

ICAM-1 abhängige Akkumulation neutrophiler Granulozyten und Leukotrien-vermittelte
Kardiodepression in Staphylococcus aureus α -Toxin-perfundierten Rattenherzen.

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Des Fachbereichs Humanmedizin

Der Justus-Liebig-Universität-Gießen

Vorgelegt von Mathias Reutemann

Aus Ludwigshafen am Rhein

Giessen 2002

Aus dem Zentrum für Innere Medizin

Leiter: Prof. Dr. W. Seeger

Universitätsklinikum Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. F. Grimminger

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Schaper

Tag der Disputation: 31. Oktober 2002

**Für meinen Vater,
meine Schwester
und in Erinnerung an meine Mutter**

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.Vorwort	1
2.Einleitung	2
2.1 Definition und Pathogenese der Sepsis	2
2.2 Kardiale Komplikationen der Sepsis	4
2.2.1 Pathophysiologische Beobachtungen	4
2.2.2 Experimentelle Ergebnisse	6
2.3 Der Einfluß von Cytokinen und inflammatorischen Mediatoren auf das Herz	7
2.4 Koronare Mikrozirkulationsstörungen als pathogenetisches Prinzip der septischen Kardiomyopathie	8
2.5 Vasoaktive Produkte der Lip- und Cyclooxygenasen	10
2.6 Inflammatorische Eigenschaften der Leukotriene	11
2.7 Pathophysiologische Bedeutung neutrophiler PMN bei der septischen Kardiomyopathie	12
2.8 Funktion und Bedeutung von Adhäsionsmolekülen	13
2.8.1 Selektine	13
2.8.2 Integrin-Rezeptoren	14
2.8.3 Immunglobulin-Superfamilie	14
2.9 Aktivatoren von PMN	18
2.9.1 PAF	18
2.9.2 fMLP	18
2.10 Die Rolle bakterieller Toxine auf die bakterielle Pathogenität	19
2.10.1 Endotoxine	19
2.10.2 Exotoxine	20
2.11 Das α -Toxin von <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.12 Fragestellung	22

3. Materialien und Methoden	23
3.1 Methoden	23
3.1.1 Präparation und Perfusion der Rattenherzen	24
3.1.2 Messung des koronaren Perfusionsdruckes und der myokardialen Kontraktilität	27
3.1.3 Standardversuchsprotokoll	27
3.1.4 Gewebeaufbereitung zur histologischen Untersuchung und Färbemethoden	29
3.1.5 Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten	31
3.1.6 Myeloperoxidaseaktivitätsnachweis zur PMN-Quantifizierung	32
3.1.7 Leukotrienanalytik	33
3.1.8 Festphasenextraktion	33
3.1.9 Produktion der mobilen Phase und der HPLC-Säulen	33
3.1.10 Reversed-Phase-HPLC	34
3.1.11 Statistische Auswertung der Ergebnisse	35
3.2 Materialien und Versuchstiere	36
3.2.1 Versuchstiere	36
3.2.2 Material und Geräte für die Organperfusion	36
3.2.3 Materialien zur Gewebefixierung und Aufarbeitung	36
3.2.4 Materialien zur immunhistochemischen- und HE- Färbung	37
3.2.5 Pharmaka	37
3.2.6 Materialien für die Zellisolation	37
3.2.7 Materialien für die MPO-Bestimmung	38
3.2.8 Materialien und Substanzen für die Leukotrienanalytik	38
4. Ergebnisse	40
4.1 Überblick	40
4.2 α -Toxin induziert im subtoxischen Bereich die koronare Expression von ICAM-1	40

4.3	Einfluß von PMN, fMLP, AA auf die physiologischen Parameter eines mit α -Toxin perfundierten Herzen	43
4.4	Ein ICAM-1 Antikörper und ein Lipoxygenasehemmer beeinflussen die beobachteten physiologischen Veränderungen	45
4.5	Quantifizierung von akkumulierten PMN in mit α -Toxin perfundierten Herzen	45
4.6	Nachweis von Cysteinyl-Leukotrienen, LTB ₄ und 5-HETE in α -Toxin perfundierten Herzen	49
5. Diskussion		54
5.1	Pathophysiologische Grundlagen des septischen Herzversagens	54
5.1.1	Bedeutung des α -Toxins von <i>Staphylococcus aureus</i>	54
5.2	α -Toxin führt zu einer verstärkten koronaren Expression von ICAM-1	56
5.3	In mit α -Toxin vorperfundierten Herzen kommt es zu einer verstärkten PMN - Akkumulation	57
5.3.1	Auswirkungen der PMN-Retention auf die kardiale Leistungsfähigkeit	58
5.4	Trans-celluläre Kooperation als möglicher Reaktionsweg der Cysteinyl-Leukotrien Synthese	59
5.5	Die Freisetzung der Leukotrienen spielt für die Änderungen in der kontraktilen Funktion der Herzen im vorliegendem Modell eine bedeutende Rolle	60
5.6	Klinische Relevanz der Ergebnisse	61
6. Zusammenfassung		63
7. Literaturverzeichnis		65
8. Danksagung		84
9. Lebenslauf		85

1. Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Oktober 1998 bis Juli 2000 am Zentrum für Innere Medizin (Leiter Prof. Dr. med. Werner Seeger) der Justus-Liebig Universität Gießen. In der klinischen Forschergruppe von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat Friedrich Grimminger zugehörig der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. med. Ulf Sibelius unter der Betreuung von Herrn Dr. med. Ulrich Grandel.

Die Arbeit befasst sich mit Fragen zur Pathogenese der septischen Kardiomyopathie die, als Komplikation der Sepsis, aufgrund ihrer inzidentiellen Zunahme in den letzten Jahren vermehrt an Bedeutung gewonnen hat. Vor allem Störungen der Mikrozirkulation als Ursache für die Abnahme der kardialen Leistungsfähigkeit sind bisher unzureichend untersucht worden.

Anhand des α -Toxins, dem bedeutendsten Exotoxin von *Staphylococcus aureus*, wurde der Einfluss bakterieller Exotoxine auf eine Expression von Adhäsionsmolekülen in postkapillären Venolen untersucht. Durch Zugabe humaner PMN und deren anschließender Aktivierung wurde deren pathophysiologische Bedeutung an blutfrei perfundierten Rattenherzen geprüft. Mittels pharmakologischer Intervention konnten die Mechanismen, die an der Entstehung der kardialen Depression beteiligt sind, überprüft werden.

2. Einleitung

2.1 Definition und Pathogenese der Sepsis

In den letzten Jahren ist es zu einer ansteigenden Inzidenz der Sepsis gekommen. Sands et al. ermittelten in einer epidemiologischen Studie 1997 eine Inzidenz von 2,8 Fällen pro 1000 Patiententage, wobei 41 % der Fälle außerhalb von Intensivstationen diagnostiziert wurden¹. Bei der Sepsis handelt es sich um eines der gravierendsten Krankheitsbilder der heutigen Intensivmedizin, das trotz erweiterter Therapiemöglichkeiten noch immer eine Gesamtmortalität von ca. 20 % aufweist². In der Hälfte der Fälle verläuft die Krankheit bis zum septischen Schock progredient. Dieser besitzt mit 40 – 60 % eine beachtliche Mortalität. Gründe für diesen Anstieg werden übereinstimmend zum einen in der Zunahme invasiver diagnostischer und operativer Maßnahmen gesehen, die einen Keimeintritt erleichtern, zum anderen in einer Ausweitung immunsuppressiver Therapien zur Behandlung chronisch inflammatorischer Prozesse. Auch der Zuwachs an Patienten mit Störungen der Immunabwehr im Rahmen einer Diabetes-mellitus Erkrankung oder einer HIV-Infektion erhöht die Gefahr, eine Sepsis zu entwickeln. Desweiteren hat der unkritische Einsatz hochwirksamer Antibiotika zur Selektion multiresistenter Keime geführt, die therapeutisch kaum noch zu beeinflussen sind. In den letzten Jahren konnte dadurch auch eine Änderung des Keimspektrums beobachtet werden. Wurden vor 20 Jahren überwiegend gram-negative Keime im Blut septischer Patienten isoliert³, so überwiegen heute die gram-positiven.

Da eine frühzeitige therapeutische Intervention die Mortalität signifikant senkt⁴, wurde von R.C. Bone⁵ eine klinische Definition der Sepsis vorgeschlagen, die als Standard allgemein akzeptiert ist. Sobald im Rahmen einer systemischen Reaktion auf eine Infektion zwei oder mehr der folgenden Symptome erfüllt sind, gilt die Sepsis als erwiesen:

- Körpertemperatur > 38 °C oder < 36 °C
- Herzfrequenz > 90/min
- Tachypnoe von > 20 Atemzügen / min oder bei maschineller Beatmung mit einem Atemminutenvolumen > 10 l/min
- Leukozyten > 12.000/mm³

Als *septisches Syndrom* bezeichnet Bone eine Sepsis, in deren Verlauf noch eines oder mehrere der folgenden Symptome aufgetreten sind:

- Oligurie (Urinausscheidung $<0,5$ ml/kg KG pro Stunde)
- erhöhter Lactatspiegel
- Hypoxämie (ohne vorbekannten Herz- oder Lungenerkrankungen)

Fällt der systolische Blutdruck zusätzlich unter 90 mmHg oder fällt er mehr als 40 mmHg von seinem Ausgangswert, so bezeichnet Bone dies als *septischen Schock*.

Den Ausgangspunkt der Erkrankung stellt oftmals eine örtlich begrenzte Infektion dar, von der es zu einer hämatogenen Streuung von Mikroorganismen und/oder ihrer Pathogenitätsfaktoren kommt. In Betracht kommen dabei sowohl Exotoxine als auch Bestandteile der Zellwand gramnegativer Bakterien, die als Endotoxine wirken. Als Folge dieser hämatogenen Aussaat kommt es zur Aktivierung körpereigener humoraler und zellulärer Effektorsysteme, zu denen das Komplement- und Gerinnungssystem sowie Granulozyten, Thrombozyten, Endothelzellen und Makrophagen zählen. Die genannten Systeme werden aktiviert und setzen ihrerseits eine Vielzahl inflammatorischer und vasoaktiver Substanzen frei, die letztlich für die auftretenden lokalen Gewebsschädigungen und Mikrozirkulationsstörungen verantwortlich sind. Gefürchtet sind, neben isolierten Schädigungen von Nieren, Lunge, Leber und Darm, vor allem deren Kombination in Form eines Multiorganversagens, sowie die hämodynamischen Veränderungen der Sepsis bis hin zum septischen Schock^{1,6}.

Initial kommt es bei Patienten mit Sepsis fast immer zu einer ausgeprägten Abnahme des peripheren Gefäßwiderstandes bis auf etwa 30% der Norm. In der *hyperdynamen* oder *hyperzirkulatorischen Phase* des septischen Schocks, die in der Regel mit einer warmen Haut einhergeht, kommt es zu einem Anstieg von Herzindex und Herzzeitvolumen. Diese sympathikotone Reaktion kann den Blutdruck noch bis zu einem gewissen Grad aufrechterhalten¹. Aufgrund eines peripheren Blutpoolings bei generalisierter Vasodilatation und einer generellen Permeabilitätsstörung des Gefäßendothels kann es dann zu einem relativen intravasalen Volumenmangel kommen, woraus eine klinische Zunahme der Schocksymptomatik resultiert. Die bei anderen Schockformen auftretende Verringerung des HZV bei erhöhtem peripheren Widerstand sieht man beim septischen Schock nur in der Terminalphase. Sie wird als *hypodyname* oder *hypozirkulatorische Phase* bezeichnet. Diese tritt aber eher selten auf und findet sich vor allem bei Patienten mit unzureichender Volumensubstitution und noch vorhandener Gefäßreagibilität⁷.

Im Rahmen des septischen Multiorganversagens wurde der Schädigung des Herzens lange Zeit keine besondere Aufmerksamkeit geschenkt, ist doch das Herzzeitvolumen septischer im Vergleich zu gesunden Patienten nicht erniedrigt sondern sogar leicht erhöht.

In den letzten Jahren wurden aber sowohl bei Tiermodellen als auch bei Patienten beträchtliche Veränderungen der myokardialen Funktion beobachtet, so dass H.P. Schuster⁸ dafür 1989 den Begriff der *septischen Kardiomyopathie* prägte. Inzwischen werden bis zu 10% aller Sepsis Todesfälle auf einen intractablen Schock infolge einer schweren, akuten septischen Kardiomyopathie zurückgeführt⁹.

2.2 Kardiale Komplikationen der Sepsis

2.2.1 Pathophysiologische Beobachtungen

Die Untersuchung der Frage, inwieweit das Herz während der Sepsis inadäquat auf die vaskulären Veränderungen reagiert, stellt den Untersuchenden vor große Schwierigkeiten. Eine Beobachtung der reinen pathophysiologischen Vorgänge bei der septischen Kardiomyopathie ist praktisch nicht möglich, da eine frühzeitige massive intensivmedizinische Intervention erforderlich ist und so eine Trennung von Therapiefolgen und Pathophysiologie erschwert wird.

Durch den drastischen Abfall des peripheren Gefäßwiderstandes müsste das HZV auf das zwei- bis dreifache der Norm ansteigen, um einen normotonen Blutdruck zu gewährleisten. Diese Leistung kann von gesunden Herzen auch ohne Probleme erbracht werden. Bei septischen Patienten sieht man diese Leistungssteigerung allerdings selten, vor allem nicht bei protahierten Verläufen. Erstellt man eine inverse Korrelation zwischen Gefäßwiderstand und HZV, so kann eine eingeschränkte Pumpfunktion des Herzens bereits bei normotoner Sepsis erkannt werden.

Mittels Radionuklidventrikulographie und Echokardiographie ist bei der septischen Kardiomyopathie eine biventrikuläre Reduktion der Ejektionsfraktionen nachweisbar und kennzeichnend, die mit einer Dilatation der Ventrikel und einer Erhöhung der enddiastolischen und endsystolischen Volumina einhergehen. Eine Erhöhung der pulmonalarteriellen Nachlast als alleiniger Grund für die Reduktion der rechtsventrikulären

Auswurffraktion konnte ausgeschlossen werden. Daher muss sie als Indiz einer globalen septischen Herzschildigung angesehen werden^{4,10}.

Als weiterer Befund ist die myokardiale Kontraktilität reduziert¹¹. Diese Änderung besitzt beträchtliche Bedeutung, da sie zum hämodynamischen Schock beitragen kann, der mit einer hohen Mortalität korreliert¹².

Außerdem lassen sich Relaxaktions-, sowie globale und regionale Kontraktionsstörungen auch bei Patienten ohne vorherige Herzerkrankung nachweisen.

Desweiteren kommt es zu einer massiven Störung der Druck-Volumen-Beziehung (Compliance) und des Frank-Starling-Mechanismus, denn die unerlässliche Infusionstherapie während der Sepsis führt zwar zu einer Erhöhung des pulmonalkapillren Verschlussdruckes und des enddiastolischen linksventrikulären Volumens, aber nicht zur erwarteten adäquaten Steigerung des Auswurfsvolumen, was eine Zunahme der Ventrikelcompliance vermuten lässt. Auch durch Gabe von β -Sympathomimetika ließen sich diese beschriebenen Veränderungen nicht völlig rekompensieren¹³. Vincent et al. beobachteten, dass septische Patienten, die aufgrund ihrer kardialen Komplikationen verstarben, eine signifikant geringere ventrikuläre Ejektionsfraktion und ein höheres enddiastolisches, rechtsventrikuläres Volumen gegenüber berlebender Patienten besaen¹⁴. All diese Veränderungen können schon bei septischen Patienten ohne Blutdruckabfall nachweisbar sein¹⁵.

