Anästhesie, Analgesie und chirurgischer Eingriff	24
4.5.2	Vitalparameter	24
4.5.3	Mikrozirkulation	25
4.5.4	Blutentnahme und Plasmagewinnung	25
4.5.5	Blutgasanalyse	25
4.5.6	Thromboelastometrie	26
4.5.7	Bestimmung der Thrombozytenzahl	27
4.5.8	Bestimmung der organspezifischen Schädigungsparameter	28
4.6	Impedanzaggregometrie mit humanem Vollblut	28
4.7	Statistik	29
5.	Ergebnisse	30
5.1	Effekte von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate während der sub-akuten Endotoxinämie	30
5.1.1	Effekt von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf das Überleben der Tiere während der sub-akuten Endotoxinämie	30
5.1.2	Effekt von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die Vitalparameter der Tiere während der sub-akuten Endotoxinämie	31

5.1.3	Effekt von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die lokale Mikrozirkulation der Tiere während der sub-akuten Endotoxinämie _____	35
5.1.4	Effekt von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die Parameter der Blutgasanalyse im Vollblut der Tiere während der sub-akuten Endotoxinämie	36
5.1.5	Effekt von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die Parameter der Thromboelastometrie während der sub-akuten Endotoxinämie _____	40
5.1.6	Effekt von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die Thrombozytenzahl während der sub-akuten Endotoxinämie _____	44
5.1.7	Effekt von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die organspezifischen Schädigungsparameter der Tiere während der sub-akuten Endotoxinämie _____	46
5.2	Effekt von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die Serotonin-induzierte Thrombozytenaktivierung <i>in vitro</i> _____	50
6.	Diskussion _____	51
6.1	Der Einfluss von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die LPS- induzierten systemischen Veränderungen <i>in vivo</i> _____	51
6.1.1	Der Einfluss von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die LPS-induzierte Disseminierte intravasale Gerinnung und Thrombozytopenie <i>in vivo</i> _____	60
6.2	Der Einfluss von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die Serotonin- induzierte Thrombozytenaktivierung <i>in vitro</i> _____	65
7.	Relevanz und Ausblick _____	67
8.	Zusammenfassung _____	69
9.	Summary _____	71
10.	Literaturverzeichnis _____	73
11.	Anhang _____	93
11.1	Abkürzungsverzeichnis _____	105
11.2	Publikationsliste _____	109
11.2.1	Publikationen _____	109
11.2.2	Extended Abstracts _____	109
11.2.3	Poster _____	109
11.2.4	Vorträge _____	110
11.3	Lebenslauf _____	111
11.4	Erklärung _____	112
11.5	Danksagung _____	113

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der <i>Toll-like</i> Rezeptor 4 (TLR4) vermittelte Signalweg von Lipopolysaccharid (LPS).....	4
Abbildung 2: Die Induktionsmechanismen der LPS-induzierten Disseminierten intravasalen Gerinnung (DIG).	5
Abbildung 3: Syntheseweg von Melatonin (MLT) in der Zirbeldrüse.	7
Abbildung 4: Die potenziellen Wirkmechanismen von exogenem Melatonin (MLT) auf die Thrombozyten.....	9
Abbildung 5: Die potenziellen Wirkmechanismen von Serotonin (5-HT) auf die Thrombozyten.....	12
Abbildung 6: Die Stereoisomere des Citaloprams.	13
Abbildung 7: Die potenziellen Wirkmechanismen von Citalopram (CIT) auf die Thrombozyten.....	14
Abbildung 8: Die Strukturformel von Sarpogrelate.	16
Abbildung 9: Die potenziellen Wirkmechanismen von Sarpogrelate (SAR) auf die Thrombozyten.....	17
Abbildung 10: Zeitlicher Ablauf der Infusion von Lipopolysaccharid (LPS), Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR).	23
Abbildung 11: Repräsentatives TEMogram der Thromboelastometrie.	26
Abbildung 12: Blutaussstrich nach der Pappenheim-Färbung.	28
Abbildung 13: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf das Überleben der Tiere während der sub-akuten Endotoxinämie.....	30
Abbildung 14: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) unter Kontrollbedingungen (A) und während der sub-akuten Endotoxinämie (B).	32
Abbildung 15: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Herzfrequenz (HF) unter Kontrollbedingungen (A) und während der sub-akuten Endotoxinämie (B).	33
Abbildung 16: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Atemfrequenz (AF) unter Kontrollbedingungen (A) und während der sub-akuten Endotoxinämie (B).	34

Abbildung 17: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die <i>Clotting Time</i> (CT, A) und die <i>Clot Formation Time</i> (CFT, B) unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie.	42
Abbildung 18: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf den α -Winkel (A) und die <i>Maximum Clot Firmness</i> (MCF, B) unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie.	43
Abbildung 19: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die <i>Area Under The Curve</i> (AUC) unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie.	44
Abbildung 20: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Thrombozytenzahl unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie.....	45
Abbildung 21: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Blutplasma der Tiere unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie.	48
Abbildung 22: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Aktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT, A) und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT, B) im Blutplasma der Tiere unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie.	49
Abbildung 23: Dosis-abhängiger Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Serotonin (10 μ M)-induzierte Thrombozytenaktivierung. ...	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnosekriterien für SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock entsprechend der 1. Revision der S2K-Leitlinien.....	2
Tabelle 2: <i>Score</i> der <i>International Society on Thrombosis and Haemostasis</i> (ISTH) für die fulminante (<i>overt</i>) Disseminierte intravasale Gerinnung (DIG).....	3
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Materialien.	19
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte.....	21
Tabelle 5: Übersicht der Versuchsgruppen.	23
Tabelle 6: Übersicht der in dieser Arbeit relevanten Parameter der Thromboelastometrie.....	27
Tabelle 7: Effekte von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Sauerstoffsättigung (sO ₂), die relative Hämoglobinmenge (rHb) und den Blutfluss (<i>Flow</i>) in der Haut und im Skelettmuskel der linken Hinterpfote der Tiere unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie.	93
Tabelle 8: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf den pH-Wert, den Kohlendioxidpartialdruck (pCO ₂), den Sauerstoffpartialdruck (pO ₂), den <i>Base Excess</i> (BE _{Ecf}), das Standardbicarbonat (HCO ₃ ⁻), die Ionenkonzentration (K ⁺ , Na ⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻), den Hämatokrit, die Konzentration von Glukose und Laktat im Vollblut der Tiere unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie.....	95
Tabelle 9: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die <i>Clotting Time</i> (CT), <i>Clot Formation Time</i> (CFT), Winkel <i>Alpha</i> (α), <i>Maximum Clot</i> <i>Firmness</i> (MCF), und <i>Area Under The Curve</i> (AUC) unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie.	100
Tabelle 10: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Thrombozytenzahl unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie.....	102
Tabelle 11: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH), der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und der Creatin-Kinase (CK) und die Konzentration von Kreatinin im Blutplasma der Tiere unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie.	103

1. Einleitung

Jährlich erkranken in Deutschland ca. 85-116 pro 100.000 Einwohner an einer Sepsis und ca. 76-110 pro 100.000 Einwohner an einer schweren Sepsis [1]. Die Krankenhaus-Sterblichkeit der Patienten mit schwerer Sepsis liegt im Durchschnitt bei 55,2 % [1]. Die Kosten für die Behandlung der schweren Sepsis betragen laut einer retrospektiven Analyse von 385 Patienten aus 3 Universitätskliniken in Deutschland im Mittel 23.297 € (1318 € pro Tag), wobei die mittleren Behandlungskosten bei den Nicht-Überlebenden trotz kürzerem Aufenthalt auf den Intensivstationen deutlich höher sind als bei den Überlebenden (25.446 € vs. 21.984 €) [2].

Die schwere Sepsis geht häufig mit einer systemischen Aktivierung der Hämostase und dem gleichzeitigen Verlust von Kompensationsmechanismen einher, was als Disseminierte intravasale Gerinnung (DIG) bezeichnet wird [3]. Diese Koagulopathie stellt eine schwerwiegende Komplikation während der schwerer Sepsis dar, da die mikrovaskulären Thrombosen in Folge der DIG ein Multiorganversagen herbeiführen können [3, 4]. Die Erforschung und Entwicklung von Medikamenten gegen die DIG scheint daher für die Therapie der schweren Sepsis von entscheidender Bedeutung zu sein. Bislang brachten klinische Studien, in der die Wirksamkeit von verschiedenen Antikoagulanzen, wie etwa rekombinantes aktiviertes Protein C oder Antithrombin gegen die Sepsis-assoziierte DIG untersucht wurde, jedoch keine Standardtherapie hervor [5].

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Sepsis

Die Sepsis wird seit der Konsensuskonferenz des *American College of Chest Physicians* und der *Society of Critical Care Medicine* von 1991 als komplexe systemische inflammatorische Reaktion des Wirts auf eine Infektion definiert [6]. Die klinische Diagnose der Sepsis schließt sowohl den Nachweis der Infektion als auch das Vorliegen des *Systemic Inflammatory Response Syndroms* (SIRS) ein (Tabelle 1) [7]. Die Infektionen, die eine Sepsis hervorrufen, entstehen am häufigsten im Respirationstrakt oder Abdomen und werden meist durch Gram-positive oder Gram-negative Bakterien ausgelöst [1]. Eine schwere Sepsis liegt vor, wenn zusätzlich eine akute Organdysfunktion diagnostiziert wird [7]. Geht die schwere Sepsis trotz adäquater Volumensubstitution mit einer persistierenden Hypotonie (systolischer Blutdruck ≤ 90 mmHg) einher, wird der Zustand als septischer Schock bezeichnet [7].

Tabelle 1: Diagnosekriterien für SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock entsprechend der 1. Revision der S2K-Leitlinien. („Sepsisleitlinien“ [7])

Diagnose	Kriterien
SIRS	mind. 2 dieser Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> • Fieber (≥ 38 °C) oder Hypothermie (≤ 36 °C) • Tachykardie: Herzfrequenz ≥ 90/min • Tachypnoe (Frequenz ≥ 20/min) oder Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 33$ mmHg) • Leukozytose ($\geq 12.000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4.000/\text{mm}^3$) oder ≥ 10 % unreife Neutrophile im Differentialblut
Sepsis	SIRS + Nachweis der Infektion
Schwere Sepsis	Sepsis + mind. 1 Kriterium der akuten Organdysfunktion : <ul style="list-style-type: none"> • akute Enzephalopathie • Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozytenzahl um > 30 % in 24 h oder Thrombozytenzahl $\leq 100.000/\text{mm}^3$ • arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 75$ mmHg unter Raumluft oder ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$-Verhältnis von ≤ 250 mmHg unter O_2-Gabe • renale Dysfunktion: eine Diurese von $\leq 0,5$ ml/kg/h für mind. 2 h und/oder Anstieg des Serumkreatinins > 2 x • metabolische Azidose: <i>Base Excess</i> ≤ -5 mM oder Laktatkonzentration $> 1,5$ x
Septischer Schock	Schwere Sepsis + Hypotonie (systolischer Blutdruck ≤ 90 mmHg)

Die schwere Sepsis ist in ca. 35 % der Fälle mit einer Disseminierten intravasalen Gerinnung (DIG) verbunden [3]. Die DIG ist gekennzeichnet durch eine systemische Aktivierung der Gerinnung mit einem simultanen Verlust von Kompensationsmechanismen, wie die Fibrinolyse und anti-koagulatorischen Proteinen, was sowohl zu mikrovaskulären Thrombosen als auch zu erhöhter Blutungsneigung führt. Die Folgen dieser Gerinnungsstörung können die Entwicklung von Ischämien und Nekrosen der einzelnen Organe bis zu Multiorganversagen sein [3]. Die aus der DIG resultierende Fibrinablagerung in den Blutgefäßen trägt darüber hinaus wahrscheinlich zur Zerstörung der Erythrozytenmembran und dementsprechend der Freisetzung von Hämoglobin aus den Erythrozyten bei [8]. Die Einteilung der DIG erfolgt nach ihrem Schweregrad anhand des *Score* der *International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) in kompensierte (*non-overt*) DIG und in fulminante (*overt*) DIG (Tabelle 2) [9]. Die fulminante DIG scheint ein starker Prädiktor für die Mortalität der Patienten mit schwerer Sepsis zu sein, da in einer Phase-III-Studie die Placebo-behandelten Sepsis-Patienten mit fulminanter DIG eine deutlich höhere 28-Tage-Sterblichkeit im Vergleich zu den Placebo-behandelten Sepsis-Patienten ohne fulminante DIG aufwiesen (43 % vs. 27 %) [4].

Tabelle 2: Score der International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) für die fulminante (*overt*) Disseminierte intravasale Gerinnung (DIG). (nach [9])

Parameter	Score
Thrombozytenzahl (10^9 L^{-1})	
> 100	0
< 100	1
< 50	2
Fibrin-Marker (z.B.: D-Dimer, Fibrinabbauprodukte)	
- kein Anstieg	0
- moderater Anstieg	1
- starker Anstieg	2
Prothrombinzeit	
< 3 s	0
> 3 s aber < 6 s	1
> 6 s	2
Fibrinogen-Gehalt	
> 1,0 g L^{-1}	0
< 1,0 g L^{-1}	1
fulminante (<i>overt</i>) DIG	≥ 5
Hinweis für kompensierte (<i>non-overt</i>) DIG	<5

Die Injektion von Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien, wird häufig als tierexperimentelles Modell (Endotoxämie) zur Imitation der systemischen Inflammation und Induktion der DIG verwendet [10]. Im Blutplasma wird das Lipopolysaccharid vom LPS-bindenden Protein durch seine Lipid A-Region erkannt und zu dem membranständigen Glykoprotein CD14 befördert, welches das LPS anschließend auf dem Komplex aus *Toll-like* Rezeptor 4 (TLR4) und dem Protein *myeloid differentiation factor 2* (MD2) überträgt (Abbildung 1) [11-14]. Die Bindung von LPS an den TLR4/MD2-Rezeptor-Komplex induziert die Änderung seiner Konformation, infolgedessen sich die Adapter-Proteine MyD88, TRIF und TRAM intrazellulär anlagern können [15]. Die nachfolgenden intrazellulären Signalwege führen schließlich zur Translokation der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF3 in den Nukleus und bewirken die Expression von Zytokinen, Chemokinen und anderen Transkriptionsfaktoren [15].

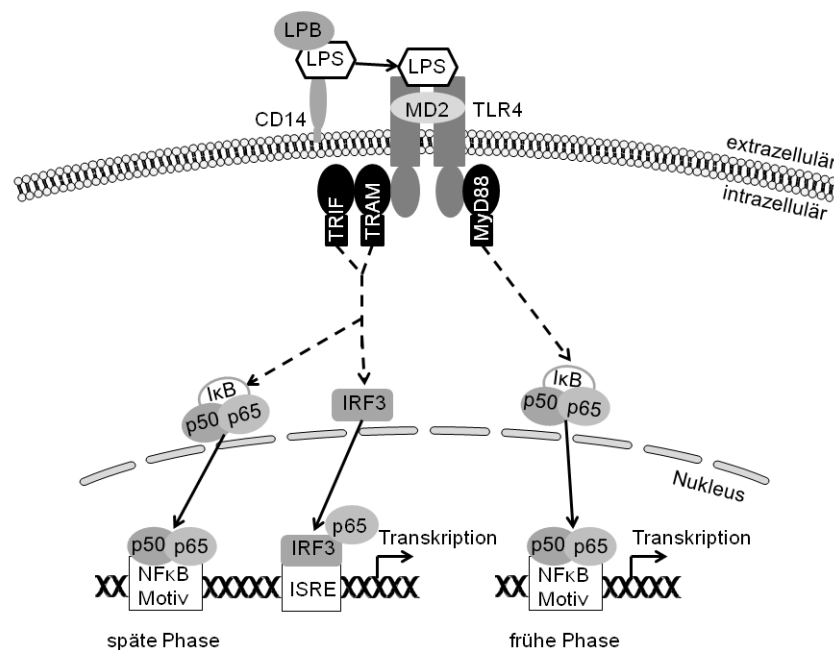


Abbildung 1: Der *Toll-like* Rezeptor 4 (TLR4) vermittelte Signalweg von Lipopolysaccharid (LPS). Lipopolysaccharid (LPS) wird vom LPS-bindenden Protein erkannt und zu dem Glykoprotein CD14 befördert, welches das LPS auf den TLR4/MD2-Komplex überträgt. Nach der Stimulation des TLR4/MD2-Komplexes durch LPS lagern sich die Adapter-Proteine MyD88, TRIF und TRAM an diesen Komplex an. Die nachfolgenden Signalwege führen zur Translokation der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF3 in den Nukleus und bewirken die Expression von Zytokinen, Chemokinen und anderen Transkriptionsfaktoren. Abkürzungen: CD14: *cluster of differentiation 14*; I κ B: Inhibitor von NF- κ B; IRF3: *interferon regulatory factor 3*; IRSE: *interferon-sensitive response*; LBP: *LPS binding protein*; LPS: Lipopolysaccharid; MD2: *myeloid differentiation factor 2*; MyD88: *myeloid differentiation primary response 88*; NF- κ B: *nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells*; TLR4: *Toll-like* Rezeptor 4; TRAM: *TRIF-related adapter molecule*; TRIF: *TIR-containing adapter molecule*. (modifiziert nach [15])

Die erforderlichen Komponenten des LPS-Rezeptorsignalkomplexes, wie CD14, TLR4/MD2 und MyD88 werden auch von den Thrombozyten exprimiert (Abbildung 2) [16]. Eine direkte Stimulation der Thrombozytenaggregation und Sekretion der α - und δ -Granula durch LPS über den TLR4-abhängigen Signalweg konnte bereits gezeigt werden [16]. Die Einleitung der Gerinnung durch LPS scheint aus der Initiation der Expression des Gewebefaktors auf den Endothelzellen und den Monozyten hervorzugehen [17, 18]. Die spätere Suppression des anti-koagulatorischen und fibrinolytischen Systems in der LPS-induzierten DIG wird u.a. auf die verminderte Expression von Thrombomodulin auf den Endothelzellen und die erhöhte Freisetzung von Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) ins Blut zurückgeführt [17, 19, 20]. Als Folge der LPS-induzierten DIG wurde bisher sowohl eine Schädigung der Leber als auch eine erhebliche Ablagerung von Fibrin in den Glomeruli der Niere nachgewiesen [20-22].

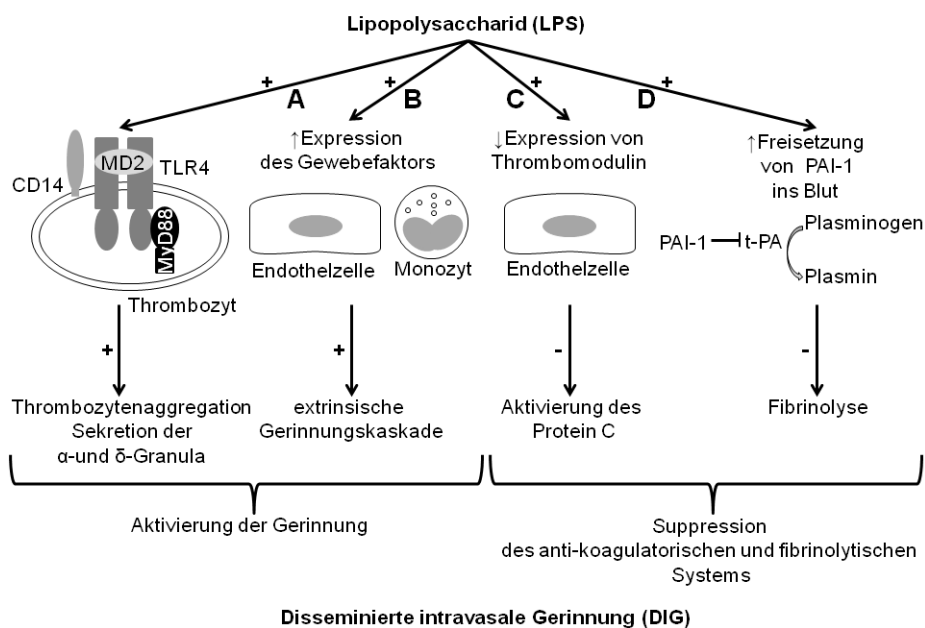


Abbildung 2: Die Induktionsmechanismen der LPS-induzierten Disseminierten intravasalen Gerinnung (DIG). Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert TLR4-abhängig die Thrombozytenaggregation und Sekretion der α - und δ -Granula (A), induziert die Expression des Gewebefaktors auf den Endothelzellen und Monozyten (B), vermindert die Expression von Thrombomodulin auf den Endothelzellen (C) und erhöht die Freisetzung des Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) ins Blut (D) [16-20]. Abkürzungen: CD14: *cluster of differentiation* 14; MD2: *myeloid differentiation factor* 2; MyD88: *myeloid differentiation primary response* 88; PAI-1: Plasminogen Aktivator Inhibitor-1; t-PA: *tissue-type plasminogen-activator*; TLR4: *Toll-like* Rezeptor 4.

2.2 Melatonin

Melatonin (MLT) ist ein Hormon, das erstmals im Jahr 1958 von Lerner *et al.* aus der Rinderzirkeldrüse isoliert und charakterisiert wurde, und ubiquitär im Pflanzen- und Tierreich vorkommt [23, 24]. Der Hauptsyntheseort des MLT in Vertebraten sind die Pinealozyten der Zirbeldrüse (*Glandula pinealis*) [25]. Zusätzlich wird MLT auch in verschiedenen extrapinealen Organen und Zellen wie z.B. in der Retina [26], dem Darm [27], der Haut [28], dem Knochenmark [29], den Geschlechtsorganen [30, 31], den Leukozyten [32] und den Thrombozyten [33] gebildet. Die Synthese von MLT beginnt mit der Hydroxylierung der aromatischen Aminosäure L-Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan durch die Tryptophan-Hydroxylase (Abbildung 3) [34]. 5-Hydroxytryptophan wird dann zu Serotonin (5-Hydroxytryptamin) decarboxyliert [35]. Serotonin wird anschließend in *N*-Acetylserotonin durch das Enzym Serotonin-*N*-Acetyltransferase umgewandelt [36]. Der letzte Schritt ist die Bildung von MLT aus *N*-Acetylserotonin, der durch das Enzym Hydroxyindol-*O*-methyltransferase katalysiert wird (Abbildung 3) [37]. Sowohl in Tag-aktiven als auch in Nacht-aktiven Tieren ist die Synthese von MLT abhängig vom Hell/Dunkel-Rhythmus und erreicht ihr Maximum in der Nacht [38]. Die „innere“ Uhr der Säugetiere (*Nukleus suprachiasmaticus*), die den zirkardiären Rhythmus synchronisiert, sendet in der Nacht neurale Impulse an die Zirbeldrüse, die zur Freisetzung von Norepinephrine führen [39]. Norepinephrine bindet an die adrenergen Rezeptoren $\alpha 1$ und $\beta 1$ der Pinealozyten und bewirkt einen Anstieg der Konzentration von cAMP in diesen Zellen und schließlich eine Aktivierung der Serotonin-*N*-Acetyltransferase, dem Schlüsselenzym der Synthese von MLT [36, 39]. Bei Licht ist hingegen die Aktivität der Serotonin-*N*-Acetyltransferase und folglich die Syntheserate von MLT reduziert [40]. Das Lichtsignal erreicht den *Nukleus suprachiasmaticus* aus der Retina über den *Tractus retinohypothalamicus* [39]. MLT wird nach seiner Synthese nicht in der Zirbeldrüse gespeichert, sondern aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften direkt ins vaskuläre System abgegeben [41]. Im Blut ist MLT zu ca. 70 % an Albumin gebunden [42]. Die nächtliche Konzentration von MLT im Blut verändert sich mit dem Lebensalter [43]. Das Maximum der nächtlichen Sekretion von MLT wird beim Menschen im Alter von ein bis fünf Jahren erreicht (210 ± 35 pg MLT/ml Serum) und liegt bei jungen Erwachsenen ungefähr bei 46 ± 4 pg/ml [43]. Der Abbau von MLT erfolgt hauptsächlich in der Leber, in der es zuerst durch Cytochrome P450 hydroxyliert und dann häufig mit Sulfat oder vereinzelt mit Glucuronid konjugiert wird [44, 45]. Die gebildeten Konjugate werden dann über den Urin ausgeschieden, wobei die urinäre Exkretion von 6-Sulfatoxymelatonin, das

Hauptabbauprodukt von MLT, mit dem tageszeitlichen Rhythmus der Sekretion von MLT im Blut korreliert [46].

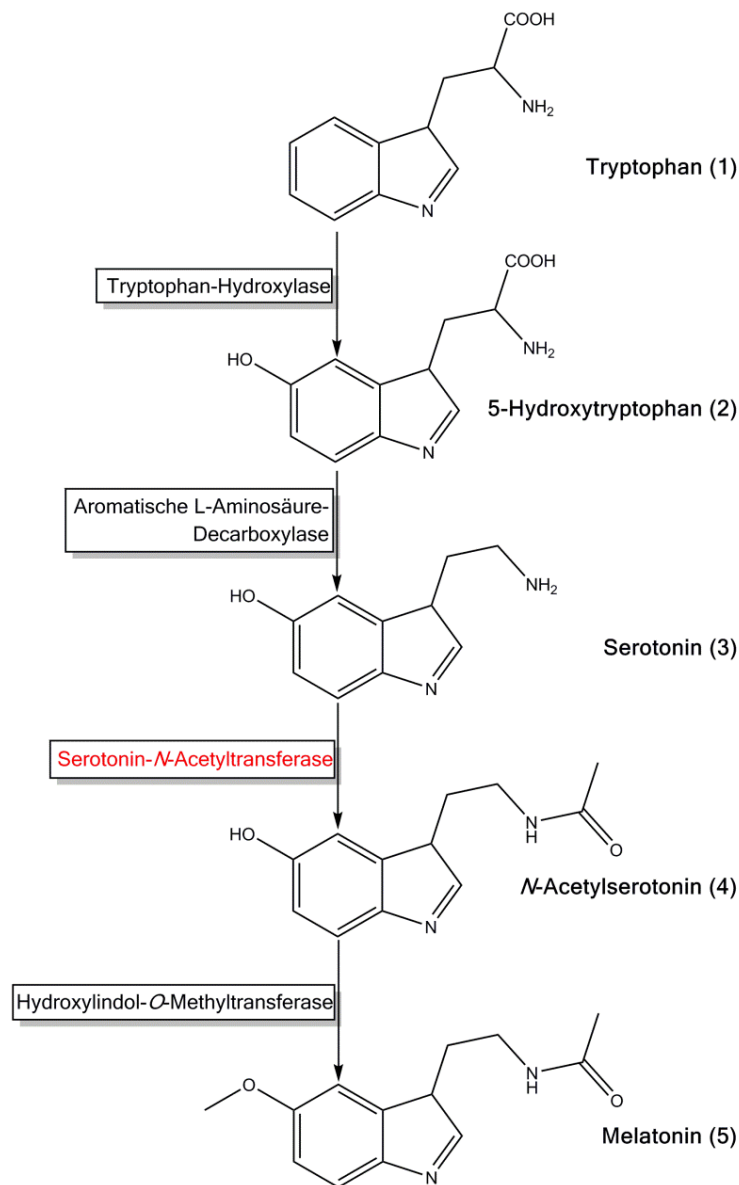


Abbildung 3: Syntheseweg von Melatonin (MLT) in der Zirbeldrüse. (nach [47])

Die Wirkung von MLT wird hauptsächlich über die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren MT_1 ($Me1_{1a}$) und MT_2 ($Me1_{1b}$) vermittelt, wobei der MT_2 -Rezeptor eine geringere Affinität ($K_D = 160$ pM) für ^{125}I -MLT im Vergleich zum MT_1 -Rezeptor ($K_D = 20-40$ pM) aufweist [48, 49]. An der Transduktion des G-Protein-vermittelten Signals von MLT sind die Adenylatzyklase, die Guanylatzyklase, die Phospholipase A2 und die Phospholipase C sowie Calcium- und Kalium-Kanäle als Effektoren beteiligt [50]. Eine weitere bekannte Bindestelle für MLT ist der MT_3 -Rezeptor, der später als das Enzym Quinone Reduktase 2 identifiziert wurde [51].

Darüber hinaus bindet MLT an die zytosolischen Proteine Calmodulin [52] und Calreticulin [53]. Im Nukleus wurde der RZR/ROR Rezeptor als Bindestelle für MLT detektiert [54].

MLT bewirkt sowohl eine Vasokonstriktion als auch eine Vasodilatation der glatten Gefäßmuskulatur [55]. In einer Studie zur Verträglichkeit von exogenem MLT wurde bereits gezeigt, dass eine kumulative intravenöse (*i.v.*) Gabe von mehr als 9 mg MLT/kg bei Wistar-Ratten starke Schwankungen des mittleren arteriellen Blutdrucks verursacht [56]. Nach dem Model von Paulis & Simko (2007) wird die Vasokonstriktion durch die MT_1 -vermittelte Abnahme von cAMP und durch die MT_1/MT_2 -vermittelte Steigerung der Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in der glatten Gefäßmuskelzelle herbeigeführt [57]. An der vasodilatatorischen Wirkung von MLT ist der MT_2 -Rezeptor auf den Endothelzellen beteiligt. Die Aktivierung des MT_2 -Rezeptors auf den Endothelzellen bewirkt über einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg eine gesteigerte Produktion von Stickstoffmonoxid, welches in den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur die Synthese von cGMP und somit die Vasodilatation fördert [57]. Darüber hinaus werden auch zentrale Wirkungen von MLT auf den Blutdruck angenommen, da in *spontaneously hypertensive rats* (SHR) nach der Applikation von MLT eine verbesserte Baroreflexantwort [58] ein verringerter Sympathikus-Output [59] sowie eine verminderte Herzrate [60] beobachtet wurden. Die Mechanismen, die diesen zentralen, kardialen Effekten von MLT zugrunde liegen, sind nicht vollständig bekannt, jedoch scheint der direkte Einfluss von MLT auf den *Nukleus suprachiasmaticus* und die *Area postrema* [61, 62] sowie die Verstärkung des inhibitorischen GABA-Signals auf den *Nukleus paraventricularis* und der *Rostral ventrolateral medulla* durch MLT [63] daran beteiligt zu sein.

Pico- bis *nanomolare* Bindestellen für MLT wurden bereits auf Thrombozyten aus Menschen und Meerschweinchen gefunden und bei den Thrombozyten aus Meerschweinchen als MLT-Rezeptor MT_1 spezifiziert (Abbildung 4) [64, 65]. In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass exogenes MLT die Arachidonsäure-, Adenosindiphosphat (ADP)- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation und δ -Granula-Sekretion, die Thromboxan A_2 -Produktion sowie die Aufnahme von Serotonin in Thrombozyten hemmt [66-72]. Die Produktion von Thromboxan A_2 in den Thrombozyten wurde durch exogenes MLT halbmaximal bei einer Konzentration von 10 μ M inhibiert [69]. Die halbmaximale Hemmung der Aufnahme von Serotonin in die Thrombozyten wurde hingegen erst bei deutlich höheren Konzentrationen von MLT (1,3 mM [71] bzw. 1,1 mM [72]) erreicht. Hinsichtlich der Hemmung der Thromboxan A_2 -Produktion wurde sowohl ein direkter Effekt von MLT auf die Aktivität der Cyclooxygenase als auch eine Wirkung von MLT über einen unspezifizierten Schritt vor der Cyclooxygenase-abhängigen Reaktion angenommen [66, 69, 70]. Darüber hinaus konnte

gezeigt werden, dass die Effekte von exogenem MLT auf die Thrombozyten tageszeitlichen Veränderungen unterliegen. Der hemmende Effekt von exogenem MLT auf die Aufnahme von Serotonin war deutlich stärker am Morgen (8:00 Uhr) als am Abend (21:00 Uhr) [71]. Eine umgekehrte tageszeitliche Variation wurde hinsichtlich der Inhibition der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation und Freisetzung von Adenosintriphosphat (ATP) sowie der Inhibition der Produktion von Thromboxan durch exogenes MLT, mit einer stärkeren Wirkung von MLT am Abend (18:00 Uhr bzw. 20:30 Uhr), gezeigt [67, 68]. In jungen, gesunden Männern verursachte die orale Gabe von MLT (3 mg) eine Verminderung der Gerinnungsaktivität des Bluts durch die Reduktion des Gerinnungsfaktors VIII und des Fibrinogens im Blut [73].

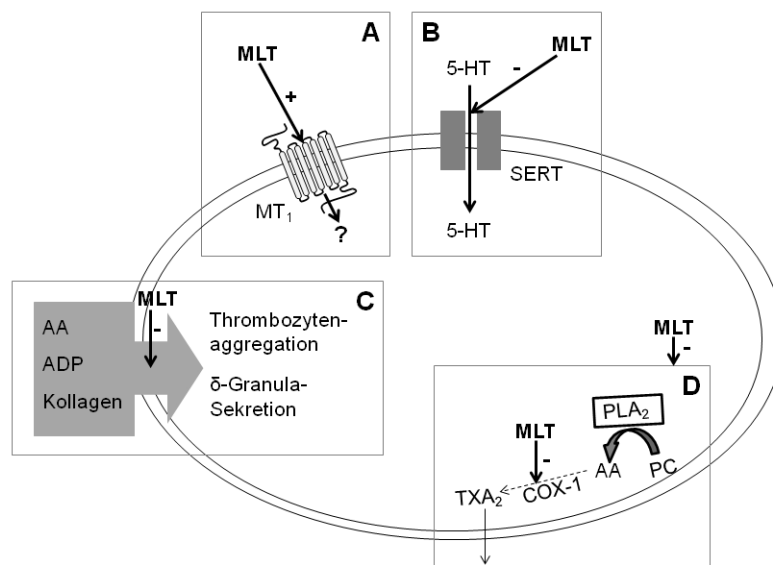


Abbildung 4: Die potenziellen Wirkmechanismen von exogenem Melatonin (MLT) auf die Thrombozyten.

Exogenes MLT bindet an seinen Rezeptor MT_1 auf den Thrombozyten (A) und hemmt die Aufnahme von Serotonin (5-HT) in die Thrombozyten (B), die Arachidonsäure-, Adenosindiphosphat- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation und δ -Granula-Sekretion (C) sowie die Thromboxan A_2 -Produktion in den Thrombozyten (D) [64-72]. Abkürzungen: AA: Arachidonsäure; ADP: Adenosindiphosphat; COX-1: Cyclooxygenase-1; MLT: Melatonin; MT_1 : Melatoninrezeptor 1; PC: Phosphatidylcholin; PLA_2 : Phospholipase A_2 ; SERT: Serotoninwiederaufnahmetransporter; TXA_2 : Thromboxan A_2 ; 5-HT: 5-Hydroxytryptamin (Serotonin).

Eine protektive Wirkung von MLT gegen die durch Chemotherapeutika oder Bestrahlung verursachte Myelosuppression wurde bei Ratten und Mäusen beobachtet [74-77]. Bei Patienten mit einer ausgeprägten Thrombozytopenie, die einer Krebstherapie und anderen Ursachen zugrunde lag, wurde größtenteils eine Normalisierung der Thrombozytenzahl durch die Behandlung mit MLT nachgewiesen [78-80]. An der Vermittlung der hämatopoetischen

Effekte von MLT ist wahrscheinlich die MLT-induzierte Freisetzung von MIO15 (*melatonin-induced opioid 15 kDA*) aus T-Helferzellen und die anschließende Bindung von MIO15 an κ -Opioid-Rezeptoren auf Stromazellen des Knochenmarks beteiligt [81].

Zahlreiche Studien mit den tierexperimentellen Sepsis-Modellen beschreiben protektive Effekte von exogenem MLT hinsichtlich des Überlebens der Tiere sowie in Bezug auf die LPS-induzierte Hypotension, Lipidperoxidation, Zell- und Organschädigung [82-93]. Diese protektiven Effekte wurden dabei auf die gleichzeitig beobachtete anti-oxidative und/oder anti-inflammatorische Wirkung von MLT zurückgeführt [82-93]. Im Allgemeinen wird die anti-oxidative Wirkung von MLT mit seiner Eigenschaft als direkter Radikalfänger in Verbindung gebracht [94]. Darüber hinaus konnte bereits nachgewiesen werden, dass exogenes MLT die Aktivität der anti-oxidativen Enzyme Glutathionperoxidase und Superoxiddismutase während der Endotoxinämie erhöht [82, 95]. Weitere tierexperimentelle Studien zeigten, dass exogenes MLT der LPS-induzierten NO-Bildung entgegenwirkt, indem es die Aktivität und Expression der iNOS vermindert [83, 84, 88, 89, 96]. In Bezug auf den Einfluss von exogenem MLT auf die Immunantwort während der Endotoxinämie widersprechen sich jedoch die tierexperimentellen Studien. Es wurden sowohl anti-inflammatorische Effekte [84, 86, 87, 90-92, 97], die durch die Abnahme der LPS-induzierten Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokine (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 und/oder IL-12) gekennzeichnet waren, als auch pro-inflammatorische Effekte [86, 98], die sich in einer Verstärkung der LPS-induzierten Freisetzung von pro-inflammatorischen Cytokinen (TNF- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-5 und/oder IL-6) widerspiegelten, nachgewiesen.

Eine einzige klinische Studie mit Neugeborenen hat bisher die Behandlung der Sepsis mit MLT untersucht [99]. Bei dieser Studie wurde einem Teil der Neugeborenen, bei denen eine Sepsis in den ersten 12 Stunden diagnostiziert wurde, *oral* 20 mg Melatonin in zwei Dosen von jeweils 10 mg verabreicht. Die Behandlung mit MLT verbesserte das Überleben der septischen Neugeborenen: drei von zehn nicht behandelten sept. Neugeborenen starben binnen 72 Stunden nach der Sepsis-Diagnose, jedoch alle zehn mit MLT-behandelten, sept. Neugeborenen überlebten innerhalb dieses Zeitraums. In der MLT-Gruppe konnte darüber hinaus eine signifikante Reduktion der Leukozytenzahl, der Neutrophilenzahl, des C-reaktiven Proteins und der Lipidperoxidation sowie ein Anstieg der Thrombozytenzahl im Vergleich zu den nicht behandelten sept. Neugeborenen beobachtet werden [99].