Als Ursache für die beschriebenen Herzschildigungen konnte eine Störung der Makrozirkulation ausgeschlossen werden, da Messungen des koronaren Blutflusses in den großen und mittleren Arterien normale oder erhöhte Werte ergaben.

Allerdings zeigten diese Untersuchungen septisch geschädigter Herzen eine Verminderung der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz als Ausdruck einer verringerten Sauerstoffextraktion, was eine Störung der koronaren Mikrozirkulation vermuten lsst^{16,17}.

Zu der Fragestellung, ob der die Sepsis auslösende Erreger für die Schwere und den Verlauf der Erkrankung von Bedeutung ist, wurden verschiedene Untersuchungen unternommen und u.a. folgende Ergebnisse festgehalten. Sowohl für die Prognose des septischen Schocks, als auch für die kardiovaskulären Veränderungen wurden keine erregerspezifischen Merkmale oder Unterschiede bezüglich des verursachenden Erregers nachgewiesen^{18,19}.

Wird die septische Kardiomyopathie überlebt, bilden sich die meist in den ersten 48 Stunden entstandenen Symptome innerhalb von 7-10 Tagen vllstndig zurück.

2.2.2 Experimentelle Ergebnisse

Da es Schwierigkeiten bereitet, die Therapiefolgen von den reinen pathophysiologischen Veränderungen der septischen Kardiomyopathie zu trennen und es sich aus ethischen Gründen verbietet, mit der Therapie zu warten, sind funktionierende Tiermodelle unverzichtbar.

Natanson et al. untersuchten die Auswirkungen einer peritonealen Implantation eines Blutgerinnsels, das von *E. coli* extrahiertes Endotoxin enthielt, an Hunden über einen Zeitraum von 10 Tagen. Innerhalb der ersten beiden Tagen fielen bei diesen Hunden der mittlere arterielle Druck, die linksventrikuläre Ejektionsfraktion und der enddiastolische Volumenindex signifikant. Eine Volumengabe erhöhte weder den mittleren arteriellen Druck, noch die Ejektionsfraktion. Es konnte aber eine Dilatation des linken Ventrikels beobachtet werden. Überlebten die Hunde, wurde am 10. Tag praktisch eine Normalisierung aller Werte beobachtet²⁰.

Zur Untersuchung der physiologischen Reserven, entnahmen Mc Donough et al. die Herzen septischer Ratten, um anschließend in dem Versuchsaufbau nach Langendorff mögliche Veränderungen der kardialen Performance zu erfassen. Durch die Applikation eines fäkalen Inokulums in die peritoneale Bauchhöhle wurde ein septisches Krankheitsbild erzeugt. Die Ratten wiesen am 2. postapplikativen Tag eine erhöhte Herzfrequenz, Fieber und einen erhöhten koronaren Blutfluss bei einem normalen arteriellen Blutdruck auf. Im Vergleich zu Kontrollherzen, fielen die septischen Herzen dadurch auf, dass der entwickelte linksventrikuläre Druck, die Ejektionsfraktion und das Herzminutenvolumen sank. Diese Effekte waren unabhängig von der angebotenen Vorlast. Wurden die Herzen jedoch erst am 7. postapplikativen Tag entnommen, konnten keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollherzen festgestellt werden²¹.

Auch bei Schafen kam es nach kontinuierlicher Infusion von Endotoxin zu einer hyperdynamen septischen Reaktion. Bevor es jedoch nach etwa vier Stunden zu einer Reduktion des peripheren Widerstandes, des arteriellen Blutdruckes und des Herzzeitvolumens kam, konnten in der Frühphase der Applikation (etwa eine Stunde nach Beginn des Versuches) ein erhöhter peripherer Widerstand und arterieller Blutdruck gemessen werden²². Die initial erhöhten Parameter waren durch erhöhte Thromboxan-spiegel in der Frühphase bedingt, wie unter anderem Masouye et al. und Pittet et al. ausführlich beschrieben haben^{23,24}.

Solomon et al. erfasste an septischen Hunden nicht nur die physiologischen Unterschiede anhand von Radionukleotidventrikulographien und Echokardiographien, sondern auch morphologische mit Licht- und Elektronenmikroskopie. Außerdem betrachteten sie den myokardialen Energiemetabolismus. Durch Volumengabe wurde der gesunkene Blutdruck septischer Tiere kompensiert und es zeigte sich ein erniedrigter peripherer Widerstand bei normalem oder leicht erhöhten kardialen Index, wie es der hyperdynamischen Phase der Sepsis entspricht. Trotzdem ließ sich bei allen septischen Tieren eine global erniedrigte linksventrikuläre Funktion messen. Es ließen sich jedoch keine Beweise für ein inadäquates Sauerstoffangebot, eine myokardiale Ischämie oder ein inadäquates Energieangebot ableiten. Auch die morphologische Untersuchung wies, bis auf eine Anreicherung neutrophiler Granulozyten in den septischen Herzen, weder eine diffuse Myokarditis, noch eine Myozytennekrose nach²⁵. Auch andere Autoren schlossen eine Gewebsschädigung als Voraussetzung der myokardialen Dysfunktion aus^{26,27,28}.

Nach intravenöser Infusion von Endotoxin entstand bei Schweinen eine hyperdynamie septische Reaktion, bei der sich deutliche Hinweise für eine Kontraktilitätsabnahme des linken Ventrikel fanden²⁹. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Untersuchungen von Goldfarb et al., die Schweinen kontinuierlich geringe Dosen Endotoxin infundiert hatten und dabei ebenfalls eine Kontraktilitätsabnahme des Herzens fanden. Eine Verringerung der koronaren Perfusion konnten sie als Ursache ausschließen³⁰.

Ältere Untersuchungen erweckten zwar den Verdacht einer globalen kardialen Ischämie, ohne jedoch einen Blutdruckabfall als Ursache der koronaren Minderperfusion sicher ausschließen zu können³¹. Neuere Untersuchungen an septischen Schafen durch Fox et al., die einen zu starken Blutdruckabfall durch eine adäquate Volumensubstitution verhinderten, zeigten jedoch eine unveränderte bis erhöhte Koronarperfusion^{32,8,10}.

Trotz des Unterschieds in der Versuchsanordnung und der verwendeten Tiermodelle, konnten nahezu alle beim Menschen durch eine Sepsis ausgelösten Symptome am Herzen auch im Tierversuch nachvollzogen werden.

2.3 Der Einfluß von Cytokinen und inflammatorischen Mediatoren auf das Herz

Makrophagen und Monozyten sind in der Lage, dass nur wenige Sekunden Halbwertszeit besitzende Zytokin Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) zu sezernieren. TNF- α kann

ursächlich für eine kardiale Dysfunktion verantwortlich sein^{33,34} und wurde im Serum septischer Patienten in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen^{35,36}. Natanson et al. konnten zeigen, dass die Abnahme der linksventrikulären Ejektionsfraktion bei Hunden nach einer TNF- α Applikation der Abnahme der linksventrikulären Ejektionsfraktion während des menschlichen, septischen Schocks gleicht^{37,38,39}. Auch lässt sich durch die alleinige Infusion von TNF- α beim Menschen ein Krankheitsbild ähnlich der septischen Kardiomyopathie induzieren⁴⁰. Eine weitere bedeutende Funktion des TNF- α während der Sepsis ist die Induktion der NO-Synthase (NOS)⁴¹. Die in mehreren Isoformen existierende NOS, u.a. die durch Endotoxin und Zytokine induzierbare Form iNOS⁴², bildet Stickstoffmonoxid, welches während der Sepsis in exzessiven Mengen nachweisbar ist⁴³. Bei NO handelt es nicht nur um einen bedeutenden Vasodilatator⁴⁴, sondern es reduziert sowohl die basale Kontraktilität von Kardiomyozyten⁴⁵ als auch ihre β -adrenerge Stimulierbarkeit⁴⁶. Desweiteren konnten Sundrani et al. nachweisen, dass eine Inhibierung der NO Produktion während der Sepsis, zu einer Zunahme der Leukozytenadhäsion in postkapillären Venolen führt und die Rollgeschwindigkeit der Leukozyten über das Endothel senkt⁴⁷.

2.4 Koronare Mikrozirkulationsstörungen als pathogenetisches Prinzip der septischen Kardiomyopathie

Eine globale ischämische oder hypoxische Schädigung des Myokards während der septischen Kardiomyopathie konnte durch Untersuchungen an septischen Patienten, die eine Zunahme des koronaren Blutflusses bei gleichzeitiger Abnahme der myokardialen Sauerstoffextraktion ergaben, ausgeschlossen werden^{8,10}. Die Ergebnisse der bisher unternommenen Untersuchungen lassen dabei aber eine Bewertung der Mikrozirkulation nicht zu. Eine verminderte Sauerstoffextraktion kann sowohl die Folge einer Störung der Sauerstoffaufnahme und -verwertung als auch einer Störung der kapillären Perfusion sein. Ein Abfall der Sauerstoffextraktion ließe sich durchaus über eine vergrößerte arteriovenöse Shuntdurchblutung erklären. Seeger et al. beschrieben derartige Veränderungen während der Sepsis u.a für die Lunge^{48,49,50} und den Darm^{51,52}. Ein wichtiges pathophysiologisches Prinzip ist dabei die schwerwiegende Störung der regionalen Mikrozirkulation, wobei es zu einer unphysiologischen Mehrdurchblutung einzelner Kapillarstrecken bei gleichzeitiger

Minderdurchblutung anderer kommt. Diese nicht bedarfsorientierte Durchblutung führt letztendlich zu einer funktionellen Shunt-Perfusion und damit zu einer mangelnden Versorgung und Funktionsstörung der Gewebe. Eine derartige Störung der Durchblutung könnte durchaus den Abfall der Sauerstoffextraktion erklären.

An septischen Schafen konnte die Unfähigkeit einer Steigerung der Sauerstoffextraktion, normalerweise eine wichtige metabolische Reserve des Herzens, gezeigt werden⁵³. Gesunde Kontrolltiere erhöhten unter Hypoxie die Sauerstoffextraktion von 78% auf 88%. Bei den septischen Versuchstieren jedoch wurde keine signifikante Steigerung gemessen. Da eine solche Steigerung durch Rekrutierung weniger perfundierter Kapillarabschnitte erreicht wird, kann ein Ausbleiben dieser Steigerung als Hinweis für eine Störung der kapillaren Perfusion angesehen werden.

Histologische Untersuchungen des Myokards von Schafen in der hyperdynamen Phase der Sepsis zeigten Einzelzellnekrosen ohne zusammenhängende infarzierte Areale, inter- und intrazelluläre Ödeme, ultrastrukturelle Kontraktionsbanden und degenerative mitochondriale Veränderungen⁵⁴. Diese hypoxische Gewebsschädigungen können nicht durch eine Störung der globalen Durchblutung erklärt werden, sondern sprechen auch für eine pathologische Änderung der Mikrozirkulation. Weitere Untersuchungen ergaben als Ursache für eine erhöhte Ischämieempfindlichkeit endotoxinämischer Rattenherzen Hinweise auf eine Störung der Mikrozirkulation⁵⁵. Groenvald et al. untersuchten, mit Hilfe von radioaktiven Mikrosphären, die regionale myokardiale Durchblutung von Hunden, die eine Bolusinjektion Endotoxin erhalten hatten. Das Herzzeitvolumen und auch der mittlere arterielle Druck der Toxin-Hunde sanken gegenüber denen der Kontrolltieren. Global konnten sie aber weder eine Änderung des Blutflusses, noch des O₂-Metabolismus nachweisen. Es zeigte sich jedoch eine Heterogenität der Durchblutung und neben Gebieten mit einer Minderperfusion ließen sich auch überperfundierte Areale nachweisen⁵⁶.

Über den Pathomechanismus der myokardialen Mikrozirkulationsstörungen ist jedoch wenig bekannt. Zu den Verteilungsstörungen in der Mikrozirkulation tragen unter anderem die Okklusion von Kapillaren durch rigide Erythrozyten⁵⁷, vermehrt gebildete vasoaktive Mediatoren, die zu einer Störung der Vasoregulation führen, eine gesteigerte kapilläre Permeabilität bei Endothelzellschädigung und eine verstärkte endotheliale Adhäsion von Granulozyten bei⁵⁸. Im Folgenden soll auf einige dieser vasoaktiven Substanzen und auf die für eine Granulozytenadhäsion nötigen Adhäsionsmoleküle näher eingegangen werden.

2.5 Vasoaktive Produkte der Lip- und Cyclooxygenasen

Das Ausgangsprodukt der vasoaktiven Eicosanoiden ist die Arachidonsäure (Eicosatetraensäure, AA), eine vierfach ungesättigte C20-Fettsäure, die von verschiedenen Phospholipasen aus den Lipiden biologischer Membranen mobilisiert wird.

Die Metabolite, die aus der AA gebildet werden, unterscheidet man nach dem Namen des für die Oxidation verantwortlichen Enzyms in Cyclooxygenase- und Lipoxygenaseprodukte.

Unter der Einwirkung von Mediatoren humoraler Kaskadensysteme, Sauerstoffradikalen und Bakterientoxinen während der Sepsis, kommt es zu einer verstärkten Aktivierung des Arachidonsäuremetabolismus und dadurch zu einem Anstieg vasoaktiver Eicosanoide⁵⁹.

Die 5-Lipoxygenasen katalysieren eine Dioxygenierung der AA zu instabilen Hydroperoxyeicosatetraenoiden (HPETE), die durch Hydroperoxydassen zu biologisch aktiven Hydroxyeicosatetraensäuren metabolisiert werden können. Dieser Schritt ist abhängig von der Interaktion der 5-Lipoxygenase mit einem Membranprotein des Zellkerns, dem 5-lipoxygenase activating protein (FLAP)⁶⁰. Aus 5-HPETE entsteht durch Dehydrierung das intermediäre Epoxid Leukotrien A₄ (LTA₄). LTA₄ kann auf verschiedenste Weise weiter metabolisiert werden. Durch spontane Hydrolyse entsteht im Folgenden 6-trans-LTB₄, durch eine weitere Dehydrierung LTB₄. Die LTC₄-Synthase katalysiert die Konjugation von LTA₄ mit Glutathion zu den Cysteinyl-Leukotrienen (LTC₄, LTD₄, LTE₄) als weitere Möglichkeit der Metabolisierung (siehe Abbildung 1).

Viele Aktivatoren der 5-Lipoxygenase sind nicht in der Lage, die zur Freisetzung der Arachidonsäure nötigen Phospholipasen zu aktivieren. Allerdings lassen sich unter inflammatorischen Bedingungen hohe AA-Gewebsspiegel messen, so dass die LT-Synthese nicht zwingend von endogen freigesetzter AA abhängig ist.

Die zur Bildung der Cysteinyl-Leukotriene notwendige LTC₄-Synthase ist in PMN nicht vorhanden. Jedoch beschrieben Maclouf et al. die Möglichkeit einer transzellulären Synthese⁶¹. Mittels Sezernierung des sehr instabilen Zwischenprodukts LTA₄ in den Extrazellulärraum durch den Granulozyt, steht es dort etwaigen Akzeptorzellen, z.B. Endothelzellen zur weiteren Metabolisierung zur Verfügung⁶². Diese können dann durch ihre Glutathion-S-Transferase LTA₄ zu Cysteinyl-Leukotriene metabolisieren.

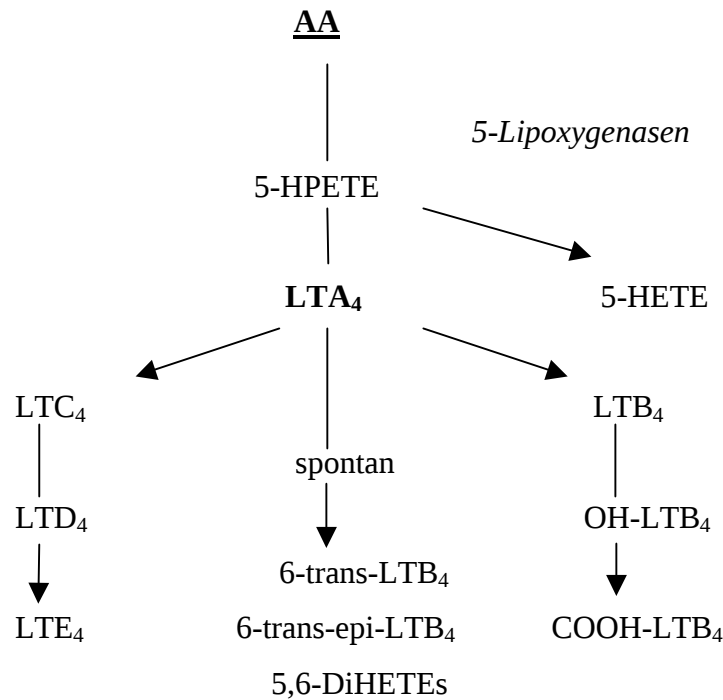


Abbildung 1 *Metabolismus der Arachidonsäure*

2.6 Inflammatorische Eigenschaften der Leukotriene

Ursprünglich wurden die Leukotriene als Leukozytenprodukte betrachtet. Piper et al. wiesen jedoch nach, dass sie auch von Koronar- und Pulmonalarterien produziert werden⁶³. LTB₄ (als Dehydrationsprodukt von LTA₄) erweist sich als starkes Chemotaxin und Aktivator von polymorphkernigen Granulozyten (PMN). PMN sind in der Lage, das instabile LTA₄ selbst zu synthetisieren und es an ihre Umgebung abzugeben, wo es von benachbarten Zellen zu LTC₄ metabolisiert werden kann⁶⁴. Diese Zell-Zell Interaktion besitzt eine wichtige Kontrollfunktion in der Produktion der Eicasonoiden.

Bei den Peptidbindung tragenden Leukotrienen (LTC₄, LTD₄, LTE₄) handelt es sich um potente Verbindungen, die bronchokonstriktorisch⁶⁵ und vasokonstriktorisch⁶⁶ wirken. An betäubten Hunden konnte Woodman et al. zeigen, dass vor allem die Leukotriene LTC₄ und LTD₄ eine sonst starke, konstriktive Wirkung auf die Koronararterien besitzen⁶⁷. Nach intraarterieller Gabe von LTC₄ oder LTD₄ in die Arterie circumflexa der Hunde, nahm der koronare Blutfluß um 42% ab, ohne dabei meßbar den systemischen oder pulmonal arteriellen Druck zu beeinflussen. Ähnliche Effekte ließen sich für LTE₄ nicht nachweisen. Da der gemessene Abfall des koronaren Blutflusses, resultierend aus einer koronaren

Vasokonstriktion, auch bei gleichzeitiger Zugabe von Indomethacin, einem potenten Cyclooxygenase Inhibitor, nachweisbar blieb, konnte ein etwaiger Einfluß von Prostaglandinen auf die Ergebnisse ausgeschlossen werden.

Frühere Arbeiten von Burke et al.⁶⁸ und Michaelassi et al.⁶⁹ vermuteten auch eine direkt negativ inotrope Wirkung der Cysteinyl-Leukotriene. Durch Versuche an isolierten Herzen und an Kardiomyozyten von Ratten, Katzen und Meerschweinchen kamen Roth et al. zu einem anderen Ergebnis. Bestätigt wurde eindeutig die vasokonstriktorische Komponente der Cysteinyl-Leukotriene. Die Tatsache, dass bei den isolierten Herzen entweder der koronare Blutfluß nach Zugabe von LTC₄ oder LTD₄ sank oder (wenn er konstant gehalten wurde) der Perfusionsdruck stieg, ließ eindeutig auf eine Vasokonstriktion schließen. An isolierten Kardiomyozyten ließen sich jedoch keine direkten Effekte nachweisen. Dies spricht gegen eine direkte negativ inotrope Wirkung der Cysteinyl-Leukotriene. Roth et al folgerten daraus, dass die nachweisbar abnehmende Kontraktionskraft der Herzen, als ein sekundärer Effekt anzusehen ist, der aus der vorangegangenen Vasokonstriktion resultiert⁷⁰.

Joris et al. zeigten an Meerschweinchen, dass LTC₄ und LTE₄ in postkapillären Venolen eine Leckage hervorrufen können, die elektronenmikroskopisch dem Effekt von Bradykinin und Histamin glich⁷¹. Diese erhöhte endotheliale Permeabilität kann zu einer Ödembildung führen.

2.7 Pathophysiologische Bedeutung neutrophiler PMN bei der septischen Kardiomyopathie

Neuere experimentelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Rekrutierung und Aktivierung von PMN auch eine Rolle bei der Entstehung der kardialen Dysfunktion während der Sepsis spielt. Barroso-Aranda et al. beobachteten eine Akkumulation von PMN in den myokardialen Kapillaren von Ratten, die eine subletale Injektion von LPS erhalten hatten. Sie schlossen daraus, dass ein Teil der LPS-induzierten Toxizität über eine Rekrutierung von PMN in der Mikrozirkulation und deren Aktivierung vermittelt wird⁷². Auch Goddard et al. zeigten in einem Sepsismodel an Schweinen eine Retention von PMN in der koronaren Mikrozirkulation⁷³. Granton et al. perfundierten zwei isolierte Herzen mit Blut eines betäubten Kaninchens. Dem Kaninchen wurden kontinuierlich 1 mg/kg KG Endotoxin infundiert. Einem der externen Herzen war ein Leukozytenfilter vorgeschaltet, während das andere Herz ungefiltertes Blut des Kaninchens erhielt. Sie konnten eine

signifikante Abnahme der kardialen Leistung nur bei dem Herzen nachweisen, welches ungefiltertes Perfusat mit aktivierten PMN erhielt⁷⁴.

2.8 Funktion und Bedeutung von Adhäsionsmoleküle

Obwohl schon vor 150 Jahren im Mikroskop beobachtet wurde, dass Leukozyten aus dem Gefäßsystem zu dem Ort einer im Interstitium gelegenen Entzündung wandern, konnte erst in den letzten Jahren mit der Entdeckung der Adhäsionsmoleküle ein Teil dieses Mechanismus aufgeklärt werden. Es werden drei verschiedene Familien von Adhäsionsmolekülen unterschieden, die eine zentrale Rolle bei der leukozytären-endothelialen Interaktion spielen⁷⁵:

- Selektine (E-, L-, P-selectin)
- Integrin-Rezeptoren (LFA-1 [CD11a/CD18], Mac-1 [CD11b/CD18], VLA-1)
- Immunglobulin-Superfamilie (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1)

In Kombination mit verschiedenen Chemotaxinen (TNF α , IL-1, FMLP) sind diese Zell-Adhäsions-Moleküle (CAMs) für den Vorgang der leukozytären-endothelialen Zelladhäsion verantwortlich^{76,77} (siehe Abbildung 2).

2.8.1 Selektine

Für die initiale Phase der Adhäsionskaskade sind die Selektine (v.a. P-selectin) verantwortlich. P-selectin (CD62P) ist innerhalb der Endothelzelle in Weibel-Palade Körpern gespeichert, und kann innerhalb von Minuten auf einen entsprechenden Reiz (z.B. durch Histamin, LTC₄, Thrombin) auf der endothelialen Zelloberfläche exprimiert werden⁷⁸. Dort vermittelt es die initiale Bindung der zirkulierenden Leukozyten (v.a. PMN) und verringert deren Geschwindigkeit auf weniger als 50µm/s, so dass diese auf der Oberfläche des Endothels entlangrollen. Durch die Kombination aus verlängerter Verweildauer der Leukozyten an der Gefäßwand und der Sezernierung von

chemotaktischen Stoffen im Bereich von Entzündungen, kommt es zur Aktivierung von Integrin-Rezeptoren auf den Leukozyten⁷⁹.

2.8.2 Integrin-Rezeptoren

Der Integrin-Rezeptor CD11/CD18 wird vor allem von PMN exprimiert, wobei er im Ausgangszustand in einer inaktiven Form vorliegt und nicht zur Adhärenz führt. In Anwesenheit des platelet-activating-factor (PAF) und/oder Interleukin-8 (IL-8) die u.a. von aktivierten Endothelzellen freigesetzt werden, kommt es zu einer Konformationsänderung und Aktivierung der Integrin-Rezeptoren. PAF wird von Endothelzellen Minuten nach Stimulierung durch Histamin, Thrombin oder LTC₄ gebildet und an der Zelloberfläche exprimiert⁸⁰. Wichtigster Ligand für CD11/CD18 ist ICAM-1⁸¹ mit dem er fest bindet und durch den der Granulozyt zur Emigration aus dem Gefäßsystem aktiviert wird. Durch die Entwicklung spezifischer Antikörper gegen den Integrin-Rezeptor CD11/CD18, konnte dessen Bedeutung für die Emigration von Granulozyten in den letzten Jahren besser untersucht werden. So zeigte sich bei Untersuchungen im Rahmen der Ischämie und Reperfusion, dass durch Blockierung von CD11/CD18 die Adhäsion und Emmigration von PMN signifikant gesenkt werden konnte⁸². Thomas et al. prüften den Effekt eines monoklonalen Antikörpers gegen einen der funktionellen Epitope von CD18 im Rahmen der Sepsisforschung. Sie konnten nachweisen, dass sich die endotheliale Adhäsion von PMN im Herzen der Versuchstiere verringerte und dass dies einen positiven Effekt auf die kardiovaskuläre Dysfunktion hatte⁸³.

2.8.3 Immunglobulin-Superfamilie

Das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) ist das bisher am besten untersuchte Adhäsionsmolekül. Es besteht aus fünf extrazellulären, immunglobulinähnlichen Proteindomänen (D1-D5), einer membrandurchquerenden (M) und einer intrazellulären (I) Domäne (siehe Abbildung 3). ICAM-1 besitzt eine geringe konstitutive Basisexpression auf der Endothelzellenoberfläche und wird auf Stimulation durch verschiedene Stimuli (z.B. Cytokine) hochreguliert. Frühere Studien deuteten an, dass für die Hochregulation von ICAM-1 auf einen Stimulus hin etwa 2-3 Stunden benötigt werden, da ICAM-1 im

Gegensatz zu P-selectin von Endothelzellen de novo synthetisiert werden muss. Gasic et al. demonstrierten aber 1991 an Hundenkarotiden, dass nach Spülung der Karotiden mit H_2O_2 eine signifikante Adhäsionszunahme von PMN zu verzeichnen war. Wobei sie diesen Effekt durch einen monoklonalen Antikörper gegen ICAM-1 praktisch komplett aufheben konnten⁸⁴. Zudem konnten Argenbright et al. zeigen, dass die Zugabe eines monoklonalen ICAM-1 Antikörpers die Adhäsion durch $C5_a$ aktivierter PMN auf unstimulierten Kaninchenendothelzellen auch in vivo signifikant senkt⁸⁵. Außerdem beschrieben sie, dass monoklonale Antikörper gegen ICAM-1 die Adhäsion aktivierter PMN in vivo und in vitro inhibieren. Wie schon für die Blockade von CD11/CD18 beschrieben wurde, so konnte auch für eine Blockade von ICAM-1 eine protektive Wirkung in der Ischämie/Reperfusion Schädigung nachgewiesen werden. Xin-Liang et al. konnten an Katzen zeigen, dass nach einer 90-minütigen Ischämie, gefolgt von einer 20-minütigen Reperusionszeit die Adhäsion von unstimulierten PMN am koronaren Endothelium signifikant stieg. Wurden aber zehn Minuten vor der PMN Gabe die Koronararterien mit einem selektiven ICAM-1 Antikörper inkubiert, sank die PMN Adhäsion um ca. 48 %⁸⁶.

Offensichtlich ist ICAM-1 der wichtigste Ligand für CD11/CD18, wobei CD11/CD18 in unterschiedlichen Regionen von ICAM-1 bindet⁸⁷. ICAM-1 konnte nicht nur auf den Endothelzellen im Bereich von Entzündungen verstärkt nachgewiesen werden, sondern besitzt auch Bedeutung u.a. bei immunmedierten Erkrankungen (z.B. Antigen induzierte Arthritis, hyperreagibles Bronchialsystem, Abstoßungsreaktion nach Transplantation, Sanarelli-Schwartzmann Reaktion)⁸⁸.

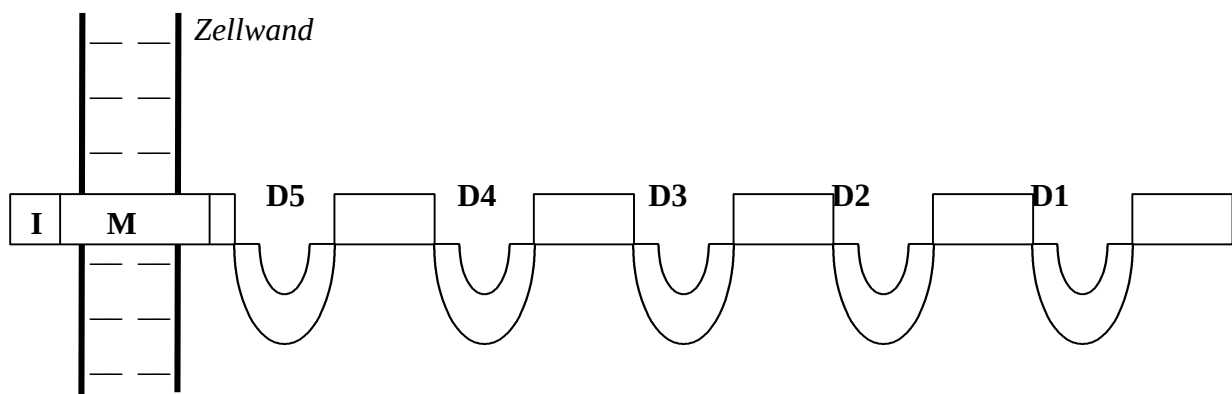


Abbildung 3 Molekulares Modell der Struktur von ICAM-1

Das interzelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM-1) besteht aus fünf extrazellulären, immunglobulinähnlichen Proteindomänen (D1-D5), einer membrandurchquerenden (M) und einer intrazellulären (I) Domäne.