2.3 Serotonin

Bei der Suche nach wirksamen Vasokonstriktoren im Rinderserum fanden Maurice M. Rapport, Arda A. Green und Irvine H. Page im Jahr 1948 eine Substanz, die sie als Serotonin (von „Serum“ und „Tonus“) bezeichneten und dessen Struktur ein Jahr später von Maurice M. Rapport (1949) aufgeklärt wurde [100, 101]. Der Nachweis von Serotonin im Gehirn von Säugetieren durch Betty M. Twarog und Irvine H. Page (1953) ebnete den Weg für die nachfolgende Erforschung der Funktion von Serotonin als Neurotransmitter und dessen Rolle bei psychischen Erkrankungen [102, 103]. Etwa 95 % des Serotonins im Körper wird in den Enterochromaffinen Zellen des Darms produziert [104]. Serotonin wird aus der Aminosäure L-Tryptophan synthetisiert und kann im Anschluss in Melatonin (Abbildung 3) oder in 5-Hydroxyindolessigsäure umgewandelt werden [36, 37, 105]. Der Abbau von Serotonin zu 5-Hydroxyindolessigsäure erfolgt über die Monooxidase A [104]. Im Blut wird Serotonin von den Thrombozyten mittels deren membranständigen Serotoninwiederaufnahmetransporter (SERT) aufgenommen [106]. Die physiologische Konzentration von Serotonin im Blutplasma liegt bei ca. 0,8 nM [107]. Der Transport von Serotonin in die Thrombozyten scheint einer strikten Regulation zu unterliegen, weil bei einer hohen Serotonin-Konzentration ($\geq 1,5$ nM) *in vitro* sowohl eine Reduktion der Aufnahme rate von Serotonin als auch eine Abnahme der Dichte des SERTs in der Thrombozytenmembran beobachtet wurde [108].

Serotonin wirkt über seine 14 verschiedenen Rezeptorsubtypen, die in 7 Hauptgruppen (5-HT₁ – 5-HT₇) eingeteilt sind und wovon alle außer der 5-HT₃-Rezeptor, bei dem es sich um einen Liganden-gesteuerten Ionenkanal handelt, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind [109]. Die Hauptgruppe 5HT₂ setzt sich aus den drei Subtypen 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} und 5-HT_{2C} zusammen. An der Transduktion des G-Protein-gekoppelten Signals der 5-HT₂-Rezeptoren ist zum einen der Phospholipase C/Inositoltriphosphat-Weg und zum anderen der RhoGEF/RhoA-Weg beteiligt [110].

Serotonin unterstützt die Kontrolle der Atmung durch seine Effekte auf das Atemzentrum des Stammhirns sowie auf das Gefäßsystem der Lunge [111]. Der 5-HT_{2A}-Rezeptor in der glatten Gefäßmuskulatur vermittelt die vasokonstriktorische Wirkung von Serotonin, indem die Aktivierung seiner nachgeschalteten Signalwege, PLC/IP₃ und RhoGEF/RhoA, letztendlich zu einer Stimulation der Myosin-Leichtketten-Kinase und zu einer Inhibition der Myosin-Leichtketten-Phosphatase führt [110].

In den δ -Granula der Thrombozyten liegt Serotonin in hohen Konzentrationen (65 mM) vor (Abbildung 5) [112]. Kommt es zur Aggregation der Thrombozyten, so wird Serotonin aus

den δ -Granula ins Blutplasma freigesetzt [113]. Das freigesetzte Serotonin wirkt über seinen Rezeptor 5-HT_{2A} als schwacher Koaktivator auf die Thrombozyten, indem es den Effekt von anderen Agonisten, wie z.B. ADP und Thrombin, auf die Aktivierung der Thrombozyten verstärkt [114]. Die Exozytose der thrombozytären α -Granula wird durch Serotonin zum einen über seine kovalente Bindung an kleine GTPasen in den Thrombozyten, ein Prozess der durch Transglutaminasen katalysiert wird und als „Serotonylierung“ bezeichnet wird, und zum anderen über den 5-HT_{2A} -Rezeptor-vermittelten Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration induziert, da beide Prozesse eine konstitutive Aktivierung der kleinen GTPasen zur Folge haben [115]. Die Serotonin-induzierte Aktivierung des thrombozytären 5-HT_{2A} -Rezeptors bewirkt darüber hinaus eine TACE (*tumor necrosis factor alpha converting enzyme*)-vermittelte Abspaltung der Adhäsionsproteine GPIIb α und GPV [116]. Die direkte Interaktion des Serotonintransporters mit dem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ spielt wahrscheinlich eine regulatorische Rolle, da eine Aktivierung des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta_3$ durch Fibrinogen den Transport von Serotonin in die Thrombozyten verstärkt [117].

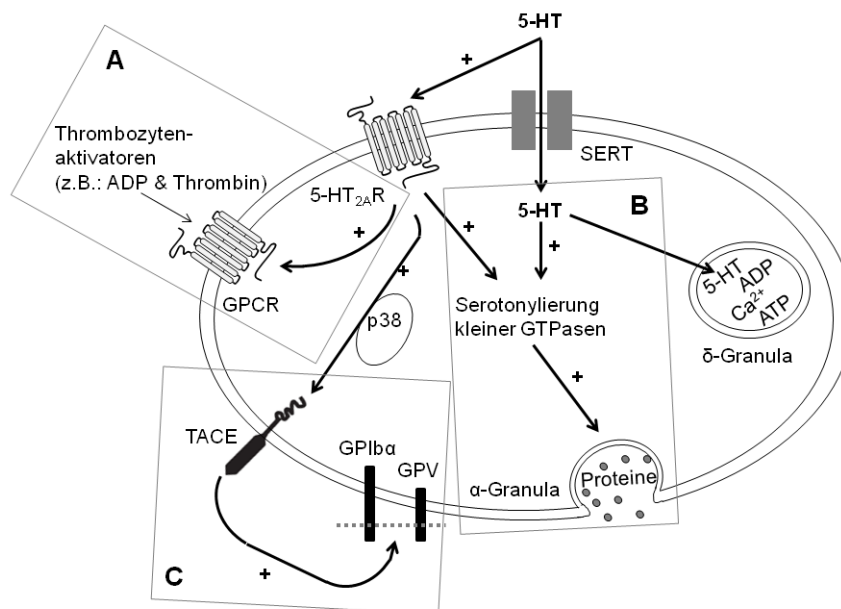


Abbildung 5: Die potenziellen Wirkmechanismen von Serotonin (5-HT) auf die Thrombozyten. Serotonin (5-HT) wirkt als schwacher Koaktivator von Thrombozytenaktivatoren (A) fördert die Exozytose der α -Granula über den Prozess der „Serotonylierung“ kleiner GTP-asen (B) und bewirkt die Abspaltung der Adhäsionsproteine GPIIb α und GPV (C). Abkürzungen: ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; GPCR: *G-protein coupled receptor*; GPIIb α : Glykoprotein Ib α ; GPV: Glykoprotein V; SERT: Serotoninwiederaufnahmetransporter; TACE: *tumor necrosis factor alpha converting enzyme* ; 5-HT: 5-Hydroxytryptamin; 5-HT_{2A}R: 5-Hydroxytryptamin Rezeptor 2A. (modifiziert nach [116])

Serotonin fördert die Thrombopoese in ihrer späten Phase mittels einer 5-HT₂-Rezeptor-abhängigen Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs in den Megakaryozyten, die eine Reorganisation des Zytoskeletts und somit die Bildung von direkten Vorläuferzellen der Thrombozyten (*Proplatelets*) bewirkt [74]. Wie die Thrombozyten besitzen sowohl die Megakaryoblasten als auch Megakaryozyten die Fähigkeit der aktiven Aufnahme von extrazellulärem Serotonin *via* SERT [118, 119]. Die Speicherung von Serotonin in den charakteristischen δ -Granula wurde allerdings nur in den reifen Megakaryozyten beobachtet [120, 121]. In den Megakaryoblasten wird vermutlich das aufgenommene Serotonin direkt in 5-Hydroxyindolessigsäure durch die Monoaminoxidasen umgewandelt [118].

2.3.1 Serotoninwiederaufnahmehemmer Citalopram

Citalopram (CIT) ist ein racemisches Gemisch (50:50) aus den zwei Isomeren: *S*-Citalopram (oder Escitalopram) und *R*-Citalopram (Abbildung 6), das als selektiver Serotoninwiederaufnahmehemmer (SSRI) wirkt und in Deutschland als Arzneimittel zur Behandlung von Depressionen zugelassen ist [122-124]. Die Blut-Hirn-Schranke können die beiden Stereoisomere des Citaloprams gleichermaßen passieren [125]. An den SERT bindet *S*-Citalopram hochaffin im Bereich der Bindungstasche für Serotonin sowie der allosterischen Bindungsstelle [126]. *R*-Citalopram besitzt eine vergleichbare Affinität für die allosterische Bindungsstelle wie *S*-Citalopram, jedoch eine deutlich geringere Affinität für die orthosterische (Serotonin-) Bindungsstelle des SERTs [126]. CIT wird über Reaktionen, wie die *N*-Demethylierung, die Desaminierung und die *N*-Oxidation, zu weniger lipophilen Verbindungen metabolisiert [127]. Die Eliminationshalbwertszeit von CIT beträgt in etwa 1,5 Tage [128].

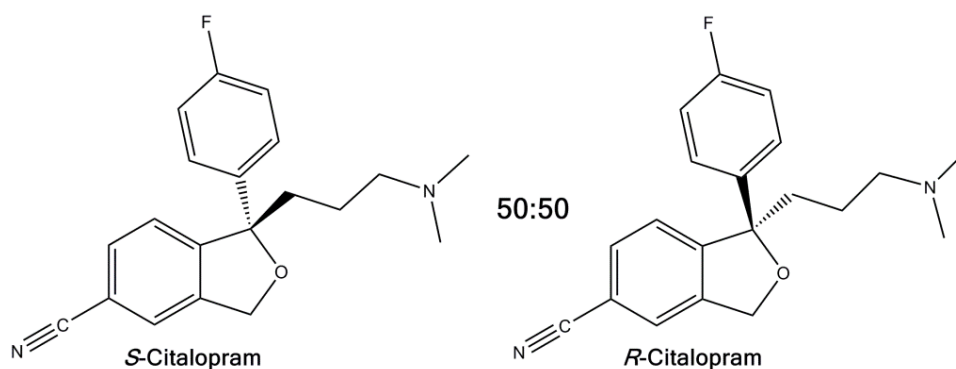


Abbildung 6: Die Stereoisomere des Citaloprams. (nach [129])

Bei älteren, depressiven Patienten konnte nach der Gabe von CIT eine signifikante Abnahme sowohl des systolischen Blutdrucks als auch der Herzfrequenz beobachtet werden [130]. Tecco *et al.* (2011) nahmen demnach eine dämpfende Wirkung von CIT auf die Aktivität des

Sympathikus an [130]. Darüber hinaus scheint CIT einen direkten, inhibitorischen Einfluss auf die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle der Kardiomyocyten zu haben [131].

In vitro wurde eine Abnahme der Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen und Fibrinogen, eine Hemmung der ADP- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation sowie der Kollagen-induzierten Sekretion der α - und δ -Granula und eine verminderte Freisetzung von Thromboxan A_2 , jedoch kein Effekt auf die plasmatische Gerinnung durch CIT beobachtet (Abbildung 7) [132-134]. Die ADP- bzw. Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation hemmt CIT bei einer Konzentration von 50 μM maximal [134] bzw. 23,4 μM halbmaximal [133]. Darüber hinaus scheint CIT die Kollagen-induzierte Aktivierung des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta_3$ zu hemmen [133]. Des Weiteren reduziert CIT die Freisetzung von Arachidonsäure aus der Thrombozytenmembran wahrscheinlich durch seine Fähigkeit sich in Membranen einzulagern [135].

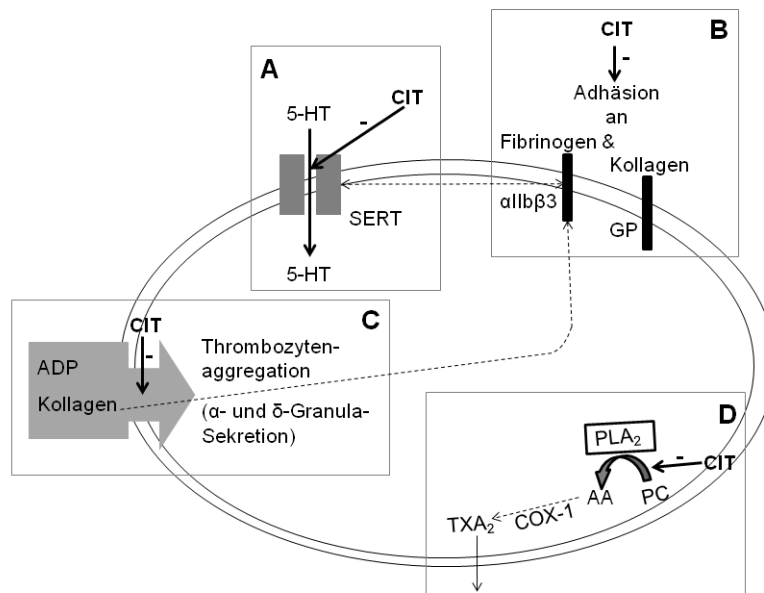


Abbildung 7: Die potenziellen Wirkmechanismen von Citalopram (CIT) auf die Thrombozyten. Citalopram (CIT), ein selektiver Serotoninwiederaufnahmehemmer (A), reduziert die Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen und Fibrinogen (B), hemmt die Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation sowie die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation und Sekretion der α - und δ -Granula (C) und vermindert die Freisetzung von Thromboxan A_2 aus den Thrombozyten (D) [132-135]. Abkürzungen: AA: Arachidonsäure; ADP: Adenosindiphosphat; CIT: Citalopram; COX-1: Cyclooxygenase-1; GP: Glykoprotein; PC: Phosphatidylcholin; PLA₂: Phospholipase A₂; SERT: Serotoninwiederaufnahmetransporter; TXA₂: Thromboxan A₂; 5-HT: 5-Hydroxytryptamin (Serotonin).

Bei depressiven Patienten wurden eine Erhöhung des Serotoninspiegels im Blutplasma sowie eine Reduktion des Serotoningehalts in den Thrombozyten bereits nach der ersten oralen Applikation von 5 mg CIT nachgewiesen [136]. In weiteren Patientenstudien, in denen jedoch nur das *S*-Enantiomer (Escitalopram) von CIT eingesetzt wurde, konnte der Einfluss auf die Thrombozytenfunktion und -zahl dargelegt werden [137-141]. Lopez-Vilchez *et al.* (2014) konnten bei Patienten mit einer Majordepression nach einer 24-wöchigen Behandlung mit Escitalopram (Ø 18 mg/Tag) eine signifikante Reduktion des pro-thrombotischen Phänotyps der Thrombozyten zeigen [137]. In der Studie von Flock *et al.* (2010) wurde zudem im venösen Blut von depressiven Patienten in Folge einer 84-tägigen Behandlung mit Escitalopram (Ø 11,4 mg/Tag) eine signifikante Abnahme der ADP- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation um 23% bzw. 15 % nachgewiesen [138]. Im Gegensatz dazu wurde bei einem depressiven Patienten mit keinerlei Risikofaktoren für die Entwicklung einer Thrombose nach der Verabreichung von Escitalopram (10-20 mg/Tag) eine venöse Thromboembolie diagnostiziert [139]. Aufgrund der konträren Effekte von Escitalopram auf die Hämostase, gehen Kurne *et al.* (2004) von einem anfänglichen pro-thrombotischen und einem nachfolgenden anti-thrombotischen Einfluss von Escitalopram aus [139]. Hinsichtlich der Thrombozytenzahl im Blut konnte nach der ein- bzw.- zweimonatigen Gabe von Escitalopram (10-20 mg/Tag) eine signifikante Abnahme beobachtet werden [140, 141].

Der Einfluss von CIT auf die Effekte von LPS wurde bisher lediglich *in vitro* untersucht [142]. Dabei wurde eine signifikante Abnahme der LPS-induzierten Produktion von TNF- α in den Mikroglia-Zellen durch CIT nachgewiesen und somit eine anti-inflammatorische Wirkung von CIT angenommen [142].

2.3.2 Serotoninantagonist Sarpogrelate

Sarpogrelate (SAR) ist ein selektiver Antagonist des Serotoninrezeptors 5-HT₂, der eine höhere Bindungsaffinität für den Subtyp 5-HT_{2A} als für die Subtypen 5-HT_{2B} und 5-HT_{2C} aufweist und lediglich mit geringer Affinität an den 5-HT₁-Rezeptor, den α_1 , α_2 und β -Adrenorezeptor und den Muskarinrezeptor bindet (Abbildung 8) [143, 144]. Die Blut-Hirn-Schranke kann SAR nur im geringen Maße (0,25 %-2 % der Blutplasmakonzentration) passieren [145, 146]. Im Körper wird SAR zu seinem aktiven Metaboliten M-1 hydroxyliert [147]. Sowohl SAR als auch M-1 werden als Glucuronid-Konjugate über die Galle ausgeschieden [147]. Die Eliminationshalbwertszeit von SAR beträgt ca. 1,2 Stunden [148].

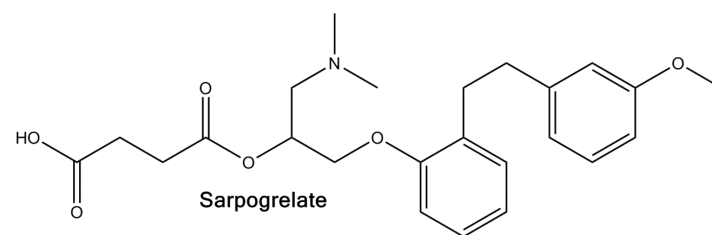


Abbildung 8: Die Strukturformel von Sarpogrelate. (nach [149])

SAR hemmt die Serotonin-induzierte 5-HT₂-vermittelte Kontraktion der glatten Muskulatur der Kaudalarterie kompetitiv ($K_i = 17,9$ nM), aber wirkt nur schwach inhibitorisch auf die 5-HT₁- ($K_i = 689$ nM) und die Adrenorezeptor-vermittelte Kontraktion ($K_i = 1320-3010$ nM) der glatten Muskulatur [150]. Eine chronische Hemmung des 5-HT₂-Rezeptors durch eine Langzeitbehandlung mit SAR verursachte bei Ratten eine Verstärkung der 5-HT_{1C}- und 5-HT₇-vermittelten Sympathikusinhibition [151].

In vitro wurde eine Hemmung der Serotonin-, Arachidonsäure-, ADP- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation durch SAR nachgewiesen (Abbildung 9) [150, 152]. Die Serotonin-induzierte Aggregation der Thrombozyten hemmt SAR halbmaximal bei einer Konzentration von 0,6 μ M [152]. Darüber hinaus konnte ein inhibitorischer Einfluss von SAR auf die Kollagen plus Serotonin-induzierte Freisetzung von P-Selectin und Serotonin aus den α - bzw. δ -Granula der Thrombozyten gezeigt werden [153]. Weder der Transport von Serotonin in die Thrombozyten, noch die Konzentration von cAMP in den Thrombozyten, noch die Umwandlung von Arachidonsäure zu Thromboxan wurden durch SAR beeinflusst [150].

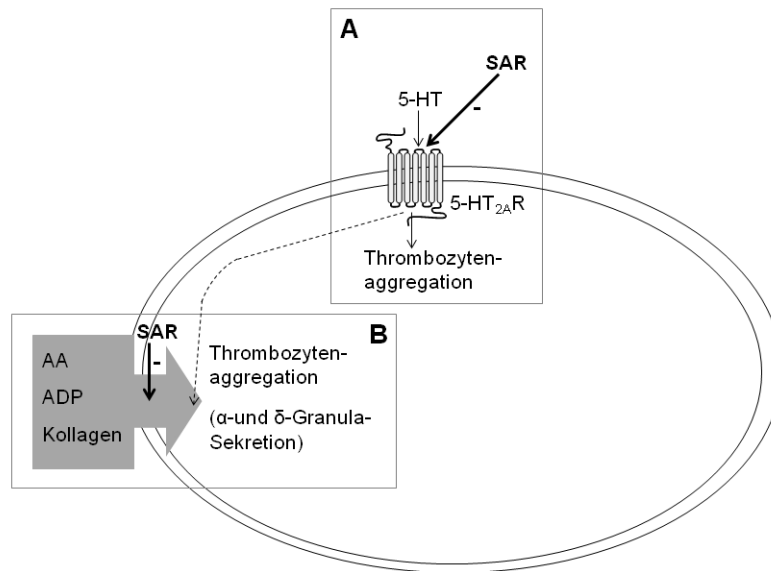


Abbildung 9: Die potenziellen Wirkmechanismen von Sarpogrelate (SAR) auf die Thrombozyten. Sarpogrelate (SAR) hemmt die Serotonin-, Arachidonsäure-, Adenosindiphosphat- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation sowie die Kollagen plus Serotonin-induzierte Sekretion der α - und δ -Granula [150, 152, 153]. Abkürzungen: AA: Arachidonsäure; ADP: Adenosindiphosphat; SAR: Sarpogrelate; 5-HT: 5-Hydroxytryptamin (Serotonin); 5-HT_{2A}R: 5-Hydroxytryptamin Rezeptor 2A.

Nur in einem tierexperimentellen Modell zum Endotoxin-Schock wurde bisher die protektive Einfluss von SAR untersucht [154]. Die protektive Gabe von SAR verminderte die Endotoxin-induzierte Abnahme des Blutdrucks, der Pulsfrequenz, des pH-Werts und des Sauerstoffpartialdrucks, sowie den Endotoxin-induzierten Anstieg des Kohlenstoffdioxidpartialdrucks und der pro-inflammatorischen Zytokine (IL-1 β , IL-8 und TNF- α) und erhöhte die Freisetzung des anti-inflammtorischen Zytokines IL-10 während des Endotoxin-Schocks. In Bezug auf die Lunge der Tiere wurde eine Reduktion der Endotoxin-induzierten peri-vaskulären, peri-bronchialen und alveolaren Infiltration von Granulozyten und Lymphozyten, sowie des Anstiegs von alveolaren Makrophagen durch die protektive Applikation von SAR beobachtet. Insgesamt war die Überlebensrate bei den Tiere, denen vor Einleitung des Endotoxin-Schocks SAR verabreicht wurde, signifikant erhöht [154].

3. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte basierend auf den zuvor genannten anti-hämostatischen Effekten von exogenem Melatonin (MLT) [66-73] untersucht werden, ob MLT eine geeignete Substanz zur Prävention oder Reduktion der Entwicklung einer Disseminierten intravasalen Gerinnung (DIG) während der systemischen Inflammation sei. Darüber hinaus sollte aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von MLT zu Serotonin (Abbildung 3) und der bereits *in vitro* nachgewiesenen Hemmung des Transports von Serotonin in die Thrombozyten durch MLT [71, 72], der Einfluss von MLT auf die DIG *in vivo* sowie auf die Serotonin-induzierte Thrombozytenaktivierung *in vitro* mit denen der selektiven Serotoninantagonisten Citalopram (CIT), einem Serotoninwiederaufnahmehemmer [122], und Sarpogrelate (SAR), einem 5-HT₂-Rezeptorantagonisten [143, 144], verglichen werden.

Die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte sub-akute Endotoxinämie (0,5 mg LPS/kg x h) in männlichen Wistar-Ratten sollte dabei als tierexperimentelles Modell zur Imitation der systemischen Inflammation und Induktion der DIG dienen. MLT sollte als 15-minütige Kurzzeitinfusion (3 x 3 mg/kg x 15 min) 15 min vor und 120 min und 240 min nach dem Beginn der LPS-Infusion intravenös (*i.v.*) verabreicht werden, da MLT eine Eliminationshalbwertszeit von ca. 45 min aufweist und diese MLT-Dosis im Gegensatz zu einer MLT-Dauerinfusion sowie einer MLT-Kurzzeitinfusion mit 1-stündiger Nachdosierung keine starken Schwankungen des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP), wie in einer vorhergehenden Studie gezeigt, hervorrief [56, 155]. CIT (0,46 mg CIT/kg x 15 min) sollte lediglich als einmalige Kurzzeitinfusion 15 min vor Beginn der LPS-Infusion appliziert werden, da seine Eliminationshalbwertszeit in etwa 1,5 Tage beträgt [128]. SAR (3 x 0,28 mg SAR/kg x 15 min) sollte aufgrund seiner Eliminationshalbwertszeit von 1,2 Stunden [148] zu den gleichen Zeitpunkten wie MLT infundiert werden. Der Einfluss von MLT, CIT und SAR auf die Hämostase während der sub-akuten Endotoxinämie sollte mithilfe der Thromboelastometrie (ROTEM), einem diagnostischen Verfahren zur Untersuchung der Gerinnungskinetik [156], und der Bestimmung der Thrombozytenzahl analysiert werden. Des Weiteren sollte mittels der Untersuchung der Vitalparameter und der lokalen Mikrozirkulation (*O2C*), der Blutgasanalyse sowie der Bestimmung organspezifischer Schädigungsparameter überprüft werden, ob mögliche Effekte auf die Hämostase im Zusammenhang mit anderen systemischen Veränderung stehen. Die Wirkung von MLT, CIT und SAR auf die Serotonin-induzierte Thrombozytenaktivierung *in vitro* sollte in venösem Vollblut von gesunden Probanden mittels der Impedanzaggregometrie untersucht werden.

4. Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Materialien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Materialien.

Hersteller	Produkt
AbbVie Deutschland (Ludwigshafen, Deutschland)	Isofluran
Air Liquide (Düsseldorf, Deutschland)	medizinischer Sauerstoff
Astra Zeneca (Wedel, Deutschland)	Lidocain (Xylocain® 1 %)
B. Braun (Melsungen, Deutschland)	Isotone Kochsalzlösung 0,9 %,Perfusor® Leitung, Perfusor® Syringe 50 ml
Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)	BD Plastipak™ 1 ml, 2ml Spritze
Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	Ethanol≥ 99,5 %, Roti ® Histofix 4%, Roti® Histokitt II (Einbettmedium)
Ceva Tiergesundheit (Düsseldorf, Deutschland)	Ketamin 10 %
Covidien (Dublin, Irland)	Nellcor™ OxiCliq A (Pulsoximetriesensor)
DiaSys Diagnostic Systems (Holzheim, Deutschland)	ALAT (GPT) FS* (IFCC mod.), ASAT (GOT) FS* (IFCC mod.), CK-NAC FS* IFCC, Creatinin FS* , LDH FS* IFCC
Eifelfango (Bad Neuenahr-Ahrweiler, Deutschland)	Natriumcitrat-Lösung (3,13 %)
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	Pipetten Reference ® 2
Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland)	Ringerlösung
Karl Beese (Barsbüttel, Deutschland)	Vliesstoffkompressen

Hersteller	Produkt
Lundbeck (Hamburg, Deutschland)	Cipramil ®
mediPlac (Borchen, Deutschland)	Druckmanschette
Medizin und Labortechnik (Edermünde, Deutschland)	Objektträger, Deckgläschen
Merck (Darmstadt, Deutschland)	Giemsa´s Azur-Eosin-Methylenblaulösung, May-Grünwald´s Eosin-Methylenblaulösung, Puffertabletten (pH = 6,8)
Radiometer Medical (Brønshøj, Dänemark)	Aterial Blood Sampler 2 ml (PICO50)
Resorba Medical (Nürnberg, Deutschland)	Chirurgisches Nahtmaterial (Seidenfaser)
Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	Pipettenspitzen 10 µ, 200 µl, 1000 µl Reaktionsgefäß 1,5 ml & 2 ml, Reagenzröhre 10 ml & 50 ml, S-Monovette® Hirudin 2,7 ml
Sartorius (Goettingen, Deutschland)	Minisart® Filter 0,20µm
Shirley Aldred & Co. LTD (Sheffield, England)	Aldabsorber
Sigma Aldrich (St. Louis, USA)	Lipopolysaccharid von <i>E.coli</i> (Serotype 0111:B4), Melatonin, Sarpogrelate Hydrochlorid, Serotonin Hydrochlorid
Smith Medical International (Grasbrunn, Deutschland)	Protex® Katheter (0,58 mm i.d./ 0,96 mm o.d), 4-Wege-Hahn, LogiCal ® Druckumwandler
TEM Innovations (München, Deutschland)	Cup&Pins, Reagenz zur Rekalzifizierung (star-tem®), Spitzen für die automatische Pipette

4.2 Geräte

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte.

Hersteller	Produkt
Bandelin electronic (Berlin, Deutschland)	Sonorex Ultraschall-Reinigungsgerät RK100
DiaSys Diagnostic Systems (Holzheim, Deutschland)	Response® 920
Drägerwerk (Lübeck, Deutschland)	Isofluran VET. MED. Vapor
Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland)	Injectomat 2000
GFL Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland)	Inkubationsbad
Kern&Sohn (Balingen-Frommern, Deutschland)	Feinwaage 770
LEA Medizintechnik (Gießen, Deutschland)	<i>oxygen to see</i> (O2C), SL-2-Flachsonde
LEICA (Wetzlar, Deutschland)	Lichtmikroskop DME
Medax (Neumünster, Deutschland)	Heizbarer Kleintier-OP-Tisch
Merck (Darmstadt, Deutschland)	Milli-Q® Integral System
Mueller Optronic (Erfurt, Deutschland)	USB-Mikroskop Kamera (MOC-1000)
Radiometer Medical (Brønshøj, Dänemark)	Blutgasanalysator ABL 715
Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)	Muliplate® Analyzer
Siemens Healthcare (Erlangen, Deutschland)	Patientenmonitor SC6805XL
Smith Medical International (Grasbrunn, Deutschland)	medfusion Spritzenpumpe Model 2010

Hersteller	Produkt
TEM Innovations (München, Deutschland)	ROTEM
Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)	Heraeus® Biofuge pico

4.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten die männlichen Wistar Ratten aus der Zucht und Haltung des Zentralen Tierlaboratoriums des Universitätsklinikums Essen. Das Gewicht der Tiere betrug zwischen 400 und 500 g. Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei einer Temperatur von $22\pm 1^\circ\text{C}$, einer Luftfeuchtigkeit von $55\pm 5\%$ und einem 12-stündigen Hell-/Dunkelrhythmus (6:00 Uhr Licht an/18:00 Uhr Licht aus, Winterzeit) mit freiem Zugang zu Wasser. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes NRW genehmigt (Az.: 84-02.04.2013.A120; Az.: 84-02.04.2012.A205).

4.4 Versuchsgruppen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt der Gabe von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) während der sub-akuten Endotoxinämie in einer Serie mit insgesamt 56 Ratten untersucht werden (Abbildung 10 & Tabelle 5). Die sub-akute Endotoxinämie wurde durch eine intravenöse (*i.v.*) Infusion von Lipopolysaccharid (0,5 mg LPS/kg x h) mit einer Perfusionsrate von 7 ml/kg x h über einen Gesamtzeitraum von 6 Stunden induziert. Mit der Gabe von LPS wurde jeweils um ca. 9:00 Uhr (Winterzeit) begonnen. Zur Herstellung der LPS-Infusion wurde das LPS in 0,9 % NaCl-Lösung gelöst und anschließend steril filtriert. MLT wurde in einer Mischung aus reinem Ethanol und 0,9 % NaCl-Lösung (1:90, EtOH:NaCl) gelöst und anschließend steril filtriert. Die Applikation dieser MLT-Lösung erfolgte über die *Vena femoralis* (3 mg MLT/kg x 15 min) 15 min vor und 120 min und 240 min nach dem Beginn der LPS-Infusion. Cipramil®, eine Konzentrat aus 40 mg/ml CIT, wurde mit 0,9 % NaCl-Lösung zu einer Endkonzentration von 0,26 mg/ml CIT verdünnt. Die CIT-Lösung (0,26 mg CIT/ml) wurde anschließend steril filtriert und mithilfe einer Spritzenpumpe (0,46 mg CIT/kg x 15 min) 15 min vor Beginn der LPS-Infusion *i.v.* verabreicht. SAR wurde in 0,9 % NaCl-Lösung gelöst, steril filtriert und *i.v.*

(0,28 mg SAR/kg x 15 min) zu den gleichen Zeitpunkten wie MLT (t= -15 min, 120 min und 240 min) infundiert.

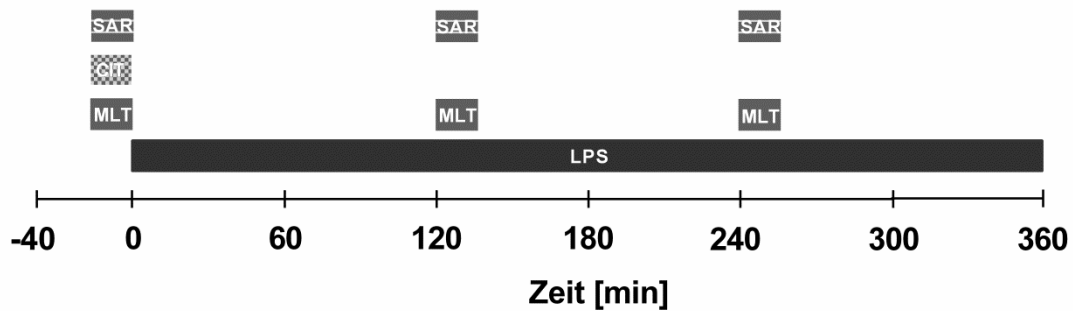


Abbildung 10: Zeitlicher Ablauf der Infusion von Lipopolysaccharid (LPS), Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR). Lipopolysaccharid (LPS) wurde als Dauerinfusion (0,5 mg LPS/kg x h) über 6 Stunden ab dem Zeitpunkt T= 0 min verabreicht. Melatonin (3 mg MLT/kg) und Sarpogrelate (0,28 mg SAR/kg) wurden als 15-minütige Kurzzeitinfusion zu den Zeitpunkten T= -15 min, 120 min und 240 min appliziert. Citalopram (0,46 mg CIT/kg) wurde als 15-minütige Kurzzeitinfusion zu dem Zeitpunkt T= -15 min infundiert.

Tabelle 5: Übersicht der Versuchsgruppen.

Serie 1			
Gruppe	Tiere	Applikation von	
SHAM	8	0,9 % NaCl	Lösungsmittel
MLT	8	0,9 % NaCl	3 x 3 mg MLT/kg x 15 min
CIT	4	0,9 % NaCl	1 x 0,46 mg CIT/kg x 15 min
SAR	4	0,9 % NaCl	3 x 0,28 mg SAR/kg x 15 min
LPS	12	0,5 mg LPS/kg x h	Lösungsmittel
LPS+MLT	12	0,5 mg LPS/kg x h	3 x 3 mg MLT/kg x 15 min
LPS+CIT	4	0,5 mg LPS/kg x h	1 x 0,46 mg CIT/kg x 15 min
LPS+SAR	4	0,5 mg LPS/kg x h	3 x 0,28 mg SAR/kg x 15 min

4.5 Versuchsdurchführung

4.5.1 Anästhesie, Analgesie und chirurgischer Eingriff

Die Tiere wurden mit Isofluran zuerst in einem Begasungstopf (2 % Isofluran in 100 % O₂, 4 l/min) zur Einleitung der Narkose bis zum Erreichen des gewünschten Toleranzstadiums nach Güdel (1937) und anschließend über eine Kleintiernarkosemaske (1,5-2,0 % Isofluran, O₂, 1 l/min) anästhesiert [157]. Dabei erfolgte keine Beatmung, die Tiere atmeten spontan. Zur Analgesie wurde Ketamin (50 mg/kg) in die rechte Bauchseite und zur lokalen Betäubung des späteren OP-Bereichs wurde Lidocain (5mg/kg) in die rechte Leistengegend subkutan (*s.c.*) injiziert. Um zu verhindern, dass die narkotisierten Tiere ersticken, wurde die Zunge der Tiere exponiert. Die Körperkerntemperatur der Tiere wurde mittels einer rektal eingeführten Temperatursonde gemessen und mittels einer Heizplatte und durch Bedecken mit Alufolie konstant über 37 °C gehalten. Mit dem chirurgischen Eingriff wurde begonnen, wenn kein Zwischenzehenreflex bzw. Lidschlussreflex mehr ausgelöst wurde. Für die nachfolgende Katheterisierung der rechten *Arteria femoralis* und *Vena femoralis* wurden zunächst diese beiden Gefäße voneinander und vom umliegenden Gewebe und dem *Nervus femoralis* getrennt. Um von Beginn des Versuchs an die Blutentnahme sowie die Messung des Blutdrucks zu ermöglichen, erfolgte als Erstes die Katheterisierung der Arterie. Dafür wurde die freiliegende Arterie mit einer Pinzette angehoben und mit einem chirurgischen Faden distal abgebunden und proximal angeschlungen. Danach wurde die Arterienwand mittels einer Gefäßschere angeschnitten und der mit Ringerlösung gefüllte Katheter in die Arterie geschoben. Die Fixierung des Arterienkatheters erfolgte mittels der distalen und proximal liegenden Ligatur. Nach dem gleichen Prinzip, wie für die Arterie beschrieben, wurde im Anschluss die Katheterisierung der Vene durchgeführt. Damit die Wunde nicht austrocknet, wurde diese nach der Katheterisierung der Femoral-Gefäße mit einer feuchten (0,9 % NaCl) Kompresse bedeckt.

4.5.2 Vitalparameter

Während des gesamten Versuchsverlaufs wurden die Vitalparameter überwacht und in 10-minütigen Abständen dokumentiert. Die Messung des arteriellen Blutdrucks erfolgte durch den mit dem Arterienkatheter verbundenen Druckumwandler und wurde mithilfe eines OP-Monitors visualisiert. Um die Funktionalität des Arterienkatheters im Versuch zu gewährleisten, wurde dieser konstant mit Ringerlösung perfundiert (3 ml/h). Die Herzfrequenz wurde durch Abzählen der systolischen Blutdruckpeaks am Monitor bestimmt. Anhand der Anzahl der Atemzüge innerhalb von 15 s wurde die Atemfrequenz pro Minute ermittelt. Die

periphere Sauerstoffsättigung des Blutes konnte mittels eines Pulsoximetriesensors, der an der linken Hinterpfote angebracht war, überwacht werden. Die Narkosetiefe wurde mithilfe eines Schmerztests alle 30 min überprüft.

4.5.3 Mikrozirkulation

Das diagnostische System *oxygen to see*, welches die Techniken Laser Doppler und Weiß-Licht-Spektroskopie kombiniert, wurde zur stündlichen Messung der lokalen Mikrozirkulation verwendet [158]. Dafür wurde eine SL-2-Flachsonde, die die Mikrozirkulation in der Haut (Tiefe: 2 mm) und im Skelettmuskel (Tiefe: 5 mm) detektiert, an die linke Hinterpfote der Ratte gehalten. Mittels der Laser Doppler Spektroskopie konnte der mikrovaskuläre Blutfluss (*Flow*) ermittelt werden. Die Weiß-Licht-Spektroskopie ermöglichte die mikrovaskuläre Bestimmung der relativen Hämoglobinmenge (rHb) und der Sauerstoffsättigung (sO₂).

4.5.4 Blutentnahme und Plasmagewinnung

Die Entnahme von Blut erfolgte über die rechte *Arteria femoralis*. Mit einem 2 ml Probennehmer, der 80 IU Elektrolyt-kompensiertes Heparin zur Verhinderung der vorzeitigen Gerinnung enthielt, wurde direkt nach der Katheterisierung der *Arteria femoralis* und zu den Zeitpunkten 0 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min und 360 min 0,5 ml arterielles Blut entnommen. Das heparinisierte Blut wurde zur Analyse der Blutgase eingesetzt. Im Anschluss an die Blutgasanalyse wurde das restliche Blut zur Gewinnung des Blutplasmas in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und für 15 min bei 3.000 x g zentrifugiert. Der Überstand (Blutplasma) wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für die anschließende Bestimmung der organspezifischen Schädigungsparameter verwendet. Ab dem Zeitpunkt 0 min und jede weitere Stunde (60 min, 120 min, 180 min, 200 min, 240 min, 300 min, 360 min) wurde zusätzlich 0,350 ml arterielles Blut in eine 1 ml Spritze, die mit 0,035 ml Citrat (3,13 %) zur Antikoagulation gefüllt war, aufgenommen. Das Citrat-Blut wurde direkt für die Thromboelastometrie und zur Herstellung von Blutaussstrichen eingesetzt.

4.5.5 Blutgasanalyse

Bei der Blutgasanalyse wurden die Partialdrücke von Sauerstoff (pO₂) und Kohlendioxid (pCO₂), der pH-Wert, der *Base Excess* (BE_{Ecf}), das Standardbicarbonat (HCO₃⁻), die Ionenkonzentrationen (K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Cl⁻), der Hämatokrit, die Konzentration der metabolischen Parameter Laktat und Glukose des heparinisierten Blutes gemessen.

4.5.6 Thromboelastometrie

Mit der Thromboelastometrie (ROTEM), einem diagnostischen Verfahren zur Untersuchung der Gerinnungskinetik, konnten bereits im Blut von Schweinen mit einer Endotoxinämie und Patienten mit einer Sepsis die zwei typischen Phasen der Disseminierten intravasalen Gerinnung (DIG) *ex vivo* dargestellt werden [159-161]. Die Thromboelastometrie (ROTEM) stellt eine Modifikation der Thromboelastographie dar [156]. In dieser Arbeit wurde für die Analyse der Gerinnungskinetik 300 μ l Citratblut in eine Küvette überführt und mit 20 μ l star-TEM (CaCl₂: 200 mM) rekalfiziert. Die Initiierung der Gerinnung erfolgte somit ausschließlich über eine Kontaktaktivierung (NATEM). Zur Erfassung der Gerinnungskinetik wurde ein sich alternierend um 4.75° drehender Stempel in die mit Citratblut gefüllte Küvette getaucht. Beim Eintritt der Gerinnung bildeten sich zwischen der Wand der Küvette und dem Stempel Gerinnseläden, die dann die Drehbewegung des Stempels hemmten. Die Bewegungshemmung wurde über einen Messzeitraum von 2 Stunden erfasst und in einer typischen Kurve (TEMogram, Abbildung 11) und in numerischen Parametern (Tabelle 6) dargestellt.

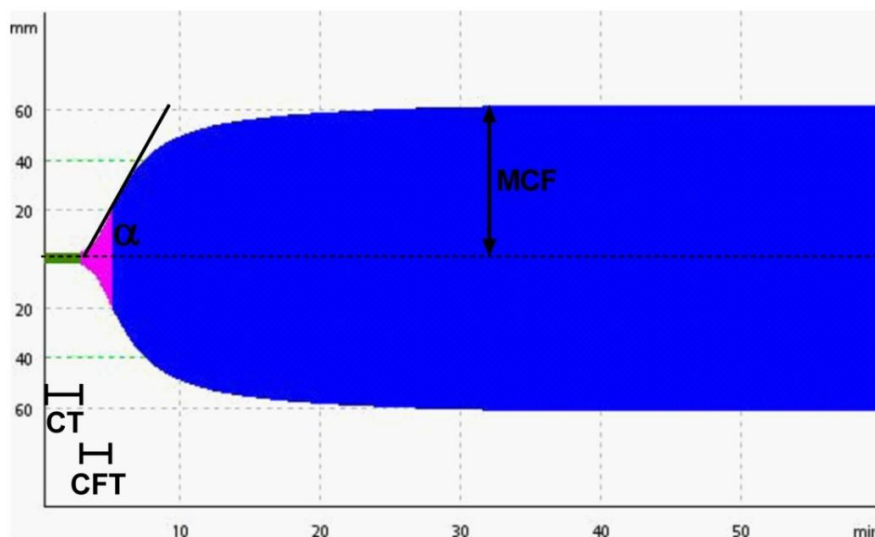


Abbildung 11: Repräsentatives TEMogram der Thromboelastometrie. Abkürzungen: α : α -Winkel; CT: Clotting Time; CFT: Clot Formation Time; MCF: Maximum Clot Firmness.

Tabelle 6: Übersicht der in dieser Arbeit relevanten Parameter der Thromboelastometrie.

Akronym	Parameter	Definition	Einheit
CT	<i>Clotting Time</i>	Die Zeit vom Start der Messung bis zu einer Amplitude von 2 mm.	s
CFT	<i>Clot Formation Time</i>	Die Zeit zwischen der 2 mm Amplitude und der 20 mm Amplitude.	s
α	α -Winkel	Der Winkel zwischen der Mittellinie (x-Achse) und einer Tangente an der Gerinnungskurve durch den 2 mm Punkt.	Grad (°)
MCF	<i>Maximum Clot Firmness</i>	Die maximale Amplitude, die in der Messung erreicht wurde.	mm
AUC	<i>Area Under The Curve</i>	Die Fläche unter der ersten abgeleiteten Kure vom Start bis die abgeleitete Kurve die MCF erreicht.	mm x 100

4.5.7 Bestimmung der Thrombozytenzahl

Zur Bestimmung der Thrombozytenzahl wurden Blutausstriche angefertigt. Hierfür wurde 4 μ l des gewonnenen Citrat-Blutes auf einen Objektträger pipettiert und danach mit einem zweiten Objektträger ausgestrichen. Anschließend wurden die luftgetrockneten Blutausstriche nach der Pappenheim-Methode gefärbt [162]. Bei der Pappenheim-Färbung wurden zuerst die Blutzellen auf den Objektträgern in einer May-Grünwald-Lösung, die Methanol, den sauren Farbstoff Eosin und den basischen Farbstoff Methylblau enthielt, für 5 min fixiert und vorgefärbt. Danach wurden die Objektträger für 3 min in dest. Wasser getaucht. Die vollständige Färbung der Blutzellen erfolgte für 20 min in einer Azur-Eosin-Methylblaufärbelösung (Giemsa-Lösung), die zuvor in einem Färbepuffer (pH = 6,8) im Verhältnis 1:15 verdünnt wurde. Dabei sollten die basischen Farbstoffe wie Methylblau und Azur B die negativ geladenen Zellbestandteile und der saure Farbstoff Eosin die positiv geladenen Zellbestandteile anfärben. Durch Waschen für 3 min in dest. Wasser wurde die überschüssige Farbe entfernt. Anschließend wurden die Objektträger an der Luft getrocknet und die Blutzellen mithilfe des Eindeckmediums abgedeckt. Die Blutzellen wurden mit einem Lichtmikroskop bei einer 400-fachen Vergrößerung betrachtet. Die Thrombozytenzahl pro 1000 Erythrozyten wurde anhand der Summe der Thrombozyten und der Erythrozyten in je zehn Gesichtsfelder pro Blutausstrich berechnet. Bei der Färbung nach Pappenheim sollten

die Erythrozyten eine rötliche Färbung und die Thrombozyten eine violette Färbung aufweisen (Abbildung 12).

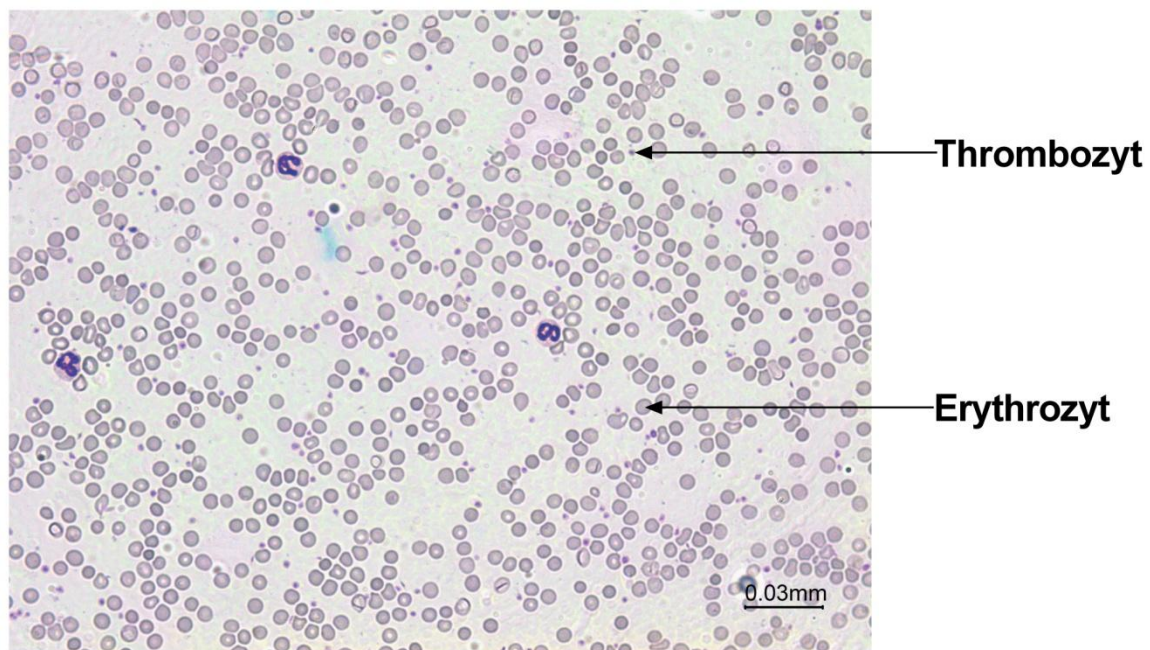


Abbildung 12: Blutausstrich nach der Pappenheim-Färbung. Exemplarischer Thrombozyt und Erythrozyt des Blutausstrichs durch Pfeile gekennzeichnet. Vergrößerung: 400 x

4.5.8 Bestimmung der organspezifischen Schädigungsparameter

Zur Beurteilung der Schädigung der Organe wurde die Aktivität der Enzyme Laktatdehydrogenase (LDH), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Creatin-Kinase (CK) sowie die Konzentration von Kreatinin im Blutplasma mittels eines automatisierten Analysengeräts (response ® 920) bestimmt. Für diese Analyse wurde das Blutplasma im Verhältnis 1:4 mit 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt.

4.6 Impedanzaggregometrie mit humanem Vollblut

Die Thrombozytenaktivierung wurde mittels des diagnostischen Systems Multiplate®, welches auf das Verfahren der Impedanzaggregometrie von Cardinal und Flower (1980) beruht [163], unter verschiedenen Bedingungen analysiert. Dafür wurde zunächst gesunden Probanden um 10 Uhr (Sommerzeit) 27 ml venöses Vollblut mittels peripherer Venenpunktion in Hirudinröhrchen abgenommen. Für die nachfolgende Analyse der Thrombozytenaggregation wurde zuerst 300 µl einer reinen 0,9 % NaCl-Lösung (n=7) oder einer 1 % Ethanol/NaCl-Lösung (n=3) mit einer definierten Konzentration an MLT ($0,5 \times 10^{-2}$ - $0,5 \times 10^{-4}$ M, n=5), CIT (10^{-3} - 10^{-6} M, n=4) und SAR (10^{-3} - 10^{-6} M, n=6) und anschließend das

gleiche Volumen an Hirudinblut (300 μ l) in die Einweg-Messzelle pipettiert. Durch die Zugabe von Serotonin in einer Endkonzentration von 10 μ M wurde dann die Thrombozytenaggregation induziert. Die Veränderung der Impedanz aufgrund der Anlagerung von Thrombozyten an den zwei Sensoren der Messzelle wurde über 6 min aufgezeichnet und in freigeählte *Aggregation Units* umgewandelt. Die Stärke und Geschwindigkeit der Thrombozytenaktivierung wurde durch den *Platelet Aggregation Index* (PAI) dargestellt. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) wurde mithilfe der Software GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., LA Jolla, USA) berechnet.

4.7 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM (*in vivo*) oder als Mittelwerte \pm SD (*in vitro*) dargestellt. Mittels *Box-Plot* wurden die Ausreißer ermittelt und entfernt. Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) für einzelne (sd) und sich wiederholende (rm) Messungen nach Fisher's (LSD) *post-hoc* Analyse wurde zum statistischen Gruppenvergleich verwendet. Ein P-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Die Überlebenskurven wurden anhand der Kaplan-Meier Methode erstellt und anschließend mit dem *log-rank*-Test untereinander verglichen.

5. Ergebnisse

5.1 Effekte von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate während der sub-akuten Endotoxinämie

5.1.1 Effekt von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf das Überleben der Tiere während der sub-akuten Endotoxinämie

In der Lipopolysaccharid (LPS)- und der Lipopolysaccharid+Sarpogrelate (LPS+SAR)-Gruppe überlebten 50 % der Tiere bis zum Versuchsende (T= 360 min; Abbildung 13). Die finale Überlebensrate in der Lipopolysaccharid+Melatonin (LPS+MLT)- und der Lipopolysaccharid+Citalopram (LPS+CIT)-Gruppe betrug hingegen 75 %. Diese Unterschiede der Versuchsgruppen in Bezug auf die Überlebensrate waren jedoch nicht signifikant. Die nachfolgenden Ergebnisse werden bis zum Zeitpunkt T= 300 min dargestellt, da bis zu diesem Zeitpunkt 75 % oder mehr der Tiere in allen Gruppen überlebten.

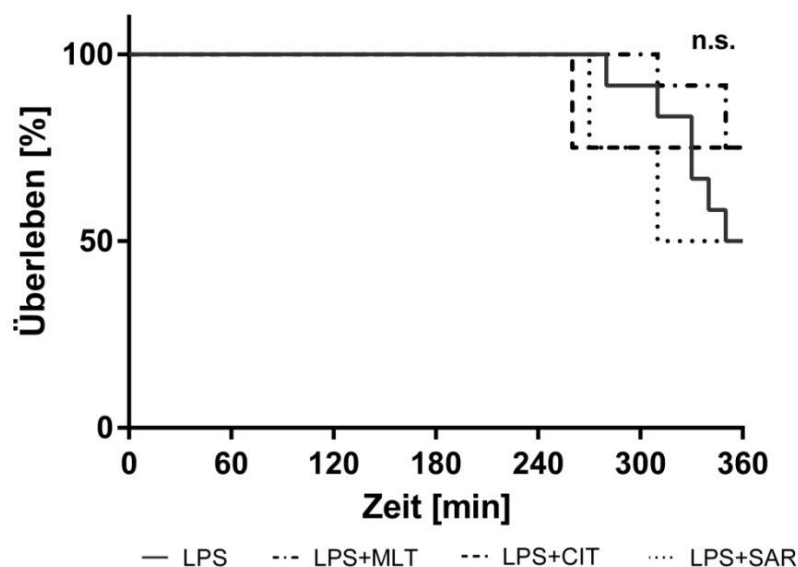


Abbildung 13: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf das Überleben der Tiere während der sub-akuten Endotoxinämie. Lipopolysaccharid (LPS) wurde als Dauerinfusion (0,5 mg LPS/kg x h) über 6 Stunden ab dem Zeitpunkt T= 0 min verabreicht. Melatonin (3 mg MLT/kg) und Sarpogrelate (0,28 mg SAR/kg) wurden als 15-minütige Kurzzeitinfusion zu den Zeitpunkten T= -15 min, 120 min und 240 min appliziert. Citalopram (0,46 mg CIT/kg) wurde als 15-minütige Kurzzeitinfusion zum Zeitpunkt T= -15 min infundiert. Dargestellt sind die Gruppen LPS (n=12), LPS+MLT (n=12), LPS+CIT (n=4) und LPS+SAR (n=4). n.s. : nicht signifikant.

5.1.2 Effekt von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die Vitalparameter der Tiere während der sub-akuten Endotoxinämie

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) der SHAM-Tiere lag im gesamten Versuchsverlauf im physiologischen Bereich (Abbildung 14A). Bei den MLT-Kontrolltieren war der MAP von 70 min bis 300 min im Vergleich zu SHAM signifikant erhöht. Die Applikation von CIT und der SAR unter Kontrollbedingungen verursachte dagegen einen signifikanten Abfall im MAP ab 40 min (CIT) bzw. ab 10 min (SAR) bis 300 min im Vergleich zu SHAM. Die Induktion der sub-akuten Endotoxinämie durch die Infusion von LPS hatte einen signifikanten Anstieg im MAP ab 130 min zur Folge (Abbildung 14B). Der höchste gemessene Wert von 118 ± 3 mmHg wurde bei diesen Tieren zum Zeitpunkt $T = 210$ min erreicht. Die Tiere, denen MLT vor und während der sub-akuten Endotoxinämie verabreicht wurde, wiesen von 70 min bis 300 min einen signifikant gesteigerten MAP im Vergleich zu den LPS-Tieren auf. Bei den Tieren, denen CIT oder SAR vor und/oder während sub-akuten Endotoxinämie appliziert wurde, war der LPS-induzierte Anstieg im MAP hingegen signifikant vermindert. Die Tiere der LPS+SAR-Gruppe zeigten zusätzlich ab 240 min einen stetigen Abfall des MAPs.

Die Herzfrequenz der Tiere der SHAM-Gruppe betrug am Anfang des Versuchs ($T = -40$ min) 324 ± 13 Schläge/min und stieg bis zum Zeitpunkt $T = 300$ min leicht auf 360 ± 8 Schläge/min an (Abbildung 15A). Die MLT-, CIT- und SAR-Kontrolltiere wiesen keine signifikanten Abweichungen in Bezug auf die Herzfrequenz gegenüber den SHAM-Tieren auf. Die Infusion von LPS bewirkte ab 70 min bis 300 min einen stetigen signifikanten Anstieg der Herzfrequenz (Abbildung 15B). Gegen Ende des Versuch ($T = 300$ min) lag die Herzfrequenz bei den LPS-Tieren bei 419 ± 12 Schläge/min. Die Gabe von MLT und SAR vor und während der sub-akuten Endotoxinämie hatte keinen signifikanten Effekt auf die Herzfrequenz. Die Tiere, denen CIT vor der Induktion der sub-akuten Endotoxinämie verabreicht wurde, zeigten ab 240 min einen signifikanten Abfall der Herzfrequenz auf im Mittel 372 ± 12 Schläge/min und infolgedessen im weiteren Versuchsverlauf im Vergleich zu den LPS-Tiere eine signifikant reduzierte Herzfrequenz.

Die Atemfrequenz der SHAM-Tiere war über den gesamten Versuchszeitraum physiologisch (Abbildung 16A). Die Gabe von MLT unter Kontrollbedingungen führte zu keiner signifikanten Veränderung. Die CIT- und SAR-Kontrolltiere wiesen hingegen eine signifikant reduzierte Atemfrequenz ab 200 min (CIT) bzw. -10 min (SAR) bis 300 min im Vergleich zu den SHAM-Tieren auf. Die Infusion von LPS verursachte ab 40 min eine signifikante Steigerung der Atemfrequenz (Abbildung 16B). Die Verabreichung von MLT vor und während der sub-

akuten Endotoxinämie hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Atemfrequenz. Bei den LPS-Tieren, denen CIT oder SAR vor und/oder während der sub-akuten Endotoxinämie appliziert wurde, war der LPS-induzierte Anstieg der Atemfrequenz signifikant vermindert.

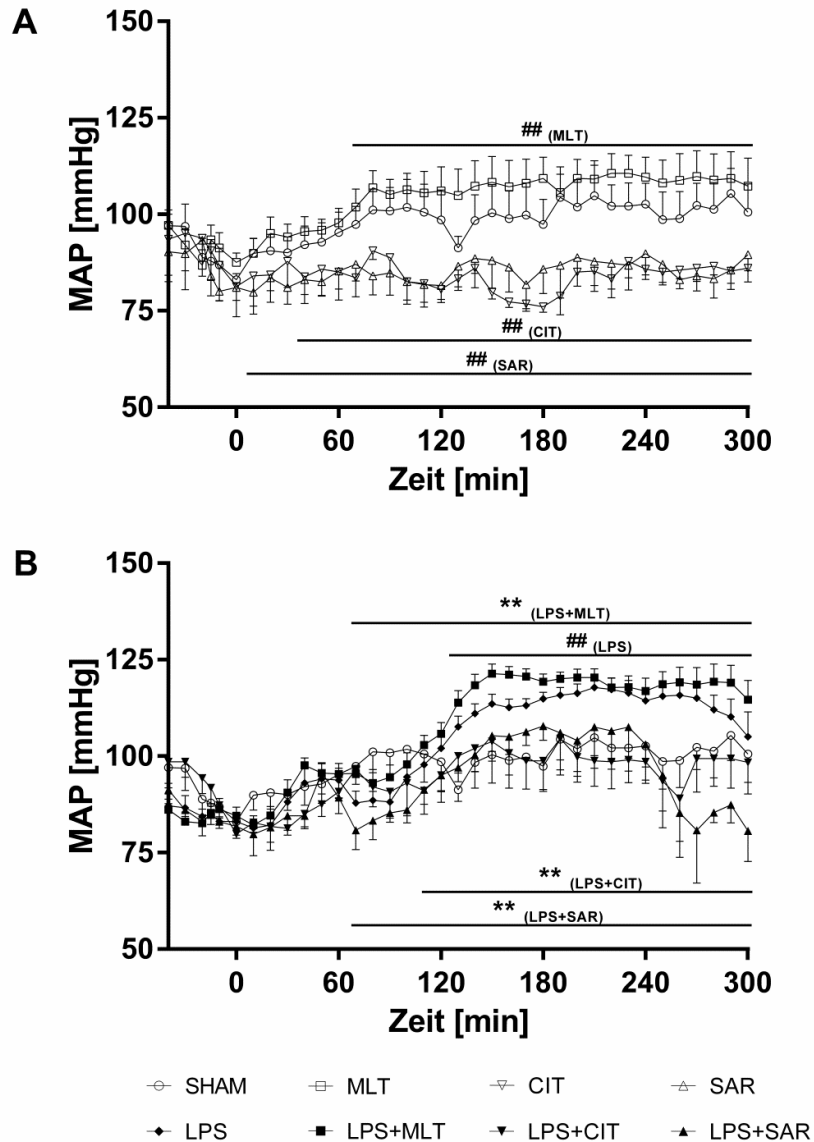


Abbildung 14: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) unter Kontrollbedingungen (A) und während der sub-akuten Endotoxinämie (B). Lipopolysaccharid (LPS) wurde als Dauerinfusion (0,5 mg LPS/kg x h) über 6 Stunden ab dem Zeitpunkt T= 0 min verabreicht. Melatonin (3 mg MLT/kg) und Sarpogrelate (0,28 mg SAR/kg) wurden als 15-minütige Kurzzeitinfusion zu den Zeitpunkten T= -15 min, 120 min und 240 min appliziert. Citalopram (0,46 mg CIT/kg) wurde als 15-minütige Kurzzeitinfusion zum Zeitpunkt T= -15 min infundiert. Die Ergebnisse der Gruppen SHAM (n=8), MLT (n=8), CIT (n=4), SAR (n=4), LPS (n=12), LPS+MLT (n=12), LPS+CIT (n=4) und LPS+SAR (n=4) sind als Mittelwerte±SEM bis zum Zeitpunkt 300 min dargestellt. ##p< 0,05 (vs. SHAM, rm), **p< 0,05 (vs. LPS, rm).

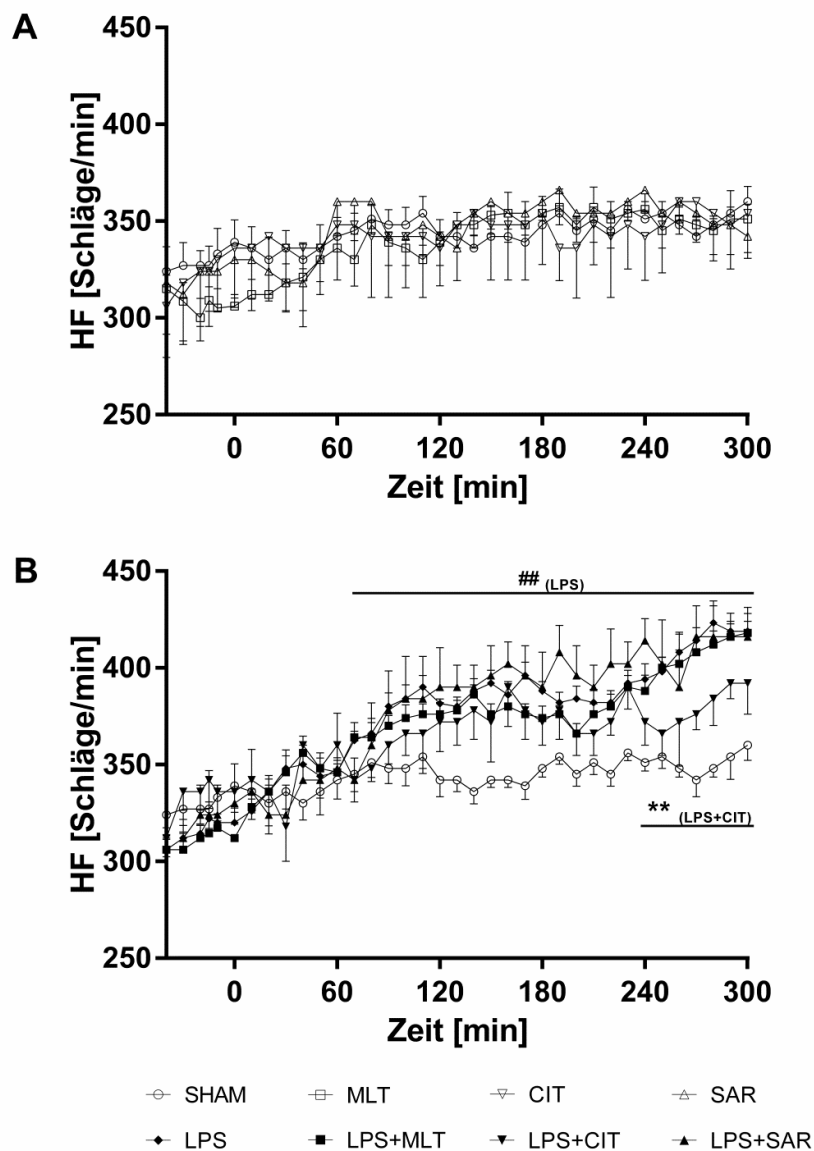


Abbildung 15: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Herzfrequenz (HF) unter Kontrollbedingungen (A) und während der sub-akuten Endotoxinämie (B). Lipopolysaccharid (LPS) wurde als Dauerinfusion (0,5 mg LPS/kg x h) über 6 Stunden ab dem Zeitpunkt T= 0 min verabreicht. Melatonin (3 mg MLT/kg) und Sarpogrelate (0,28 mg SAR/kg) wurden als 15-minütige Kurzzeitinfusion zu den Zeitpunkten T= -15 min, 120 min und 240 min appliziert. Citalopram (0,46 mg CIT/kg) wurde als 15-minütige Kurzzeitinfusion zum Zeitpunkt T= -15 min infundiert. Die Ergebnisse der Gruppen SHAM (n=8), MLT (n=8), CIT (n=4), SAR (n=4), LPS (n=12), LPS+MLT (n=12), LPS+CIT (n=4) und LPS+SAR (n=4) sind als Mittelwerte±SEM bis zum Zeitpunkt 300 min dargestellt. ##p< 0,05 (vs. SHAM, rm), **p< 0,05 (vs. LPS, rm).

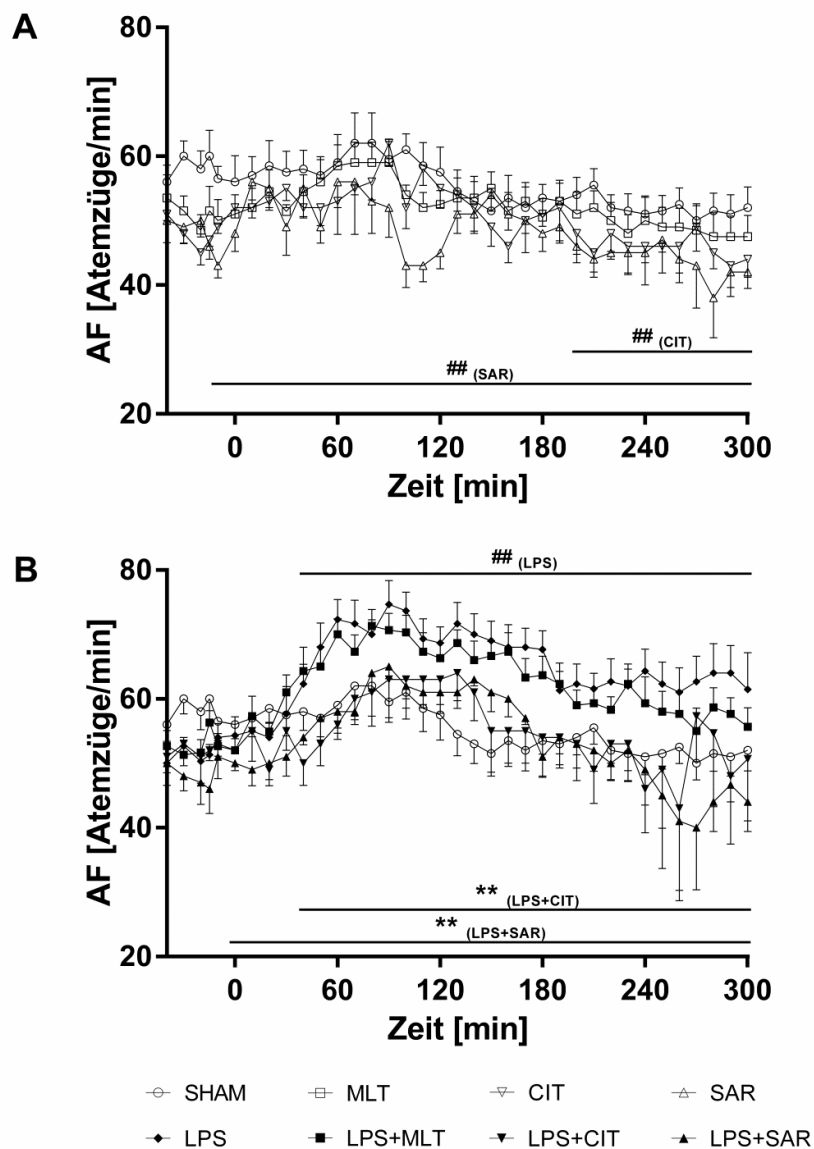


Abbildung 16: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Atemfrequenz (AF) unter Kontrollbedingungen (A) und während der sub-akuten Endotoxinämie (B). Lipopolysaccharid (LPS) wurde als Dauerinfusion (0,5 mg LPS/kg x h) über 6 Stunden ab dem Zeitpunkt T= 0 min verabreicht. Melatonin (3 mg MLT/kg) und Sarpogrelate (0,28 mg SAR/kg) wurden als 15-minütige Kurzzeitinfusion zu den Zeitpunkten T= -15 min, 120 min und 240 min appliziert. Citalopram (0,46 mg CIT/kg) wurde als 15-minütige Kurzzeitinfusion zum Zeitpunkt T= -15 min infundiert. Die Ergebnisse der Gruppen SHAM (n=8), MLT (n=8), CIT (n=4), SAR (n=4), LPS (n=12), LPS+MLT (n=12), LPS+CIT (n=4) und LPS+SAR (n=4) sind als Mittelwerte±SEM bis zum Zeitpunkt 300 min dargestellt. ##p< 0,05 (vs. SHAM, rm), **p< 0,05 (vs. LPS, rm).

5.1.3 Effekt von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die lokale Mikrozirkulation der Tiere während der sub-akuten Endotoxinämie

Die Sauerstoffsättigung in der Haut der linken Hinterpfote der SHAM-Tiere unterlag keinen deutlichen Schwankungen (Anhang Tabelle 7). Die MLT- und SAR-Kontrolltiere unterschieden sich hinsichtlich der Sauerstoffsättigung in der Haut nicht signifikant von den SHAM-Tieren. Bei den CIT-Kontrolltieren war hingegen die Sauerstoffsättigung in der Haut von 60 min bis 120 min im Vergleich zu den SHAM-Tieren kurzzeitig signifikant reduziert. Die LPS-Tiere zeigten über den gesamten Versuchszeitraum eine signifikant verminderte Sauerstoffsättigung in der Haut im Vergleich zu den SHAM-Tieren. Gegen Ende des Versuchs (T= 300 min) lag die Sauerstoffsättigung in der Haut bei den LPS-Tieren bei $60\pm 6\%$. Die LPS+MLT-Tiere wiesen zu den Zeitpunkten T= 0 min und T= 120 min im Vergleich zu den LPS-Tieren eine signifikant erhöhte Sauerstoffsättigung in der Haut auf. Bei den LPS+CIT-Tieren war die Sauerstoffsättigung in der Haut zum Zeitpunkt T= 120 min zeitweilig signifikant erhöht. Die Verabreichung von SAR vor und während der sub-akuten Endotoxinämie hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Sauerstoffsättigung in der Haut.

Bei den Tieren der Gruppe SHAM erhöhte sich die Sauerstoffsättigung im Muskel der linken Hinterpfote im Verlauf des Versuches leicht (Anhang Tabelle 7). Die Gabe von MLT, CIT und SAR unter Kontrollbedingungen hatte keinen signifikanten Effekt auf die Sauerstoffsättigung im Muskel. Die LPS-Tiere wiesen im Vergleich zu den SHAM-Tieren gegen Ende des Versuchs (T= 300 min) eine signifikant reduzierte Sauerstoffsättigung im Muskel von $85\pm 4\%$ auf. Die Tiere, denen MLT, CIT und SAR vor und/oder während der sub-akuten Endotoxinämie appliziert wurde, unterschieden sich in Bezug auf die Sauerstoffsättigung im Muskel nicht signifikant von den LPS-Tieren.

5.1.4 Effekt von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die Parameter der Blutgasanalyse im Vollblut der Tiere während der sub-akuten Endotoxinämie

Der pH-Wert des Vollblutes der Tiere sank in allen Gruppen im Verlauf des Versuchs leicht ab (Anhang Tabelle 8). Bei den MLT-Kontrolltieren war der pH-Wert gegen Ende des Versuchs (T= 300 min) signifikant erhöht im Vergleich zu den SHAM-Tieren. Die CIT-Kontrolltiere wiesen zum Zeitpunkt T= 120 min ebenfalls einen kurzzeitig signifikant erhöhten pH-Wert im Vergleich zu den SHAM-Tieren auf. Die Verabreichung von SAR unter Kontrollbedingungen hatte hingegen keinen Effekt auf den pH-Wert. Die Tiere der LPS-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant von den Tieren der SHAM-Gruppe. Die Applikation von MLT und SAR vor und während der sub-akuten Endotoxinämie hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf den pH-Wert. Die Gabe von CIT vor der Induktion der sub-akuten Endotoxinämie verursachte jedoch zum Zeitpunkt T= 60 min eine zeitweilige signifikante Verminderung des pH-Werts.

Der Kohlendioxidpartialdruck ($p\text{CO}_2$) im Vollblut der SHAM-Gruppe unterlag im gesamten Versuchsverlauf keinen signifikanten Schwankungen (Anhang Tabelle 8). Die MLT-, CIT- und SAR-Kontrolltiere unterschieden sich hinsichtlich des Kohlendioxidpartialdrucks nicht signifikant von den SHAM-Tieren. Die Infusion von LPS bewirkte gegen Ende des Versuchs (T= 300 min) einen signifikanten Abfall des Kohlendioxidpartialdrucks auf $39,8 \pm 4,3$ mmHg. Die Tiere, denen MLT oder CIT vor und/oder während sub-akuten Endotoxinämie verabreicht wurde, zeigten im Vergleich zu den LPS-Tieren keinen signifikant veränderten Kohlendioxidpartialdruck. Bei gleichzeitiger Gabe von LPS und SAR war der Kohlendioxidpartialdruck zum Zeitpunkt T= 60 min kurzzeitig vermindert.