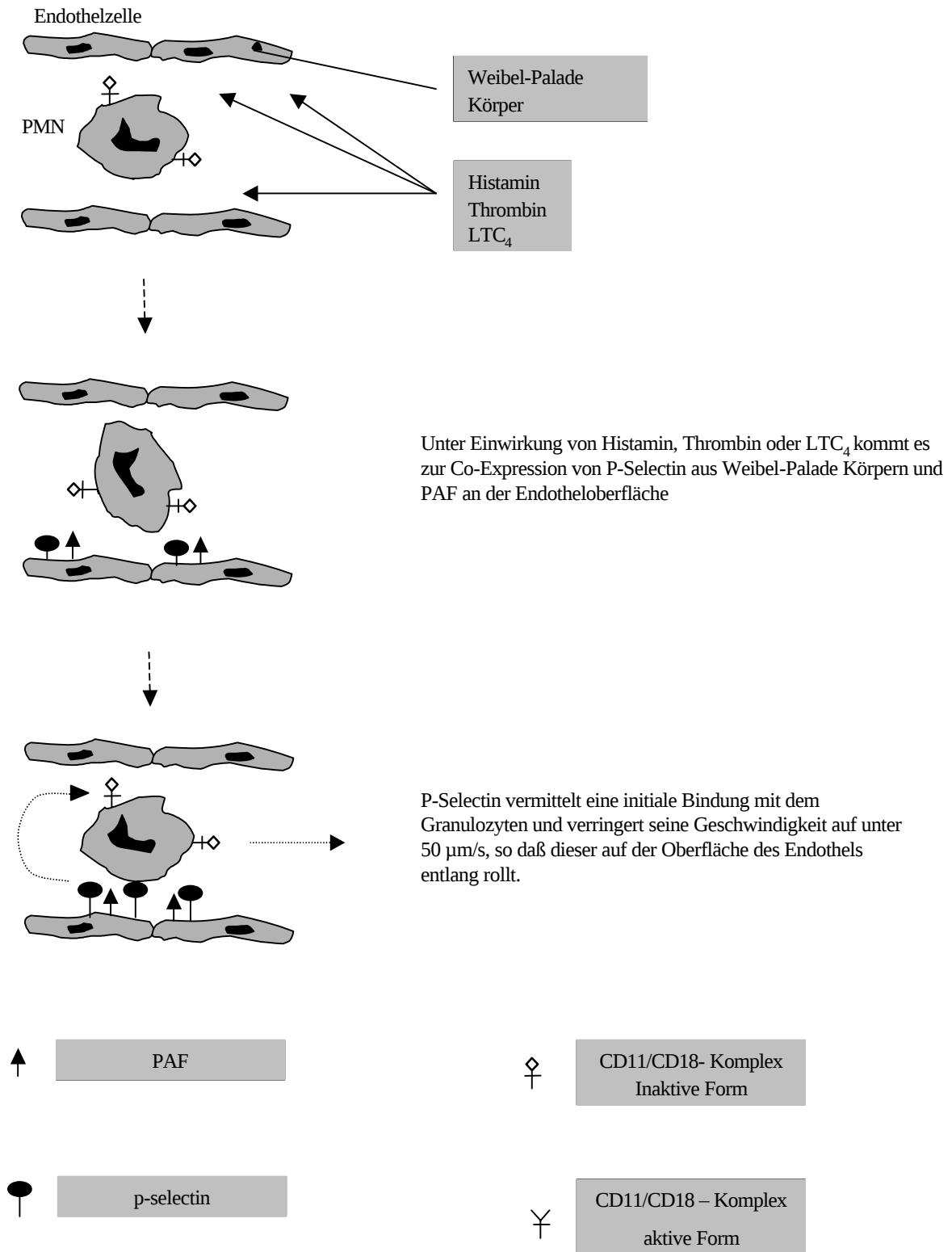


Abbildung 2 Schaubild zur Granulozytenadhäsion

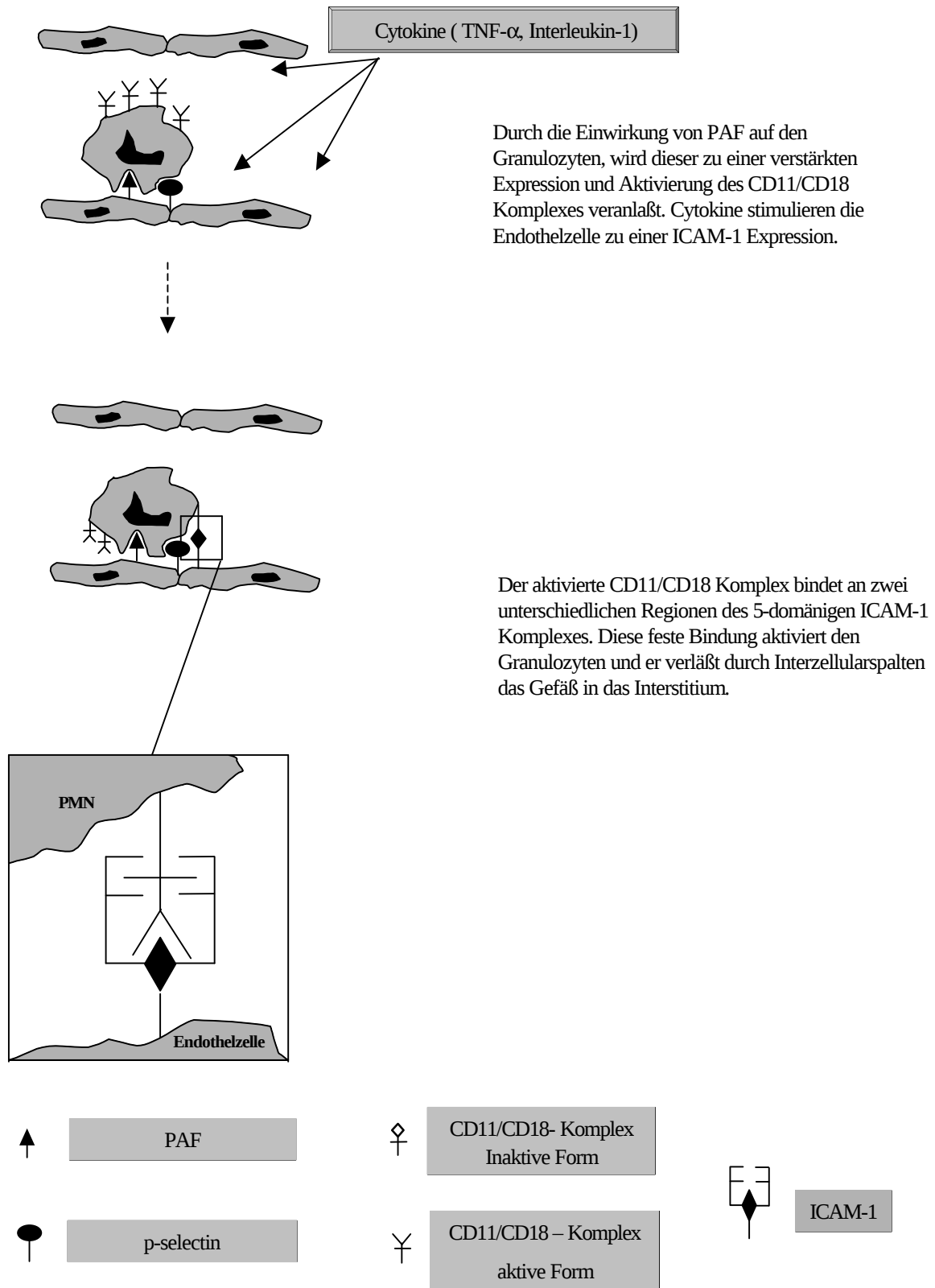


Abbildung 2 Schaubild zur Granulozytenadhäsion

2.9 Aktivatoren von PMN

2.9.1 Der Plättchen-aktiverende-Faktor (PAF)

Die Bildung des Plättchen aktivierenden Faktors (PAF, 1-O-Alkyl-2-Acetyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin) erfolgt aus Membranphospholipiden mit der Struktur 1-O-Alkyl-2-Acyl-Glycero-3-Phosphocholin durch eine Deacylierung mit folgender Acetylierung⁸⁹: Endothelzellen, Mastzellen, Makrophagen und Granulozyten sind zu dieser Synthese fähig^{90,91}.

Werden Endothelzellen durch Thrombin, Histamin oder LTC₄ aktiviert, kommt es innerhalb von Minuten zur Expression von P-selectin und der Bildung von PAF⁹². Das bedeutet, dass derselbe Stimulus die Bildung sowohl eines Adhäsionsmoleküls, als auch eines spezifisch aktivierenden Moleküls induziert. PAF bindet, wie auch P-selectin, an dem PMN und induziert die Hochregulation des Glykoproteins CD11/CD18. Als Konsequenz daraus wird der PMN aktiviert. Die anbindende Komponente, vermittelt durch P-selectin, verstärkt wahrscheinlich noch die durch PAF vermittelte Adhäsionsfähigkeit⁵⁰.

Abgesehen von der aktivierenden Wirkung von PAF auf Thrombozyten und Granulozyten, besitzt es auch noch ausgeprägte vasomotorische Eigenschaften in der pulmonalen und koronaren Strombahn. PAF induziert einen Teil seiner inflammatorischen und vasoaktiven Wirkungen über die Bildung von Leukotrienen. Die Zugabe von PAF löst am isolierten Rattenherz eine kurzzeitige Vasodilatation aus, gefolgt von einer durch Leukotrienen induzierten Vasokonstriktion^{93,94}.

2.9.2 N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP)

Bei fMLP handelt es sich um einen repräsentativen Vertreter der formyl-Peptide, die von allen Bakterien gebildet werden^{95,96}. Auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten konnte anhand radioaktiver Methoden ein Rezeptor mit hoher Affinität für fMLP nachgewiesen werden⁹⁷. Erste Untersuchungen ergaben, dass sich neutrophile Granulozyten in Richtung eines fMLP-Gradienten orientieren⁹⁸. Neuere Untersuchungen von Maher et al. konnten eine direkte Bewegung der Granulozyten in Richtung der höheren fMLP Konzentration nachweisen. Außer chemotaktisch wirkt fMLP auch direkt auf den Aktivitätszustand des

Granulozyten. Unter der Einwirkung von fMLP wurde eine Erhöhung der granulozytären Steifheit und eine vermehrte Retention im pulmonalen Gefäßbett beschrieben⁹⁹.

Asako et al. beschrieben die effektive Induzierung granulozytärer Adhäsion und sowohl eine Verminderung der Rollgeschwindigkeit von Granulozyten über das Endothel, als auch ihre Emigration in das Gewebe durch fMLP.

Durch Bindung von fMLP an seinen spezifischen G-Protein-Rezeptor wird die Phospholipase A₂ (PLA₂) und die Phospholipase C (PLC) aktiviert^{100,101}. Möglicherweise über Veränderungen der lokalen Ca²⁺-Konzentration¹⁰², führt die Aktivierung von PLC zu einer Hochregulation der β_2 -Integrin Funktion^{103,104,105}. PLA₂ führt zur Freisetzung von Arachidonsäure, die essentiell ist für die de novo Expression und Aktivierung von β_2 -Integrin CD11b/CD18 aus tertiären Reservegranulas¹⁰⁶.

Daher wird fMLP, neben PAF, routinemäßig zur Aktivierung von Granulozyten bei in vivo und in vitro Versuchen eingesetzt^{107,108,109}.

2.10 Die Rolle bakterieller Toxine auf die bakterielle Pathogenität

Während der Sepsis kommt es zu einer hämatogenen Dissemination des Erregers oder seiner Pathogenitätsfaktoren. Dabei handelt es sich bei Letzteren um äußerst potente Aktivatoren verschiedenster inflammatorischer Reaktionen. In Bezug auf die zugrundeliegende Erregerspezies, konnten aber keine Unterschiede in Quantität und Qualität der hervorgerufenen kardiovaskulären Symptome festgestellt werden. Sowohl in der gram-positiven, als auch in der gram-negativen Sepsis ist die myokardiale Kontraktilität septischer Patienten gestört¹¹⁰. Natanson et al. zeigten anhand eines Hundemodells, dass sowohl *Escherichia coli* als auch *Staphylococcus aureus*, als Prototypen gramnegativer bzw. grampositiver Keime, gleichartige kardiovaskulären Veränderungen auslösen¹¹¹.

Die erwähnten Pathogenitätsfaktoren der Bakterien lassen sich in zwei Gruppen unterteilen:

2.10.1 Strukturelle Bestandteile der Bakterienwand

Bei den Endotoxinen handelt es sich um strukturelle, pathogene Bestandteile der Bakterienwand, welche erst bei Zerfall des Bakteriums freiwerden. Neben dem

physiologischen Absterben der Erreger und ihrer Zerstörung durch die humorale und zelluläre Immunität des Wirtes, kann eine Antibiotikatherapie zu einer massiven Freisetzung der pathogenen Bestandteile führen. Endotoxin ist ein Lipopolysaccharid (LPS) und besteht aus drei Teilen, von denen der äußerste aus strukturell und antigenetisch verschiedenen Oligosacchariden gebildet wird und die Grundlage der O-Typisierung gramnegativer Bakterien darstellt. Praktisch Strukturgleichheit besitzt bei den meisten gramnegativen Erregern der Mittelteil des LPS, welcher aus sogenannten Core-Oligosacchariden besteht. Für die eigentliche Toxizität des Endotoxins wird das sich anschließende Lipid A verantwortlich gemacht. Dass die alleinige Applikation von LPS in der Lage ist, sowohl allgemein septische Symptome, als auch die speziellen Veränderungen der septischen Kardiomyopathie hervorzurufen, wurde an Tiermodellen und gesunden Probanden intensiv untersucht und nachgewiesen^{112,113,114}. Da ein direkt toxischer und negativ inotroper Effekt des Endotoxins auf isolierte Kardiomyozyten ausgeschlossen wurde, scheint es seine Toxizität über die Aktivierung andere Effektorsysteme auszuüben¹¹⁵.

Ein weiterer Bestandteil grampositiver Keime ist die Lipoteichonsäure (LTA), die in der Zytoplasmamembran der Bakterien verankert ist und als lineares Molekül die gesamte Mureinschicht durchzieht¹¹⁶. De Kimpe et al. konnten nachweisen, dass die LTA in der Lage ist die NOS zu induzieren und dadurch zu einer Hypotension führen kann¹¹⁷.

2.10.2 Exotoxine

Bei Exotoxinen handelt es sich um Pathogenitätsfaktoren, die aktiv von Bakterien sezerniert werden und wesentlich zu ihrer Virulenz beitragen. Im Gegensatz zu den thermostabilen, glukolipoidartigen Endotoxinen sind sie eiweißartig und thermolabil. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass Exotoxine stärker die Bildung von Antikörpern induzieren.

Wichtige Sepsiserreger sind in der Lage, Exotoxine zu bilden. So wird von dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* das die Proteinbiosynthese irreversibel blockierende Exotoxin A gebildet. Auch lässt sich an isolierten Kardiomyozyten eine verzögerte De- und Resensibilisierung für Katecholamine in Gegenwart von *Pseudomonas* Exotoxin A nachweisen^{118,119}.

Von *Streptococcus pyogenes* wird das porenbildende Exotoxin Streptolysin O gebildet. Das antigenetisch wirksame Lysin O, das auch zur Antikörper-Titer-Bestimmung genutzt wird, wirkt toxisch auf isolierte Kardiomyozyten¹²⁰.

Ein wichtiger Virulenzfaktor intestinaler und extraintestinaler Infektionen durch *Enterohämorrhagische Escherichia coli*, ist das porenbildende Exotoxin α -Hämolysin¹²¹. Elliot et al. konnten zeigen, dass α -Hämolysin eine direkte zytotoxische und eine entzündungsinduzierende Wirkung besitzt¹²².