Der Sauerstoffpartialdruck ($p\text{O}_2$) im Vollblut der SHAM-Tiere lag im gesamten Versuchsverlauf zwischen 294 ± 30 mmHg und 386 ± 26 mmHg (Anhang Tabelle 8). Die MLT- und SAR-Kontrolltiere wiesen bezüglich des Sauerstoffpartialdrucks keine deutlichen Abweichungen im Vergleich zu den SHAM-Tieren auf. Bei den CIT-Kontrolltieren stieg der Sauerstoffpartialdruck zum Zeitpunkt T= 240 min kurzzeitig signifikant an. Die Infusion von LPS bewirkte eine signifikante Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks zum Zeitpunkt T= 60 min. Die Gabe von CIT vor der sub-akuten Endotoxinämie hatte keinen Effekt auf den Sauerstoffpartialdruck. Die Applikation von MLT bzw. SAR vor und während der sub-akuten Endotoxinämie verursachte dagegen einen signifikanten Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks zum Zeitpunkt T= 180 min (LPS+MLT) bzw. T= 120 min (LPS+SAR).

Der *Base Excess* (BE_{Ecf}) im Vollblut der Tiere der SHAM-Gruppe sank im Verlauf des Versuchs leicht ab (Anhang Tabelle 8). Die MLT- und CIT-Kontrolltiere wiesen einen signifikant erhöhten BE_{Ecf} zum Zeitpunkt $T=120$ min im Vergleich zu den SHAM-Tieren auf. Keinen signifikanten Unterschied zu den SHAM-Tieren hinsichtlich BE_{Ecf} zeigten dagegen die SAR-Kontrolltiere. Die LPS-induzierte sub-akute Endotoxinämie verursachte einen signifikanten Abfall des BE_{Ecf} auf $-9,9 \pm 0,5$ mM gegen Ende des Versuchs ($T=300$ min). Die Gabe von MLT vor und während der sub-akuten Endotoxinämie hatte keinen signifikanten Effekt auf den BE_{Ecf} der Tiere. Bei den Tieren, denen vor der Induktion der sub-akuten Endotoxinämie CIT verabreicht wurde, war der LPS-induzierte Abfall des BE_{Ecf} signifikant vermindert. Die LPS+SAR-Tiere zeigten zum Zeitpunkt $T=240$ min ($-7,8 \pm 1,0$ mM) einen signifikant verringerten BE_{Ecf} im Vergleich zu den LPS-Tieren ($-5,8 \pm 0,4$ mM).

Die SHAM-Tiere wiesen über den gesamten Versuchszeitraum relativ konstante Werte für das Standardbicarbonat (HCO_3^-) im Vollblut auf (Anhang Tabelle 8). Das Standardbicarbonat der MLT- und CIT-Kontrolltiere war zum Zeitpunkt $T=120$ min im Vergleich zu den SHAM-Tieren kurzzeitig signifikant erhöht. Die Applikation von SAR unter Kontrollbedingungen hatte keinen Effekt auf das Standardbicarbonat. Die Infusion von LPS erzeugte ab 240 min einen signifikanten Abfall des Standardbicarbonats. Gegen Ende des Versuchs ($T=300$ min) betrug das Standardbicarbonat bei den LPS-Tieren $16,2 \pm 0,4$ mM. Die LPS+MLT-Tiere unterschieden sich bezüglich des Standardbicarbonats nicht signifikant von den LPS-Tieren. Bei den LPS+CIT-Tieren war der LPS-induzierte Abfall des Standardbicarbonats gegen Ende des Versuchs ($T=300$ min) signifikant verringert. Die LPS+SAR-Tiere wiesen zum Zeitpunkt $T=240$ min ein signifikant vermindertes Standardbicarbonat von $17,7 \pm 0,9$ mM im Vergleich zu den LPS-Tieren ($19,3 \pm 0,9$ mM) auf.

Die Konzentration der Kaliumionen (K^+) im Vollblut unterlag in der SHAM-Gruppe keinen deutlichen Schwankungen (Anhang Tabelle 8). Die Tiere der MLT-Kontrollgruppe wiesen zum Zeitpunkt $T=240$ min eine signifikant verminderte K^+ -Konzentration auf. Bei den Tieren der CIT-Kontrollgruppe wurde zu den Zeitpunkten $T=0$ min und $T=240$ min eine signifikant reduzierte K^+ -Konzentration gemessen. Die SAR-Kontrolltiere zeigten in Bezug auf die K^+ -Konzentration keinen signifikanten Unterschied zu den SHAM-Tieren. Die LPS-induzierte, sub-akute Endotoxinämie rief gegen Ende des Versuchs ($T=300$ min) einen signifikanten Anstieg der K^+ -Konzentration auf $5,8 \pm 0,2$ mM hervor. Die Applikation von MLT, CIT oder SAR vor und/oder während der sub-akuten Endotoxinämie hatte jedoch keinen Einfluss auf diesen LPS-induzierten Anstieg der K^+ -Konzentration.

In den Tieren der SHAM-Gruppe veränderte sich die Konzentration der Natriumionen (Na^+) über den gesamten Versuchszeitraum nicht signifikant (Anhang Tabelle 8). Bei den MLT-Kontrolltieren war die Na^+ -Konzentration von 0 min bis 120 min und zum Zeitpunkt 300 min gegenüber den SHAM-Tieren signifikant reduziert. Die CIT- und SAR-Kontrolltiere wiesen hingegen in Bezug auf die Na^+ -Konzentration keinen signifikanten Unterschied zu den SHAM-Tieren auf. Die Infusion von LPS bewirkte zum Zeitpunkt $T=60$ min einen kurzzeitigen signifikanten Abfall der Na^+ -Konzentration. Die Applikation von MLT und CIT vor und/oder während der sub-akuten Endotoxinämie hatte keinen Einfluss auf die Na^+ -Konzentration. Die Gabe von SAR verursachte bei den Tieren mit sub-akuter Endotoxinämie hingegen einen signifikanten Anstieg der Na^+ -Konzentration von 0 min bis 60 min.

Die Konzentration der Calciumionen (Ca^{2+}) lag bei den Tieren der SHAM-Gruppe über dem gesamten Versuchszeitraum zwischen $1,33\pm 0,06$ mM und $1,50\pm 0,02$ mM (Anhang Tabelle 8). Bei den MLT-Kontrolltieren war die Ca^{2+} -Konzentration zum Zeitpunkt $T=60$ min im Vergleich zu den SHAM-Tieren kurzzeitig signifikant reduziert. Die Tiere der CIT-Kontrollgruppe wiesen hingegen in Bezug auf die Ca^{2+} -Konzentration keine signifikanten Abweichungen gegenüber den SHAM-Tieren auf. Bei den Tieren der SAR-Kontrollgruppe lag die Ca^{2+} -Konzentration zu den Zeitpunkten $T=0$ min und $T=120$ min signifikant über der Ca^{2+} -Konzentration der SHAM-Tiere. Die LPS-induzierte sub-akute Endotoxinämie verursachte ab 60 min einen stetigen signifikanten Abfall der Ca^{2+} -Konzentration. Gegen Ende des Versuchs ($T=300$ min) lag die Ca^{2+} -Konzentration bei LPS-Tieren bei $1,18\pm 0,02$ mM. Die LPS+MLT-Tiere zeigten zum Zeitpunkt $T=60$ min eine kurzzeitig signifikant erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zu den LPS-Tieren auf. Bei den Tieren der LPS+CIT- und LPS+SAR-Gruppe war die Ca^{2+} -Konzentration zum Zeitpunkt $T=0$ min signifikant erhöht und die nachfolgende LPS-induzierte Abnahme der Ca^{2+} -Konzentration signifikant reduziert.

Die Tiere der SHAM-Gruppe wiesen im gesamten Versuchsverlauf keine signifikanten Veränderungen in Bezug auf die Konzentration der Chloridionen (Cl^-) auf (Anhang Tabelle 8). Die MLT-, CIT- und SAR-Kontrolltiere zeigten hinsichtlich der Cl^- -Konzentration keinen signifikanten Unterschied zu den SHAM-Tieren. Die Infusion von LPS bewirkte gegen Ende des Versuchs ($T=300$ min) einen signifikanten Anstieg der Cl^- -Konzentration auf 118 ± 1 mM. Die Gabe von MLT und CIT vor und/oder während der sub-akuten Endotoxinämie hatte keinen Effekt auf die Cl^- -Konzentration. Bei den Tieren der LPS+SAR-Gruppe war die

Cl⁻-Konzentration zum Zeitpunkt T= 60 min signifikant erhöht im Vergleich zu den LPS-Tieren.

Der Hämatokrit des Vollblutes der SHAM-Gruppe lag zwischen $34,8 \pm 1,8$ % und $38,8 \pm 1,3$ % (Anhang Tabelle 8). Die MLT-Kontrolltiere wiesen in Bezug auf den Hämatokrit keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den SHAM-Tieren auf. Bei den Tiere, denen CIT bzw. SAR unter Kontrollbedingungen verabreicht wurde, war von 240 min bis 300 min der Hämatokrit signifikant reduziert im Vergleich zu den SHAM-Tieren. Die Infusion von LPS bewirkte zum Zeitpunkt T= 60 min einen kurzzeitigen signifikanten Anstieg des Hämatokrits. Die Gabe von MLT vor und während der sub-akuten Endotoxinämie hatte keinen Einfluss auf den Hämatokrit. Die LPS+CIT- und LPS+SAR-Tieren zeigten einen signifikant verminderten Hämatokrit über den gesamten Versuchszeitraum im Vergleich zu den LPS-Tieren.

Die Konzentration von Glukose im Vollblut der Tiere der SHAM-Gruppe nahm im Versuchsverlauf leicht ab (Anhang Tabelle 8). Die MLT und CIT-Kontrolltiere zeigten hinsichtlich der Glukose-Konzentration keine signifikanten Abweichungen gegenüber den SHAM-Tieren. Die Tiere der SAR-Kontrollgruppe wiesen hingegen zum Zeitpunkt T= 180 min eine kurzzeitig signifikant verminderte Glukose-Konzentration im Vergleich zu den SHAM-Tieren auf. Die Infusion von LPS verursachte erst zum Zeitpunkt T= 60 min einen leichten Anstieg und anschließend ab 180 min einen stetigen signifikanten Abfall der Glukose-Konzentration. Gegen Ende des Versuchs (T= 300 min) war die Glukose-Konzentration im Vollblut dieser Tiere auf 36 ± 6 mg/dL gesunken. Die Gabe von MLT vor und während der sub-akuten Endotoxinämie hatte keinen signifikanten Einfluss auf die LPS-induzierte Abnahme der Glukose-Konzentration. Bei den LPS+CIT-Tieren fiel der leichte LPS-induzierte Anstieg der Glukose-Konzentration signifikant geringer im Vergleich zu den LPS-Tieren aus. Die Applikation von SAR vor und während der sub-akuten Endotoxinämie hatte keinen signifikanten Effekt auf das LPS-induzierte Absinken der Glukose-Konzentration.

Die Konzentration von Laktat im Vollblut der Tiere der SHAM-Gruppe stieg im Verlauf des Versuchs leicht an (Anhang Tabelle 8). Die Applikation von MLT, CIT und SAR unter Kontrollbedingungen hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Laktat-Konzentration. Die Infusion von LPS hatte einen signifikanten Anstieg der Laktat-Konzentration von 60 min bis 300 min zur Folge. Die Laktat-Konzentration im Vollblut der LPS-Tiere stieg bis zum Zeitpunkt T= 300 min auf $3,5 \pm 0,4$ mM an. Die Gabe von MLT und SAR vor und während der sub-akuten Endotoxinämie hatte keinen signifikanten Effekt auf die Laktat-Konzentration.

Die Applikation von CIT vor der Induktion der sub-akuten Endotoxinämie bewirkte zum Zeitpunkt T= 60 min eine signifikante und gegen Ende des Versuchs eine leichte Reduktion des LPS-induzierten Anstiegs der Laktat-Konzentration.

5.1.5 Effekt von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die Parameter der Thromboelastometrie während der sub-akuten Endotoxinämie

Die *Clotting Time* (CT) war bei den Tieren der Gruppen SHAM relativ konstant über den gesamten Versuchszeitraum (Abbildung 17A & Anhang Tabelle 9). Die MLT-Kontrolltiere unterschieden sich hinsichtlich der CT nicht signifikant von den SHAM-Tieren. Die Gabe von CIT und SAR unter Kontrollbedingungen bewirkte eine signifikante Verringerung der CT zum Versuchszeitpunkt T= 120 min. Die Infusion von LPS verursachte zuerst eine signifikante Verkürzung der CT auf 150 ± 21 s (T= 120 min) bzw. 145 ± 27 s (T= 180 min) und gegen Ende des Versuchs eine signifikante Verlängerung der CT auf 2768 ± 853 s (T= 300 min). MLT hatten während der sub-akuten Endotoxinämie keinen signifikanten Effekt auf die CT. Bei den Tieren, denen CIT und SAR vor und/oder während der sub-akuten Endotoxinämie verabreicht wurde, war der LPS-induzierte Anstieg der CT signifikant vermindert.

Die *Clot Formation Time* (CFT) unterlag keinen signifikanten Schwankungen bei den Tieren der Gruppen SHAM, MLT, CIT und SAR (Abbildung 17B & Tabelle 9). Die Infusion von LPS bewirkte einen signifikanten Anstieg der CFT ab 240 min. Gegen Ende des Versuchs (T= 300 min) lag die CFT bei den Tieren der LPS-Gruppe bei 1038 ± 657 s. Die Gabe von MLT und SAR vor und während der sub-akuten Endotoxinämie hatte keinen signifikanten Einfluss auf den LPS-induzierten Anstieg der CFT. Die LPS+CIT wiesen zum Zeitpunkt T= 0 min eine zeitweilige signifikant reduzierte CFT im Vergleich zu den LPS-Tieren auf.

Der α -Winkel veränderte sich bei den Tieren der Gruppen SHAM, MLT, CIT und SAR über den gesamten Versuchszeitraum nicht signifikant (Abbildung 18A & Tabelle 9). Die LPS-induzierte sub-akute Endotoxinämie rief eine signifikante Abnahme des α -Winkels ab 240 min hervor. Gegen Ende des Versuchs (T= 300 min) betrug der α -Winkel bei diesen Tieren $35\pm 15^\circ$. Die Applikation von MLT vor und während der sub-akuten Endotoxinämie hatte keine signifikanten Auswirkungen auf den α -Winkel. Bei den Tieren der Gruppe LPS+CIT war der α -Winkel zum Zeitpunkt T= 0 min signifikant erhöht und die nachfolgende LPS-induzierte Abnahme des α -Winkels signifikant vermindert im Vergleich zu den Tieren

der LPS-Gruppe. Die Tiere der LPS+SAR-Gruppe wiesen ebenfalls eine signifikante Reduktion des LPS-induzierten Abfalls des α -Winkels auf.

Die *Maximum Clot Firmness* (MCF) unterlag bei den Tieren der Gruppe SHAM, MLT und SAR keinen signifikanten Schwankungen (Abbildung 18B & Anhang Tabelle 9). Die Gabe von CIT unter Kontrollbedingungen bewirkte zum Zeitpunkt T= 120 min einen kurzzeitigen signifikanten Anstieg der MCF. Die Infusion von LPS hatte einen signifikanten Abfall der MCF ab 240 min zur Folge. Gegen Ende des Versuchs (T= 300 min) lag die MCF bei den LPS-Tieren bei 22 ± 6 mm. Die Applikation von MLT vor und während der sub-akuten Endotoxinämie hatte keine signifikanten Effekte auf die MCF. Bei den Tieren der Gruppe LPS+CIT war die MCF im Vergleich zu den Tieren der LPS-Gruppe zum Zeitpunkt T= 0 min signifikant erhöht und die nachfolgende LPS-induzierte Abnahme der MCF signifikant vermindert. Die Tiere der LPS+SAR-Gruppe wiesen auch eine signifikante Reduktion des LPS-induzierten Abfalls der MCF auf.

Die *Area Under The Curve* (AUC) bei den Tieren der Gruppen SHAM, MLT und SAR war über den gesamten Versuchszeitraum relativ gleich bleibend (Abbildung 19 & Anhang Tabelle 9). Bei den Tieren, denen CIT unter Kontrollbedingungen appliziert wurde, stieg die AUC zum Zeitpunkt T= 120 min kurzzeitig signifikant an. Die Infusion von LPS führte zu einem signifikanten Abfall der AUC ab 240 min. Gegen Endes des Versuchs (T=300 min) war die AUC bei den LPS-Tieren auf 1657 ± 552 mm x 100 gesunken. Die Gabe von MLT vor und während der sub-akuten Endotoxinämie beeinflusste die AUC nicht signifikant. Bei den Tieren der Gruppe LPS+CIT war die AUC im Vergleich zu den Tieren der LPS-Gruppe zum Zeitpunkt T= 0 min signifikant erhöht und die nachfolgende LPS-induzierte Abnahme der AUC signifikant vermindert. Die Tiere der LPS+SAR-Gruppe wiesen ebenfalls eine signifikante Reduktion des LPS-induzierten Abfalls der AUC auf.

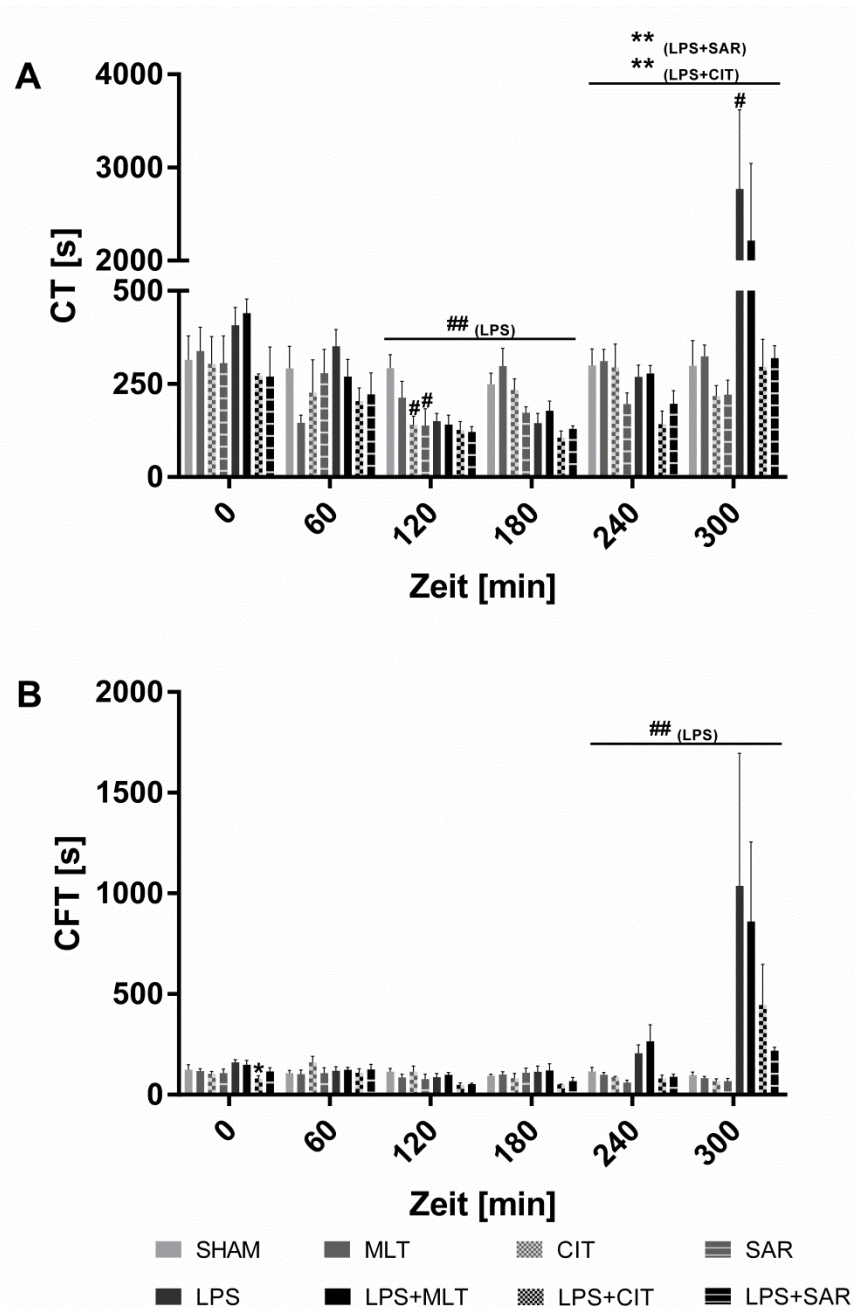


Abbildung 17: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Clotting Time (CT, A) und die Clot Formation Time (CFT, B) unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie. Lipopolysaccharid (LPS) wurde als Dauerinfusion (0,5 mg LPS/kg x h) über 6 Stunden ab dem Zeitpunkt T= 0 min verabreicht. Melatonin (3 mg MLT/kg) und Sarpogrelate (0,28 mg SAR/kg) wurden als 15-minütige Kurzzeitinfusion zu den Zeitpunkten T= -15 min und 240 min appliziert. Citalopram (0,46 mg CIT/kg) wurde als 15-minütige Kurzzeitinfusion zum Zeitpunkt T= -15 min infundiert. Die Ergebnisse der Gruppen SHAM (n=8), MLT(n=8), CIT (n=4), SAR (n=4), LPS (n=12), LPS+MLT (n=12), LPS+CIT (n=4), LPS+SAR (n=4) sind als Mittelwerte±SEM bis zum Zeitpunkt 300 min dargestellt. #p< 0,05 (vs. SHAM, sd), ##p< 0,05 (vs. SHAM, rm), *p< 0,05 (vs. LPS, sd), **p< 0,05 (vs. LPS, rm).

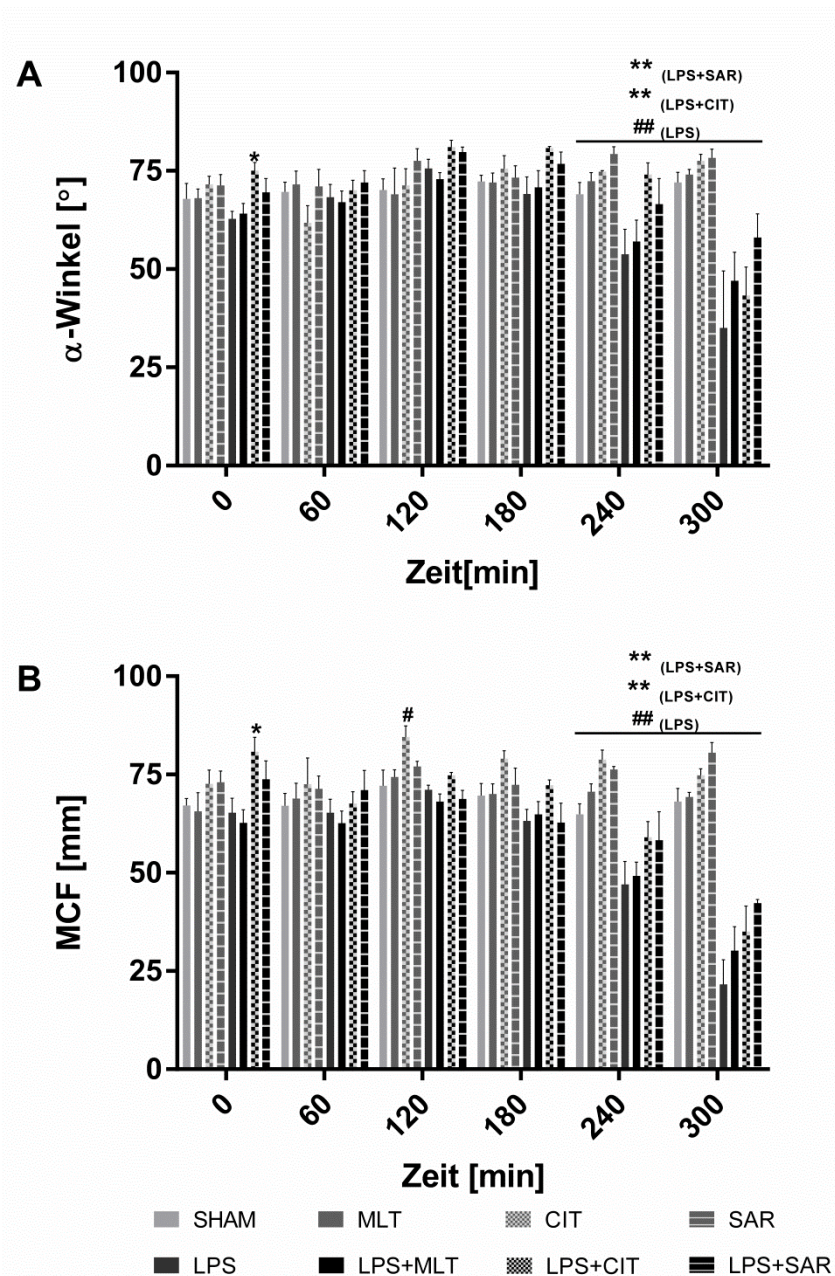


Abbildung 18: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf den α -Winkel (A) und die *Maximum Clot Firmness* (MCF, B) unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie. Lipopolysaccharid (LPS) wurde als Dauerinfusion (0,5 mg LPS/kg x h) über 6 Stunden ab dem Zeitpunkt T= 0 min verabreicht. Melatonin (3 mg MLT/kg) und Sarpogrelate (0,28 mg SAR/kg) wurden als 15-minütige Kurzzeitinfusion zu den Zeitpunkten T= -15 min, 120 min und 240 min appliziert. Citalopram (0,46 mg CIT/kg) wurde als 15-minütige Kurzzeitinfusion zum Zeitpunkt T= -15 min infundiert. Die Ergebnisse der Gruppen SHAM (n=8), MLT (n=8), CIT (n=4), SAR (n=4), LPS (n=12), LPS+MLT (n=12), LPS+CIT (n=4), LPS+SAR (n=4) sind als Mittelwerte \pm SEM bis zum Zeitpunkt 300 min dargestellt. #p< 0,05 (vs. SHAM, sd), ##p< 0,05 (vs. SHAM, rm), *p< 0,05 (vs. LPS, sd), **p< 0,05 (vs. LPS, rm).

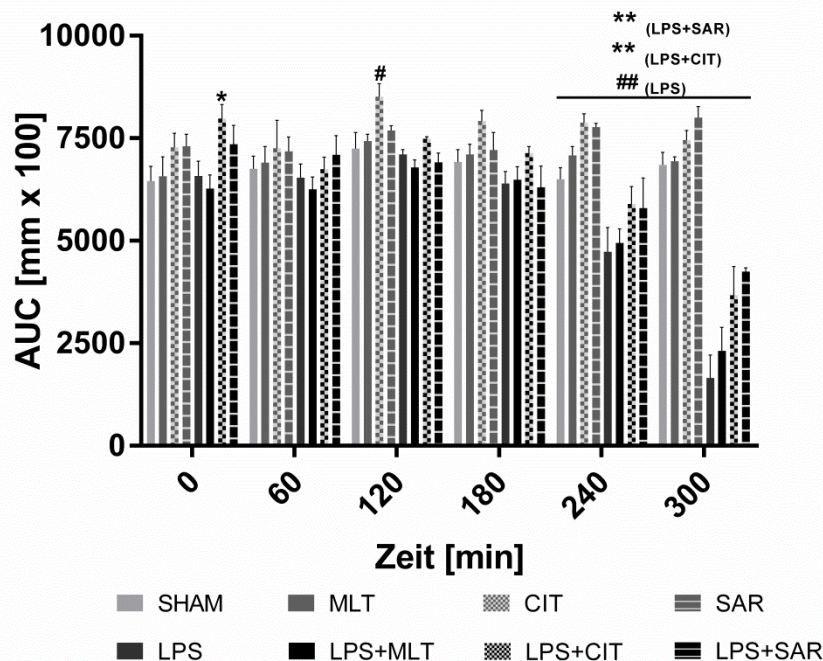


Abbildung 19: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Area Under The Curve (AUC) unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie. Lipopolysaccharid (LPS) wurde als Dauerinfusion (0,5 mg LPS/kg x h) über 6 Stunden ab dem Zeitpunkt T= 0 min verabreicht. Melatonin (3 mg MLT/kg) und Sarpogrelate (0,28 mg SAR/kg) wurden als 15-minütige Kurzzeitinfusion zu den Zeitpunkten T= -15 min, 120 min und 240 min appliziert. Citalopram (0,46 mg CIT/kg) wurde als 15-minütige Kurzzeitinfusion zum Zeitpunkt T= -15 min infundiert. Die Ergebnisse der Gruppen SHAM (n=8), MLT (n=8), CIT (n=4), SAR (n=4), LPS (n=12), LPS+MLT (n=12), LPS+CIT (n=4), LPS+SAR (n=4) sind als Mittelwerte±SEM bis zum Zeitpunkt 300 min dargestellt. #p< 0,05 (vs. SHAM, sd), ##p< 0,05 (vs. SHAM, rm), *p< 0,05 (vs. LPS, sd), **p< 0,05 (vs. LPS, rm).

5.1.6 Effekt von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die Thrombozytenzahl während der sub-akuten Endotoxinämie

Die Anzahl der Thrombozyten bei den Tieren der SHAM-Gruppe war über den ganzen Versuchszeitraum unverändert (Abbildung 20 & Anhang Tabelle 10). Die Gabe von MLT unter Kontrollbedingungen bewirkte ab 180 min einen signifikanten Anstieg der Thrombozytenzahl, der bis zum Ende des Versuchs (T= 300 min) anhielt. Die Verabreichung von CIT unter Kontrollbedingungen hatte über den gesamten Versuchszeitraum eine signifikante Verminderung der Thrombozytenzahl zur Folge. Die Tiere, denen SAR appliziert wurde, wiesen ebenfalls eine reduzierte Thrombozytenzahl auf, die über den Zeitraum von 60 min bis 120 min signifikant war. Die Infusion von LPS verursachte einen signifikanten Abfall der Thrombozytenzahl ab 240 min (94±10) bis 300 min (55±8). Die Applikation von MLT vor und während der sub-akuten Endotoxinämie reduzierte signifikant die LPS-induzierte Ab-

nahme der Thrombozytenzahl. Die LPS+CIT- und LPS+SAR-Tiere zeigten im Vergleich zu den LPS-Tieren eine signifikant verminderte Thrombozytenzahl von 0 min bis 180 min auf.

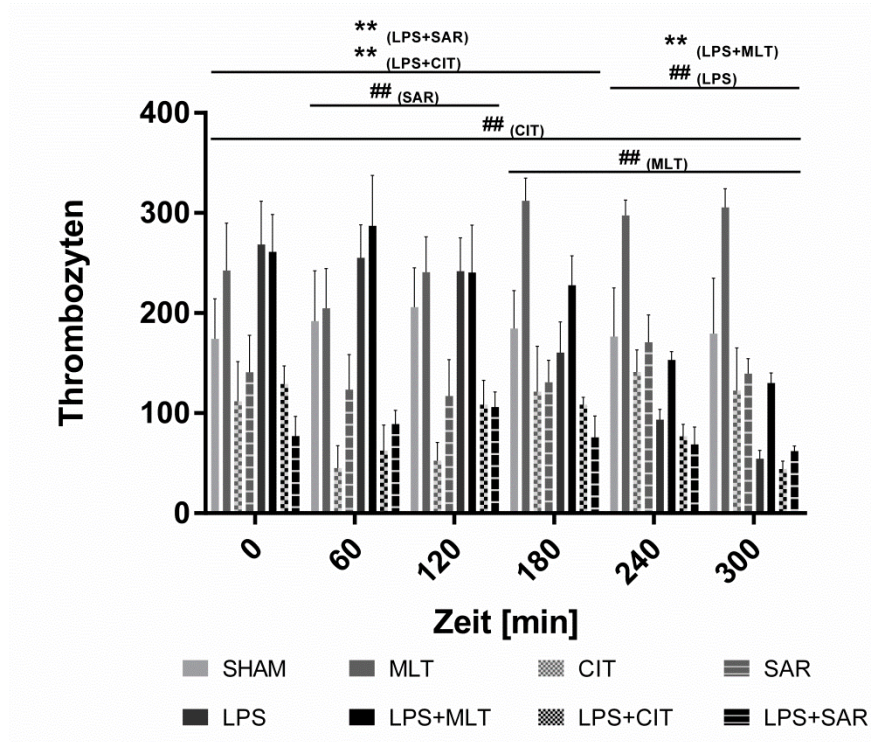


Abbildung 20: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Thrombozytenzahl unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie. Lipopolysaccharid (LPS) wurde als Dauerinfusion (0,5 mg LPS/kg x h) über 6 Stunden ab dem Zeitpunkt T= 0 min verabreicht. Melatonin (3 mg MLT/kg) und Sarpogrelate (0,28 mg SAR/kg) wurden als 15-minütige Kurzzeitinfusion zu den Zeitpunkten T= -15 min, 120 min und 240 min appliziert. Citalopram (0,46 mg CIT/kg) wurde als 15-minütige Kurzzeitinfusion zum Zeitpunkt T= -15 min infundiert. Die Anzahl der Thrombozyten pro 1000 Erythrozyten der Gruppen SHAM (n=5), MLT (n=6), CIT (n=4), SAR (n=4), LPS (n=8), LPS+MLT (n=8), LPS+CIT (n=4) und LPS+SAR (n=4) ist als Mittelwert±SEM bis zum Zeitpunkt 300 min dargestellt. ##p< 0,05 (vs. SHAM, rm), **p< 0,05 (vs. LPS, rm).

5.1.7 Effekt von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die organspezifischen Schädigungsparameter der Tiere während der sub-akuten Endotoxinämie

Die Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Blutplasma der Tiere der SHAM-Tiere veränderte sich über den gesamten Versuchszeitraum nicht signifikant (Abbildung 21 & Anhang Tabelle 11). Die MLT-Kontrolltiere zeigten über den gesamten Versuchszeitraum keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der LDH-Aktivität gegenüber den SHAM-Tieren. Die Tiere der CIT- und SAR-Kontrollgruppe wiesen hingegen von 0 min bis 60 min eine signifikant reduzierte LDH-Aktivität im Vergleich zu SHAM auf. Die Infusion von LPS führte zu einem signifikanten Anstieg der LDH-Aktivität ab 120 min. Gegen Ende des Versuchs (T= 300 min) betrug die LDH-Aktivität im Blutplasma der LPS-Tiere 1435 ± 267 U/L. MLT hatte keinen Effekt auf die LDH-Aktivität während der sub-akuten Endotoxinämie. Bei den Tieren, denen CIT oder SAR vor und/oder während der sub-akuten Endotoxinämie verabreicht wurden, war der LPS-induzierte Anstieg der LDH-Aktivität im Vergleich zu den LPS-Tieren signifikant reduziert.

Die Tiere der Gruppe SHAM wiesen keine signifikante Veränderung der Enzymaktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) im Blutplasma über den gesamten Versuchszeitraum auf (Abbildung 22A & Anhang Tabelle 11). Die Verabreichung von MLT, CIT und SAR unter Kontrollbedingungen hatte keinen Einfluss auf die GOT-Aktivität im gesamten Versuchsverlauf. Die Infusion von LPS verursachte einen signifikanten Anstieg der GOT-Aktivität ab 120 min. Gegen Ende des Versuchs (T= 300 min) lag die GOT-Aktivität bei den Tieren der LPS-Gruppe bei 345 ± 50 U/L. Bei den Tieren, denen MLT vor und während der sub-akuten Endotoxinämie appliziert wurde, war von 60 min bis 240 min die GOT-Aktivität im Vergleich zu den LPS-Tieren signifikant erhöht. Die Gabe von CIT und SAR vor und/oder während der sub-akuten Endotoxinämie bewirkte dagegen eine signifikante Reduktion des LPS-induzierten Anstiegs der GOT-Aktivität.

Die Enzymaktivität der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) im Blutplasma der Tiere der SHAM-Gruppe veränderte sich über den gesamten Versuchszeitraum nicht signifikant (Abbildung 22B & Anhang Tabelle 11). Die Gabe von MLT, CIT und SAR unter Kontrollbedingungen hatte keinen signifikanten Effekt auf die GPT-Aktivität. Die Infusion von LPS bewirkte einen signifikanten Anstieg der GPT-Aktivität ab 240 min. Gegen Ende des Versuchs (T= 300 min) betrug die GPT-Aktivität bei den Tieren der LPS-Gruppe 177 ± 36 U/L. Die Tiere, denen MLT vor und während der sub-akuten Endotoxinämie appliziert wurde,

wiesen von 120 min bis 240 min im Vergleich zu den LPS-Tieren eine signifikant erhöhte GPT-Aktivität auf. Die Gabe von CIT und SAR vor und/oder während der sub-akuten Endotoxinämie verursachte eine signifikante Minderung des LPS-induzierten Anstiegs der GPT-Aktivität.

Die Konzentration von Kreatinin im Blutplasma der Tiere der SHAM-Gruppe veränderte sich über dem gesamten Versuchszeitraum nicht signifikant (Anhang Tabelle 11). Die MLT-, CIT-SAR-Kontrolltiere wiesen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Kreatinin-Konzentration gegenüber den SHAM-Tieren auf. Die Infusion von LPS hatte über den Versuchszeitraum von 300 min lediglich einen leichten Anstieg der Kreatinin-Konzentration zur Folge. Die Applikation von MLT und SAR vor und während der sub-akuten Endotoxinämie hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Kreatinin-Konzentration. Die Gabe von CIT vor der Induktion der sub-akuten Endotoxinämie bewirkte hingegen einen kurzzeitigen signifikanten Abfall der Kreatinin-Konzentration zu dem Zeitpunkt T= 60 min.

Die Enzymaktivität der Creatin-Kinase (CK) im Blutplasma der Tiere der SHAM-Gruppe unterlag im gesamten Versuchszeitraum keinen signifikanten Schwankungen (Anhang Tabelle 11). Die MLT-, CIT- und SAR-Kontrolltiere unterschieden sich in Bezug auf die CK-Aktivität nicht signifikant von den SHAM-Tieren. Die Infusion von LPS verursachte einen signifikanten Anstieg der CK-Aktivität ab 120 min (199 ± 17 U/L). Gegen Ende des Versuchs (T= 300 min) betrug die CK-Aktivität bei den Tieren der LPS-Gruppe 386 ± 60 U/L. Die Applikation von MLT, CIT und SAR vor und/oder während der sub-akuten Endotoxinämie hatte keinen signifikanten Einfluss auf die CK-Aktivität.