2.11 Das α -Toxin von *Staphylococcus aureus*

Einer der häufigsten Auslöser einer grampositiven Sepsis ist *Staphylococcus aureus* (*Staph. aureus*). Eines seiner wichtigsten Toxine ist ein Zytotoxin mit einem Molekulargewicht von 34 000 Dalton, das sogenannte α -Toxin^{123,124,125}. α -Toxin gehört in die Gruppe der porenbildenden Toxine, ist primär wasserlöslich und wird von den Bakterien aktiv in monomerer Form sezerniert. Erst bei Kontakt mit der Zellmembran einer Zielzelle, kommt es zu einer Konformationsänderung der Proteine. Dabei ermöglichen vorher verborgene hydrophobe Molekülanteile ein Eindringen des Toxins in die Lipidmembran. Durch Oligomerisierung inserierter Monomere entsteht eine Pore, die Heptamerstruktur besitzt^{126,127,128}. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie lässt sich diese Pore darstellen und erweist sich als eine senkrecht zur Membran stehende Öffnung, die Moleküle bis zu einer Größe von ca. 1,5 nm passieren lässt^{123,124,125}. Im Extremfall führt diese Permeabilitäts-erhöhung zur Zytolyse, es kann aber auch zu Aktivierung verschiedenster Zellreaktionen kommen¹²⁹. Ionenströme durch die Toxinpore werden als molekularer Mechanismus für die Aktivierung sekundärer Zellreaktionen durch porenbildende Exotoxine verantwortlich gemacht. Lange Zeit wurde ein Ca^{2+} -Einstrom durch die α -Toxin-Pore als grundlegender Mechanismus postuliert. Neuere Arbeiten weisen aber darauf hin, dass es vermutlich über die Pore zu einer Verschiebung von Kaliumionen kommt als initialer Schritt der Zellaktivierung. So wird zum Beispiel der Arachidonsäurenmetabolismus aktiviert, so dass eine gesteigerte Produktion von Prostaglandinen und Leukotrienen nicht verwundert^{123,124}. Die Toxizität des α -Toxins wurde sowohl an isolierten Zellen als auch Tiermodellen aufgezeigt.

Eine Bolusinjektion des gereinigten α -Toxins führt bei Schafen zu einem akuten Herzversagen¹³⁰. An isolierten Rattenherzen kann nach Zugabe von α -Toxin eine Erhöhung des enddiastolischen und endsystolischen Druckes, bei gleichzeitiger Abnahme der Kontraktilität, gemessen werden¹³¹. Sibelius et al. konnten nachweisen, dass die vasoaktiven Effekte des Toxins über Thromboxan vermittelt werden¹³². Gemmel et al. demonstrierten, dass sich durch α -Toxin direkt die phagozytotischen Eigenschaften von PMN erhöhen lassen¹³³.

2.12 Fragestellung

Die Pathogenese der septischen Kardiomyopathie ist noch immer unzureichend geklärt. Neben kardiodepressiven Effekten von Zytokinen, deren Spiegel in der Sepsis erhöht sind, scheinen kardiale Mikrozirkulationsstörungen eine wichtige pathogenetische Relevanz zu besitzen. Zudem weisen neuere experimentelle Daten darauf hin, dass adhärente PMN ebenfalls zur kardialen Funktionsbeeinträchtigungen in der Sepsis beitragen können.

Da bakteriellen Exotoxinen eine große Bedeutung bei der Entstehung septischer Organkomplikationen zuzukommen scheint, wurde vor diesem Hintergrund in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob *Staphylococcus aureus* α -Toxin eine Aktivierung des koronaren Endothels in Form einer Expression von ICAM-1 hervorruft.

Desweiteren wurde untersucht, ob eine erhöhte Expression von ICAM-1 eine verstärkte Retention von PMN in Toxin-perfundierten Herzen zur Folge hat.

Abschließend sollte geklärt werden, inwieweit die Aktivierung dieser retentierten PMN zu Veränderungen kardialer Funktionsparameter führt und ob die dafür zugrundeliegenden Mediatorsysteme identifiziert werden können.

3. Methoden und Materialien

3.1 Methoden

Prinzip der Perfusion isolierter Herzen nach O. Langendorff

1895 beschrieb der Physiologe O. Langendorff eine Methode zur Perfusion isolierter Säugetierherzen¹³⁴. Unter dieser Methode wird im allgemeinen eine Präparation verstanden, bei der das Perfusat retrograd in den Aortenstumpf eines isolierten Herzens eingeleitet wird und bei suffizienter Aortenklappe über die Koronarostien in das koronare Gefäßsystem gelangt (siehe Abbildung 4).

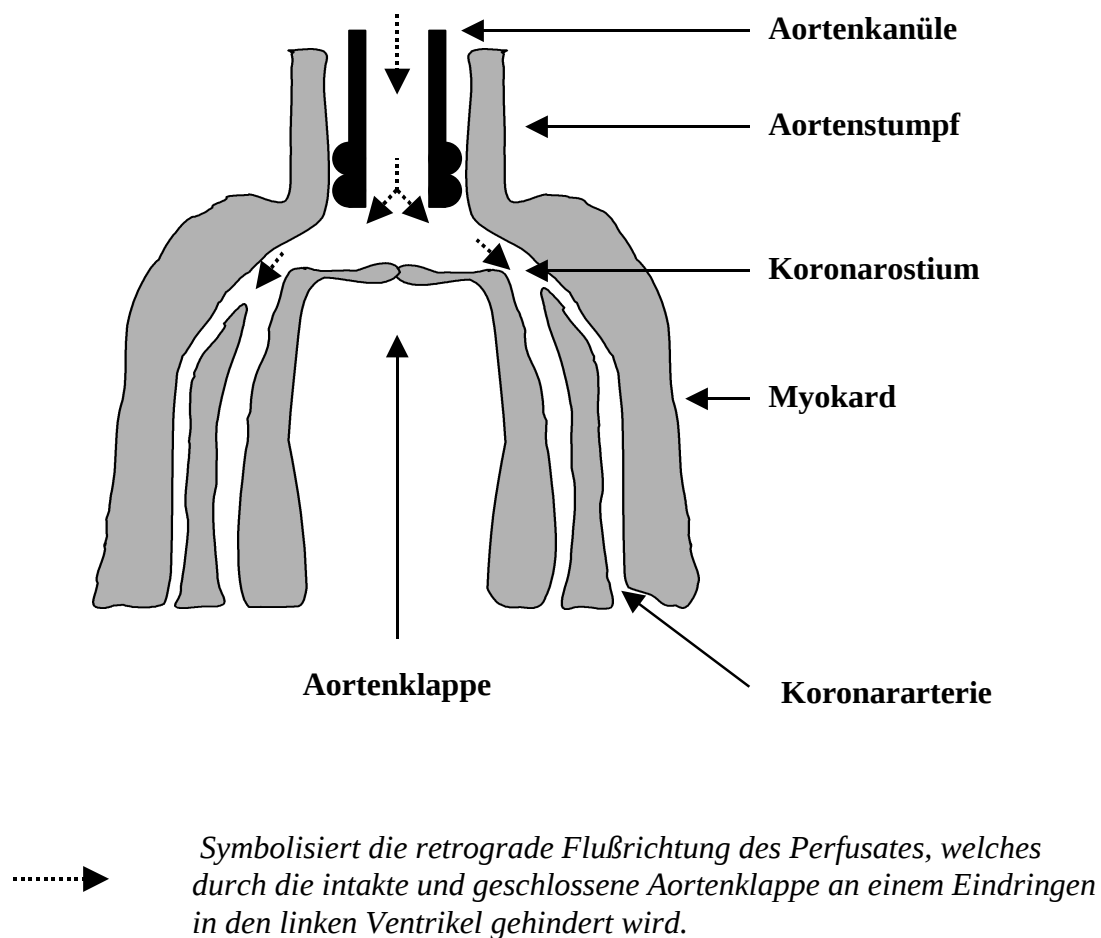


Abbildung 4 Schema der retrograden Perfusion des isolierten Herzens

Da die Aortenklappe ein Abfließen der sauerstoffgesättigten Elektrolyt-Glucose-Lösung in den linken Ventrikel verhindert und weil das Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem bei der Präparation erhalten bleibt, erhält man eine isolierte, spontan schlagende Herzpräparation bei praktisch leeren Ventrikeln. Dies bildet in modifizierter Form die Grundlage der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchsanordnung zur Perfusion isolierter und intakter Rattenherzen.

3.1.1 Präparation und Perfusion isolierter Rattenherzen

Durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital-Natrium (Nembutal[®], 60 mg/kg Körpergewicht) und Heparin (Liquemin[®] 1000 IU/kg Körpergewicht) wurde eine ausreichend tiefe Narkose erreicht und eine intravasale Thrombenbildung vermieden. Die Tiefe der Narkose wurde durch den Ausfall des Kornealreflexes und schmerzinduzierter Abwehrbewegungen gesichert. Nach einer abdominalen Inzision wurde eine bilaterale Thorakotomie durchgeführt, die Brustwand nach kranial verlagert und der Thymus am oberen Gefäßpol des Herzens mobilisiert. Das Perikard wurde inzidiert und das noch schlagende Herz, inklusive eines für die spätere Fixierung ausreichend langen Aortenstumpfes, entfernt und in eine mit 4°C kalter Krebs-Henseleit-Lösung gefüllte Schale für die Präparation zurechtgelegt. Aufgrund der sofort auftretenden Kardioplegie, betrug die Zeitspanne zwischen Durchtrennung der großen Gefäße und dem Herzstillstand nicht mehr als eine Minute. In dieser Lösung wurde dann zur besseren Übersicht eventuelle Thymusreste und Pulmonalvenenstümpfe entfernt, um eine bessere Platzierung des Druckaufnehmers in den linken Ventrikel zu ermöglichen. Durch Spülung wurden Blutreste aus den Koronarien entfernt und das Herzgewicht bestimmt. Die Fixierung erfolgte über den Aortenstumpf an einer Aortenkanüle mit einem Innendurchmesser von 1,5 mm und einem Außendurchmesser von 2,0 mm (Hugo Sachs Elektronik). Danach wurde das Herz freihängend in eine temperierte, abgeschlossenen Organkammer (37° C) verbracht (schematische Versuchsdarstellung siehe Abbildung 5). Sowohl die Temperatur in der Organkammer, als auch die Temperatur des Perfusates wurden konstant gehalten. Die Krebs-Henseleit-Lösung zur retrograden Perfusion des Herzens hatte folgende, modifizierte Zusammensetzung (in mM):

NaCl (125), KCL (4,4), KH_2PO_4 (1,1), $\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,3), $\text{CaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,4), NaHCO_3 (25) und Glukose (13,32). Die Perfusionslösung wurde kontinuierlich mit Carbogen (5 % CO_2 , 95 % O_2) begast und dadurch in dem temperierten Reservoir ein pH von 7,4 $\pm$ 0,03, ein pO_2 von 500 $\pm$ 45 mmHg und ein pCO_2 von 35 $\pm$ 5 mmHg bei einer Temperatur von 37,5° C erreicht.

Durch eine Schlauchpumpe (MS-4 Reglo 8-100, Ismatec) wurde das Herz mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 10 ml/min/g Herzgewicht perfundiert. Vor Versuchsbeginn wurde das Herz mit 150 ml der Perfusionslösung gespült, und die Spülflüssigkeit danach verworfen. Nach Beendigung des Spülvorganges wurde das abtropfende Perfusat aufgefangen und über einen Filter mit der Porengröße von 15 μm in das Reservoir zurückgepumpt. Während des Versuches zirkulierten so 50 ml des Perfusates, damit sich eventuelle Mediatoren und Metabolite in nachweisbaren Konzentrationen anreichern konnten. Proben zur Bestimmung dieser Mediatoren und Metabolite wurden direkt vor dem Filter entnommen.

Bei einem Teil der Versuche, wurden polymorphkernige Granulozyten direkt nach der Rollerpumpe zugegeben, um einen eventuellen Einfluss der Pumpenmechanik auf die Granulozyten auszuschließen.

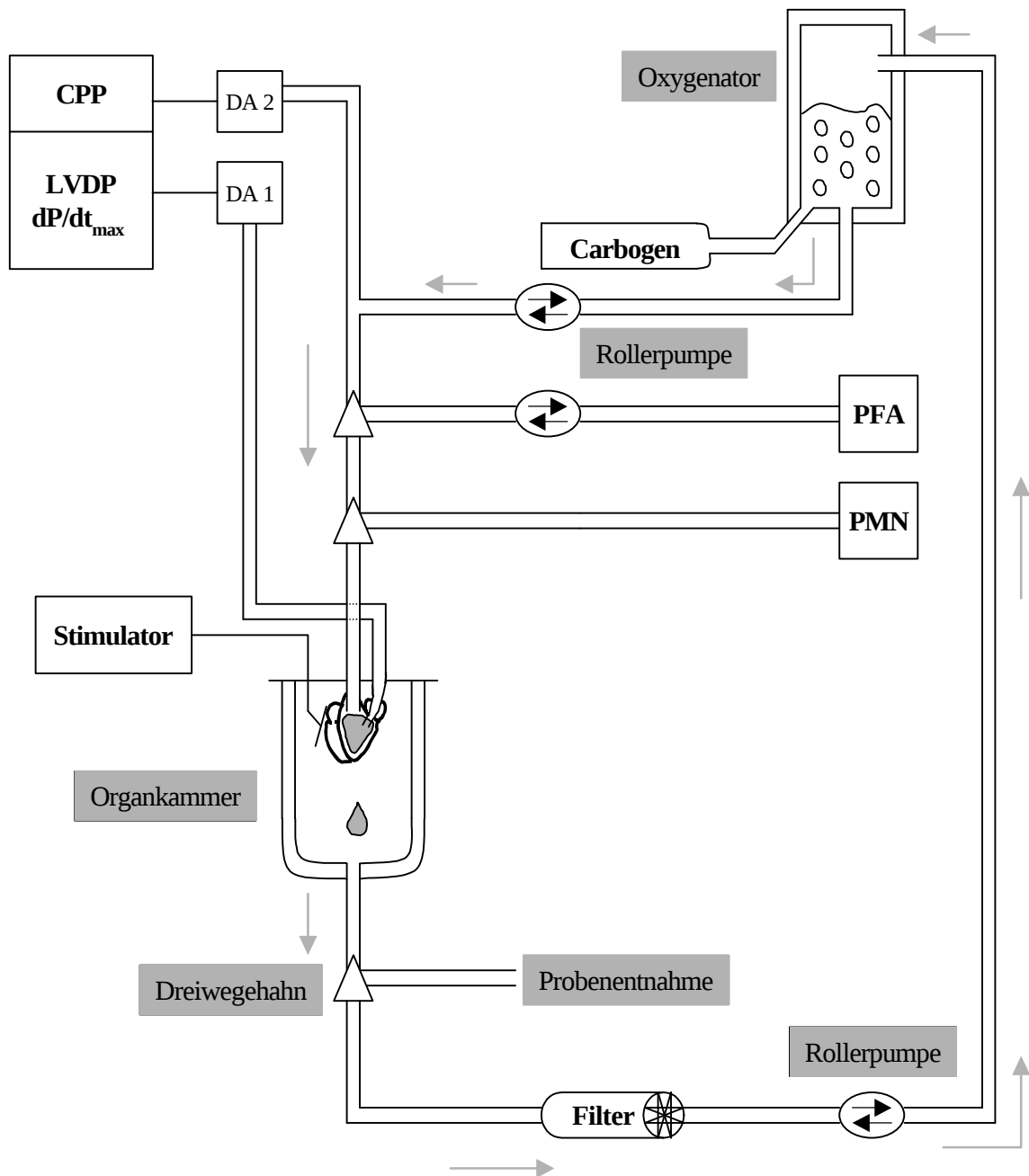


Abbildung 5: Schema des Versuchsaufbau zur retrograden Perfusion isolierter Rattenherzen

Das Herz hängt an einer Aortenkanüle in der auf 37° C erwärmten Organkammer. Das Perfusat wird in einem ebenfalls 37° C warmen Oxygenator mit Carbogen (5 % CO₂ in O₂) gesättigt, gleichzeitig dient der Oxygenator als Reservoir. Eine Rollerpumpe pumpt das Perfusat mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit über die Aortenkanüle retrograd in die Koronarien. Das vom Organ abtropfende Perfusat wird filtriert und in den Oxygenator zurückgeführt. Der koronare Perfusionsdruck wird direkt oberhalb der Aortenkanüle gemessen. Durch einen im linken Ventrikel gelegenen Latexballon wird der linksventrikuläre Druck (LVDP) gemessen und durch seine Differenzierung die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ($dP/dt_{\max}$) ermittelt. Die Probenentnahme erfolgt über einen Dreiweghahn unmittelbar vor dem Filter. Durch eine Stimulator wird die Herzfrequenz über die gesamte Versuchszeit konstant gehalten.

DA = Druckaufnehmer, PFA = Paraformylaldehyd 4% (Fixationslösung zur Perfusion des Organs nach Versuchsende), PMN = polymorphkernige Granulozyten

3.1.2 Messung des koronaren Perfusionsdruckes und der myokardialen Kontraktilität

Als Maß des koronaren Widerstandes wurde über einen oberhalb der Aortenkanüle gelegenen Druckaufnehmer (Combitrans, B. Braun), der bei konstantem Volumenfluss entstehende Perfusionsdruck (CPP) gemessen (siehe Abbildung 5).

Zur Bestimmung der linksventrikulären Pumpfunktion, wurde ein mit Kochsalzlösung gefüllter Latexballon (Hugo Sachs Elektronik) nach Passage des linken Vorhofes und der Mitralklappe, in den linken Ventrikel platziert. Der luftfreie Ballon wurde bis zum Erreichen eines enddiastolischen Wertes von 8 - 12 mmHg mit Flüssigkeit gefüllt. Der linksventrikuläre Druck (left ventricular pressure, LVP) konnte anhand der isovolumentrischen Kontraktion des Myokards über den den Ventrikel komplett ausfüllenden Ballon ermittelt werden. Die Signale beider Druckaufnehmer wurden durch Brückenverstärker amplifiziert (Schwarzer DME 48 S, Picker). Aus der Differenz von systolischem und diastolischem Wert ergibt sich der vom linken Ventrikel entwickelte Druck (left ventricular developed pressure, LVDP), und durch Differenzierung desselben (Schwarzer DER 48, Picker) als Parameter der Kontraktilität, die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}). Alle physiologischen Parameter wurden durch einen Mehrkanalschreiber (Schwarzer CU 12-N, Picker) erfasst.

Alle Herzen wurden mit einem Stimulationsgerät (Stimulator P Typ 201, Hugo Sachs Elektronik) mit einer Frequenz von 300- 360 Schlägen pro Minute (5-6 Hz) stimuliert, um frequenzabhängige Veränderungen von LVP und dp/dt_{max} auszuschließen.

3.1.3 Standardversuchsprotokoll

Nachdem die Herzen mit 150 ml Perfusat nicht rezikulierend ausgiebig gespült wurden, schloss sich die Phase des 'steady state' an. Nach diesen 25 Minuten, in denen die 50 ml Perfusat rezikulierten, wurden alle Herzen, die keine konstanten Werte für CPP, LVDP und dp/dt_{max} zeigten, verworfen.

Alle Herzen wurden dann rezirkulierend, mit einem Gesamtvolumen von 50 ml, bei einem konstanten koronaren Fluß von 10 ml/min/g, perfundiert. Nach der Stabilisierung der Herzen wurden sie für 180 min. mit 0,125 µg/ml α -Toxin perfundiert. Nach 185 min. wurden die PMN, in einer Endkonzentration von 10^6 PMN/ml, dem Perfusat hinzugefügt

und nach 200 min. erfolgte die Applikation von 2 $\mu\text{mol/l}$ fMLP und 25 $\mu\text{mol/l}$ AA für 10 min. Die Experimente wurden nach 210 Versuchsminuten beendet. Mit Kontrollherzen wurde, in Abwesenheit von α -Toxin, nach dem gleichen Versuchsprotokoll verfahren. Zur pharmakologischen Intervention wurde dem Perfusat der mit α -Toxin vorbehandelten Herzen 20 min. vor der PMN Applikation entweder der ICAM-1 Antikörper in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ oder der Lipoxigenasehemmer MK-886 in einer Konzentration von 7,5 $\mu\text{M/l}$ zugegeben. Wurde MK-886 benutzt, so wurden die PMN 10 min. lang mit MK-886 in der selben Konzentration vorbehandelt. Zusätzliche Kontrollversuche beinhalteten eine 180 min. Perfusion von Herzen jeweils in An- oder Abwesenheit von α -Toxin, gefolgt von einer Gabe HBSS-HEPES-Puffer ohne PMN und einer anschließenden Gabe von fMLP und AA, dem beschriebenen Versuchprotokoll folgend. Die Konzentration von LPS lag in α -Toxin angereichertem Perfusat unterhalb der Nachweisgrenze von $< 5 \text{ pg LPS/ml}$, der Nachweisversuch erfolgte dabei mit dem standardisierten LPS-Test der Firma Haemochrom (Coatest Plasma Endotoxin, Haemochrom, Essen, Deutschland).

Für folgende Versuchsgruppen gilt $n = 5$:

- Kontrolle
- Kontrolle + PMN
- Kontrolle + PMN + fMLP + AA
- Kontrolle + fMLP + AA
- α -Toxin
- α -Toxin + PMN
- α -Toxin + PMN + fMLP + AA
- α -Toxin + fMLP + AA
- α -Toxin + PMN + fMLP + AA + anti-ICAM-1
- α -Toxin + PMN + fMLP + AA + MK-886

3.1.4 Gewebeaufbereitung zur histologischen Untersuchung und immunhistochemische Färbemethoden

Zur histologischen Untersuchung des Myokards wurden die Herzen nach Versuche mit 100 ml einer Fixationslösung (4 % Paraformaldehyd in PBS, pH 7,45) perfundiert. Aus der Wand des linken Ventrikels wurden ca. 2 mm dicke und 6 mm lange Stücke mit einem Skalpell geschnitten und in der Fixationslösung 1,5 Stunden bei 4° C inkubiert, der Rest des Herzens wurde verworfen. Durch Inkubation der Gewebestücke in einer aufsteigenden Acetonreihe (50 %, 70 %, 90 %) für jeweils drei Mal 7 Minuten und einer abschließenden fünfmaligen Inkubation in 100 % Aceton für 5 Minuten, wurden die Gewebestücke dehydriert. Das Aceton wurde dann durch ein Gemisch von Immunobed- Infiltratlösung (100 ml Immunobed-solution A + 1,0 g Immunobed catalyst) und Aceton 100% in einem Verhältnis von 1:1 ersetzt. Nach weiteren 10 Minuten erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Rüttler die Inkubation in reiner Immunobed-Infiltratlösung.

Nach Zugabe des Härters (1ml Immunobed-Lösung B pro 25 ml Immunobed-Infiltratlösung) zur Immunobed-Infiltratlösung setzt der Polymerisierungsprozeß des Kunststoffes ein. Damit wurden die Gewebestücke in der Einbettungsform luftblasenfrei übergossen. Die Aushärtung erfolgte über 12-24 Stunden im Kühlschrank. Anschließend erfolgte eine Dehydrierung im Exsikkator. Diese Blöcke wurden mit Hilfe eines Glasmessers in 5 µm dicke Gewebescheiben geschnitten (Mesacut 2-Ultramikrotom, Reichert-Jung, Wien) und auf Objektträgern fixiert.

Die immunhistochemische Untersuchung der plastinierten Gewebestücke erfolgte nach der von Beckstead et al. entwickelten Methode¹³⁵ unter Verwendung der Avidin-Biotin Immunperoxidase. Es wurden monoklonale Antikörper gegen ICAM-1 (CD54) nach folgender Methode eingesetzt:

- Enzymatische Vorbehandlung (0,25% Trypsin in 10mM PBS; pH 7,45)
 - ⇒ Inkubation bei 37° C, 10 min.
 - ⇒ 3 mal 2 min. in PBS auswaschen
- Blockieren der endogenen Peroxidaseaktivität (0,3 % H₂O₂ in 10 % Methanol)
 - ⇒ Inkubation bei 37° C, 30 min.
 - ⇒ 3 mal 5 min. in PBS auswaschen

- Inkubation der Schnitte mit verdünntem Mausserum (10 ml PBS + 150 µl Serum)
(in den folgenden Schritten kurz als 'Serum' bezeichnet)
⇒ Inkubation bei 37° C, 30 min.
- Primärantikörper (in 'Serum' gelöst und auf 1:20 mit Aqua dest. verdünnt)
⇒ Inkubation bei 37° C, 24 Stunden
⇒ 3 mal 5 min. in PBS auswaschen
- Biotinilierter Sekundärantikörper (50 µl biotinilierter Antikörper in 10 ml 'Serum')
⇒ Inkubation bei 37° C, 60 min.
⇒ 3 mal 5 min. in PBS auswaschen
- Inkubation mit VECTASTAIN ABC-Peroxidase Komplex[®]
⇒ Inkubation bei 37° C, 60 min.
⇒ 3 mal 5 min. in PBS auswaschen
- Inkubation mit Peroxidase-Substrat/Chromogengemisch
(5 ml Aqua dest.+ 100 µl Puffer-Stock-Lsg[®] + 200µl DAB-Stock-Lsg[®] + 100 µl H₂O₂)
- Kern-Gegenfärbung mit Hämatoxylin (10 – 20 sek.)
⇒ 10 min. Bläuen in Leitungswasser
- Versiegelung der Präparate mit Permount[®] und Glasdeckeln

Die Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop bei einer 400-fachen Vergrößerung begutachtet.

Als weitere histologische Untersuchungsmethode wurden Präparate mit Hämatoxylin und Eosin nach folgender Methode gefärbt:

- Färbung der Schnitte mit Hämalaunlösung (5-10 min.)
- Bläuung der Schnitte in Leitungswasser (10 min.)
- Färbung der Schnitte mit Eosin 1% (1-2 min.)
- Spülung in Leitungswasser
- Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe
(50%, 70%, 90%, 96%, 2x 100%) je 1 min.
- Versiegelung der Präparate mit Permount[®] und Glasdeckeln

Die Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop bei einer 200-fachen Vergrößerung begutachtet.

3.1.5 Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten

Die Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten aus peripherem Blut wurde nach der Methode von Boyum¹³⁶ durch Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten durchgeführt. Sie erfolgte standardisiert unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur (20-25°C), wobei die Isolierung durchschnittlich zwei Stunden benötigte.

Die Isolierung erfolgte aus EDTA-antikoaguliertem Blut gesunder Spender im durchschnittlichem Alter von 25 Jahren. Durch Punktion der Vena basilica in der Armbeuge mit einer Kanüle der Größe 19 G, wurde Blut in eine zuvor mit EDTA-gefüllten Spritze aspiriert, wobei die EDTA-Endkonzentration 0,125 % betrug.

Es erfolgte zunächst eine Verdünnung des Blutes von 1:2 mit PBS -/-. Mit Hilfe einer sterilen Polypropylenpipette (Falcon) wurden 35 ml dieses Gemisches auf 15 ml Ficoll-Lösung in einem sterilen Propylenröhrchen (Falcon) aufgeschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 400g für 35 min.. Dadurch wurde die Mischung in die drei folgenden unterschiedlichen Schichten aufgeteilt:

- thrombozytenreiches Plasma
- mononukleäre Zellen (Mono- und Lymphozyten)
- Granulo- und Erythrozyten

Die Granulozyten befinden sich gemeinsam mit den Erythrozyten in der Bande am Boden des Röhrchens, die beiden oberen Banden werden abgesaugt. Zur Trennung von Granulozyten und Erythrozyten werden sie in einem Verhältnis von 1:3 mit Polyvinylalkohol in NaCl vermischt und zur Sedimentation der Erythrozyten 20 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Der PMN-reiche Überstand wurde dann mit einer Pipette abgenommen, in frische Röhrchen überpipettiert und bei 150g 10 min. zentrifugiert. Durch Resuspendierung der Zellen mit 18 ml aqua dest. erfolgt eine hypotone Lyse der restlichen, empfindlicheren Erythrozyten. Durch Zusatz von 2 ml 10-fachem PBS-Konzentrat wurde die Lyse nach 20 Sekunden gestoppt.

Um eventuelle Ficoll-Rückstände zu entfernen wurden die PMN in 2 Waschschritten in PBS -/- bei 150g und für 10 Minuten gereinigt.

Bei 400-facher Vergrößerung und mit Hilfe eine Neubauer-Zählkammer, erfolgte zwischen den beiden Waschschritten die lichtmikroskopische Zählung der Zellen. Durschnittlich ließen sich ca. 10×10^7 PMN aus 50 ml Blut isolieren.

Durch Differentialblutbildern wurde in regelmäßigen Abständen die Reinheit der isolierten Granulozyten kontrolliert. Dabei lag der PMN-Anteil im Durchschnitt bei 97 %. Die restlichen 3 % teilten sich auf in Mono- und Lymphozyten (mit ca. 1%) und eosinophile und basophile Granulozyten.

Am Ende der Isolierung waren noch ca. 98 % der Granulozyten vital, was anhand der Trypan-Blau-Ausschluß-Methode und der LDH-Freisetzung kontrolliert wurde. Die spontane LDH-Freisetzung der PMN wurde auf die durch das Bienegift Mellitin hervorgerufene absolute Enzymfreisetzung bezogen und lag immer unter 3 %.

3.1.6 Myeloperoxidaseaktivitätsnachweis zur PMN-Quantifizierung

Da reine Myokardzellen im Gegensatz zu PMN praktisch keine Myeloperoxidase besitzen, ist eine Aktivitätssteigerung dieses Enzyms direkt proportional zur enthaltenen PMN Menge. Zur Quantifizierung der PMN in den Versuchsherzen bedienten wir uns der Methode von Bradley et al.¹³⁷, die 1985 von Mullane et al.¹³⁸ modifiziert wurde.

Nach Versuche wurden aus dem linken Ventrikel Stücke der Größe 0,8 – 1,0g geschnitten und bei – 80° C bis zur Untersuchung tiefgefroren.

Zu den Myokardstücken wurden im Verhältnis 1:10 (Gewicht/Volumen) HTAB-Puffer zugesetzt und die Proben homogenisiert (Ultra-Thurax T25). Es folgte eine dreißigminütige Zentrifugation (Rotor SS34 / 12500 rpm) bei 4° C. Der durch die Trennung der festen und flüssigen Bestandteile entstandene Überstand wurde entnommen und für die MPO-Aktivitätsmessung genutzt. Zu 50 µl Probenüberstand wurden 950 µl ODI-Lösung zugegeben und die Extinktionsänderung bei 460 nm und 25° C photometrisch bestimmt. Eine Einheit [U] MPO ist definiert als die Menge Enzym die 1 mmol H₂O₂ bei 25° C in einer Minute hydrolysiert.