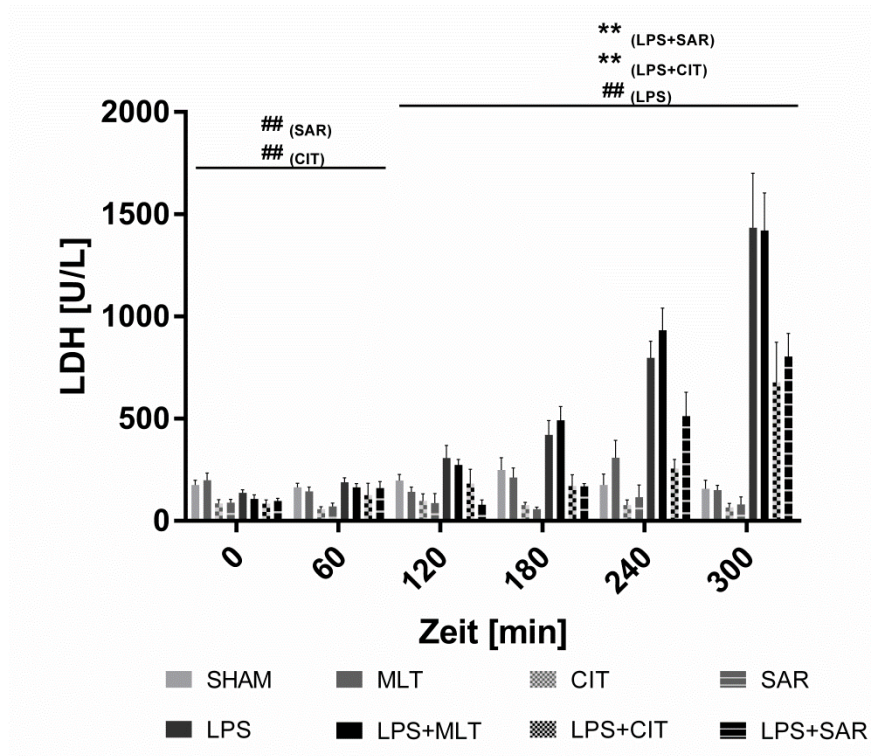


Abbildung 21: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Blutplasma der Tiere unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie. Lipopolysaccharid (LPS) wurde als Dauerinfusion (0,5 mg LPS/kg x h) über 6 Stunden ab dem Zeitpunkt T= 0 min verabreicht. Melatonin (3 mg MLT/kg) und Sarpogrelate (0,28 mg SAR/kg) wurden als 15-minütige Kurzzeitinfusion zu den Zeitpunkten T= -15 min, 120 min und 240 min appliziert. Citalopram (0,46 mg CIT/kg) wurde als 15-minütige Kurzzeitinfusion zum Zeitpunkt T= -15 min infundiert. Die Ergebnisse der Gruppen SHAM (n=8), MLT (n=5), CIT (n=4), SAR (n=4), LPS (n=12), LPS+MLT (n=12), LPS+CIT (n=4) und LPS+SAR (n=4) sind als Mittelwerte±SEM bis zum Zeitpunkt 300 min dargestellt. ##p< 0,05 (vs. SHAM, rm), **p< 0,05 (vs. LPS, rm).

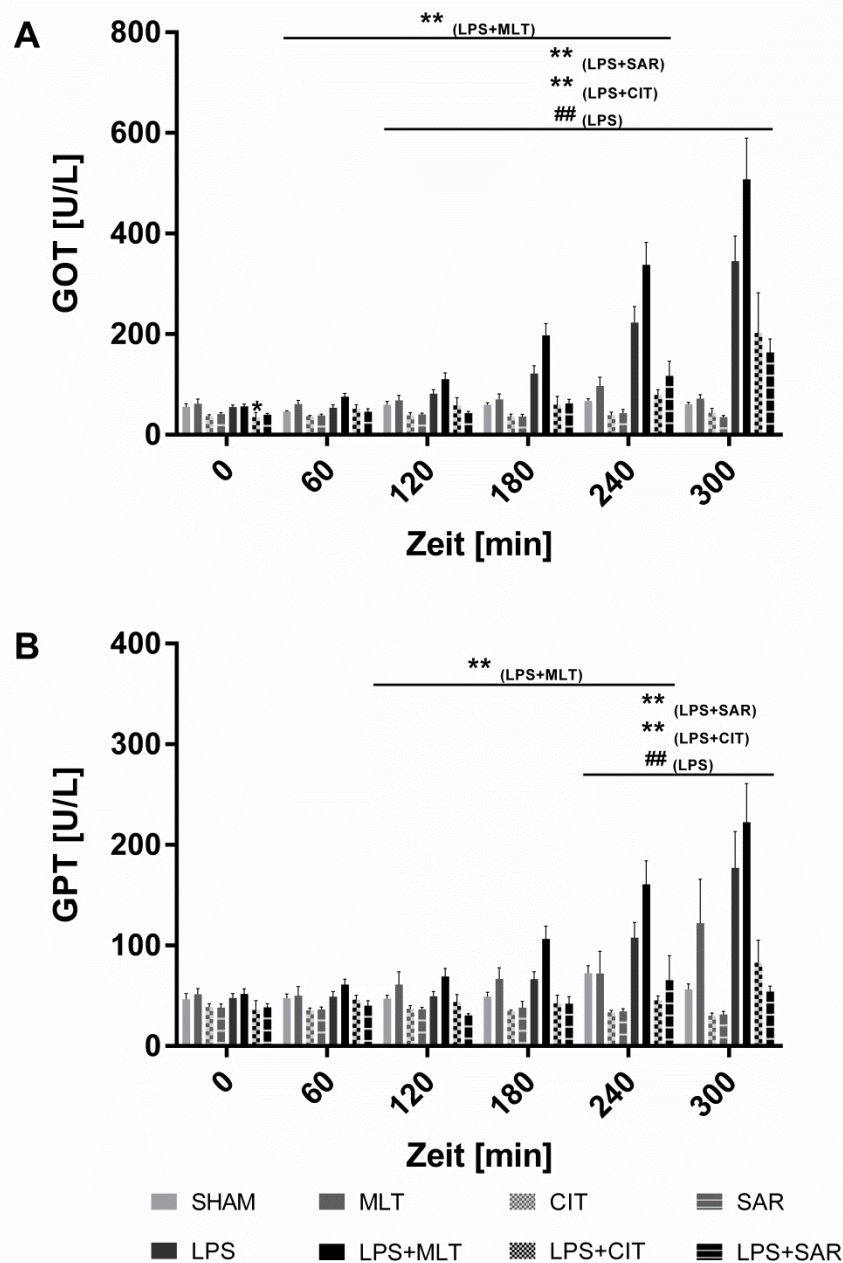


Abbildung 22: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Aktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT, A) und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT, B) im Blutplasma der Tiere unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie.

Lipopolysaccharid (LPS) wurde als Dauerinfusion (0,5 mg LPS/kg x h) über 6 Stunden ab dem Zeitpunkt T= 0 min verabreicht. Melatonin (3 mg MLT/kg) und Sarpogrelate (0,28 mg SAR/kg) wurden als 15-minütige Kurzzeitinfusion zu den Zeitpunkten T= -15 min, 120 min und 240 min appliziert. Citalopram (0,46 mg CIT/kg) wurde als 15-minütige Kurzzeitinfusion zum Zeitpunkt T= -15 min infundiert. Die Ergebnisse der Gruppen SHAM (n=8), MLT (n=5), CIT (n=4), SAR (n=4), LPS (n=12), LPS+MLT (n=12), LPS+CIT (n=4) und LPS+SAR (n=4) sind als Mittelwerte±SEM bis zum Zeitpunkt 300 min dargestellt. ##p< 0,05 (vs. SHAM, rm), *p< 0,05 (vs. LPS, sd), **p< 0,05 (vs. LPS, rm).

5.2 Effekt von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die Serotonin-induzierte Thrombozytenaktivierung *in vitro*

Die Aktivierung der Thrombozyten durch Zugabe von Serotonin in einer Endkonzentration von 10 μM spiegelte sich in einem Anstieg des *Platelet Aggregation Index* (PAI) auf $162 \pm 12 \text{ AU} \times \text{min}$ wieder (Abbildung 23). Aufgrund der geringen Löslichkeit der zu untersuchenden Substanzen, wurde Ethanol in einer Endkonzentration von 0,5 % zu der physiologischen NaCl-Lösung hinzugefügt. Die Zugabe von Ethanol hatte jedoch keinen Einfluss auf die Serotonin-induzierte Thrombozytenaktivierung (PAI: $191 \pm 4 \text{ AU} \times \text{min}$). CIT, SAR und MLT bewirkten eine Dosis-abhängige Hemmung der Serotonin-induzierten Thrombozytenaktivierung mit unterschiedlicher, mittlerer inhibitorischer Konzentration. Die mittlere inhibitorische Konzentration für MLT ($\sim 1413 \mu\text{M}$) war 24-29 mal höher als die für CIT ($\sim 58 \mu\text{M}$) und SAR ($\sim 48 \mu\text{M}$).

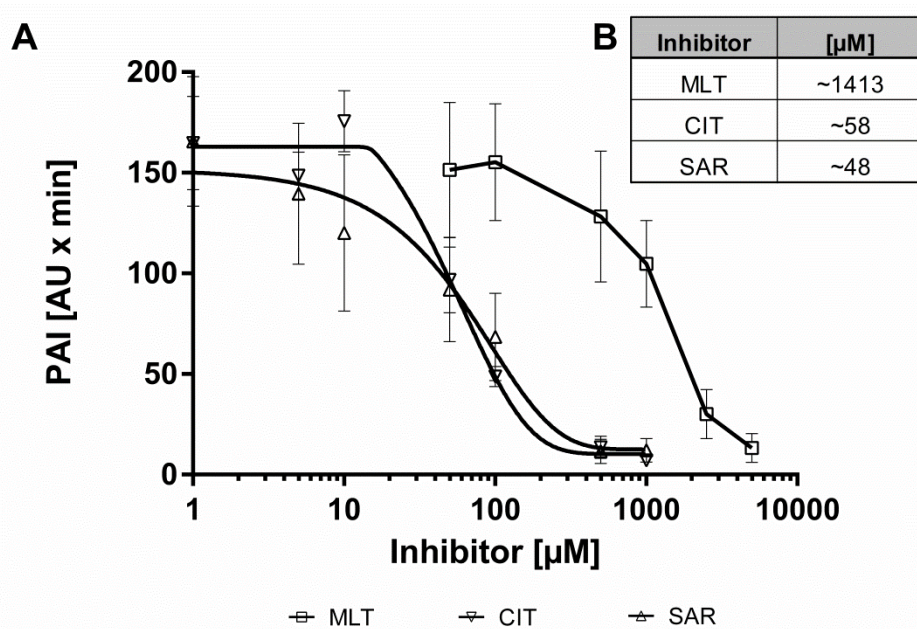


Abbildung 23: Dosis-abhängiger Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Serotonin (10 μM)-induzierte Thrombozytenaktivierung. Der *Platelet Aggregation Index* (PAI, Mittelwert \pm SD; A) für verschiedene Dosen von Melatonin ($0,5 \times 10^{-2}$ - $0,5 \times 10^{-4}$ M MLT, n=5), Citalopram (10^{-3} - 10^{-6} M CIT, n=4) und Sarpogrelate (10^{-3} - 10^{-6} M SAR, n=6) und die resultierende mittlere inhibitorische Konzentration (IC50; B) für MLT ($\sim 1413 \mu\text{M}$), CIT ($\sim 58 \mu\text{M}$) und SAR ($\sim 48 \mu\text{M}$) sind dargestellt.

6. Diskussion

6.1 Der Einfluss von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die LPS-induzierten systemischen Veränderungen *in vivo*

Die Induktion der sub-akuten Endotoxinämie durch die Infusion von Lipopolysaccharid (LPS) bewirkte einen signifikanten Anstieg sowohl des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) als auch der Herzfrequenz (Abbildung 14B & Abbildung 15B). Die Hypertension sowie die Tachykardie bei den LPS-Tieren können auf die bereits beschriebene, erhöhte Ausschüttung von Katecholaminen durch LPS zurückgeführt werden [164]. In dieser Phase scheinen die LPS-Tiere somit noch keine Zytokin-induzierte Resistenz gegenüber den Katecholaminen gebildet zu haben [165].

Bei den Tieren, denen Melatonin (MLT) vor und während der sub-akuten Endotoxinämie verabreicht wurde (LPS+MLT), fiel die Hypertension stärker im Vergleich zu den Tieren der LPS-Gruppe aus (Abbildung 14B). Im Hinblick auf die Herzfrequenz wurde jedoch kein Unterschied zwischen den Tieren der LPS+MLT und der LPS-Gruppe beobachtet (Abbildung 15B). In einem Rattenmodell des Endotoxin-Schocks (10 mg LPS/kg *i.v.*) konnte bereits gezeigt werden, dass die Tiere, denen MLT in einer niedrigen Dosis (3 x 3 mg MLT/kg) appliziert wurde, einen höheren mittleren arteriellen Blutdruck als die LPS-Tiere aufweisen [84]. Wu *et al.* (2001) erklärten diesen Effekt von MLT mit einer Inhibition von Mechanismen, wie z.B. die Freisetzung von TNF- α im Plasma, die Expression der NOS II in der Leber und der Produktion von Superoxid in der Aorta, die zur Hypotension im Endotoxin-Schock führen [84]. Allerdings scheint dieser Effekt von der MLT-Dosis abhängig zu sein, da bei einer höheren MLT-Dosis (20 mg/kg) im Endotoxin-Schock keine Reduktion der LPS-induzierten Hypotension erzielt wurde [166]. Dieser Dosis-Wirkungsunterschied, sowie die in dieser Arbeit beobachtete Steigerung der Hypertension während der sub-akuten Endotoxinämie durch MLT (3 x 3 mg/kg), als auch der erhöhte Blutdruck in den MLT-Kontrolltieren, weisen auf einen direkten Blutdruck-steigernden Effekt von MLT über seine G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in der glatten Gefäßmuskulatur hin. In niedrigen Dosen wirkt MLT wahrscheinlich hauptsächlich über den hochaffinen MT₁-Rezeptor ($K_D = 20\text{-}40$ pM) auf der glatten Gefäßmuskulatur, der über eine Abnahme von cAMP sowie der Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat eine Vasokonstriktion und somit eine Steigerung im MAP vermittelt [48, 57]. Bei höheren MLT-Dosen wird auch der niederaffine MT₂-Rezeptor ($K_D = 160$ pM) auf den Endothelzellen aktiviert [49, 57]. Dies bewirkt wahrscheinlich über

einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg eine Steigerung der Produktion von Stickstoffmonoxid, welches in den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur die Synthese von cGMP und somit die Vasodilatation fördert [57].

Die Tiere, denen Citalopram (CIT) vor der sub-akuten Endotoxinämie infundiert wurde (LPS+CIT), zeigten einen signifikant verminderten LPS-induzierten Anstieg im MAP (Abbildung 14B). Zusätzlich wurde bei diesen Tieren ein signifikanter Abfall der Herzfrequenz gegen Ende des Versuchs beobachtet (Abbildung 15B). Diese kardiovaskulären Effekte von CIT während der sub-akuten Endotoxinämie beruhen möglicherweise auf die längst vermutete dämpfende Wirkung von CIT auf die Aktivität des Sympathikus [130]. Darüber hinaus könnte die bereits *in vitro* nachgewiesene CIT-induzierte Hemmung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle der Kardiomyocyten zu einer reduzierten Kontraktilität des Herzens bei den LPS+CIT-Tieren beigetragen haben [131].

Bei den Tieren, denen Sarpogrelate (SAR) vor und während der sub-akuten Endotoxinämie verabreicht wurde (LPS+SAR), konnte ebenfalls eine signifikante Verringerung des LPS-induzierten Anstiegs im MAP beobachtet werden (Abbildung 14B). Auf die LPS-induzierte Steigerung der Herzfrequenz hatte die Gabe von SAR hingegen keinen signifikanten Einfluss (Abbildung 15B). Die Blutdruck-senkende Wirkung von SAR während der Endotoxinämie ist wahrscheinlich auf dessen inhibitorischen Einfluss auf den 5-HT_{2A} -Rezeptor in der glatten Gefäßmuskulatur zurückzuführen, da dieser Rezeptor im aktivierten Zustand eine Vasokonstriktion durch die Stimulation der Myosin-Leichtketten-Kinase sowie die Inhibition der Myosin-Leichtketten-Phosphatase vermittelt [110, 150]. Die bisher im Endotoxin-Schock gezeigte Verminderung der Endotoxin-induzierten Abnahme des Blutdrucks und der Herzfrequenz durch die prophylaktische Gabe von SAR hängt hingegen vermutlich mit der gleichzeitig beobachteten anti-inflammatorischen Wirkung von SAR zusammen, die sich in einer Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokinen (IL- 1β , IL-8 und TNF- α) und einem Anstieg des anti-inflammatorischen Zytokines IL-10 ausdrückte [154]. Eine Beteiligung von TNF- α an dem starken Blutdruckabfall im septischen Schock wurde bereits angenommen [167]. Die Blutdruck-senkende Wirkung von TNF- α im septischen Schock wird auf viele verschiedene Mechanismen, wie einer verstärkten Exkretion von Natrium [168], einer erhöhten endothelialen Permeabilität [169, 170], einer Abnahme von Vassopressin 2-Rezeptoren und Aquaporin 2 [171], einer gesteigerten NO-Produktion [172], einer Reduktion der Herzkontraktilität [173] und einer Resistenz gegenüber Katecholaminen [165, 174] zurückgeführt.

Die prozentuale Sauerstoffsättigung in der Haut und im Muskel in der linken Hinterpfote der LPS-Tiere war im Vergleich zu den SHAM-Tieren gegen Ende des Versuchs deutlich reduziert (Anhang Tabelle 7). In Bezug auf den Skelettmuskel konnte bereits gezeigt werden, dass in Folge der sub-akuten Endotoxinämie im Skelettmuskel eine Abnahme des Angebots an Sauerstoff durch dessen Minderperfusion sowie ein erhöhter Verbrauch von Sauerstoff erfolgt [175]. Der erhöhte Verbrauch von Sauerstoff im Skelettmuskel könnte ein Resultat der LPS-induzierten Stimulierung des sympathikoadrenergen Systems sein [164, 176]. Hershey und Bond (1994) konnten allerdings im Skelettmuskel während der Endotoxinämie weder einen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs durch die intra-arteriale Infusion von Noradrenalin noch eine Verminderung des Sauerstoffverbrauchs durch die Vorbehandlung der Tiere mit dem Betablocker Propranolol nachweisen. Daher nahmen sie an, dass nicht-adrenerge Mediatoren, deren Ausschüttung durch LPS-induziert wird, den erhöhten Verbrauch von Sauerstoff im Skelettmuskel während der Endotoxinämie hervorrufen [177].

Die Gabe von MLT, CIT oder SAR, vor und/oder während der Endotoxinämie, konnte die LPS-induzierte Reduktion der prozentualen Sauerstoffsättigung in der Haut und im Muskel nicht signifikant verhindern (Anhang Tabelle 7).

Die Tiere der LPS-Gruppe wiesen im Verlauf der sub-akuten Endotoxinämie zuerst eine leichte Hyperglykämie und später eine starke Hypoglykämie auf (Anhang Tabelle 8). Die Hyperglykämie ist ein Zeichen für eine Stressreaktion und kann wahrscheinlich auf eine Katecholamin- und Glukagon-vermittelte Stimulation der Glukoneogenese und der Glykogenolyse und der damit verbundenen gesteigerten Bildung von Glukose zurückgeführt werden [178-181]. Der anschließende signifikante Abfall der Konzentration von Glukose im Blut der LPS-Tiere entstand vermutlich in Folge von erschöpften Glykogenspeichern, einer erhöhten, peripheren Verwertung von Glukose sowie einer verminderten Glukoneogenese durch eine zunehmende Schädigung der Leber [182, 183]. Von einer zunehmenden Schädigung der Leber in Folge der sub-akuten Endotoxinämie kann aufgrund des starken Anstiegs der Aktivität der Enzyme Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) im Blutplasma der LPS-Tiere ausgegangen werden (Abbildung 22 & Anhang Tabelle 11).

Die LPS+MLT-Tiere und LPS+SAR-Tiere wiesen hinsichtlich der Hyperglykämie und der Hypoglykämie keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den LPS-Tieren auf (Anhang Tabelle 8). Bei den LPS+CIT-Tieren fiel die anfängliche Hyperglykämie nicht so stark aus wie bei den LPS-Tieren. Dieser verminderte Anstieg der Konzentration von Glukose im Blutplasma der LPS+CIT-Tiere hängt möglicherweise mit der Stress-reduzierenden Wirkung

von Serotonin zusammen, dessen extrazelluläre Konzentration durch die CIT-bedingte Hemmung des Serotoninwiederaufnahmetransporters (SERT) erhöht wird [136, 184].

Der signifikante Anstieg der Konzentration von Laktat sowie das Absinken des pH im Blut unter einen Wert von 7,35 bei den Tieren der LPS-Gruppe kennzeichnen das Vorliegen einer Laktatazidose (Anhang Tabelle 8) [185]. Als Folge der in dieser Arbeit nachgewiesenen disseminierten intravasalen Gerinnung (DIG, siehe Abschnitt 6.1.1), könnte es bei LPS-Tieren möglicherweise zur Minderversorgung der Organe mit Sauerstoff und dadurch zur erhöhten Synthese von Laktat durch die anaerobe Glykolyse gekommen sein [186]. Neben dem erniedrigten Sauerstoffangebot werden jedoch derzeit auch weitere Erklärungen für die gesteigerte Laktatbildung in der (experimentellen) Sepsis, wie ein Entzündungs-bedingter, erhöhter Glukose-Metabolismus, der die oxidative Kapazität der Mitochondrien übersteigt, sowie die Entwicklung einer Mitochondrien-Dysfunktion angeführt [186, 187]. Darüber hinaus könnte die Leberschädigung, von der aufgrund des starken Anstiegs der Aktivität der Enzyme GOT und GPT ausgegangen werden kann (Abbildung 22 & Anhang Tabelle 11), auch zu der Erhöhung der Laktat-Konzentration beigetragen haben, da die Leber normalerweise Laktat aus dem Blut aufnimmt und über die Gluconeogenese in Glukose umwandelt [188, 189]. In Folge dieser Laktatazidose wurde im Blut der LPS-Tiere eine signifikante Abnahme des Standardbicarbonats sowie des *Base Excess* (BE_{Ecf}) nachgewiesen (Anhang Tabelle 8), was charakteristisch für eine metabolische Azidose im Allgemeinen ist [190]. Die starke Steigerung der Atemfrequenz bei den LPS-Tieren diene wahrscheinlich der Kompensation der Laktatazidose durch die Abatmung von Kohlenstoffdioxid über die Lunge, so dass demzufolge auch eine Abnahme des Kohlendioxidpartialdrucks im Blut dieser Tiere, die gegen Ende des Versuchs (T= 300 min) signifikant war, beobachtet wurde (Abbildung 16B & Anhang Tabelle 8) [185, 190].

Die Gabe von MLT hatte keinen Einfluss auf die Laktatazidose und nachfolgende kompensatorische Mechanismen während der sub-akuten Endotoxinämie (Anhang Tabelle 8). Bei den LPS+CIT-Tieren war der Anstieg der Konzentration von Laktat im Blut anfangs signifikant und gegen Ende des Versuchs leicht im Verhältnis zu dem der LPS-Tiere reduziert. Aufgrund dessen waren wahrscheinlich auch die bei den LPS-Tieren beobachteten kompensatorischen Mechanismen der Laktatazidose, wie die Abnahme des Standardbicarbonats und BE_{Ecf} sowie der Anstieg der Atemfrequenz (Abbildung 16B), weniger ausgeprägt. Eine mögliche Erklärung für die geringe Konzentration von Laktat im Blut der LPS+CIT-Tiere könnte eine abgeschwächte Stressantwort sein [184], die sich durch die gleichzeitig verminderte Hyperglykämie bei den LPS+CIT-Tieren andeutet. Darüber hinaus könnte auch die geringere

Schädigung der Leber bei den LPS+CIT-Tieren, von der aufgrund des reduzierten Anstiegs der Aktivität der Enzyme GOT und GPT ausgegangen werden kann (Abbildung 22 & Anhang Tabelle 11), zu einer verminderten Bildung von Laktat beigetragen haben.

Die LPS+SAR-Tiere zeigten bei einem ähnlich hohen Anstieg der Konzentration von Laktat im Blut einen verminderten Anstieg der Atemfrequenz im Vergleich zu den LPS-Tieren (Anhang Tabelle 8 & Abbildung 16B). Aufgrund einer Verminderung der Endotoxin-induzierten Bronchokonstriktion, die bereits hinsichtlich eines anderen 5-HT_{2A}-Rezeptor-antagonisten (Kentaserin) nachgewiesen wurde [191], könnte bei den LPS+SAR-Tieren der Anstieg der Atemfrequenz geringer ausgefallen sein, da eine Reduktion der Bronchokonstriktion einen verbesserten Gasaustausch über die Lunge zur Folge haben könnte. Ein verbesserter Gasaustausch könnte auch als Erklärung dafür dienen, warum bei den LPS+SAR-Tieren trotz geringer Atemfrequenz anfänglich eine signifikant erniedrigter Kohlendioxidpartialdruck und eine signifikant erhöhter Sauerstoffpartialdruck im Blut im Vergleich zu den LPS-Tieren detektiert wurde. Ob darüber hinaus das über die Femoralgefäße applizierte SAR auch die Wirkung von Serotonin im Atemzentrum des Gehirns deutlich beeinflusst hat, ist jedoch fraglich, da bisher angenommen wird, dass SAR die Blut-Hirnschranke nur im geringen Maße (0,25 % - 2 % der Blutplasmakonzentration) passieren kann [145, 146, 192]. Die gegen Ende des Versuchs im Blut der LPS+SAR-Tieren im Vergleich zu den LPS-Tieren ermittelten geringeren Werte für das Standardbicarbonat und den BE_{Ecf} sind möglicherweise auf die gleichzeitige, signifikante Abnahme des Hämatokrits bei den LPS+SAR-Tieren zurückzuführen, da der Hämoglobingehalt des Blutes in die Berechnung des Standardbicarbonats und des BE_{Ecf} mit einbezogen wird [193].

Die Tiere der LPS-Gruppe wiesen gegen Ende des Versuchs eine signifikant erhöhte Konzentration an Kaliumionen (K⁺) im Blut im Vergleich zu den Tieren der SHAM-Gruppe auf (Anhang Tabelle 8). Diese Hyperkalämie entstand wahrscheinlich aufgrund einer gesteigerten Lyse der Erythrozyten und der damit verbundenen Freisetzung von K⁺. Eine Endotoxinämie induziert nach derzeitigem Kenntnisstand die Lyse der Erythrozyten wahrscheinlich direkt über eine TLR4-unabhängige Interaktion von LPS mit der Membran der Erythrozyten [194] sowie indirekt durch die Ablagerung von Fibrin in den Blutgefäßen in Folge einer DIG [8].

Die Applikation von MLT, CIT oder SAR vor und/oder während der sub-akuten Endotoxinämie beeinflusste den LPS-induzierten Hyperkalämie nicht signifikant (Anhang Tabelle 8).

Bei den Tieren der LPS-Gruppe wurde im Verlauf der Endotoxinämie eine signifikante Abnahme der Kalziumionen (Ca²⁺)-Konzentration mit Blut im Vergleich zu den Tieren der

SHAM-Gruppe beobachtet (Anhang Tabelle 8). Als mögliche Ursachen für die Entstehung der Hypokalzämie in der (experimentellen) Sepsis werden derzeit eine Vielzahl an Mechanismen angeführt, wie u.a. erhöhte Calciurese [195], Chelatisierung von Kalzium [195], Akkumulation von Kalzium in Zellen und Geweben [195-199] und Anstieg des Biomarkers Procalcitonin [200, 201].

Die Tiere der LPS+MLT-Gruppe wiesen eine Stunde nach der ersten Gabe von MLT eine signifikant erhöhte Konzentration von Ca^{2+} im Blutplasma im Vergleich zu den Tieren der LPS-Gruppe auf (Anhang Tabelle 8). In anderen pathophysiologischen Prozessen konnte bereits gezeigt werden, dass MLT eine gestörte Ca^{2+} -Absorption des Darms reduzieren und die Expression des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers in den Zellen der Bauchspeicheldrüse erhöhen kann [202, 203]. Die Abnahme der Konzentration von Ca^{2+} im Blutplasma gegen Ende des Versuchs konnte durch die zweimalige Nachdosierung von MLT wahrscheinlich aufgrund der zuvor beschriebenen Vielzahl an Ursachen, die für die Entstehung der Hypokalzämie in der Endotoxinämie verantwortlich sind, jedoch nicht verhindert werden.

Bei den LPS+CIT-Tieren war hingegen die Endotoxinämie-bedingte Abnahme der Konzentration von Ca^{2+} im Blut signifikant reduziert (Anhang Tabelle 8), was durch die bereits *in vitro* nachgewiesene CIT-induzierte Hemmung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle der Kardiomyocyten [131] und dem damit verbundenen, verminderten Ca^{2+} -Einstrom in die Kardiomyocyten bedingt sein könnte.

Die LPS+SAR-Tiere wiesen ebenfalls eine signifikant verminderte Abnahme der Konzentration von Ca^{2+} im Blut im Vergleich zu den LPS-Tieren auf (Anhang Tabelle 8), was mit einem verminderten Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} in die Zellen der glatten Muskulatur zusammenhängen könnte, da der 5-HT_{2A} -Rezeptor an den Serotonin-induzierten Anstieg von Ca^{2+} in diesen Zellen, sowohl durch extrazelluläre als auch durch intrazelluläre Ca^{2+} -Quellen, beteiligt zu sein scheint [204].

Bei den LPS-Tieren konnte ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Blutplasma (Abbildung 21 & Tabelle 11), welche eine generelle Zell- und Gewebeschädigung anzeigt, im späteren Verlauf der sub-akuten Endotoxinämie nachgewiesen werden. Die Entstehung von Zell- und Gewebeschäden in Folge der Sepsis wird u.a. auf eine Störung sowohl des Sauerstoffangebots als auch der Sauerstoffverwertung zurückgeführt [205]. Eine Minderperfusion der Gewebe mit Sauerstoff kann beispielsweise durch die DIG, die in dieser Arbeit mittels Thromboelastometrie detektiert wurde (siehe Abschnitt 6.1.1) und die sowohl zu mikrovaskulären Thrombosen als auch zu einer erhöhten Blutungsneigung führt [3], entstehen. Eine Korrelation von DIG-typischen

Veränderungen der Thromboelastographie, wie verlängerter *K-time* (CFT bei ROTEM), vermindertem α -Winkel und reduzierter maximaler Amplitude (MCF bei ROTEM), mit der Schädigung der Leber konnte in einem anderen Endotoxinämie-Modell bereits gezeigt werden [21]. Im Zusammenhang mit der LPS-induzierten DIG wurde außerdem eine erhebliche Ablagerung von Fibrin in den Glomeruli der Niere in anderen tierexperimentellen Studien beobachtet [20, 22]. In einer Studie zur Dosis-Wirkung von LPS in Ratten konnte darüber hinaus für die in dieser Arbeit verwendete LPS-Dosis (0.5mg/kg/h) nicht nur eine starke Fibrinablagerung in der Niere, sondern auch in der Leber, aber nicht in der Lunge in einem vergleichbaren Versuchszeitraum nachgewiesen werden [206]. Im zeitlichen Verlauf der Endotoxinämie erfolgte demnach die Fibrinablagerung zuerst in den Glomeruli und peritubulären Kapillaren der Niere (nach 2 Stunden) und später in der Leber (nach 4 Stunden) [206]. Die Störung der Sauerstoffverwertung in den Geweben entsteht hingegen wahrscheinlich durch eine zunehmende Dysfunktion der Mitochondrien [207]. Im Laufe der Endotoxinämie kann der Sauerstoffverbrauch der Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) der Atmungskette aufgrund des erhöhten NO-Spiegels gehemmt sein, so dass in Folge dessen der Sauerstoff am Komplex I und Komplex III zu Superoxid reduziert wird [208-210]. Generell scheinen im Hinblick auf die Störung des Sauerstoffangebots als auch der Mitochondrien-Dysfunktion in der Endotoxinämie allerdings Unterschiede zwischen den einzelnen Organen vorzuliegen [211, 212]. Aus den Ergebnissen der Messung der Sauerstoffsättigung im Skelettmuskel kann daher nicht auf den Zustand der Sauerstoffsättigung in anderen Organen geschlossen werden (Anhang Tabelle 7). Ein frühzeitiger Abfall des Sauerstoffpartialdrucks sowie der Effizienz der Atmungskette in Folge der Endotoxinämie wurde in der Leber nachgewiesen [211, 212]. Von einer LPS-induzierten Schädigung der Leber kann auch in dieser Arbeit ausgegangen werden, da ein starker Anstieg der Aktivität der Enzyme GPT und GOT im Blutplasma der LPS-Tiere detektiert wurde (Abbildung 22 & Anhang Tabelle 11). Im zeitlichen Verlauf der sub-akuten Endotoxinämie steigt jedoch zuerst die Aktivität des Enzyms GOT und dann die des Enzyms GPT an. Aufgrund der Tatsache, dass das Enzym GOT auch in Erythrozyten exprimiert wird, könnte auch die zuvor beschriebene LPS-induzierte Hämolyse zu dem frühen Anstieg der Aktivität der GOT beigetragen haben und erst ab dem Zeitpunkt des Anstiegs der Aktivität des leberspezifischen Enzyms GPT eine starke Schädigung der Leber erfolgt sein [213, 214]. In Bezug auf die Konzentration von Kreatinin im Blutplasma, die ein Indikator für eine Nierenfunktionsstörung ist [215], konnte bei den LPS-Tieren ein leichter Anstieg, der im Vergleich zur SHAM-Gruppe jedoch nicht signifikant war, gegen Ende des Versuchs beobachtet werden (Anhang Tabelle 11). Die

Kreatinin-Konzentration bei den LPS-Tieren betrug gegen Ende des Versuch $1,37 \pm 0,26$ mg/dL und lag somit leicht oberhalb des für männliche Wistar-Ratten bestimmten Referenzbereichs von $0,42 \pm 0,73$ mg/dL [216]. Bei diesen Tieren scheint somit keine schwerwiegende Einschränkung der Nierenfunktion vorzuliegen. Die zunehmende Aktivität des Enzyms Creatin-Kinase (CK) im Blutplasma der LPS-Tiere im Vergleich zu den SHAM-Tieren kann ein Hinweis für eine Schädigung der Herz- und Skelettmuskulatur sein (Anhang Tabelle 11) [215]. Da jedoch die bei den LPS-Tieren maximal gemessene Aktivität der CK von 386 ± 60 U/L noch in dem für männliche Wistar-Ratten bestimmten Referenzbereich von 444 ± 164 U/L [216] liegt, kann bei LPS-Tieren nicht von einer starken Schädigung der Herz- und Skelettmuskulatur ausgegangen werden.

Die LPS+MLT-Tiere wiesen keinen Unterschied im Vergleich zu den LPS-Tieren in Bezug auf die Aktivität der Enzyme LDH und CK sowie die Konzentration von Kreatinin im Blutplasma auf (Abbildung 21 & Tabelle 11). Die Aktivität von GOT und GPT im Blutplasma hingegen stieg bei den Tieren der LPS+MLT-Gruppe frühzeitiger und stärker an (Abbildung 22 & Anhang Tabelle 11), was auf eine raschere und schwerwiegendere Schädigung der Leber bei den LPS+MLT-Tieren im Vergleich zu den LPS-Tieren hindeutet. Konträr zu diesen Ergebnissen wurde in anderen tierexperimentellen Sepsis-Modellen jedoch eine Protektion der Organe durch die prophylaktische und/oder therapeutische Gabe von MLT gezeigt, die sich u.a. in eine Reduktion des Anstieges der Schädigungsparameter LDH, GOT, GPT und Kreatinin widerspiegelte und auf die gleichzeitig detektierte anti-oxidative bzw. anti-inflammatorische Wirkung von MLT zurückgeführt wurde [83, 88, 92, 217]. Im Hinblick auf das gewählte Tiermodell der Sepsis sowie teilweise in Bezug auf die verwendete MLT-Dosis unterscheiden sich diese Studien allerdings von dieser Arbeit. Eine weitere mögliche Erklärung für die divergenten Ergebnisse, könnte die in einer vorherigen Studie beobachtete pro-inflammatorische Wirkung des MLT sein [98]. Jedoch fiel dabei die Verstärkung der LPS-induzierten Freisetzung des Zytokins IL-6, für das bereits sowohl protektive als auch schädliche Einflüsse auf die Organe in tierexperimentellen Sepsis-Modellen beschrieben wurden [218-220], am Deutlichsten aus [98].

Bei den LPS+CIT-Tieren war der Anstieg der Aktivität der Enzyme LDH, GOT und GPT im Blutplasma im Vergleich zu den LPS-Tieren signifikant reduziert (Abbildung 21, Abbildung 22 & Anhang Tabelle 11), was auf eine verminderte Zell- und Gewebeschädigung im Allgemeinen und geringere Leberschädigung im Speziellen hinweist. Die Reduktion der Zell- und Gewebeschädigung sowie der Leberschädigung könnte mit der Verminderung der LPS-induzierten Verbrauchskoagulopathie durch CIT, von der in dieser Arbeit aufgrund der

Ergebnisse der Thromboelastometrie ausgegangen werden kann (siehe Abschnitt 6.1.1), zusammenhängen, da diese eine bessere Zufuhr der Zellen und Gewebe mit Sauerstoff impliziert. Eine weitere mögliche Erklärung für die geringere Zell- und Gewebsschädigung sowie Leberschädigung bei den LPS-CIT-Tieren könnte die bereits bekannte anti-inflammatorische Wirkung von CIT sein, die allerdings bisher lediglich *in vitro* bezüglich der LPS-stimulierten Mikroglia-Zellen gezeigt wurde [142]. Da die LPS+CIT-Tiere gegen Ende der sub-akuten Endotoxinämie keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Konzentration von Kreatinin sowie der Aktivität des Enzyms CK im Blutplasma im Vergleich zu den LPS-Tieren aufwiesen (Anhang Tabelle 11), kann angenommen werden, dass bei beiden Versuchsgruppen ein ähnlicher Grad der Nierenschädigung sowie der Herz- und Skelettmuskelschädigung vorlag.

Der bei den LPS+SAR-Tieren signifikant geringere Anstieg der Aktivität der Enzyme LDH, GOT und GPT im Vergleich zu den LPS-Tieren (Abbildung 21, Abbildung 22 & Anhang Tabelle 11) könnte wie bei den LPS+CIT-Tieren mit einer Reduktion der LPS-induzierten Verbrauchskoagulopathie, von der bei den LPS+SAR-Tieren ebenfalls aufgrund der Ergebnisse der Thromboelastometrie ausgegangen werden kann (siehe Abschnitt 6.1.1), zusammenhängen. Darüber hinaus könnte auch der anti-inflammatorische Einfluss von SAR, der bereits in einem Modell des Endotoxin-Schocks nachgewiesen wurde [154], zu der geringeren Zell- und Gewebsschädigung sowie der verminderten Leberschädigung beigetragen haben. Da sich die LPS+SAR-Tiere im gesamten Versuchsverlauf in Bezug auf die Konzentration von Kreatinin sowie die Aktivität des Enzyms CK von den LPS-Tieren nicht signifikant unterschieden (Anhang Tabelle 11), kann angenommen werden, dass der Schweregrad der Nierenschädigung bzw. der Herz- und Skelettmuskelschädigung bei beiden Versuchsgruppen ähnlich war.

Insgesamt war der Einfluss von MLT auf die LPS-induzierten systemischen Veränderungen meist gegensätzlich zu CIT und SAR, was darauf hindeutet, dass MLT nicht wie CIT und SAR als Serotoninantagonist, sondern über andere Mechanismen wie z.B. seinen G-Proteingekoppelten Rezeptoren MT_1 und MT_2 unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen *in vivo* wirkt.

6.1.1 Der Einfluss von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die LPS-induzierte Disseminierte intravasale Gerinnung und Thrombozytopenie *in vivo*

In Bezug auf die Parameter der Thromboelastometrie, konnte bei den LPS-Tieren zuerst eine Verkürzung der *Clotting Time* (CT) und dann gegen Ende des Versuchs eine Verlängerung der CT und der *Clot Formation Time* (CFT) sowie eine Reduktion des α -Winkels, der *Maximum Clot Firmness* (MCF) und der *Area Under The Curve* (AUC) beobachtet werden (Abbildung 17-19 & Anhang Tabelle 9). Die anfängliche Verkürzung der CT deutet auf eine Hyperkoagulabilität des Blutes hin. Die anschließende Verlängerung der CT und der CFT und die Reduktion des α -Winkels, der MCF und der AUC gegen Ende des Versuchs kennzeichnet eine Hypokoagulabilität des Blutes. Die LPS-Tiere weisen somit die für die Disseminierte intravasale Gerinnung (DIG)-typischen Phasen auf, die bereits mithilfe der Thromboelastometrie bei einem anderen sub-akuten Endotoxinämie-Modell mit Schweinen sowie bei Sepsis-Patienten nachgewiesen wurden [159-161].

Die zuerst beobachtete starke Aktivierbarkeit der Gerinnung entsteht wahrscheinlich aufgrund der Initiation der Expression des Gewebefaktors auf den Endothelzellen und Monozyten durch LPS und der damit verbundenen Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade [17, 18, 221]. Die in dieser Arbeit gegen Ende des Versuchs mittels der Thromboelastometrie nachgewiesene Hypokoagulabilität des Blutes ist höchstwahrscheinlich durch den massiven Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten bedingt. Ein signifikanter Abfall der Thrombozytenzahl wurde bei den LPS-Tieren ab dem Zeitpunkt (T= 240 min), ab dem auch eine signifikante Abnahme der Kurve der Thromboelastometrie beobachtet wurde, detektiert (Abbildung 20 & Anhang Tabelle 10). Diese Verbrauchskoagulopathie ist vermutlich das Resultat der LPS-induzierten Aktivierung der Gerinnung als auch der bereits beschriebenen Suppression des anti-koagulatorischen und fibrinolytischen Systems durch LPS. Der LPS-bedingte Verlust der Kompensationsmechanismen, wie den anti-koagulatorischen Proteinen und der Fibrinolyse, liegt nach derzeitigem Kenntnisstand einer verminderten Expression von Thrombomodulin auf den Endothelzellen und einer erhöhten Freisetzung von Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 ins Blut zu Grunde [17, 19, 20].

Bei den LPS+MLT-Tieren konnte keine Reduktion der LPS-induzierten Veränderungen der Parameter der Thromboelastometrie beobachtet werden (Abbildung 17-19 & Anhang Tabelle 9). Demgemäß vermindert die Gabe von MLT die LPS-induzierte Aktivierung der Gerinnung und die daraus resultierende Verbrauchskoagulopathie nicht (DIG). Konträr zu diesem Ergebnis, wurde bisher jedoch gezeigt, dass die orale Gabe von 3 mg MLT einen inhibitorischen

Effekt auf die plasmatische Gerinnung bei jungen, gesunden Männern hat [73]. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte die starke Aktivierung der Gerinnung durch LPS sein, welche anscheinend nicht verhindert werden kann durch die intravenöse Gabe von einer sogar höheren kumulativen MLT-Dosis (3 x 3mg/kg). Aufgrund der Tatsache, dass MLT ein zirkadiäres Hormon ist, welches in der Nacht von der Zirbeldrüse synthetisiert und sekretiert wird [40], und deren Effektoren dieser tageszeitlichen Veränderung unterliegen [67, 68, 71], kann auch die Tageszeit der Applikation von MLT entscheidend für das Erreichen eines ausreichenden anti-hämostatischen Effekts sein. Das Ausbleiben der signifikanten Reduktion der LPS-induzierten DIG durch exogenes MLT könnte ebenso durch die in einer vorherigen Studie beobachtete pro-inflammatorische Wirkung des MLT bedingt sein [98]. Eine wechselseitige Beeinflussung der Inflammation und Gerinnung wird gegenwärtig angenommen, wobei die Inflammation eine Förderung der Gerinnung bewirkt und die Gerinnung wiederum die Aktivität der Inflammation beeinflusst [222]. Die zweimalige Gabe von 3 mg/kg MLT während der sub-akuten Endotoxinämie bewirkte in einer vorherigen Studie eine signifikante Verstärkung der LPS-induzierten Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 [98]. Das Zytokin IL-6 kann die Gerinnung zum einen durch eine Erhöhung der Expression des Gewebefaktors, des Fibrinogens, des Faktors VIII und des von Willebrand-Faktors und zum anderen durch die Reduktion der Proteine des natürlichen anti-koagulatorischen Systems (Antithrombin und Protein S) fördern [223]. Eine Korrelation zwischen der IL-6-Konzentration und dem Schweregrad der DIG konnte bereits bei Sepsis-Patienten gezeigt werden: die Patienten mit fulminanter DIG wiesen im Vergleich zu den Patienten mit einer kompensierten DIG eine deutlich erhöhte Konzentration des Zytokins IL-6 im Blutplasma auf [224].

Obwohl die Gabe von MLT nicht die LPS-induzierte DIG reduzierte, konnte interessanterweise eine signifikante Verminderung der LPS-induzierten Abnahme der Thrombozytenzahl durch MLT detektiert werden (Abbildung 20 & Anhang Tabelle 10). Da die Thrombozytenzahl auch in der MLT-Kontrollgruppe erhöht war, stimuliert es vielleicht direkt die Bildung von Thrombozyten und/oder deren Freisetzung ins Blut. Protektive Effekte auf die Wiederherstellung der Thrombozytenzahl durch die Gabe von MLT wurde bereits in Maus- und Rattenmodellen der Myelosuppression sowie bei Patienten mit einer ausgeprägten Thrombozytopenie gezeigt [74-80]. Aufgrund der Tatsache, dass die gesamte Megakaryopoese einige Tage in Anspruch nimmt und in dieser Arbeit der Effekt von MLT bereits nach 3 Stunden sichtbar war, ist ein Anstieg der Thrombozytenzahl durch MLT *via* Megakaryopoese sehr unwahrscheinlich. Eine mögliche Ursache für den schnellen Anstieg

der Thrombozytenzahl durch MLT könnte die Freisetzung von Thrombozyten aus der Milz sein, in der dreißig Prozent der gebildeten Thrombozyten gespeichert werden [225]. Eine allgemeine Beteiligung der α -Adrenorezeptoren an der Freisetzung der in der Milz gespeicherten Thrombozyten wird kontrovers diskutiert [226, 227]. Darüber hinaus könnten auch die MLT-Membranrezeptoren MT_1 und MT_2 , deren Expression bereits in der Milz nachgewiesen wurde, an der MLT-induzierten Freisetzung der Thrombozyten aus der Milz beteiligt sein [228]. Jedoch kann die erhöhte Thrombozytenzahl ebenso auf den beobachteten MLT-induzierten Anstieg im MAP zurückgeführt werden, weil die Scheerspannung bekanntermaßen die Freisetzung der Thrombozyten aus ihren Vorläuferzellen, den *Proplatelets*, stimuliert [229].

Bei den LPS+CIT-Tiere konnten anfänglich ein signifikant verminderter Wert für die CFT und signifikant erhöhte Werte für den α -Winkel, die MCF sowie die AUC im Vergleich zu den LPS-Tieren nachgewiesen werden (Abbildung 17-19 & Anhang Tabelle 9), was wiederum auf eine stärkere Aktivierbarkeit der Gerinnung bei diesen Tieren hinweist. Ein möglicher Grund für diese stärkere Aktivierbarkeit der Gerinnung könnte eine kurzzeitige, CIT-bedingte Erhöhung der Konzentration von Serotonin im Blutplasma der Tiere und die damit verbundene Stimulation der 5-HT_{2A}-Rezeptor-vermittelten Thrombozytenaggregation sein. Eine Erhöhung des Serotoninspiegels im Blutplasma sowie eine Reduktion des Serotoningehalts in Thrombozyten konnte bei der Behandlung von depressiven Patienten mit CIT bereits beobachtet werden [136]. Eine anfängliche, gerinnungsaktivierende Wirkung des S-Enantiomers von CIT (Escitalopram) wurde zuvor von Kurne *et al.* (2004) angenommen, da sie bei einem depressiven Patienten mit keinerlei Risikofaktoren für die Entwicklung einer Thrombose nach der Verabreichung von Escitalopram eine venöse Thromboembolie diagnostizierten [139]. Gegen Ende des Versuchs konnte bei den Tieren der LPS+CIT-Gruppe hingegen eine Verminderung des LPS-induzierten Anstiegs der CT sowie der LPS-induzierten Abnahme des α -Winkels, der MCF und der AUC beobachtet werden. Dies lässt auf eine Reduktion der LPS-induzierten Verbrauchskoagulopathie durch CIT schließen. Da eine reduzierte Verbrauchskoagulopathie allerdings eine vorherige Minderung der LPS-induzierten Aktivierung der Gerinnung voraussetzt, kann diese wahrscheinlich auf die bereits *in vitro* gezeigte, inhibitorische Wirkung von CIT auf die Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen und Fibrinogen, die Adenosindiphosphat (ADP)- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation und Kollagen-induzierte Sekretion der α - und δ -Granula sowie die Freisetzung von Thromboxan A₂ zurückgeführt werden [132-134]. Insgesamt kann somit auf eine anfängliche pro-thrombotische und eine nachfolgende anti-thrombotische Wirkung von CIT auf-

grund des Verlaufs der stündlich ermittelten Thromboelastometriekurve sowie des bereits von Kurne *et al.* (2004) für Escitalopram postulierten dualen Effekts auf die Thrombozytenfunktion geschlossen werden [139].

Bei den LPS+CIT-Tieren war die Thrombozytenzahl im Blut im Vergleich zu den LPS-Tieren deutlich vermindert (Abbildung 20 & Anhang Tabelle 10). Die Abnahme der Thrombozytenzahl wurde bereits bei depressiven Patienten, die mit Escitalopram (10-20 mg/Tag) behandelt wurden, beobachtet [140, 141], wobei Song *et al.* (2012) u.a. von einer Medikamenten-induzierten Immunthrombozytopenie ausgingen. Da jedoch in der vorliegenden Arbeit unmittelbar nach der Applikation und nicht wie in den Studien von Atagolu *et al.* (2009) und Song *et al.* (2012) erst nach ein bzw. zwei Monaten eine Messung der Thrombozytenzahl erfolgte [140, 141], liegt die beobachtete reduzierte Thrombozytenzahl wahrscheinlich nicht immunologischen Mechanismen sondern einer direkten Inhibition von serotonergen Mechanismen zu Grunde. Demnach scheint der Transport von Serotonin in die Thrombozyten anscheinend essentiell für deren Homöostase zu sein.

Bei den LPS+SAR-Tieren konnte gegen Ende des Versuchs eine deutliche Reduktion des LPS-induzierten Anstiegs der CT sowie der LPS-induzierten Abnahme des α -Winkels, der MCF und der AUC beobachtet werden (Abbildung 17-19 & Anhang Tabelle 9). Diese Ergebnisse weisen auf eine Reduktion der LPS-induzierten Verbrauchskoagulopathie hin, die wiederum wahrscheinlich einer vorherigen Minderung der LPS-induzierten Aktivierung der Gerinnung zu Grunde liegt. Der Rezeptorantagonist SAR reduzierte vermutlich die LPS-induzierte Gerinnungsaktivierung durch seine bereits *in vitro* nachgewiesene, inhibitorische Wirkung auf die Serotonin-, Arachidonsäure-, ADP und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation sowie auf die Kollagen plus Serotonin-induzierte Freisetzung der α - und δ -Granula aus den Thrombozyten [150, 152, 153]. Obwohl für Serotonin in Bezug auf die Thrombozytenaktivierung eine Funktion als schwacher Koaktivator, der den Effekt von anderen Agonisten wie z.B. ADP und Thrombin auf die Thrombozyten verstärkt, angenommen wird [114], scheint den Ergebnissen zufolge eine Antagonisierung des Rezeptors 5-HT_{2A} durch SAR ein wirksamer Mechanismus zur Minderung der LPS-induzierten Gerinnungsaktivierung während der sub-akuten Endotoxinämie zu sein.

Die LPS+SAR-Tiere wiesen im Vergleich zu den Tieren der LPS-Gruppe eine deutlich verminderte Thrombozytenzahl auf (Abbildung 20 & Anhang Tabelle 10). Eine Beteiligung des 5-HT_{2A}-Rezeptors auf den Megakaryozyten an der Serotonin-vermittelten Förderung der späten Phase der Thrombopoese, die eine Reorganisation des Zytoskeletts und somit die Bildung von direkten Vorläuferzellen der Thrombozyten (*Proplatelets*) zur Folge hat, wurde

bereits nachgewiesen [74]. Da jedoch bei den Tieren der LPS+SAR-Gruppe unmittelbar nach der ersten Gabe von SAR eine reduzierte Thrombozytenzahl beobachtet wurde, kann diese aus zeitlichen Gründen nicht auf eine Minderung der Serotonin-vermittelten Förderung der Thrombopoese durch die Bindung von SAR an den Rezeptor 5-HT_{2A} auf den Megakaryozyten zurückgeführt werden. Stattdessen vermindert SAR durch seine Bindung an den 5-HT_{2A}-Rezeptor auf den Thrombozyten wahrscheinlich eine stetige, leichte Aktivierung der Thrombozyten durch Serotonin und stört dadurch möglicherweise dessen Homöostase. Generell scheint den Ergebnissen zufolge sowohl der Transport von Serotonin in die Thrombozyten als auch die Aktivierung der Thrombozyten über den 5-HT_{2A}-Rezeptor essentiell für die Thrombozytenhomöostase zu sein.

Trotz der strukturellen Ähnlichkeit von MLT zu Serotonin und der bereits *in vitro* nachgewiesenen Hemmung des Transports von Serotonin in die Thrombozyten hatte MLT *in vivo* nicht den gleichen Einfluss auf die Hämostase während der sub-akuten Endotoxinämie wie die spezifischen Serotoninantagonisten CIT und SAR. Demzufolge scheint MLT unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen *in vivo* keine serotoninantagonistische Wirkung auf die Hämostase auszuüben.

6.2 Der Einfluss von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die Serotonin-induzierte Thrombozytenaktivierung *in vitro*

Eine Aktivierung der Thrombozyten konnte durch den Einsatz von Serotonin in einer Endkonzentration von 10 μM , die deutlich über der physiologischen Konzentration von Serotonin im Blut von ca. 0,8 nM lag [107], mittels der Impedanzaggregometrie nachgewiesen werden. Für den Nachweis der Serotonin-induzierten Aktivierung der Thrombozyten *in vitro* waren hohe Konzentrationen von Serotonin erforderlich, da Serotonin *in vivo* erst bei einer Aggregation des Thrombozyts von diesem ausgeschüttet wird und vornehmlich als Koaktivator auf die Thrombozyten wirkt, indem es den Effekt von anderen Agonisten wie z.B. ADP und Thrombin auf die Aktivierung der Thrombozyten verstärkt [113, 114].

Sowohl für CIT, einem selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmer [122], als auch für SAR, einem selektiven Antagonisten des Serotoninrezeptors 5-HT₂ [144], konnte eine dosisabhängige Hemmung der Serotonin-induzierten Thrombozytenaktivierung nachgewiesen werden (Abbildung 23). Die mittlere inhibitorische Konzentration betrug für CIT ~58 μM und für SAR ~48 μM . Folglich kann eine Hemmung sowohl des Transports von Serotonin in die Thrombozyten über den Serotonintransporter als auch des 5-HT_{2A}-Rezeptors der Thrombozyten einen inhibitorischen Einfluss auf die Serotonin-induzierte Thrombozytenaktivierung ausüben. Nach dem Modell von Walther *et al.* (2003) sind beide serotonerge Prozesse an der Exozytose der thrombozytären α -Granula, in denen Adhäsionsproteine, Gerinnungsfaktoren, Faktoren der Fibrinolyse, Zytokine und Wachstumsfaktoren gespeichert sind [230], beteiligt [115]. Serotonin fördert die Exozytose der α -Granula nach diesem Modell zum einen durch seinen Transport über den SERT in die Thrombozyten und seine anschließende kovalente Bindung an kleine GTPasen, welches als „Serotonylierung“ bezeichnet wird, und zum anderen über den 5-HT_{2A}-Rezeptor-vermittelten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, da beide Prozesse eine konstitutive Aktivierung der kleinen GTPasen zur Folge haben [115]. Für MLT war die Konzentration (~1413 μM), bei der eine halbmaximale Hemmung der Serotonin-induzierten Thrombozytenaktivierung beobachtet wurde, 24-29 mal höher im Vergleich zu CIT und SAR. Der in dieser Arbeit ermittelte IC₅₀-Wert (1,413 mM) für die MLT-vermittelte Hemmung der Serotonin-induzierten Thrombozytenaktivierung entsprach in etwa den bereits publizierten IC₅₀-Werten für die MLT-vermittelte Hemmung der Aufnahme von Serotonin in den Thrombozyten (1,3 mM [71] & 1,1 mM [72]). Demnach liegt die Serotonin-antagonistische Wirkung von MLT auf die Thrombozytenaktivierung wahrscheinlich der bereits bekannten Hemmung der Aufnahme von Serotonin in die

Thrombozyten zu Grunde. MLT wirkt wahrscheinlich inhibitorisch auf die Aufnahme von Serotonin durch eine direkte Interaktion mit der nieder affinen Bindestelle des thrombozytären SERT, welche die Bindung von Serotonin an der primären, hoch affinen Bindestelle reguliert, wie es bereits für den SERT der Dickdarmkarzinomzellen *Caco-2* gezeigt werden konnte [231-233]. Da das *S*-Entantiomer von CIT nicht nur an der allosterischen Bindestelle von SERT, sondern auch im Bereich der Bindestelle für Serotonin hochaffin zu binden vermag [126], konnte wahrscheinlich durch eine deutlich niedrigere Konzentration von CIT im Vergleich zu MLT bereits eine halbmaximale Hemmung der Serotonin-induzierten Thrombozytenaktivierung erzeugt werden.

Insgesamt deuten die Ergebnisse der *in vitro* Versuche auf einen serotoninantagonistischen Einfluss von Melatonin auf die Thrombozytenaktivierung über die bereits nachgewiesene MLT-vermittelte Hemmung des Transports von Serotonin hin. Diese Wirkung wird jedoch erst bei hohen Konzentrationen von MLT (mM) erreicht und konnte demzufolge wahrscheinlich durch die Gabe von MLT in einer Dosis von 3 x 3 mg/kg *in vivo* nicht erzeugt werden.

7. Relevanz und Ausblick

Bezüglich des klinischen Nutzens von exogenem MLT bei der Sepsis-assoziierten DIG kann aufgrund der in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse angenommen werden, dass MLT keine wirksame Substanz gegen die DIG ist (siehe Abschnitt 6.1.1). Die in dieser Arbeit beobachtete Steigerung der Thrombozytenzahl unter Kontrollbedingungen sowie die Reduktion der LPS-induzierten Abnahme der Thrombozytenzahl während der sub-akuten Endotoxämie durch die von MLT (Abbildung 20 & Anhang Tabelle 10) und der zuvor in einer klinischen Studie mit septischen Neugeborenen nachgewiesene Anstieg der Thrombozytenzahl durch die Behandlung mit MLT [99] deuten allerdings daraufhin, dass exogenes MLT die Freisetzung von Thrombozyten fördert und somit wahrscheinlich ein wirkungsvolles Medikament gegen die Sepsis-assoziierte Thrombozytopenie darstellt. Da MLT ein zirkadiäres Hormon ist, welches in der Nacht von der Zirbeldrüse synthetisiert und sekretiert wird [40], sollte allerdings überprüft werden ob die Tageszeit der Applikation von MLT entscheidend für das Erzielen dieser Wirkung ist. Ein erster Hinweis dafür könnte die bereits nachgewiesene Ineffektivität einer um ca. 3-4 Stunden im Vergleich zu dieser Arbeit tageszeitlich verzögerten, therapeutischen Gabe von MLT unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxämie sein [234]. Hinsichtlich der Verträglichkeit von exogenem MLT kann aufgrund der bereits durchgeführten, pharmakologischen Toleranzstudien mit gesunden, männlichen Probanden [235, 236], bei denen exogenes MLT lediglich eine leichte, vorübergehende Müdigkeit bzw. eine Reduktion des Schlafes aber keine toxikologische Wirkungen hervorrief, davon ausgegangen werden, dass auch bei den Sepsis-Patienten kein großes Risiko durch die Gabe von MLT besteht. Jedoch sollten Schwankungen des mittleren arteriellen Blutdrucks als unerwünschte Nebenwirkung des verabreichten MLTs, die bereits in einer Verträglichkeitsstudie mit exogenem MLT in Wistar-Ratten gezeigt wurde [56], in Betracht gezogen werden.

Im Gegensatz zu MLT besitzen die selektiven Serotoninantagonisten CIT und SAR den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge das Potential der hypokoagulablen Phase der LPS-induzierten DIG massiv entgegenwirken zu können, was auf eine Verminderung der Verbrauchskoagulopathie hinweist (siehe Abschnitt 6.1.1) und zu der gleichzeitig beobachten, geringen Schädigung der Zellen und Geweben im Allgemeinen und der Leber im Speziellen beigetragen haben könnte (siehe Abschnitt 6.1). Die Hemmung sowohl des Transports von Serotonin in die Thrombozyten durch CIT als auch der 5-HT_{2A}-Rezeptor-vermittelten Aktivierung der Thrombozyten durch SAR könnten demnach bei Sepsis-Patienten geeignete Mechanismen gegen die Verbrauchskoagulopathie und die konsekutiven Schädigung der Organe darstellen.

Da in dieser Arbeit lediglich die Wirkung von prophylaktisch verabreichten CIT bzw. prophylaktisch plus therapeutisch verabreichten SAR untersucht wurde, sollte in nachfolgenden Studien ebenso die Effektivität einer alleinigen therapeutischen Gabe dieser beiden Substanzen überprüft werden. Darüber hinaus muss in Betracht gezogen werden, dass CIT und SAR auch unerwünschte Nebeneffekte bei Sepsis-Patienten hervorrufen können, da die Zielstrukturen von CIT und SAR nicht nur von den Thrombozyten, sondern auch von anderen Zellen und Geweben exprimiert werden [109, 237]. Aufgrund der Gegebenheit, dass CIT und SAR als Arzneimittel u.a. in Deutschland [123] bzw. Japan [238, 239] eingesetzt werden, sollten jedoch mögliche Nebenwirkungen bereits bekannt und demzufolge für Sepsis-Patienten abschätzbar sein.

8. Zusammenfassung

Bei Patienten mit einer schweren Sepsis stellt die Disseminierte intravasale Gerinnung (DIG) einen starken Prädiktor für die Mortalität dar. Die DIG ist gezeichnet durch eine systemische Aktivierung der Gerinnung mit einem simultanen Verlust von Kompensationsmechanismen. Inhibitorische Effekte von exogenem Melatonin (MLT) auf die plasmatische Gerinnung sowie die Thrombozytenaggregation wurden bereits *in vivo* bzw. *in vitro* unter Normalbedingungen nachgewiesen.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob exogenes MLT auch die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte DIG während der sub-akuten Endotoxinämie vermindert. Darüber hinaus sollte aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von MLT zu Serotonin und der bereits *in vitro* nachgewiesenen Hemmung des Transports von Serotonin in die Thrombozyten durch MLT, der Einfluss von MLT auf die DIG *in vivo* sowie auf die Serotonin-induzierte Thrombozytenaktivierung *in vitro* mit denen der selektiven Serotoninantagonisten Citalopram (CIT), einem Serotoninwiederaufnahmehemmer, und Sarpogrelate (SAR), einem 5-HT₂-Rezeptorantagonisten, verglichen werden.

Die sub-akute Endotoxinämie wurde in männlichen Wistar-Ratten durch eine intravenöse (*i.v.*) Dauerinfusion von LPS (0,5 mg/kg x h) induziert. MLT (3 x 3 mg/kg x 15 min) und SAR (0,28 mg/kg x 15 min) wurden als Kurzzeitinfusion 15 min vor und dann 120 min und 240 min nach dem Beginn der LPS-Infusion *i.v.* verabreicht. CIT wurde (0,46 mg/kg x 15 min) lediglich 15 min vor Beginn der LPS-Infusion *i.v.* infundiert. Zur Untersuchung der Gerinnungskinetik mittels der Thromboelastometrie und zur Bestimmung der Thrombozytenzahl wurde jede Stunde über die rechte *Arteria femoralis* der Tiere Blut entnommen. Für die Untersuchung der Serotonin-induzierten Thrombozytenaktivierung *in vitro* wurde gesunden Probanden venöses Vollblut abgenommen und dieses mittels der Impedanzaggregometrie untersucht.

Die Dauerinfusion von LPS verursachte zuerst eine Hyperkoagulobilität und später eine Hypokoagulobilität des Blutes sowie eine signifikante Abnahme der Thrombozytenzahl. Die Gabe von MLT vor und während der sub-akuten Endotoxinämie hatte keinen Einfluss auf die LPS-induzierten Veränderungen der Parameter der Thromboelastometrie. Allerdings bewirkte MLT eine signifikante Reduktion der LPS-induzierten Abnahme der Thrombozytenzahl. Die Applikation von CIT vor der sub-akuten Endotoxinämie bewirkte eine anfänglich stärkere Aktivierbarkeit der Gerinnung und gegen Ende des Versuchs eine signifikant verminderte Hypokoagulobilität des Blutes im Vergleich zu den LPS-Tieren. Die Infusion von SAR vor

und während der sub-akuten Endotoxinämie reduzierte ebenfalls die LPS-bedingten Hypokoagulabilität des Blutes. Die Thrombozytenzahl war sowohl bei den LPS+CIT-Tieren als auch bei den LPS+SAR-Tieren im Vergleich zu den LPS-Tieren stark vermindert. *In vitro* bewirkten MLT, CIT und SAR eine Dosis-abhängige Hemmung der Serotonin-induzierten Thrombozytenaktivierung (IC₅₀= ~1413 µM MLT, ~58 µM CIT, ~48 µM SAR).

Den Ergebnissen zufolge vermindert exogenes MLT die LPS-induzierte Thrombozytopenie jedoch nicht die LPS-induzierte DIG während der sub-akuten Endotoxinämie. Im Gegensatz zu MLT bewirkten die selektiven Serotoninantagonisten CIT und SAR eine signifikante Reduktion der hypokoagulablen Phase der LPS-induzierten DIG. Sowohl der Transport von Serotonin in die Thrombozyten als auch die Aktivierung der Thrombozyten über den 5-HT_{2A}-Rezeptor scheinen, den Ergebnissen nach, essentiell für die Thrombozytenhomöostase, da eine Hemmung dieser Prozesse durch CIT bzw. SAR eine Reduktion der Thrombozytenzahl verursachte. In den *in vitro* Versuchen wurde im Gegensatz zu den *in vivo* Versuchen eine serotoninantagonistische Wirkung von Melatonin auf die Thrombozyten gezeigt, die jedoch erst bei hohen Konzentrationen von MLT (mM) erreicht wurde und demzufolge *in vivo* nicht von Bedeutung ist.

9. Summary

In septic patients, disseminated intravascular coagulation (DIC) is a strong predictor of mortality. DIC is characterised by a systemic activation of coagulation with simultaneous loss of compensation mechanisms. Under normal conditions inhibitory effects of exogenous melatonin (MLT) on plasma coagulation and platelet aggregation have already been observed *in vivo* or *in vitro*.

Here, I studied whether MLT also diminishes the lipopolysaccharide (LPS)-induced DIC during subacute endotoxaemia. On the basis of the structural similarity of MLT to serotonin and its *in vitro* observed inhibitory effect on the transport of serotonin in platelet, the effect of MLT on DIC *in vivo* and on serotonin-induced platelet activation *in vitro* were compared with the selective serotonin antagonists citalopram (CIT), a serotonin-reuptake-inhibitor, and sarpogrelate (SAR), a 5-HT₂-receptor antagonist.

Sub-acute endotoxaemia was induced in male Wistar rats by a continuous intravenous infusion of LPS (0.5 mg/kg x h). MLT (3 x 3 mg/kg x 15 min) and SAR (0.28 mg/kg x 15 min) was applied intravenously as three 15-min infusion directly before and 120 min and 240 min after starting LPS administration. CIT (0.46 mg/kg x 15 min) was infused intravenously only 15 min before starting the LPS infusion. To study the kinetic of clot formation *via* thromboelastometry and to determine the amount of platelets, blood samples were taken from the femoral artery catheter every hour. Venous Blood was drawn from healthy volunteers to study platelet activation by impedance aggregometry.

The continuous infusion of LPS led initially to a hypercoagulable state and finally to a hypocoagulable state and a decrease of platelet count. The administration of MLT before and during sub-acute endotoxaemia had no influence on the LPS-induced alterations in parameters of thromboelastometry. However, MLT caused a significant reduction of the LPS-induced decrease of platelet count. The application of CIT before sub-acute endotoxaemia affected a initial increased activation of coagulation and later a diminished LPS-induced hypocoagulable state. The infusion SAR before and during sub-acute endotoxaemia reduced also the LPS-induced hypocoagulable state. The platelet count was diminished in the LPS+CIT-group and in the LPS+SAR-group compared to the LPS-group. *In vitro*, MLT, CIT and SAR caused a dose-dependent inhibition of serotonin-induced platelet activation (IC₅₀= ~1413 µM MLT, ~58 µM CIT, ~48 µM SAR).

These results indicate that the administration of MLT does diminish LPS-induced thrombocytopenia, but not the LPS-induced DIC during sub-acute endotoxaemia. The selective serotonin antagonists CIT and SAR affected, in contrast to MLT, a significant reduction of the hypocoagulable state. The transport of serotonin in platelets as well as activation of platelets *via* receptor 5-HT_{2A} seemed to be essential for platelet homeostasis, because an inhibition of both processes by CIT and SAR caused a reduction of platelet count. In contrast to the *in vivo* experiments, *in vitro* experiments showed a serotonin-antagonistic action of MLT on platelets. But this could only be reached at high concentration of MLT (mM) and has consequently no relevance *in vivo*.

10. Literaturverzeichnis

- [1] Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med.* 2007;33:606-18.
- [2] Moerer O, Schmid A, Hofmann M, Herklotz A, Reinhart K, Werdan K, et al. Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. *Intensive Care Med.* 2002;28:1440-6.
- [3] Levi M. Disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med.* 2007;35:2191-5.
- [4] Dhainaut JF, Yan SB, Joyce DE, Pettila V, Basson B, Brandt JT, et al. Treatment effects of drotrecogin alfa (activated) in patients with severe sepsis with or without overt disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost.* 2004;2:1924-33.
- [5] Tsao CM, Ho ST, Wu CC. Coagulation abnormalities in sepsis. *Acta Anaesthesiol Taiwan.* 2015;53:16-22.
- [6] 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.* 1992;20:864-74.
- [7] Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, et al. Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)). *Ger Med Sci.* 2010;8:1-86.
- [8] Heyes H, Kohle W, Slijepcevic B. The appearance of schistocytes in the peripheral blood in correlation to the degree of disseminated intravascular coagulation. An experimental study in rats. *Haemostasis.* 1976;5:66-73.
- [9] Toh CH, Hoots WK. The scoring system of the Scientific and Standardisation Committee on Disseminated Intravascular Coagulation of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: a 5-year overview. *J Thromb Haemost.* 2007;5:604-6.
- [10] Berthelsen LO, Kristensen AT, Tranholm M. Animal models of DIC and their relevance to human DIC: a systematic review. *Thromb Res.* 2011;128:103-16.

- [11] Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:2744-8.
- [12] Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*. 1999;274:10689-92.
- [13] Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 1999;189:1777-82.
- [14] Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*. 2013;45:66.
- [15] Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*. 2004;113:153-62.
- [16] Zhang G, Han J, Welch EJ, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya TA, Malik AB, et al. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol*. 2009;182:7997-8004.
- [17] Moore KL, Andreoli SP, Esmon NL, Esmon CT, Bang NU. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J Clin Invest*. 1987;79:124-30.
- [18] Guha M, O'Connell MA, Pawlinski R, Hollis A, McGovern P, Yan SF, et al. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood*. 2001;98:1429-39.
- [19] Colucci M, Paramo JA, Collen D. Generation in plasma of a fast-acting inhibitor of plasminogen activator in response to endotoxin stimulation. *J Clin Invest*. 1985;75:818-24.
- [20] Asakura H, Suga Y, Yoshida T, Ontachi Y, Mizutani T, Kato M, et al. Pathophysiology of disseminated intravascular coagulation (DIC) progresses at a different rate in tissue factor-induced and lipopolysaccharide-induced DIC models in rats. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003;14:221-8.

- [21] Tsai HJ, Tsao CM, Liao MH, Ka SM, Liaw WJ, Wu CC. Application of thrombelastography in liver injury induced by endotoxin in rat. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2012;23:118-26.
- [22] Yoshikawa T, Furukawa Y, Murakami M, Takemura S, Kondo M. Experimental model of disseminated intravascular coagulation induced by sustained infusion of endotoxin. *Res Exp Med (Berl)*. 1981;179:223-8.
- [23] Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee Y, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*. 1958;80:2587-7.
- [24] Hardeland R, Balzer I, Poeggeler B, Fuhrberg B, Uria H, Behrmann G, et al. On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. *J Pineal Res*. 1995;18:104-11.
- [25] Underwood H, Goldman BD. Vertebrate circadian and photoperiodic systems: role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms*. 1987;2:279-315.
- [26] Gern WA, Ralph CL. Melatonin synthesis by the retina. *Science*. 1979;204:183-4.
- [27] Raikhlin NT, Kvetnoy IM, Tolkachev VN. Melatonin may be synthesised in enterochromaffin cells. *Nature*. 1975;255:344-5.
- [28] Slominski A, Pisarchik A, Zbytek B, Tobin DJ, Kauser S, Wortsman J. Functional activity of serotonergic and melatonergic systems expressed in the skin. *J Cell Physiol*. 2003;196:144-53.
- [29] Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res*. 2000;28:193-202.
- [30] Itoh MT, Ishizuka B, Kudo Y, Fusama S, Amemiya A, Sumi Y. Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary. *Mol Cell Endocrinol*. 1997;136:7-13.
- [31] Tijmes M, Pedraza R, Valladares L. Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids*. 1996;61:65-8.
- [32] Finocchiaro LM, Nahmod VE, Launay JM. Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. *Biochem J*. 1991;280:727-31.
- [33] Launay JM, Lamaitre BJ, Husson HP, Dreux C, Hartmann L, Da Prada M. Melatonin synthesis by rabbit platelets. *Life Sci*. 1982;31:1487-94.

- [34] Lovenberg W, Jequier E, Sjoerdsma A. Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science*. 1967;155:217-9.
- [35] Clark CT, Weissbach H, Udenfriend S. 5-Hydroxytryptophan decarboxylase: preparation and properties. *J Biol Chem*. 1954;210:139-48.
- [36] Klein DC, Berg GR. Pineal gland: stimulation of melatonin production by norepinephrine involves cyclic AMP-mediated stimulation of N-acetyltransferase. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1970;3:241-63.
- [37] Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science*. 1960;131:1312.
- [38] Challet E. Minireview: Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology*. 2007;148:5648-55.
- [39] Coomans CP, Ramkisoensing A, Meijer JH. The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. *Front Neuroendocrinol*. 2015;37:29-42.
- [40] Klein DC, Weller JL. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science*. 1970;169:1093-5.
- [41] Rollag MD, Morgan RJ, Niswender GD. Route of melatonin secretion in sheep. *Endocrinology*. 1978;102:1-8.
- [42] Cardinali DP, Lynch HJ, Wurtman RJ. Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology*. 1972;91:1213-8.
- [43] Waldhauser F, Weiszenbacher G, Frisch H, Zeitlhuber U, Waldhauser M, Wurtman RJ. Fall in nocturnal serum melatonin during prepuberty and pubescence. *Lancet*. 1984;1:362-5.
- [44] Facciola G, Hidestrand M, von Bahr C, Tybring G. Cytochrome P450 isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes. *Eur J Clin Pharmacol*. 2001;56:881-8.
- [45] Kopin IJ, Pare CM, Axelrod J, Weissbach H. 6-Hydroxylation, the major metabolic pathway for melatonin. *Biochim Biophys Acta*. 1960;40:377-8.
- [46] Bojkowski CJ, Arendt J, Shih MC, Markey SP. Melatonin secretion in humans assessed by measuring its metabolite, 6-sulfatoxymelatonin. *Clin Chem*. 1987;33:1343-8.
- [47] Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev*. 2003;55:325-95.