3.1.7 Leukotrienanalytik

Im Wesentlichen bestand die Analytik der Leukotriene aus zwei Abschnitten. Mittels Festphasenextraktion wurden die Lipoxygenaseprodukte vorab aus den Eluatproben (10 ml) extrahiert. Unter zurhilfenahme der reversed-Phase-HPLC (high pressure liquid chromatography) und zusätzlicher UV-Spektrenanalyse, wurden dann die einzelnen Leukotriene indentifiziert und quantifiziert

3.1.8 Festphasenextraktion

Zur Extraktion wurden Bond Elut-Vorsäulen aus einer Silica-Gel Matrix (Partikelgröße 40µm) verwendet. Die daran kovalent gebundenen C₁₈-Alkylreste erlauben, aufgrund ihrer hohen Affinität für unipolare Verbindungen, die Extraktion und anschließende Elution der Lipoxygenaseprodukte. Zur Beschleunigung dieses Vorgangs wurden die verwendeten Lösungen mit leichtem Sog in einer Vakuumkammer durch die Vorsäulen bewegt. Nach einer jeweils zweimaligen Konditionierung der Vorsäulen mit eisgekühltem Methanol und Aqua destillata, wurden die ebenfalls eisgekühlten Proben aufgetragen. Um polare Verunreinigungen zu vermeiden, folgten daraufhin zwei Spülgänge mit Aqua destillata. Durch zweimaliges Durchsaugen von Chloroform (je 500µl), wurde dann die wässrige Phase verdrängt, um schließlich mit zweimal 500µl Methanol die Lipoxygenaseprodukte zu eluieren. Das aufgefangene Methanol wurde dann unter einem kontinuierlichen Strickstoffstrom verdampft. Die eingedampften Proben konnten bis zur Weiterverarbeitung bei -20° C aufbewahrt werden.

3.1.9 Produktion der mobilen Phase und der HPLC-Säulen

3,8 g des Packungsmaterials (Octadecysilyl-Hypersil-Partikel, 5µm) wurden in 35 ml Isopropanol gelöst und unter 440 bar Druck wurde diese Suspension mit einem Säulenpackgerät in die gereinigten Leersäulen gepresst. Zur Ergänzung der gepackten und verschlossenen Säule und um die Hauptsäule zu schützen, wurde eine handgepackte Vorsäule mit Silica-Gelpartikeln hinzugefügt. Die Konditionierung der HPLC-Säule vor

der eigentlichen Inbetriebnahme erfolgte mit einer Lösung aus Na₂EDTA (0,5 %) in Methanol / H₂O (1:9).

Die aus Methanol / H₂O / Essigsäure (72:18:0,16) mobile Phase, wurde mit NH₄OH auf einen pH von 4,9 eingestellt und zur Entfernung partikulärer Verunreinigungen mit einer Teflonmembran (Millipore) gefiltert.

3.1.10 Reversed-Phase-HPLC

Für die chromatographische Auftrennung einzelner Lipoxygenaseprodukte bilden verschiedene Wechselwirkungen die Grundlage. Die apolaren Kohlenstoffketten der Lipoxygenaseprodukte treten dabei mit dem Säulenpackungsmaterial in Wechselwirkung, wobei die polaren Anteile der Lipoxygenaseprodukte mit der flüssigen Phase interagieren. Die unterschiedliche Retentionszeit der einzelnen Produkte innerhalb der Säule, erklären sich daher über Ladungs- und damit substanzspezifischen Wechselwirkungen. Grundsätzlich durchwandert eine Substanz die Säule desto schneller, polarer sie ist.

Die durch die Festphasenextraktion gewonnen, eingedampften Proben wurden in 50 µl Methanol aufgenommen. Davon wurden wiederum 20 µl über ein Probenaufgabeeventil mit einem Fluß von 1,3 ml x min⁻¹ und einem Druck von ca. 180 bar auf die Säule gepumpt und eluiert. Mit dem Spectroflowdetector wurden die Cysteinyl-Leukotriene bei 280 nm und Leukotrien B₄ bei 270 nm erfasst. Die Menge der retinierten Metabolite konnte mit dem Shimadzu-Integrator ermittelt werden. Durch Vergleich mit den Retentionszeiten isolierter Standards konnten, die einzelnen Metabolite identifiziert werden. Der Photodiodenarray-Detektor ermöglichte, durch spektrale Analytik der eluierten Substanzen, in einem Wellenlängenbereich zwischen 190 und 330 nm, zusätzlich die spezifische Identifikation koeluiender Verunreinigungen.

3.1.11 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Änderungen der myokardialen Kontraktilität (LVDP, $dP/dt_{\max}$) sind als prozentuale Abweichungen, die Akkumulation der Leukotriene als Differenz zu den gemittelten Leerwerten nach Ablauf der Äquilibrierungsphase angegeben. Generell wurden alle Daten als Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Werte wurden mit einer Varianzanalyse (one-way-ANOVA) und dem Tukey's Honestly Significant Difference Test als post-hoc Test auf statistische Signifikanz überprüft. Bei einem Wert von $p < 0,05$ wurde eine statistische Signifikanz zugrunde gelegt. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sind in den jeweiligen Graphiken gekennzeichnet.

3.2 Materialien und Versuchstiere

3.2.1 Versuchstiere

Für alle Versuche wurden männliche Wistar Ratten (Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 250 – 300 g verwendet.

3.2.2 Material und Geräte für die Organperfusion

- Stimulationsgerät, Stimulator P Typ 201, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
- Aortenkanüle und Latexballon, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
- Druckaufnehmer, COMBITRANS, B. Braun, Melsungen, Deutschland
- Brückenverstärker, Schwarzer CU 12-N, Picker, München, Deutschland
- Schlauchpumpe, MS-4 Reglo 8-100, Ismatec, Glattbrugg, Schweiz
- Umwälzthermostat Thermomix BU, B. Braun, Melsungen, Deutschland
- Doppelwandiges Perfusateservoir bzw. Oxygenator und Organkammer aus Glas, angefertigt bei Hohlglas, Lich, Deutschland
- Krebs-Henseleit-Lösung (Elektrolytlösung I/3), Serag-Wiessner, Naila, Deutschland

3.2.3 Material zur Gewebefixierung und Aufarbeitung

- PFA 4 %, Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- PBS (10x; w/o Ca^{2+} Mg^{2+}), Gibco, Karlsruhe, Deutschland
- Aceton, reinst., Merck, Darmstadt, Deutschland
- Immunobed-solution A, Polyscience, Warrington, PA, USA
- Immunobed-solution B, Polyscience, Warrington, PA, USA
- Immuno-catalyst, Polyscience, Warrington, PA, USA
- Immunobed Plastikeinbettungsformen und -halter EBH-2, Polyscience, Warrington, PA,

USA

- Mesacut 2-Ultramikrotom, Reichert-Jung, Wien, Österreich
- Zeiss Lichtmikroskop, Zeiss, Göttingen, Deutschland

3.2.4 Material zur immunhistochemischen- und HE- Färbung

- Vectastain *Elite* ABC Reagent, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
- Monoklonaler Maus anti-Ratten ICAM-1 (CD54) Antikörper (1A29), Pharmingen, CA, USA
- DAB Peroxidase Substrat Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
- Eosin, Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Haemalaun, Sigma, Deisenhofen, Deutschland

3.2.5 Pharmaka

- Liquemin (Heparin), Hoffmann-La Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland
- Nembutal (Pentobarbital-Natrium), Sanofi CEVA, Frankreich

3.2.6 Material für die Zellisolation

- BSA (bovines Serum-Albumin, fettsäurefrei), Calbiochem, La Jolla, USA
- Ficoll-Paque, Pharmacia, Uppsala, Schweden
- PBS -/- (ohne Ca^{2+} / Mg^{2+})
 - 100 ml PBS 10x (ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}), Gibco, Karlsruhe, Deutschland
 - + 900 ml aqua destillata
 - + 1 N NaOH ad pH 7,4
- Polyvinylalkohol (PVA)
 - 1000 ml 0,9% NaCl, Pharmacia und Upjohn, Nürnberg, Deutschland
 - + 10g PVA, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Aqua ad iniectabilia, Pharmacia und Upjohn, Nürnberg, Deutschland

3.2.7 Material für den Myeloperoxidasenachweis

- HTAB-Puffer

250 mg Hexadecyltrimethylammoniumbromid

+ 45 ml Aqua dest.

+ 5 ml KH_2PO_4 (50mM)

⇒ pH auf 6,0 einstellen

- ODI – Lösung

8,35 mg o-Dianisidine, Sigma, Deisenhofen, Deutschland

+ 5 ml PBS (10x; w/o Ca^{2+} Mg^{2+}), Gibco, Karlsruhe, Deutschland

+ 0,5 ml H_2O_2 Lösung (6 ml Aqua dest. + 10 µl 30%- H_2O_2 -Lösung)

⇒ pH auf 6,0 einstellen

3.2.8 Material und Substanzen für die Leukotrienanalytik

- Absorbance Detector Spectroflow 773, Kratos ,Weiterstadt, Deutschland
- Ammoniakalische Lösung 25 % pro analysi, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Aqua tridestillata
- Chloroform reinst, Fluka, Bern, Schweiz
- EDTA-Titriplex, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Essigsäure 100 % pro analysi, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Festphasenvorsäulen (C_{18} , 6 cm³, Max Bond Elut), Varian, Frankfurt a.M., Deutschland)
- Pumpe Gynkotheek[®] M 600, Gynkotheek, München, Deutschland
- Präzisionsspritze 50 µl, Hamilton, Darmstadt, Deutschland
- Integrator C-R6A, Gynkotheek und Shimadzu über Gynkotheek, München, Deutschland
- Isopropanol pro analysi, Fluka, Bern, Schweiz
- Leersäulen 25 cm aus Edelstahl, Innendurchmesser 0,46 cm, Shandon, Runcorn, England
- LT B₄, Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- LT C₄, Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- LT D₄, Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- 5-HETE, Sigma, Deisenhofen, Deutschland

- LT E₄, Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Methanol reinst, Fluka, Bern, Schweiz
- Octadecysilyl-Hypersil Packungsmaterial 5 µm, Machery und Nagel, Düren, Deutschland
- Photodiode Array Detect Detector Modell 990, Waters, Eschborn, Deutschland
- Probenaufgabenventil Modell 7125, Rheodyne über Latek, Eppelheim, Deutschland

4. Ergebnisse

4.1 Überblick

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit liegt auf der Untersuchung des Einflusses von PMN auf die physiologischen Parameter von isolierten Rattenherzen, die im Vorfeld mit α -Toxin von *Staphylococcus aureus* behandelt wurden.

Zunächst wurden die isolierten Rattenherzen mit einer α -Toxin Konzentration von 0,125 $\mu\text{g/ml}$ über einen Zeitraum von 180 min. perfundiert. Nachdem gezeigt werden konnte, dass diese Konzentration des Exotoxins noch keine signifikante Änderung der physiologischen Parameter im Vergleich zu den Kontrollherzen bewirkt, wurde untersucht, ob diese Konzentration zu einer vermehrten Expression von ICAM-1 führt. Dann erfolgte ab der 185. und 200. Versuchsminute die koronare Applikation von isolierten PMN, die nach Aktivierung mit Arachidonsäure und fMLP einen Kontraktilitätsverlust und eine Steigerung des koronaren Gefäßwiderstandes hervorriefen. In den letzten Untersuchungsschritten wurde dann durch pharmakologische Interventionsversuche gezeigt, dass die Veränderungen der physiologischen Parameter Ausdruck einer kardialen Cysteinyl-Leukotrienproduktion waren.

4.2 α -Toxin induziert im subtoxischen Bereich die koronare Expression von ICAM-1

Die koronare Perfusion von α -Toxin in einer Konzentration von 0,125 $\mu\text{g/ml}$ führte im Beobachtungszeitraum von 180 min. zu keiner signifikanten Veränderung der physiologischen Parameter im Vergleich zu den Kontrollherzen. Der koronare Perfusionsdruck als Maß für den Koronarwiderstand bei konstantem Perfusatfluß betrug nach 180 min. für die Kontrollherzen 63 ± 1 mmHg und nach Zugabe von α -Toxin 62 ± 4 mmHg. Der systolisch entwickelte linksventrikuläre Druck (LVDP), errechnet aus der Differenz zwischen dem enddiastolischen und dem endsystolischen Druck, betrug bei den Kontrollherzen 79 ± 5 mmHg und bei den α -Toxin Herzen 81 ± 7 mmHg. Auch die linksventrikuläre maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}), die durch automa-

tische Differenzierung der linksventrikulären Druckkurve ermittelt wurde, zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. So betrug der ermittelte $dP/dt_{\max}$ für die Kontrollherzen 2400 ± 227 mmHg/s und für die mit α -Toxin perfundierten Herzen 2600 ± 227 mmHg/s nach 180 minütiger Versuchsdauer.

Die α -Toxin Herzen wurden danach einer immunhistochemischen Untersuchung zum Nachweis von ICAM-1 unterzogen. Dabei gelang nur in toxinperfundierten Herzen ein Nachweis von ICAM-1 in postkapillären Venolen (siehe Bild 1). Dieser Nachweis gelang bei Kontrollherzen nicht (siehe Bild 2). Um unspezifische Bindungen der Antikörper als Ursache der Anfärbung auszuschließen, wurden zur Kontrolle α -Toxin Herzen gefärbt, bei denen entweder der primäre oder der sekundäre Antikörper fehlte. In diesen Präparaten ließ sich keine Anfärbung nachweisen (keine Abbildung).

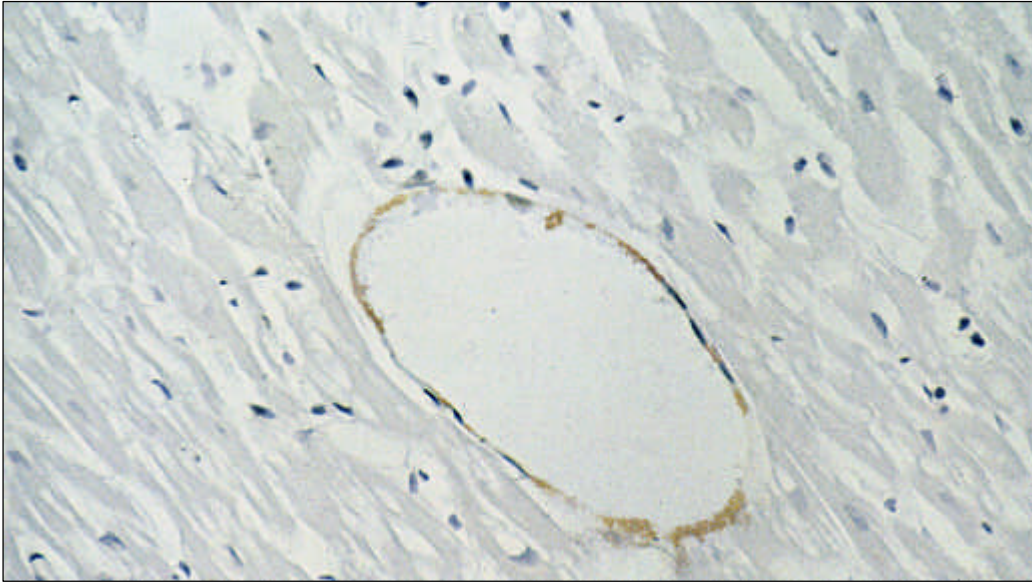


Bild 1: Immunhistochemische ICAM-1 Färbung eines Toxinherzens

Die Abbildung zeigt einen Schnitt durch das Myokard des linken Ventrikels eines mit α -Toxin perfundierten Herzens bei 400-facher Vergrößerung, das mit Antikörpern gegen ICAM-1 inkubiert wurde. Im Anschluss erfolgte eine Markierung mit Peroxidase-Substratlösung. Das braune Reaktionsprodukt zeigt die Lokalisation der ICAM-1 Moleküle an. Das Präparat wurde zur besseren Übersicht mit Gill's Hämatoxylin gegengefärbt.