- [48] Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*. 1994;13:1177-85.
- [49] Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:8734-8.
- [50] New DC, Tsim ST, Wong YH. G protein-linked effector and second messenger systems involved in melatonin signal transduction. *Neurosignals*. 2003;12:59-70.
- [51] Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, et al. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem*. 2000;275:31311-7.
- [52] Benitez-King G, Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci*. 1993;53:201-7.
- [53] Macias M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, et al. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem*. 2003;270:832-40.
- [54] Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem*. 1994;269:28531-4.
- [55] Doolen S, Krause DN, Dubocovich ML, Duckles SP. Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 1998;345:67-9.
- [56] Effenberger-Neidnicht K, Al Nator M, Brencher L, Oude Lansink M, de Groot H. Prevention of endotoxin-induced hypotension in rats by the circadian hormone melatonin. *Infection*. 2013;41:11-2.
- [57] Paulis L, Simko F. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind. *Physiol Res*. 2007;56:671-84.
- [58] Girouard H, Denault C, Chulak C, de Champlain J. Treatment by n-acetylcysteine and melatonin increases cardiac baroreflex and improves antioxidant reserve. *Am J Hypertens*. 2004;17:947-54.
- [59] K-Laflamme A, Wu L, Foucart S, de Champlain J. Impaired basal sympathetic tone and alpha1-adrenergic responsiveness in association with the hypotensive effect of melatonin in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1998;11:219-29.

- [60] Kawashima K, Miwa Y, Fujimoto K, Oohata H, Nishino H, Koike H. Antihypertensive action of melatonin in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens A*. 1987;9:1121-31.
- [61] Reppert SM, Weaver DR, Rivkees SA, Stopa EG. Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science*. 1988;242:78-81.
- [62] Irmak MK, Sizlan A. Essential hypertension seems to result from melatonin-induced epigenetic modifications in area postrema. *Med Hypotheses*. 2006;66:1000-7.
- [63] Wang F, Li J, Wu C, Yang J, Xu F, Zhao Q. The GABA(A) receptor mediates the hypnotic activity of melatonin in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003;74:573-8.
- [64] Vacas MI, Del Zar MM, Martinuzzo M, Cardinali DP. Binding sites for [3H]-melatonin in human platelets. *J Pineal Res*. 1992;13:60-5.
- [65] Yau MY, Pang CS, Kravtsov G, Pang SF, Shiu SY. 2[125I]Iodomelatonin binding sites in guinea pig platelets. *J Pineal Res*. 2002;32:97-105.
- [66] Kornblihtt LI, Finocchiaro L, Molinas FC. Inhibitory effect of melatonin on platelet activation induced by collagen and arachidonic acid. *J Pineal Res*. 1993;14:184-91.
- [67] Del Zar MM, Martinuzzo M, Falcon C, Cardinali DP, Carreras LO, Vacas MI. Inhibition of human platelet aggregation and thromboxane-B2 production by melatonin: evidence for a diurnal variation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;70:246-51.
- [68] Del Zar MM, Martinuzzo M, Cardinali DP, Carreras LO, Vacas MI. Diurnal variation in melatonin effect on adenosine triphosphate and serotonin release by human platelets. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1990;123:453-8.
- [69] Leach CM, Thorburn GD. A comparison of the inhibitory effects of melatonin and indomethacin on platelet aggregation and thromboxane release. *Prostaglandins*. 1980;20:51-6.
- [70] Martinuzzo M, Del Zar MM, Cardinali DP, Carreras LO, Vacas MI. Melatonin effect on arachidonic acid metabolism to cyclooxygenase derivatives in human platelets. *J Pineal Res*. 1991;11:111-5.
- [71] Martin FJ, Atienza G, Aldegunde M, Miguez JM. Melatonin effect on serotonin uptake and release in rat platelets: diurnal variation in responsiveness. *Life Sci*. 1993;53:1079-87.
- [72] Valevski A, Modai I, Jerushalmy Z, Kikinon L, Weizman A. Effect of melatonin on active transport of serotonin into blood platelets. *Psychiatry Res*. 1995;57:193-6.

- [73] Wirtz PH, Spillmann M, Bartschi C, Ehlert U, von Kanel R. Oral melatonin reduces blood coagulation activity: a placebo-controlled study in healthy young men. *J Pineal Res.* 2008;44:127-33.
- [74] Ye JY, Liang EY, Cheng YS, Chan GC, Ding Y, Meng F, et al. Serotonin enhances megakaryopoiesis and proplatelet formation via p-Erk1/2 and F-actin reorganization. *Stem Cells.* 2014;32:2973-82.
- [75] Koc M, Buyukokuroglu ME, Taysi S. The effect of melatonin on peripheral blood cells during total body irradiation in rats. *Biol Pharm Bull.* 2002;25:656-7.
- [76] Anwar MM, Mahfouz HA, Sayed AS. Potential protective effects of melatonin on bone marrow of rats exposed to cytotoxic drugs. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 1998;119:493-501.
- [77] Rapozzi V, Zorzet S, Comelli M, Mavelli I, Perissin L, Giraldi T. Melatonin decreases bone marrow and lymphatic toxicity of adriamycin in mice bearing TLX5 lymphoma. *Life Sci.* 1998;63:1701-13.
- [78] Lissoni P, Tancini G, Barni S, Paolorossi F, Rossini F, Maffe P, et al. The pineal hormone melatonin in hematology and its potential efficacy in the treatment of thrombocytopenia. *Recenti Prog Med.* 1996;87:582-5.
- [79] Lissoni P, Mandala M, Rossini F, Fumagalli L, Barni S. Growth Factors: Thrombopoietic Property of the Pineal Hormone Melatonin. *Hematology.* 1999;4:335-43.
- [80] Viviani S, Negretti E, Orazi A, Sozzi G, Santoro A, Lissoni P, et al. Preliminary studies on melatonin in the treatment of myelodysplastic syndromes following cancer chemotherapy. *J Pineal Res.* 1990;8:347-54.
- [81] Maestroni GJ. kappa-Opioid receptors in marrow stroma mediate the hematopoietic effects of melatonin-induced opioid cytokines. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;840:411-9.
- [82] Sewerynek E, Melchiorri D, Reiter RJ, Ortiz GG, Lewinski A. Lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity is inhibited by the antioxidant melatonin. *Eur J Pharmacol.* 1995;293:327-34.
- [83] Crespo E, Macias M, Escames G, Martin M, Vives F, Guerrero JM, et al. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J.* 1999;13:1537-46.

- [84] Wu C-C, Chiao C-W, Hsiao G, Chen A, Yen M-H. Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats. *J Pineal Res.* 2001;30:147-56.
- [85] Yerer MB, Yapislar H, Aydogan S, Yalcin O, Baskurt O. Lipid peroxidation and deformability of red blood cells in experimental sepsis in rats: The protective effects of melatonin. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2004;30:77-82.
- [86] Bitzer-Quintero OK, Ortiz GG, Ruiz-Rizo L, Torres-Mendoza BM, Vazques-Vallis E, Rodriguez-Perez M. Effects of melatonin on plasma levels of TNF α , IL-1 and IL-6 in mice after lipopolysaccharide administration. *Biol Rhythm Res.* 2005;36:159-68.
- [87] Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Naji L, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave I, Guerrero JM, et al. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: Regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J Pineal Res.* 2005;39:400-8.
- [88] Escames G, Lopez LC, Ortiz F, Ros E, Acuna-Castroviejo D. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol.* 2006;41:1165-73.
- [89] De Fillipps D, Iuvone T, Esposito G, Steardo L, Arnold GH, Pelckmans Paul A, et al. Melatonin reverses lipopolysaccharide-induced gastro-intestinal motility disturbances through the inhibition of oxidative stress. *J Pineal Res.* 2008;44:45-51.
- [90] Shang Y, Xu SP, Wu Y, Jiang YX, Wu ZY, Yuan SY, et al. Melatonin reduces acute lung injury in endotoxemic rats. *Chin Med J (Engl).* 2009;122:1388-93.
- [91] Tyagi E, Agrawal R, Nath C, Shukla R. Effect of melatonin on neuroinflammation and acetylcholinesterase activity induced by LPS in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 2010;640:206-10.
- [92] Lowes DA, Webster NR, Murphy MP, Galley HF. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *Br J Anaesth.* 2013;110:472-80.
- [93] Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Spence DW, Kato H, Cardinali DP. Melatonin in septic shock: some recent concepts. *J Crit Care.* 2010;25:656.e1-e6.
- [94] Tan D-X, Chen L, Poeggeler B, Manchester L, Reiter R. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J.* 1993;1:57-60.

- [95] Xing HY, Ling YL, Meng AH, Zhao XY, Huang XL. Melatonin improves vascular reactivity of endotoxemia rats. *Sheng Li Xue Bao.* 2005;57:367-72.
- [96] d'Emmanuele di Villa Bianca R, Marzocco S, Di Paola R, Autore G, Pinto A, Cuzzocrea S, et al. Melatonin prevents lipopolysaccharide-induced hyporeactivity in rat. *J Pineal Res.* 2004;36:146-54.
- [97] Baykal A, Iskit AB, Hamaloglu E, Guc AO, Hascelik G, Sayek I. Melatonin modulates mesenteric blood flow and TNF α concentration after lipopolysaccharide challenge. *Eur J Surg.* 2000;166:722-27.
- [98] Effenberger-Neidnicht K, Brencher L, Broecker-Preuss M, Hamburger T, Petrat F, de Groot H. Immune stimulation by exogenous melatonin during experimental endotoxemia. *Inflammation.* 2014;37:738-44.
- [99] Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ, Tan DX, Cuzzocrea S, Chiurazzi P, et al. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res.* 2001;50:756-60.
- [100] Rapport MM, Green AA, Page IH. Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *J Biol Chem.* 1948;174:735-41.
- [101] Rapport MM. Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J Biol Chem.* 1949;180:961-9.
- [102] Twarog BM, Page IH. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol.* 1953;175:157-61.
- [103] Olivier B. Serotonin: a never-ending story. *Eur J Pharmacol.* 2015;753:2-18.
- [104] Fidalgo S, Ivanov DK, Wood SH. Serotonin: from top to bottom. *Biogerontology.* 2013;14:21-45.
- [105] Waalkes TP, Coburn H. Conversion of serotonin (5-hydroxytryptamine) to 5-hydroxyindoleacetic acid by rabbit blood. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1958;99:742-6.
- [106] Beikmann BS, Tomlinson ID, Rosenthal SJ, Andrews AM. Serotonin uptake is largely mediated by platelets versus lymphocytes in peripheral blood cells. *ACS Chem Neurosci.* 2013;4:161-70.
- [107] Beck O, Wallen NH, Broijersen A, Larsson PT, Hjemdahl P. On the accurate determination of serotonin in human plasma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;196:260-6.

- [108] Brenner B, Harney JT, Ahmed BA, Jeffus BC, Unal R, Mehta JL, et al. Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. *J Neurochem.* 2007;102:206-15.
- [109] Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev.* 1994;46:157-203.
- [110] Gamoh S, Hisa H, Yamamoto R. 5-hydroxytryptamine receptors as targets for drug therapies of vascular-related diseases. *Biol Pharm Bull.* 2013;36:1410-5.
- [111] Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med.* 2009;60:355-66.
- [112] Holmsen H, Weiss HJ. Secretable storage pools in platelets. *Annu Rev Med.* 1979;30:119-34.
- [113] Benedict CR, Mathew B, Rex KA, Cartwright J, Jr., Sordahl LA. Correlation of plasma serotonin changes with platelet aggregation in an in vivo dog model of spontaneous occlusive coronary thrombus formation. *Circ Res.* 1986;58:58-67.
- [114] Li N, Wallen NH, Ladjevardi M, Hjemdahl P. Effects of serotonin on platelet activation in whole blood. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1997;8:517-23.
- [115] Walther DJ, Peter JU, Winter S, Holtje M, Paulmann N, Grohmann M, et al. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell.* 2003;115:851-62.
- [116] Duerschmied D, Canault M, Lievens D, Brill A, Cifuni SM, Bader M, et al. Serotonin stimulates platelet receptor shedding by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17). *J Thromb Haemost.* 2009;7:1163-71.
- [117] Carneiro AM, Cook EH, Murphy DL, Blakely RD. Interactions between integrin alphaIIb beta3 and the serotonin transporter regulate serotonin transport and platelet aggregation in mice and humans. *J Clin Invest.* 2008;118:1544-52.
- [118] Yang M, Srikiatkachorn A, Anthony M, Chesterman CN, Chong BH. Serotonin uptake, storage and metabolism in megakaryoblasts. *Int J Hematol.* 1996;63:137-42.
- [119] Tytgat GA, van den Brug MD, Voute PA, Smets LA, Rutgers M. Human megakaryocytes cultured in vitro accumulate serotonin but not meta-iodobenzylguanidine whereas platelets concentrate both. *Exp Hematol.* 2002;30:555-63.

- [120] White JG. Serotonin storage organelles in human megakaryocytes. *Am J Pathol.* 1971;63:403-10.
- [121] Tranzer JP, da Prada M, Pletscher A. Storage of 5-hydroxytryptamine in megakaryocytes. *J Cell Biol.* 1972;52:191-7.
- [122] Hyttel J. Neurochemical characterization of a new potent and selective serotonin uptake inhibitor: Lu 10-171. *Psychopharmacology (Berl).* 1977;51:225-33.
- [123] Rote Liste 2015, Arzneimittelverzeichnis für Deutschland (einschließlich EU-Zulassungen und bestimmter Medizinprodukte). Rote Liste Service GmbH (Frankfurt am Main). 2015;55. Auflage:41-2.
- [124] Sanchez C. The pharmacology of citalopram enantiomers: the antagonism by R-citalopram on the effect of S-citalopram. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006;99:91-5.
- [125] Rochat B, Baumann P, Audus KL. Transport mechanisms for the antidepressant citalopram in brain microvessel endothelium. *Brain Res.* 1999;831:229-36.
- [126] Zhong H, Haddjeri N, Sanchez C. Escitalopram, an antidepressant with an allosteric effect at the serotonin transporter--a review of current understanding of its mechanism of action. *Psychopharmacology (Berl).* 2012;219:1-13.
- [127] Milne RJ, Goa KL. Citalopram. *Drugs.* 1991;41:450-77.
- [128] Fredricson Overo K. Kinetics of citalopram in man; plasma levels in patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1982;6:311-8.
- [129] Zhang P, Cyriac G, Kopajtic T, Zhao Y, Javitch JA, Katz JL, et al. Structure-activity relationships for a novel series of citalopram (1-(3-(dimethylamino)propyl)-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carbonitrile) analogues at monoamine transporters. *J Med Chem.* 2010;53:6112-21.
- [130] Tecco J, Monreal J, Staner L. Citalopram may reduce sympathoadrenal hyperactivity in elderly depressed patients: an open multicenter study in Belgium and Luxembourg. *Psychiatr Danub.* 2011;23 Suppl 1:35-42.
- [131] Hamplova-Peichlova J, Krusek J, Paclt I, Slavicek J, Lisa V, Vyskocil F. Citalopram inhibits L-type calcium channel current in rat cardiomyocytes in culture. *Physiol Res.* 2002;51:317-21.

- [132] Hallback I, Hagg S, Eriksson AC, Whiss PA. In vitro effects of serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors on human platelet adhesion and coagulation. *Pharmacol Rep.* 2012;64:979-83.
- [133] Tseng YL, Chiang ML, Huang TF, Su KP, Lane HY, Lai YC. A selective serotonin reuptake inhibitor, citalopram, inhibits collagen-induced platelet aggregation and activation. *Thromb Res.* 2010;126:517-23.
- [134] Tseng YL, Chiang ML, Lane HY, Su KP, Lai YC. Selective serotonin reuptake inhibitors reduce P2Y₁₂ receptor-mediated amplification of platelet aggregation. *Thromb Res.* 2013;131:325-32.
- [135] Oruch R, Hodneland E, Pryme IF, Holmsen H. In thrombin stimulated human platelets Citalopram, Promethazine, Risperidone, and Ziprasidone, but not Diazepam, may exert their pharmacological effects also through intercalation in membrane phospholipids in a receptor-independent manner. *J Chem Biol.* 2009;2:89-103.
- [136] Bardi P, de Lalla A, Urso R, Auteri A, Dell'Erba A, Bossini L, et al. Activity of citalopram on adenosine and serotonin circulating levels in depressed patients. *J Clin Psychopharmacol.* 2005;25:262-6.
- [137] Lopez-Vilchez I, Serra-Millas M, Navarro V, Rosa Hernandez M, Villalta J, Diaz-Ricart M, et al. Prothrombotic platelet phenotype in major depression: downregulation by antidepressant treatment. *J Affect Disord.* 2014;159:39-45.
- [138] Flock A, Zobel A, Bauriedel G, Tuleta I, Hammerstingl C, Hofels S, et al. Antiplatelet effects of antidepressant treatment: a randomized comparison between escitalopram and nortriptyline. *Thromb Res.* 2010;126:83-7.
- [139] Kurne A, Ertugrul A, Yağcıoğlu AEA, Yazıcı KM. Venous thromboembolism and escitalopram. *General hospital psychiatry.* 2004;26:481-3.
- [140] Ataoglu A, Canan F. Mean platelet volume in patients with major depression: effect of escitalopram treatment. *J Clin Psychopharmacol.* 2009;29:368-71.
- [141] Song HR, Jung YE, Wang HR, Woo YS, Jun TY, Bahk WM. Platelet count alterations associated with escitalopram, venlafaxine and bupropion in depressive patients. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2012;66:457-9.

- [142] Tynan RJ, Weidenhofer J, Hinwood M, Cairns MJ, Day TA, Walker FR. A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. *Brain Behav Immun.* 2012;26:469-79.
- [143] Rashid M, Manivet P, Nishio H, Pratuangdejkul J, Rajab M, Ishiguro M, et al. Identification of the binding sites and selectivity of sarpogrelate, a novel 5-HT₂ antagonist, to human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptor subtypes by molecular modeling. *Life Sci.* 2003;73:193-207.
- [144] Maruyama K, Kinami J, Sugita Y, Takada Y, Sugiyama E, Tsuchihashi H, et al. MCI-9042: high affinity for serotonergic receptors as assessed by radioligand binding assay. *J Pharmacobiodyn.* 1991;14:177-81.
- [145] Obata H, Saito S, Ishizaki K, Goto F. Antinociception in rat by sarpogrelate, a selective 5-HT_{2A} receptor antagonist, is peripheral. *Eur J Pharmacol.* 2000;404:95-102.
- [146] Komatsu T, Enjouji S, Nakai H, Inokuchi T, Iida S. Studies on the metabolic fate of (±)-2-(Dimethylamino)-1-[[o-(m-methoxyphenethyl)-phenoxy]methyl]ethylhydrogen succinate hydrochloride (MCI-9042) (II): absorption, distribution, metabolism and excretion after a single administration to rats. *Yakubutsu Dotai.* 1991;6:377-98.
- [147] Kim HJ, Jeong ES, Seo KA, Shin KJ, Choi YJ, Lee SJ, et al. Glucuronidation of a sarpogrelate active metabolite is mediated by UDP-glucuronosyltransferases 1A4, 1A9, and 2B4. *Drug Metab Dispos.* 2013;41:1529-37.
- [148] Nirogi R, Bhyrapuneni G, Muddana N, Budige G, Ajjala D, Chintanippula S, et al. Pharmacokinetics of Sarpogrelate following single intravenous or oral administration in rats. *Drug Metabolism Reviews* 2009;41:165-6.
- [149] Doggrell SA. Sarpogrelate: cardiovascular and renal clinical potential. *Expert Opin Investig Drugs.* 2004;13:865-74.
- [150] Hara H, Osakabe M, Kitajima A, Tamao Y, Kikumoto R. MCI-9042, a new antiplatelet agent is a selective 5-HT_{2B}-serotonergic receptor antagonist. *Thromb Haemost.* 1991;65:415-20.
- [151] Garcia-Pedraza JA, Garcia M, Martin ML, Gomez-Escudero J, Rodriguez-Barbero A, Roman LS, et al. Peripheral 5-HT_{1D} and 5-HT₇ serotonergic receptors modulate sympathetic neurotransmission in chronic sarpogrelate treated rats. *Eur J Pharmacol.* 2013;714:65-73.

- [152] Qi R, Ozaki Y, Satoh K, Kurota K, Asazuma N, Yatomi Y, et al. Quantitative measurement of various 5-HT receptor antagonists on platelet activation induced by serotonin. *Thromb Res.* 1996;81:43-54.
- [153] Nakamura K, Kariyazono H, Moriyama Y, Toyohira H, Kubo H, Yotsumoto G, et al. Effects of sarpogrelate hydrochloride on platelet aggregation, and its relation to the release of serotonin and P-selectin. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1999;10:513-9.
- [154] Nishiyama T. Acute effects of sarpogrelate, a 5-HT_{2A} receptor antagonist on cytokine production in endotoxin shock model of rats. *Eur J Pharmacol.* 2009;614:122-7.
- [155] Harpsoe NG, Andersen LP, Gogenur I, Rosenberg J. Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review. *Eur J Clin Pharmacol.* 2015;71:901-9.
- [156] Luddington RJ. Thrombelastography/thromboelastometry. *Clin Lab Haematol.* 2005;27:81-90.
- [157] Guedel AE. *Inhalation Anesthesia: A Fundamental Guide.* Anesthesia & Analgesia. 1937;16:119-20.
- [158] Frank KH, Kessler M, Appelbaum K, Dummler W. The Erlangen micro-lightguide spectrophotometer EMPHO I. *Phys Med Biol.* 1989;34:1883-900.
- [159] Schochl H, Solomon C, Schulz A, Voelckel W, Hanke A, Van Griensven M, et al. Thromboelastometry (TEM) findings in disseminated intravascular coagulation in a pig model of endotoxemia. *Mol Med.* 2011;17:266-72.
- [160] Muller MC, Meijers JC, Vroom MB, Juffermans NP. Utility of thromboelastography and/or thromboelastometry in adults with sepsis: a systematic review. *Crit Care.* 2014;18:30.
- [161] Zeerleder S, Hack CE, Wuillemin WA. Disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Chest.* 2005;128:2864-75.
- [162] Pappenheim A. Zur Blutzellfärbung im klinischen Bluttrockenpräparat und zur histologischen Schnittpräparatfärbung der hämatopoetischen Gewebe nach meinen Methoden. *Folia Haematol.* 1912;13:337-44.
- [163] Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods.* 1980;3:135-58.
- [164] Jones SB, Romano FD. Plasma catecholamines in the conscious rat during endotoxemia. *Circ Shock.* 1984;14:189-201.

- [165] Bucher M, Kees F, Taeger K, Kurtz A. Cytokines down-regulate alpha1-adrenergic receptor expression during endotoxemia. *Crit Care Med.* 2003;31:566-71.
- [166] Liaw SJ, Chen JC, Ng CJ, Chiu DF, Chen MF, Chen HM. Beneficial role of melatonin on microcirculation in endotoxin-induced gastropathy in rats: possible implication in nitrogen oxide reduction. *J Formos Med Assoc.* 2002;101:129-35.
- [167] Ramseyer VD, Garvin JL. Tumor necrosis factor-alpha: regulation of renal function and blood pressure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;304:1231-42.
- [168] Schmidt C, Hocherl K, Schweda F, Kurtz A, Bucher M. Regulation of renal sodium transporters during severe inflammation. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:1072-83.
- [169] Adembri C, Sgambati E, Vitali L, Selmi V, Margheri M, Tani A, et al. Sepsis induces albuminuria and alterations in the glomerular filtration barrier: a morphofunctional study in the rat. *Crit Care.* 2011;15:277.
- [170] Naikawadi RP, Cheng N, Vogel SM, Qian F, Wu D, Malik AB, et al. A critical role for phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 in endothelial junction disruption and vascular hyperpermeability. *Circ Res.* 2012;111:1517-27.
- [171] Hocherl K, Schmidt C, Kurt B, Bucher M. Inhibition of NF-kappaB ameliorates sepsis-induced downregulation of aquaporin-2/V2 receptor expression and acute renal failure in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;298:196-204.
- [172] Kilbourn RG, Gross SS, Jubran A, Adams J, Griffith OW, Levi R, et al. NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:3629-32.
- [173] Kumar A, Paladugu B, Mensing J, Kumar A, Parrillo JE. Nitric oxide-dependent and -independent mechanisms are involved in TNF-alpha -induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;292:1900-6.
- [174] Wray GM, Coakley JH. Severe septic shock unresponsive to noradrenaline. *Lancet.* 1995;346:1604.
- [175] Vallet B, Lund N, Curtis SE, Kelly D, Cain SM. Gut and muscle tissue PO₂ in endotoxemic dogs during shock and resuscitation. *J Appl Physiol (1985).* 1994;76:793-800.
- [176] Hagen J, Hagen P. Actions of adrenalin and noradrenalin on metabolic systems. *Actions of hormones on molecular processes.* 1964:268-319.

- [177] Hershey JC, Bond RF. The influence of sympathoadrenal activation on skeletal muscle oxygen extraction during endotoxemia. *Shock*. 1994;1:115-22.
- [178] Hargrove DM, Bagby GJ, Lang CH, Spitzer JJ. Adrenergic blockade prevents endotoxin-induced increases in glucose metabolism. *Am J Physiol*. 1988;255:629-35.
- [179] Lang CH, Bagby GJ, Blakesley HL, Spitzer JJ. Importance of hyperglucagonemia in eliciting the sepsis-induced increase in glucose production. *Circ Shock*. 1989;29:181-91.
- [180] Cherrington AD, Fuchs H, Stevenson RW, Williams PE, Alberti KG, Steiner KE. Effect of epinephrine on glycogenolysis and gluconeogenesis in conscious overnight-fasted dogs. *Am J Physiol*. 1984;247:137-44.
- [181] Stevenson RW, Steiner KE, Davis MA, Hendrick GK, Williams PE, Lacy WW, et al. Similar dose responsiveness of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis to glucagon in vivo. *Diabetes*. 1987;36:382-9.
- [182] Farrar WE, Jr., Watson JG. Hypoglycemia following endotoxin administration in animals with liver damage. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1964;115:833-7.
- [183] Miller SI, Wallace RJ, Jr., Musher DM, Septimus EJ, Kohl S, Baughn RE. Hypoglycemia as a manifestation of sepsis. *Am J Med*. 1980;68:649-54.
- [184] Davies SJ, Hood SD, Argyropoulos SV, Morris K, Bell C, Witchel HJ, et al. Depleting serotonin enhances both cardiovascular and psychological stress reactivity in recovered patients with anxiety disorders. *J Clin Psychopharmacol*. 2006;26:414-8.
- [185] Horn F. *Biochemie des Menschen (Das Lehrbuch für das Medizinstudium)*. Georg Thieme Verlag (Stuttgart). 2012;5. Auflage:582-3.
- [186] Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2013;50:23-36.
- [187] Crouser ED, Julian MW, Blaho DV, Pfeiffer DR. Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity. *Crit Care Med*. 2002;30:276-84.
- [188] Kraut JA, Madias NE. Lactic acidosis. *N Engl J Med*. 2014;371:2309-19.
- [189] Löfler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Medizin Verlag (Heidelberg). 2007;8. Auflage:372-4.
- [190] Klinke R, Silbernagl S. *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag (Stuttgart). 1996;2. Auflage:280-2.

- [191] Olson NC, Grizzle MK, Anderson DL. Effects of ketanserin on pulmonary hemodynamics, lung mechanics, and gas exchange in endotoxemic pigs. *Am J Vet Res.* 1986;47:2193-6.
- [192] Onimaru H, Shamoto A, Homma I. Modulation of respiratory rhythm by 5-HT in the brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Pflugers Arch.* 1998;435:485-94.
- [193] Referenzhandbuch der ABL700 Serie. Radiometer Medical (Brønshøj, Dänemark). 2004;Kapitel 6:28.
- [194] Brauckmann S, Effenberger-Neidnicht K, de Groot H, Nagel M, Mayer C, Peters J, et al. Mechanismen der Lipopolysaccharid-induzierten Hämolyse – Hinweise für eine direkte Zellmembraninteraktion. *Anästh Intensivmed.* 2015;56:2-40.
- [195] Zaloga GP. Ionized hypocalcemia during sepsis. *Crit Care Med.* 2000;28:266-8.
- [196] Carlstedt F, Eriksson M, Kiiski R, Larsson A, Lind L. Hypocalcemia during porcine endotoxemic shock: effects of calcium administration. *Crit Care Med.* 2000;28:2909-14.
- [197] Sayeed MM, Maitra SR. Effect of diltiazem on altered cellular calcium regulation during endotoxic shock. *Am J Physiol.* 1987;253:549-54.
- [198] Song SK, Karl IE, Ackerman JJ, Hotchkiss RS. Increased intracellular Ca²⁺: a critical link in the pathophysiology of sepsis? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:3933-7.
- [199] Rose S, Thompson KD, Sayeed MM. Ca(2+)-related hepatocellular alterations during intra-abdominal sepsis. *Am J Physiol.* 1992;263:553-8.
- [200] Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet.* 1993;341:515-8.
- [201] Holowaychuk MK, Martin LG. Review of hypocalcemia in septic patients. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care.* 2007;17:348-58.
- [202] Carpentieri A, Marchionatti A, Areco V, Perez A, Centeno V, Tolosa de Talamoni N. Antioxidant and antiapoptotic properties of melatonin restore intestinal calcium absorption altered by menadione. *Mol Cell Biochem.* 2014;387:197-205.
- [203] Huai J, Shao Y, Sun X, Jin Y, Wu J, Huang Z. Melatonin ameliorates acute necrotizing pancreatitis by the regulation of cytosolic Ca²⁺ homeostasis. *Pancreatology.* 2012;12:257-63.
- [204] Saini HK, Sharma SK, Zahradka P, Kumamoto H, Takeda N, Dhalla NS. Attenuation of the serotonin-induced increase in intracellular calcium in rat aortic smooth muscle cells by sarpogrelate. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003;81:1056-63.

- [205] Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med.* 2007;35:2408-16.
- [206] Terada Y, Eguchi Y, Nosaka S, Toba T, Nakamura T, Shimizu Y. Capillary endothelial thrombomodulin expression and fibrin deposition in rats with continuous and bolus lipopolysaccharide administration. *Laboratory investigation.* 2003;83:1165-73.
- [207] Gellerich FN, Trumbeckaite S, Opalka JR, Gellerich JF, Chen Y, Neuhof C, et al. Mitochondrial dysfunction in sepsis: evidence from bacteraemic baboons and endotoxaemic rabbits. *Biosci Rep.* 2002;22:99-113.
- [208] Brown GC. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 1995;369:136-9.
- [209] Herrero A, Barja G. Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 2000;32:609-15.
- [210] Demin OV, Kholodenko BN, Skulachev VP. A model of O₂-generation in the complex III of the electron transport chain. *Mol Cell Biochem.* 1998;184:21-33.
- [211] Dyson A, Stidwill R, Taylor V, Singer M. Tissue oxygen monitoring in rodent models of shock. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:526-33.
- [212] Porta F, Takala J, Weikert C, Bracht H, Kolarova A, Lauterburg BH, et al. Effects of prolonged endotoxemia on liver, skeletal muscle and kidney mitochondrial function. *Crit Care.* 2006;10:118.
- [213] Frank JJ, Bermes EW, Bickel MJ, Watkins BF. Effect of in vitro hemolysis on chemical values for serum. *Clin Chem.* 1978;24:1966-70.
- [214] Wroblewski F, Ladue JS. Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac with hepatic disease. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1956;91:569-71.
- [215] Dörner K. Taschenlehrbuch: Klinische Chemie und Hämatologie Georg Thieme Verlag (Stuttgart). 2009;7. Auflage:445-79.
- [216] Zur B. Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse. Dissertation (Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). 2005:47-55.

- [217] Wu J-Y, Tsou M-Y, Chen T-H, Chen S-J, Tsao C-M, Wu C-C. Therapeutic effects of melatonin on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J Pineal Res.* 2008;45:106-16.
- [218] Ding Y, Lin Y, Zhu T, Huang M, Xu Q. Interleukin 6 increases dysfunction of organs in sepsis rats through sirtuin 1. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7:2593-8.
- [219] Nandi D, Mishra MK, Basu A, Bishayi B. Protective effects of interleukin-6 in lipopolysaccharide (LPS)-induced experimental endotoxemia are linked to alteration in hepatic anti-oxidant enzymes and endogenous cytokines. *Immunobiology.* 2010;215:443-51.
- [220] Inoue K, Takano H, Shimada A, Morita T, Yanagisawa R, Sakurai M, et al. Cytoprotection by interleukin-6 against liver injury induced by lipopolysaccharide. *Int J Mol Med.* 2005;15:221-4.
- [221] Zacharowski K, Sucker C, Zacharowski P, Hartmann M. Thrombelastography for the monitoring of lipopolysaccharide induced activation of coagulation. *Thromb Haemost.* 2006;95:557-61.
- [222] Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med.* 2010;38:26-34.
- [223] Kerr R, Stirling D, Ludlam CA. Interleukin 6 and haemostasis. *Br J Haematol.* 2001;115:3-12.
- [224] Hoppensteadt D, Tsuruta K, Hirman J, Kaul I, Osawa Y, Fareed J. Dysregulation of inflammatory and hemostatic markers in sepsis and suspected disseminated intravascular coagulation. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2015;21:120-7.
- [225] Wadenvik H, Kutti J. The spleen and pooling of blood cells. *Eur J Haematol.* 1988;41:1-5.
- [226] Freden K, Lundborg P, Vilen L, Kutti J. The peripheral platelet count in response to adrenergic alpha-and beta-1-receptor stimulation. *Scand J Haematol.* 1978;21:427-32.
- [227] Ojiri Y, Noguchi K, Shiroma N, Matsuzaki T, Sakanashi M, Sakanashi M. Uneven changes in circulating blood cell counts with adrenergic stimulation to the canine spleen. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002;29:53-9.
- [228] Ishii H, Tanaka N, Kobayashi M, Kato M, Sakuma Y. Gene structures, biochemical characterization and distribution of rat melatonin receptors. *J Physiol Sci.* 2009;59:37-47.

- [229] Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, Devine MT, Richardson JL, Ehrlicher A, et al. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol.* 2010;191:861-74.
- [230] Kehrel B. Blutplättchen: Biochemie und Physiologie. *Hämostaseologie.* 2003;23:149-58.
- [231] Paul SM, Rehavi M, Rice KC, Ittah Y, Skolnick P. Does high affinity [3H] imipramine binding label serotonin reuptake sites in brain and platelet? *Life Sci.* 1981;28:2753-60.
- [232] Wennogle LP, Meyerson LR. Serotonin modulates the dissociation of [3H]imipramine from human platelet recognition sites. *Eur J Pharmacol.* 1982;86:303-7.
- [233] Matheus N, Mendoza C, Iceta R, Mesonero JE, Alcalde AI. Melatonin inhibits serotonin transporter activity in intestinal epithelial cells. *J Pineal Res.* 2010;48:332-9.
- [234] Brencher L. Protektive Wirkung von therapeutisch verabreichtem Melatonin in der Endotoxinämie in männlichen Wistar-Ratten. Bachelorarbeit (Studiengang Medizinische Biologie an der Universität Duisburg-Essen). 2013.
- [235] Galley HF, Lowes DA, Allen L, Cameron G, Aucott LS, Webster NR. Melatonin as a potential therapy for sepsis: a phase I dose escalation study and an ex vivo whole blood model under conditions of sepsis. *J Pineal Res.* 2014;56:427-38.
- [236] Seabra ML, Bignotto M, Pinto LR, Jr., Tufik S. Randomized, double-blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment. *J Pineal Res.* 2000;29:193-200.
- [237] Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Mol Interv.* 2004;4:109-23.
- [238] Shaikh Q, Kamal AK. Sarpogrelate- another new antiplatelet agent? *J Pak Med Assoc.* 2012;62:1253.
- [239] World Health Organization (WHO). Sarpogrelate: revised data sheet. *WHO Drug Information.* 2001;15:26.

11. Anhang

Tabelle 7: Effekte von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Sauerstoffsättigung (sO₂), die relative Hämoglobinmenge (rHb) und den Blutfluss (Flow) in der Haut und im Skelettmuskel der linken Hinterpfote der Tiere unter Kontrollbedingungen und während der subakuten Endotoxinämie. Lipopolysaccharid (LPS) wurde als Dauerinfusion (0,5 mg LPS/kg x h) über 6 Stunden ab dem Zeitpunkt T= 0 min verabreicht. Melatonin (3 mg MLT/kg) und Sarpogrelate (0,28 mg SAR/kg) wurden als 15-minütige Kurzzeitinfusion zu den Zeitpunkten T= -15 min, 120 min und 240 min appliziert. Citalopram (0,46 mg CIT/kg) wurde als 15-minütige Kurzzeitinfusion zum Zeitpunkt T= -15 min infundiert. Die Ergebnisse der *oxygen to see*-Messung der Gruppen SHAM (n=7), MLT (n=8), CIT (n=4), SAR (n=4), LPS (n=12), LPS+MLT (n=12), LPS+CIT (n=4), LPS+SAR (n=4) sind als Mittelwerte±SEM bis zum Zeitpunkt 300 min dargestellt. #p< 0,05 (vs. SHAM, sd), ##p< 0,05 (vs. SHAM, rm), *p< 0,05 (vs. LPS, sd), **p< 0,05 (vs. LPS, rm).

Zeit[min]	0	60	120	180	240	300
sO₂ Haut [%]						
SHAM	84±2	84±2	83±1	82±4	73±5	78±2
MLT	81±2	80±2	80±2	76±2	72±3	76±2
CIT	77±3	77±3##	74±2##	79±2	78±1	78±2
SAR	80±1	80±1	80±3	81±2	79±2	77±3
LPS	76±2##	80±2##	74±1##	76±2##	64±5##	60±6##
LPS+MLT	83±1*	78±2	78±1*	70±3	61±5	71±3
LPS+CIT	83±2	81±3	80±2*	77±2	73±1	74±1
LPS+SAR	82±3	75±3	76±3	72±4	68±1	68±6
sO₂ Skelettmuskel [%]						
SHAM	83±8	95±2	96±1	94±3	92±3	96±1
MLT	85±8	97±1	95±1	95±1	96±1	95±1
CIT	89±8	96±1	99±1	96±2	86±8	97±0,3
SAR	97±1	96±2	95±2	98±0,5	97±1	97±1
LPS	98±1#	94±3	97±1	97±0,5	90±3	85±4#
LPS+MLT	98±1	97±1	96±1	86±6	94±1	85±5
LPS+CIT	96±2	96±2	96±1	84±7	90±4	93±2
LPS+SAR	98±1	97±1	95±2	93±3	90±4	96±1

Zeit[min]	0	60	120	180	240	300
rHb Haut [AU]						
SHAM	75±4	67±3	63±4	64±3	64±2	60±3
MLT	80±6	75±3	72±5	64±6	62±5	63±5
CIT	88±4	83±6#	75±5	74±2	75±1	74±4
SAR	90±2###	89±3###	90±2###	90±5###	84±5###	79±6###
LPS	75±4	71±4	66±4	68±4	62±3	61±6
LPS+MLT	74±4	72±4	71±3	65±3	62±4	61±3
LPS+CIT	90±4	81±3	82±3**	81±3**	75±3	65±6
LPS+SAR	91±3*	81±5	88±3*	76±5	70±5	68±5
rHb Skelettmuskel [AU]						
SHAM	95±11	112±13	87±10	105±16	77±7	74±6
MLT	80±7	96±5	86±6	86±8	67±9	69±6
CIT	94±4	89±4	83±4	65±7#	67±7	63±6
SAR	96±8	80±9#	76±9	72±7#	60±6	74±8
LPS	97±3	93±2#	79±3	82±3	67±3	63±4
LPS+MLT	92±4	91±4	81±5	78±5	70±4	58±5
LPS+CIT	87±5	83±5	81±5	60±5*	73±6	73±13
LPS+SAR	93±3	78±4*	79±6	71±7	53±6	72±9
Flow Haut [AU]						
SHAM	290±34	284±25	268±21	252±24	204±27	213±25
MLT	285±18	293±16	229±20	286±42	223±20	241±15
CIT	306±45	301±55	271±41	287±20	381±38#	267±49
SAR	429±46###	330±25###	358±33###	351±44###	426±24###	332±18###
LPS	297±15	289±23	270±33	276±25	206±21	215±36
LPS+MLT	326±12	312±27	278±26	275±24	202±20	208±26
LPS+CIT	370±70	318±44	336±60	399±28*	310±59	243±36
LPS+SAR	374±32*	317±64	396±46*	362±75	361±73*	241±23

Zeit[min]	0	60	120	180	240	300
Flow Skelettmuskel [AU]						
SHAM	363±58	321±35	300±39	377±48	322±37	271±12
MLT	419±35	368±23	428±34	384±34	286±32	375±21#
CIT	458±15	378±10	437±22#	309±68	236±54	334±68
SAR	466±52	365±42	428±59#	368±33	429±70	276±74
LPS	405±36	454±40#	351±28	367±20	332±25	275±22
LPS+MLT	552±67*	425±35	380±46	435±50	276±15	267±26
LPS+CIT	513±94	400±9	430±111	238±68	334±58	405±19*
LPS+SAR	367±40	349±46	408±54	295±58	186±23*	288±93

Tabelle 8: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf den pH-Wert, den Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂), den Sauerstoffpartialdruck (pO₂), den Base Excess (BE_{Ecf}), das Standardbicarbonat (HCO₃⁻), die Ionenkonzentration (K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Cl⁻), den Hämatokrit, die Konzentration von Glukose und Laktat im Vollblut der Tiere unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie. Lipopolysaccharid (LPS) wurde als Dauerinfusion (0,5 mg LPS/kg x h) über 6 Stunden ab dem Zeitpunkt T= 0 min verabreicht. Melatonin (3 mg MLT/kg) und Sarpogrelate (0,28 mg SAR/kg) wurden als 15-minütige Kurzzeitinfusion zu den Zeitpunkten T= -15 min, 120 min und 240 min appliziert. Citalopram (0,46 mg CIT/kg) wurde als 15-minütige Kurzzeitinfusion zum Zeitpunkt T= -15 min infundiert. Die Ergebnisse der Gruppen SHAM (n=8), MLT (n=8), CIT (n=4), SAR (n=4) LPS (n=12), LPS+MLT (n=12), LPS+CIT (n=4) und LPS+SAR (n=4) sind als Mittelwerte±SEM bis Zeitpunkt 300 min dargestellt. #p< 0,05 (vs. SHAM, sd), ##p< 0,05 (vs. SHAM, rm), *p< 0,05 (vs. LPS, sd), **p< 0,05 (vs. LPS, rm).

Zeit [min]	0	60	120	180	240	300
pH						
SHAM	7,273±0,016	7,280±0,025	7,244±0,039	7,279±0,033	7,244±0,027	7,239±0,021
MLT	7,272±0,008	7,281±0,016	7,276±0,009	7,294±0,020	7,292±0,013	7,301±0,017#
CIT	7,308±0,017	7,276±0,027	7,334±0,025#	7,297±0,031	7,302±0,019	7,291±0,017
SAR	7,257±0,015	7,276±0,030	7,230±0,022	7,270±0,030	7,252±0,019	7,186±0,016
LPS	7,274±0,007	7,295±0,007	7,279±0,020	7,273±0,019	7,259±0,020	7,246±0,022
LPS+MLT	7,278±0,011	7,289±0,009	7,286±0,004	7,283±0,014	7,272±0,011	7,227±0,020
LPS+CIT	7,284±0,014	7,220±0,039*	7,240±0,026	7,288±0,008	7,195±0,066	7,235±0,040
LPS+SAR	7,305±0,021	7,317±0,012	7,305±0,003	7,273±0,036	7,216±0,059	7,196±0,060

Zeit [min]	0	60	120	180	240	300
pCO₂ [mmHg]						
SHAM	53,3±2,7	50,6±3,5	52,2±4,8	47,9±2,9	52,9±3,4	51,8±1,2
MLT	55,1±2,3	54,8±3,1	52,5±2,8	49,9±3,6	48,2±1,7	46,8±2,4
CIT	50,5±2,8	53,0±6,3	46,9±4,6	50,5±5,8	49,7±4,2	49,6±3,3
SAR	54,3±2,9	51,3±4,5	58,5±4,6	50,6±4,3	50,7±2,1	61,6±1,4
LPS	56,9±2,5	50,1±1,4	47,9±3,5	47,2±1,3	47,7±3,7	39,8±4,3#
LPS+MLT	57,4±1,8	50,2±1,4	49,8±2,5	49,1±2,6	45,6±2,1	44,2±3,6
LPS+CIT	51,0±3,4	55,8±4,9	55,2±4,1	46,2±6,1	60,8±13,0	47,1±2,3
LPS+SAR	49,1±3,3	41,0±0,7*	43,9±3,3	45,0±5,6	49,8±9,3	42,2±3,7
pO₂ [mmHg]						
SHAM	386±26	328±39	373±34	365±11	294±30	345±34
MLT	406±22	379±22	404±20	369±26	391±27	320±29
CIT	457±15	400±14	373±55	398±37	431±24#	373±37
SAR	405±27	331±32	368±8	346±37	299±33	341±28
LPS	380±24	425±20#	352±28	345±26	379±31	381±34
LPS+MLT	419±19	446±8	414±28	442±12*	400±21	413±15
LPS+CIT	387±41	411±42	353±40	445±8	343±46	358±73
LPS+SAR	455±8	368±67	456±7*	328±111	316±79	464±3
Base Excess (Ecf) [mM]						
SHAM	-2,4±1,1	-3,1±1,1	-4,8±1,1	-4,4±1,7	-4,0±1,1	-4,6±1,3
MLT	-1,5±0,9	-1,1±0,4	-2,3±0,9#	-2,5±0,8	-3,1±0,6	-3,3±0,5
CIT	-0,9±1,0	-2,4±0,9	-1,1±0,6#	-2,1±0,5	-1,9±0,6	-2,6±0,7
SAR	-2,8±0,3	-3,0±0,6	-3,2±0,4	-3,7±0,6	-4,7±0,8	-4,8±0,7
LPS	-0,6±0,9	-2,1±0,6	-4,3±0,7	-3,9±0,6	-5,8±0,4	-9,9±0,5#
LPS+MLT	-0,2±0,4	-2,5±0,4	-3,6±0,7	-3,5±0,4	-5,6±0,3	-9,0±0,5
LPS+CIT	-2,3±1,4	-4,7±2,2	-3,7±1,1	-4,2±3,2	-5,7±0,9	-7,0±1,4*
LPS+ SAR	-1,9±0,5	-4,7±0,8	-4,1±1,6	-5,8±0,1	-7,8±1,0*	-10,9±1,8

Zeit [min]	0	60	120	180	240	300
HCO₃⁻ [mM]						
SHAM	21,7±0,9	21,6±0,9	19,9±1,0	20,4±1,4	21,2±0,8	20,1±1,1
MLT	22,3±0,6	22,6±0,3	21,8±0,6#	21,8±0,6	21,4±0,5	21,3±0,4
CIT	23,1±0,8	21,7±0,4	23,1±0,4#	22,2±0,1	22,4±0,4	21,8±0,5
SAR	21,2±0,1	21,4±0,5	20,9±0,1	20,9±0,5	20,1±0,6	19,6±0,6
LPS	22,9±0,6	22,1±0,5	20,4±0,5	20,7±0,5	19,3±0,3##	16,2±0,4##
LPS+MLT	23,3±0,3	21,7±0,3	20,9±0,5	21,1±0,3	19,5±0,2	16,9±0,3
LPS+CIT	21,9±1,0	19,8±1,7*	20,6±0,9	20,7±2,3	19,0±0,9	18,4±1,2*
LPS+SAR	22,3±0,4	20,4±0,6	20,8±1,2	19,3±0,1	17,7±0,9*	15,5±1,5
cK⁺ [mM]						
SHAM	5,1±0,1	5,1±0,1	4,7±0,1	5,0±0,2	5,2±0,1	4,9±0,2
MLT	5,1±0,04	5,0±0,1	4,8±0,1	4,8±0,1	4,6±0,1#	4,7±0,2
CIT	4,6±0,2#	4,7±0,3	4,7±0,1	4,5±0,1	4,4±0,2#	4,4±0,1
SAR	5,1±0,1	5,1±0,03	5,0±0,1	4,8±0,1	4,8±0,1	4,8±0,04
LPS	5,2±0,1	5,0±0,1	4,4±0,2	5,0±0,1	5,3±0,2	5,8±0,2#
LPS+MLT	5,2±0,1	5,0±0,1	4,7±0,1	5,3±0,2	5,3±0,1	5,7±0,2
LPS+CIT	5,0±0,2	5,1±0,2	4,5±0,1	4,9±0,4	5,2±0,2	5,4±0,2
LPS+SAR	5,2±0,1	4,8±0,1	4,4±0,2	4,7±0,1	5,0±0,05	5,2±0,1
cNa⁺ [mM]						
SHAM	139±0,4	139±1	140±1	139±1	139±1	141±1
MLT	137±1##	137±1##	137±0,3##	138±1	138±0,5	138±0,3#
CIT	139±1	139±0,4	139±1	139±0,5	139±0,3	139±0,4
SAR	140±1	140±1	139±1	140±1	141±1	141±1
LPS	138±1	137±1#	140±1	140±1	141±1	141±1
LPS+MLT	138±0,3	139±0,4	140±0,2	140±0,4	141±0,5	142±0,4
LPS+CIT	138±0,3	138±0,3	138±1	139±1	142±1	142±1
LPS+SAR	140±0,3**	142±2**	141±1	141±0,3	143±1	143±1

Zeit [min]	0	60	120	180	240	300
cCa²⁺ [mM]						
SHAM	1,33±0,06	1,50±0,02	1,37±0,06	1,40±0,06	1,41±0,05	1,40±0,03
MLT	1,42±0,03	1,43±0,01#	1,40±0,03	1,39±0,03	1,41±0,01	1,40±0,02
CIT	1,39±0,06	1,44±0,04	1,45±0,01	1,45±0,02	1,43±0,01	1,41±0,02
SAR	1,47±0,02#	1,48±0,03	1,52±0,01#	1,49±0,01	1,48±0,01	1,48±0,02
LPS	1,40±0,01	1,35±0,02###	1,32±0,04###	1,33±0,02###	1,27±0,01###	1,18±0,02###
LPS+MLT	1,42±0,02	1,41±0,02*	1,38±0,02	1,36±0,02	1,28±0,03	1,19±0,03
LPS+CIT	1,45±0,03**	1,49±0,02**	1,41±0,02**	1,40±0,06**	1,38±0,003**	1,30±0,01**
LPS+SAR	1,46±0,01**	1,49±0,03**	1,40±0,03**	1,40±0,03**	1,35±0,02**	1,27±0,003**
cCl⁻ [mM]						
SHAM	110±1	112±2	112±1	114±2	114±1	115±2
MLT	110±1	109±1	110±1	112±1	112±0,5	113±1
CIT	111±1	113±1	111±0,3	112±0,4	114±3	113±1
SAR	113±1	114±1	113±1	115±1	115±1	115±1
LPS	109±1	110±1	113±1	114±1	116±1	118±1#
LPS+MLT	109±1	111±1	113±1	115±1	117±1	118±1
LPS+CIT	111±1	111±1	112±1	115±5	116±1	117±1
LPS+SAR	113±1	113±1*	117±1	115±2	117±2	118±1
Hämatokrit [%]						
SHAM	38,8±1,3	38,0±0,6	36,6±0,8	35,8±0,9	36,2±0,7	34,8±1,8
MLT	38,9±1,1	38,5±1,1	36,9±1,0	36,5±1,4	35,8±1,1	34,3±1,5
CIT	35,7±1,0	34,3±1,6	34,5±1,2	32,3±0,8	31,8±0,5###	30,1±0,2###
SAR	36,3±1,1	34,7±1,2	33,4±1,1	32,7±0,7	31,4±0,8###	30,5±0,5###
LPS	40,0±0,9	41,1±0,8#	37,8±1,2	36,2±1,2	35,7±1,1	35,8±0,6
LPS+MLT	40,0±0,8	39,9±1,0	37,9±1,3	36,3±1,3	34,5±1,2	33,9±1,2
LPS+CIT	36,9±1,5**	37,2±0,5**	35,3±0,8**	34,6±1,8**	30,4±0,5**	30,2±0,3**
LPS+SAR	36,8±1,1**	36,7±0,6**	33,9±1,1**	32,4±0,9**	30,1±1,0**	29,5±1,4**

Zeit [min]	0	60	120	180	240	300
Glukose [mg/dL]						
SHAM	183±14	193±14	193±9	195±9	170±8	164±16
MLT	185±7	204±9	208±7	196±7	196±7	179±4
CIT	185±8	183±16	189±12	178±16	172±13	168±7
SAR	189±21	178±10	174±6	162±4#	155±3	148±2
LPS	187±5	219±9	184±11	127±9###	71±10###	36±6###
LPS+MLT	193±5	203±7	173±13	128±9	72±7	39±4
LPS+CIT	181±16	168±4*	182±24	122±17	62±19	47±13
LPS+SAR	173±3	194±7	180±24	121±6	49±12	24±5
Laktat [mM]						
SHAM	1,0±0,1	1,0±0,2	1,4±0,1	1,5±0,2	1,3±0,1	1,3±0,1
MLT	1,0±0,1	1,4±0,1	1,2±0,1	1,3±0,1	1,3±0,1	1,4±0,1
CIT	1,1±0,1	1,0±0,1	1,3±0,1	1,2±0,1	1,3±0,1	1,4±0,1
SAR	0,9±0,1	1,0±0,1	1,1±0,1	1,3±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1
LPS	1,0±0,1	2,2±0,1###	2,2±0,2###	1,9±0,1###	2,3±0,1###	3,5±0,4###
LPS+MLT	1,0±0,1	2,2±0,2	2,1±0,3	1,7±0,2	2,0±0,2	3,0±0,4
LPS+CIT	1,0±0,05	1,5±0,2*	1,9±0,4	1,8±0,3	1,9±0,2	2,2±0,2
LPS+SAR	0,9±0,1	1,8±0,2	2,2±0,2	2,4±0,4	2,5±0,5	2,8±0,2

Tabelle 9: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Clotting Time (CT), Clot Formation Time (CFT), Winkel Alpha (α), Maximum Clot Firmness (MCF), und Area Under The Curve (AUC) unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie. Lipopolysaccharid (LPS) wurde als Dauerinfusion (0,5 mg LPS/kg x h) über 6 Stunden ab dem Zeitpunkt T= 0 min verabreicht. Melatonin (3 mg MLT/kg) und Sarpogrelate (0,28 mg SAR/kg) wurden als 15-minütige Kurzzeitinfusion zu den Zeitpunkten T= -15 min, 120 min und 240 min appliziert. Citalopram (0,46 mg CIT/kg) wurde als 15-minütige Kurzzeitinfusion zum Zeitpunkt T= -15 min infundiert. Die Ergebnisse der Thromboelastometrie der Gruppen SHAM (n=8), MLT(n=8), CIT (n=4), SAR (n=4), LPS (n=12), LPS+MLT (n=12), LPS+CIT (n=4), LPS+SAR (n=4) sind als Mittelwerte \pm SEM bis zum Zeitpunkt 300 min dargestellt. #p< 0,05 (vs. SHAM, sd), ##p< 0,05 (vs. SHAM, rm), *p< 0,05 (vs. LPS, sd), **p< 0,05 (vs. LPS, rm).

Zeit[min]	0	60	120	180	240	300
CT [s]						
SHAM	315 \pm 64	292 \pm 59	292 \pm 36	249 \pm 29	300 \pm 45	299 \pm 67
MLT	338 \pm 64	145 \pm 21	213 \pm 45	298 \pm 47	311 \pm 32	323 \pm 31
CIT	304 \pm 73	226 \pm 88	141 \pm 23#	234 \pm 29	294 \pm 63	218 \pm 27
SAR	306 \pm 72	279 \pm 63	138 \pm 45#	173 \pm 16	196 \pm 30	221 \pm 39
LPS	408 \pm 48	351 \pm 45	150 \pm 21##	145 \pm 27##	269 \pm 32	2768 \pm 853#
LPS+MLT	440 \pm 37	270 \pm 46	141 \pm 25	178 \pm 26	278 \pm 22	2214 \pm 830
LPS+CIT	272 \pm 5	204 \pm 35	127 \pm 22	106 \pm 18	142 \pm 36**	296 \pm 73**
LPS+SAR	270 \pm 79	222 \pm 57	121 \pm 15	129 \pm 9	197 \pm 35**	319 \pm 34**
CFT [s]						
SHAM	124 \pm 26	108 \pm 13	114 \pm 16	95 \pm 8	117 \pm 19	98 \pm 14
MLT	118 \pm 12	102 \pm 20	86 \pm 16	101 \pm 14	99 \pm 12	83 \pm 8
CIT	105 \pm 12	161 \pm 30	114 \pm 28	82 \pm 23	87 \pm 3	68 \pm 10
SAR	107 \pm 21	108 \pm 27	78 \pm 25	110 \pm 23	61 \pm 11	68 \pm 13
LPS	161 \pm 13	119 \pm 20	88 \pm 18	115 \pm 27	206 \pm 42##	1038 \pm 657##
LPS+MLT	149 \pm 21	123 \pm 13	99 \pm 12	120 \pm 33	266 \pm 82	861 \pm 395
LPS+CIT	81 \pm 14*	110 \pm 19	49 \pm 9	51 \pm 3	81 \pm 17	447 \pm 200
LPS+SAR	115 \pm 20	127 \pm 24	53 \pm 6	68 \pm 18	89 \pm 13	220 \pm 15

Zeit[min]	0	60	120	180	240	300
α-Winkel [°]						
SHAM	68±4	70±3	70±3	72±2	69±3	72±3
MLT	68±2	72±3	69±7	72±2	72±2	74±1
CIT	72±2	62±4	71±4	76±3	75±0,3	78±2
SAR	71±3	71±4	78±3	73±3	79±2	78±2
LPS	63±2	68±3	76±2	69±4	54±6###	35±15###
LPS+MLT	64±3	67±3	73±2	71±4	57±5	47±7
LPS+CIT	75±2*	70±3	81±2	81±0,5	74±3**	43±7**
LPS+SAR	70±4	72±3	80±1	77±3	67±7**	58±6**
MCF [mm]						
SHAM	67±2	67±3	72±4	70±3	65±3	68±3
MLT	66±5	69±4	74±2	70±3	71±2	69±1
CIT	73±3	73±7	85±3#	79±2	79±2	75±2
SAR	73±3	71±3	77±1	72±4	76±1	81±3
LPS	65±4	65±3	71±1	63±3	47±6###	22±6###
LPS+MLT	63±3	63±3	68±2	65±3	49±4	30±6
LPS+CIT	81±4*	68±3	75±1	72±1	59±4**	35±7**
LPS+SAR	74±5	71±5	69±2	63±5	58±7**	42±1**
AUC [mm x 100]						
SHAM	6451±366	6754±309	7248±394	6919±299	6498±278	6849±307
MLT	6572±474	6901±397	7431±161	7101±258	7083±210	6940±105
CIT	7281±337	7257±683	8510±320#	7918±257	7876±219	7456±230
SAR	7301±291	7180±346	7686±121	7213±422	7769±97	8005±265
LPS	6577±357	6539±322	7106±114	6396±289	4726±592###	1657±552###
LPS+MLT	6270±333	6253±302	6784±184	6485±320	4944±341	2316±574
LPS+CIT	7980±342*	6748±291	7491±48	7135±159	5899±420**	3673±698**
LPS+SAR	7350±466	7099±463	6910±227	6303±515	5794±736**	4249±85**

Tabelle 10: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Thrombozytenzahl unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie. Lipopolysaccharid (LPS) wurde als Dauerinfusion (0,5 mg LPS/kg x h) über 6 Stunden ab dem Zeitpunkt T= 0 min verabreicht. Melatonin (3 mg MLT/kg) und Sarpogrelate (0,28 mg SAR/kg) wurden als 15-minütige Kurzzeitinfusion zu den Zeitpunkten T= -15 min, 120 min und 240 min appliziert. Citalopram (0,46 mg CIT/kg) wurde als 15-minütige Kurzzeitinfusion zum Zeitpunkt T= -15 min infundiert. Die Anzahl der Thrombozyten pro 1000 Erythrozyten der Gruppen SHAM (n=5), MLT (n=6), CIT (n=4), SAR (n=4), LPS (n=8), LPS+MLT (n=8), LPS+CIT (n=4) und LPS+SAR (n=4) ist als Mittelwert±SEM bis zum Zeitpunkt 300 min dargestellt. ##p< 0,05 (vs. SHAM, rm), **p< 0,05 (vs. LPS, rm).

Zeit[min]	0	60	120	180	240	300
Thrombozytenzahl pro 1000 Erythrozyten						
SHAM	174±40	192±51	206±39	184±38	176±49	180±55
MLT	243±47	205±40	241±35	312±23##	297±15##	306±19##
CIT	112±40##	45±22##	53±18##	122±45##	141±22##	123±43##
SAR	141±37	124±35##	117±36##	131±22	171±27	140±15
LPS	269±43	255±33	242±34	160±31	94±10##	55±8##
LPS+MLT	261±37	287±51	240±47	228±30	153±9**	130±10**
LPS+CIT	129±18**	63±26**	109±24**	109±7**	77±12	44±8
LPS+SAR	77±20**	89±13**	106±15**	76±21**	69±17	62±5

Tabelle 11: Effekt von Melatonin (MLT), Citalopram (CIT) und Sarpogrelate (SAR) auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH), der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und der Creatin-Kinase (CK) und die Konzentration von Kreatinin im Blutplasma der Tiere unter Kontrollbedingungen und während der sub-akuten Endotoxinämie. Lipopolysaccharid (LPS) wurde als Dauerinfusion (0,5 mg LPS/kg x h) über 6 Stunden ab dem Zeitpunkt T= 0 min verabreicht. Melatonin (3 mg MLT/kg) und Sarpogrelate (0,28 mg SAR/kg) wurden als 15-minütige Kurzzeitinfusion zu den Zeitpunkten T= -15 min, 120 min und 240 min appliziert. Citalopram (0,46 mg CIT/kg) wurde als 15-minütige Kurzzeitinfusion zum Zeitpunkt T= -15 min infundiert. Die Ergebnisse der Gruppen SHAM (n=8), MLT (n=5), CIT (n=4), SAR (n=4), LPS (n=12), LPS+MLT (n=12), LPS+CIT (n=4) und LPS+SAR (n=4) ist als Mittelwert \pm SEM bis zum Zeitpunkt 300 min dargestellt. #p< 0,05 (vs. SHAM, sd), ##p< 0,05 (vs. SHAM, rm), *p< 0,05 (vs. LPS, sd), **p< 0,05 (vs. LPS, rm).

Zeit[min]	0	60	120	180	240	300
LDH [U/L]						
SHAM	177 \pm 22	165 \pm 20	198 \pm 30	250 \pm 60	175 \pm 54	157 \pm 42
MLT	199 \pm 35	145 \pm 21	143 \pm 22	212 \pm 47	308 \pm 86	151 \pm 24
CIT	85 \pm 18###	58 \pm 12###	97 \pm 35	77 \pm 14	77 \pm 26	66 \pm 20
SAR	89 \pm 17###	71 \pm 17###	87 \pm 46	58 \pm 11	115 \pm 60	81 \pm 37
LPS	138 \pm 15	189 \pm 21	308 \pm 61###	421 \pm 69###	797 \pm 82###	1435 \pm 267###
LPS+MLT	108 \pm 19	165 \pm 18	274 \pm 27	493 \pm 66	932 \pm 109	1420 \pm 185
LPS+CIT	83 \pm 19	125 \pm 59	183 \pm 71**	171 \pm 55**	256 \pm 45**	678 \pm 197**
LPS+SAR	97 \pm 13	161 \pm 32	79 \pm 23**	169 \pm 13**	512 \pm 118**	804 \pm 114**
GOT [U/L]						
SHAM	56 \pm 6	46 \pm 1	60 \pm 7	59 \pm 4	67 \pm 4	60 \pm 4
MLT	61 \pm 10	61 \pm 7	68 \pm 10	71 \pm 11	97 \pm 18	71 \pm 8
CIT	37 \pm 2	37 \pm 1	39 \pm 5	37 \pm 4	39 \pm 6	44 \pm 9
SAR	41 \pm 3	38 \pm 3	40 \pm 3	36 \pm 4	43 \pm 7	35 \pm 4
LPS	55 \pm 5	54 \pm 6	82 \pm 8###	122 \pm 15###	223 \pm 32###	345 \pm 50###
LPS+MLT	56 \pm 5	75 \pm 7**	111 \pm 12**	198 \pm 23**	338 \pm 44**	507 \pm 83
LPS+CIT	35 \pm 9*	52 \pm 8	58 \pm 16**	60 \pm 16**	79 \pm 11**	202 \pm 80**
LPS+SAR	40 \pm 2	46 \pm 6	43 \pm 3**	62 \pm 8**	117 \pm 29**	164 \pm 26**

Zeit[min]	0	60	120	180	240	300
GPT [U/L]						
SHAM	47±6	48±4	47±3	49±4	72±8	57±5
MLT	51±6	50±9	61±13	67±11	72±22	122±44
CIT	39±3	36±2	37±3	35±1	34±2	30±3
SAR	38±4	37±2	36±2	38±6	35±3	32±3
LPS	48±4	49±5	50±5	66±8	108±15###	177±36###
LPS+MLT	52±5	61±5	69±8**	106±13**	161±23**	222±38
LPS+CIT	36±9	46±4	44±7	42±8	46±4**	83±22**
LPS+SAR	39±4	40±5	31±2	42±7	66±24**	54±5**
Kreatinin [mg/dL]						
SHAM	0,82±0,14	0,74±0,13	0,85±0,15	1,00±0,17	0,98±0,11	0,84±0,14
MLT	0,63±0,03	0,77±0,10	0,70±0,11	0,76±0,13	0,63±0,03	0,82±0,17
CIT	0,76±0,24	0,73±0,17	0,73±0,26	0,77±0,20	0,86±0,18	0,73±0,10
SAR	0,59±0,18	0,81±0,22	0,69±0,16	0,73±0,21	0,80±0,26	0,78±0,19
LPS	0,74±0,06	0,84±0,07	0,77±0,06	0,96±0,10	1,18±0,11	1,37±0,26
LPS+MLT	0,77±0,08	0,73±0,06	0,89±0,10	1,00±0,10	1,27±0,12	1,66±0,19
LPS+CIT	0,60±0,10	0,46±0,17*	0,68±0,19	0,69±0,14	0,75±0,19	1,10±0,32
LPS+SAR	0,74±0,07	0,64±0,17	0,59±0,31	0,86±0,18	0,90±0,27	1,78±0,60
CK [U/L]						
SHAM	152±23	98±13	94±14	94±13	94±18	104±14
MLT	155±38	102±33	58±12	100±35	65±2	148±39
CIT	146±13	77±6	86±8	93±13	127±44	172±80
SAR	146±24	82±5	74±11	69±5	86±12	74±9
LPS	183±15	110±10	199±17###	199±14###	235±11###	386±60###
LPS+MLT	133±20	107±14	203±16	163±16	239±27	381±88
LPS+CIT	126±35	112±25	177±52	171±49	165±43	242±40
LPS+SAR	162±29	114±15	152±13	170±20	199±24	189±5

11.1 Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ADP	Adenosindiphosphat
AF	Atemfrequenz
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ATP	Adenosinriphosphat
AUC	<i>Area Under The Curve</i>
BE _{Ecf}	<i>Base Excess</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD14	<i>cluster of differentiation 14</i>
CFT	<i>Clot Formation Time</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CIT	Citalopram
CK	Creatin-Kinase
COX-1	Cyclooxygenase-1
CRP-XL	<i>cross-linked collagen related peptide</i>
CT	<i>Clotting Time</i>
dest.	destilliert
DIG	Disseminierte intravasale Gerinnung
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
GPIb α	Glykoprotein Iba
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GPV	Glykoprotein V

GTPasen	Guanosintriphosphatasen
HF	Herzfrequenz
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
I κ B	Inhibitor von NF- κ B
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltriphosphat
IRF3	<i>interferon regulatory factor 3</i>
IRSE	<i>interferon-sensitive response</i>
<i>i.v.</i>	intravenös
LBP	<i>LPS binding protein</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MCF	<i>Maximum Clot Firmness</i>
MD2	<i>myeloid differentiation factor 2</i>
MIO15	<i>melatonin-induced opioid 15 kDA</i>
MLT	Melatonin
MT ₁	Melatoninrezeptor 1 (Mel _{1a})
MT ₂	Melatoninrezeptor 2 (Mel _{1b})
MT ₃	Melatoninrezeptor 3
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
NATEM	nicht-aktivierte Thromboelastometrie
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells</i>
NOSII	<i>nitric oxide synthetase II</i>
O2C	<i>oxygen to see</i>

PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1
PAI	<i>Platelet Aggregation Index</i>
PC	Phosphatidylcholin
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
rHb	relative Hämoglobinmenge
RhoA	<i>Ras homology gene family member A</i>
RhoGEF	<i>Rho guanine exchange factor</i>
rm	<i>repeated measurements</i>
ROTEM	Rotationsthromboelastometrie
SAR	Sarpogrelate
SD	<i>standard deviation</i>
s.c.	subkutan
sd	<i>single data</i>
SEM	<i>standard error of mean</i>
SERT	Serotoninwiederaufnahmetransporter
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
sO ₂	Sauerstoffsättigung
SSRI	selektive Serotoninwiederaufnahmehemmer
TACE	<i>tumor necrosis factor alpha converting enzyme</i>
TLR4	<i>Toll-like</i> Rezeptor 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
t-PA	<i>tissue-type plasminogen-activator</i>
TRAM	<i>TRIF-related adapter molecule</i>

TRAP	<i>thrombin receptor agonist</i>
TRIF	<i>TIR-containing adapter molecule</i>
TXA ₂	Thromboxan A ₂
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
5-HT ₁₋₇	5-Hydroxytryptamin Rezeptor 1-7

11.2 Publikationsliste

11.2.1 Publikationen

- **Maren Oude Lansink**, Herbert de Groot, Katharina Effenberg-Neidnicht. Melatonin reduces small intestinal microvessel blood accumulation during systemic inflammation. J Surg Res (in preparation).
- **Maren Oude Lansink**, Klaus Görlinger; Matthias Hartmann; Herbert de Groot; Katharina Effenberger-Neidnicht. Melatonin does not affect disseminated intravascular coagulation but diminishes decreases in platelet count during subacute endotoxaemia in rats. Thromb Res (in revision).

11.2.2 Extended Abstracts

- **Maren Oude Lansink**, Lisa Brencher, Katharina Effenberger-Neidnicht, Klaus Görlinger, Matthias Hartmann, Herbert de Groot. The effects of melatonin on platelet count and hemolysis during sub-acute endotoxemia are not associated with a diminishment of LPS-induced disseminated intravascular coagulation. Infection. 2015; 43:17.
- Katharina Effenberger-Neidnicht, Simon Bornmann, Matthias Hartmann, Johannes Jägers, **Maren Oude Lansink**, Herbert de Groot. Is there an association between cell-free hemoglobin and the congestion of capillaries in small intestines during endotoxemia? Infection. 2015; 43:16-17.
- Katharina Effenberger-Neidnicht, Mohannad Al Nator, **Maren Oude Lansink**, Herbert de Groot. Prevention of endotoxin-induced hypotension in rats by the circadian hormone melatonin. Infection. 2013; 41: 11-12.

11.2.3 Poster

- **Maren Oude Lansink**, Lisa Brencher, Katharina Effenberger-Neidnicht, Klaus Görlinger, Matthias Hartmann, Herbert de Groot. The effects of melatonin on platelet count and hemolysis during sub-acute endotoxemia are not associated with a diminishment of LPS-induced disseminated intravascular coagulation. Sepsis Update am 09.09-11.09.2015 in Weimar.

- Katharina Effenberger-Neidnicht, Simon Bornmann, Matthias Hartmann, Johannes Jägers, **Maren Oude Lansink**, Herbert de Groot. Is there an association between cell-free hemoglobin and the congestion of capillaries in small intestines during endotoxemia? Sepsis Update am 09.09-11.09.2015 in Weimar.
- **Maren Oude Lansink**, Lisa Brencher, Mohannad Al Nator, Katharina Effenberger-Neidnicht, Herbert de Groot. Einfluss von Melatonin auf die Hämostase im LPS-Modell der Ratte. Forschungstag der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Essen am 22.11.2013.
- Katharina Effenberger-Neidnicht, Mohannad Al Nator, **Maren Oude Lansink**, Herbert de Groot. Prevention of endotoxin-induced hypotension in rats by the circadian hormone melatonin. Sepsis Update am 04.06.-09.06.2013 in Weimar.

11.2.4 Vorträge

- **Maren Oude Lansink**, Katharina Effenberger-Neidnicht, Herbert de Groot. Progress report. Lab meeting am 14.08.2014.
- **Maren Oude Lansink**, Katharina Effenberger-Neidnicht, Herbert de Groot. Wirkt exogen zugeführtes Melatonin rezeptorabhängig während einer Endotoxämie? 19. Workshop „Zell- und Gewebeschädigung: Mechanismen, Protektion und Therapie“, 28.11.-30.11.2013 in Xanten.
- **Maren Oude Lansink**, Katharina Effenberger-Neidnicht, Herbert de Groot. Progress report. Lab meeting am 13.06.2013.
- **Maren Oude Lansink**, Mohannad Al Nator, Lisa Brencher, Effenberger-Neidnicht, Herbert de Groot. Effect of melatonin on haemostasis during endotoxemia in male rats. BIOME Seminar “Ischaemia, Reperfusion and Angiogenesis“ am 04.06.2013.

11.3 Lebenslauf

„Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.“

11.4 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin, Citalopram und Sarpogrelate auf die Hämostase in der sub-akuten Endotoxinämie in männlichen Wistar-Ratten“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im September 2015

Maren Oude Lansink

11.5 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2012 bis September 2015 im Institut für Physiologische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei:

- Herrn Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot für die Bereitstellung der wissenschaftlichen Arbeitsstelle und die Überlassung des interessanten Themas sowie die vielen wertvollen Ratschläge und aufschlussreichen Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- Herrn Prof. Dr. Christian Mayer für die Übernahme des Koreferats.
- Frau Dr. Katharina Effenberger-Neidnicht für ihr außerordentliches Engagement, die großartige fachliche Unterstützung und Förderung sowie die stete Diskussionsbereitschaft während der wissenschaftlichen Begleitung dieser Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. Matthias Hartmann für die stete Kooperationsbereitschaft.
- Herrn Dr. Klaus Görlinger für die Bereitstellung des ROTEM-Systems und seine Expertise hinsichtlich der Hämostase.
- Frau Kristina Piwellek für die ausgezeichnete Einarbeitung in die Operationstechniken.
- Herrn Johannes Jägers für gute Zusammenarbeit im Labor und die stete Hilfsbereitschaft.
- Frau Johanna Teloh für die schöne gemeinsame Promotionszeit.
- allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie für die kollegiale Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima.
- Frau Verena Rensing für die treue Freundschaft und bedingungslose Unterstützung zu jeder Zeit.
- meinen Eltern und meinem Freund für das stete Vertrauen, den Rückhalt und die bedingungslose Unterstützung zu jeder Zeit.