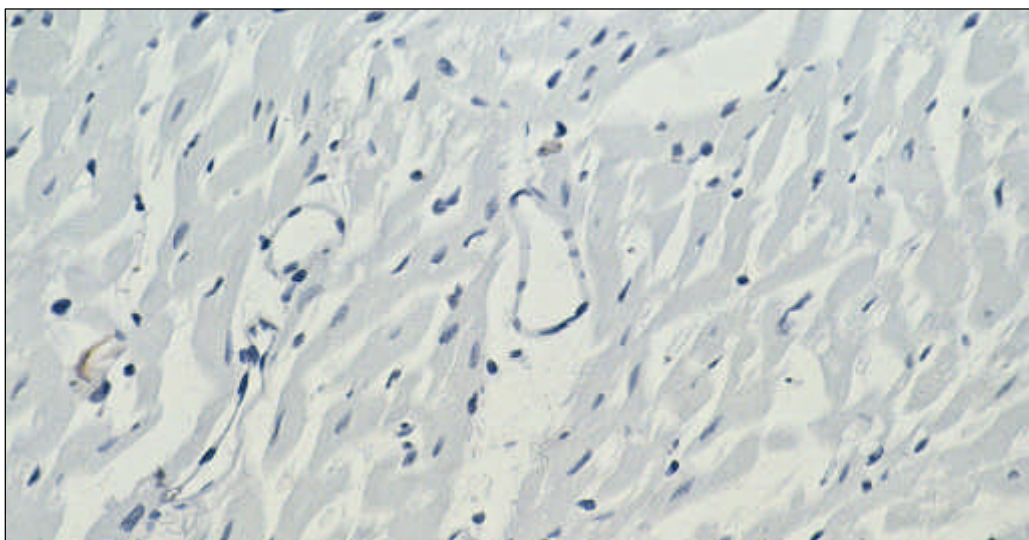


Bild 2: Immunhistochemische ICAM-Färbung eines Kontrollherzens

Die Abbildung zeigt einen Schnitt durch das Myokard des linken Ventrikels eines Kontrollherzens bei 400-facher Vergrößerung, das mit Antikörpern gegen ICAM-1 inkubiert wurde. Die anschließende Markierung mit Peroxidase-Substratlösung läßt kein braunes Reaktionsprodukt erkennen. Das Präparat wurde zur besseren Übersicht mit Gill's Hämatoxylin gegengefärbt.

4.3 Einfluß von PMN, fMLP, AA auf die physiologischen Parameter eines mit α -Toxin perfundierten Herzen

Vor dem Hinzufügen der PMN wurden alle Herzen zuerst 180 min. perfundiert, wobei der Zeitpunkt 0 der α -Toxingabe entspricht. Innerhalb von fünf Minuten wurden dann 5 ml einer PMN Emulsion, die 10^6 PMN/ml enthielt, dem Perfusat zugegeben. Weder Toxinherzen noch Kontrollherzen zeigten bei einer alleinigen Zugabe von unstimulierten PMN eine signifikante Änderung der gemessenen physiologischen Parameter. Wurde dem Perfusat jedoch in der 200. Versuchsminute zusätzlich noch fMLP in einer Konzentration von 2 $\mu\text{mol/l}$ und Arachidonsäure in einer Konzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$ zugesetzt, so änderte sich die Herzfunktion beträchtlich.

Die gemessenen Parameter der kardialen Pumpfunktion, nämlich LVDP und dP/dt zeigten eine signifikante Abnahme, bei gleichzeitiger Zunahme des koronaren Perfusionsdruckes.

Bei einer Zugabe von fMLP und Arachidonsäure nach 180 min. zu Kontrollherzen, konnten keine dieser Änderungen beobachtet werden (siehe Abbildung 6 A-C). Wurden α -Toxin Herzen nach 180 min. keine PMN zugesetzt, so konnte auch nach Hinzufügen von fMLP und Arachidonsäure keine Änderung der Herzleistung gemessen werden (nicht dargestellt).

Folgende Seite **Abbildung 6**

Die Herzen wurden mit α -Toxin in einer Konzentration von 0,125 $\mu\text{g/ml}$ für 180 min. in die An- oder Abwesenheit eines Anti-ICAM-1 Antikörpers (2 $\mu\text{g/ml}$) oder des Lipoxigenaseninhibitors MK-886 (7,5 μM) perfundiert.

In der 185. Versuchsminute wurden dem Perfusat 10^6 PMN/ml zugesetzt, gefolgt von einer Aktivierung in der 200. min durch fMLP in einer Konzentration von 2 $\mu\text{mol/l}$ und Arachidonsäure in einer Konzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$.

Kontrollherzen wurden demselben Versuchsprotokoll folgend ohne α -Toxin perfundiert.

Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM von mindestens fünf unabhängigen Experimenten.

Mit * markierte Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle ($p < 0,05$).

A: systolisch entwickelter linksventrikulärer Druck (LVDP)

B: maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ($\text{dP/dt}_{\text{max}}$)

C: Differenz des koronaren Perfusionsdruckes (ΔCPP)

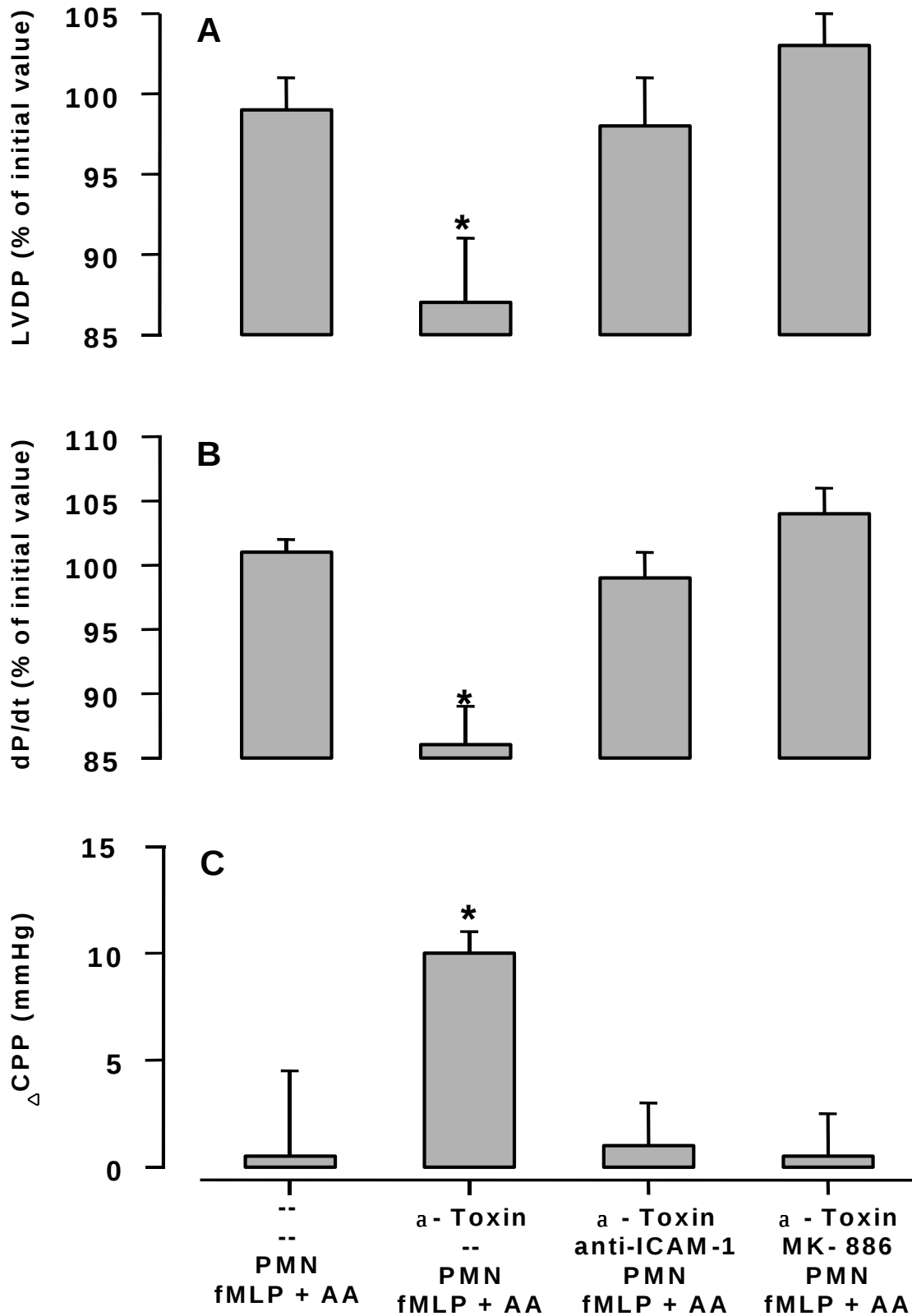


Abbildung 6: Veränderungen der physiologischen Parameter eines mit α -Toxin vorbehandelten Herzens auf die Gabe von PMN, fMLP, und AA – Auswirkungen eines Anti-ICAM-1 Antikörpers und einem Lipoxxygenase Inhibitor

4.4 Ein ICAM-1 Antikörper und ein Lipoxygenasehemmer beeinflussen die beobachteten physiologischen Veränderungen

Wurde den Toxin-Herzen 20 Minuten vor dem Hinzufügen der PMN der Anti-ICAM-1 Antikörper zugegeben, welcher auch für den Nachweis von ICAM-1 in der Immunhistologie verwendet wurde, konnten die Effekte auf den koronaren Perfusionsdruck, die linksventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit und den linksventrikulären Druck auch bei Zugabe von fMLP und Arachidonsäure nicht nachgewiesen werden.

Interessanterweise konnte derselbe präventive Effekt auch bei Hinzufügen des Lipoxygenaseinhibitors MK-886 in einer Konzentration von 7,5 $\mu\text{mol/L}$ 20 Minuten vor der PMN Gabe beobachtet werden. Um möglichen Störfaktoren durch bereits vor der Applikation gebildeten Lipoxygenasenprodukten entgegenzuwirken, wurden die PMN vor dem Hinzufügen in der gleichen Konzentration von MK-886 vorinkubiert (siehe Abbildung 6 A-C).

4.5 Quantifizierung von akkumulierten PMN in mit α -Toxin perfundierten Herzen

Um nachzuweisen, ob es zu einer Akkumulation von PMN im Myokard kommt, wurden histologische Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin (HE) von Kontroll- und Toxinherzen angefertigt. Im Vergleich kam es zu einer vermehrten Akkumulation in mit α -Toxin vorbehandelten Herzen (siehe Bild 3 und Bild 4).

Eine interessante Beobachtung der histologischen Begutachtung, betraf die Verteilung der PMN innerhalb des Myokards. So wurden Akkumulationen von PMN bei den α -Toxin Herzen vor allem subepikardial beobachtet, wobei es subendokardial anscheinend zu einer geringeren Akkumulation gekommen war. Eine Quantifizierung dieser Beobachtung war jedoch mit der angewandten semiquantitativen Methode mit Hilfe eines Lichtmikroskops nicht möglich. Es wären weitere Untersuchungen nötig, um diesen Sachverhalt zu klären und um klarzustellen, ob die Ursache für die vorliegenden Beobachtungen möglicherweise in einer Verteilungsstörung von subendokardialen zu subepikardialen Gebieten liegt.

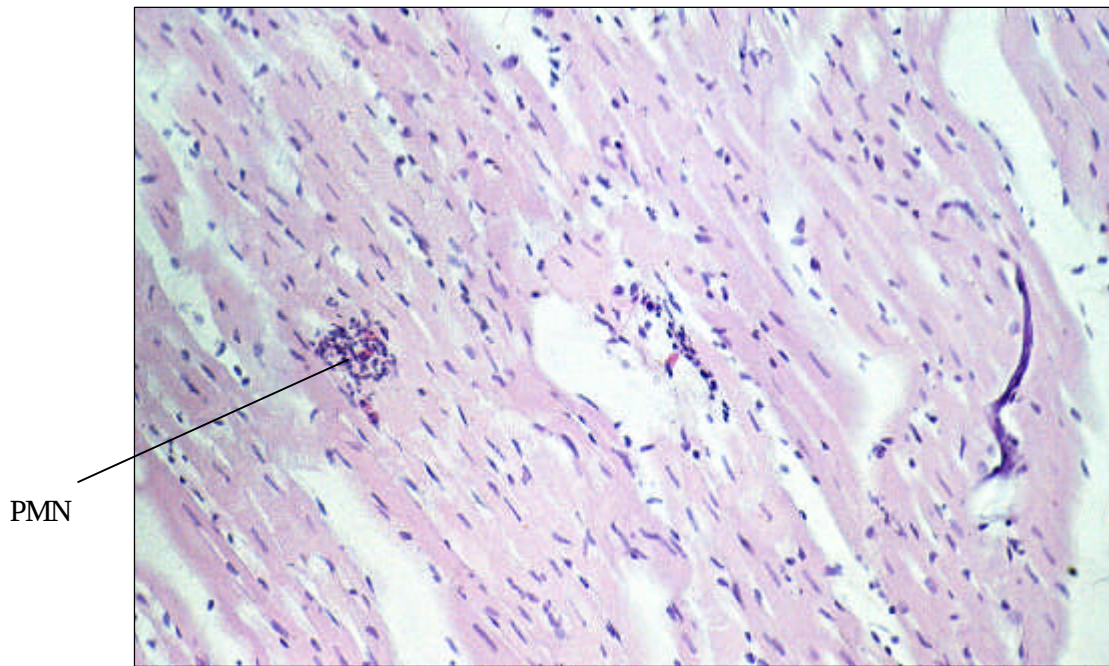


Bild 3: HE-Färbung eines Kontrollherzens mit PMN Perfusion

Schnitt durch den linken Ventrikel eines Kontrollherzens bei 200-facher Vergrößerung. Deutlich ist eine Ansammlung von PMN im Myokard erkennbar.

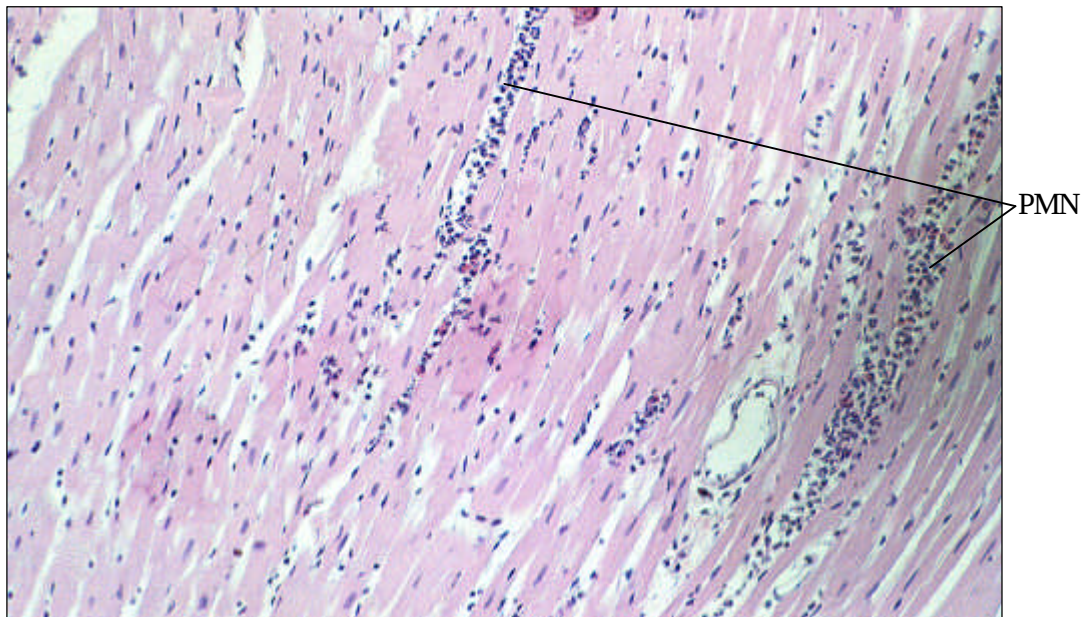


Bild 4: HE-Färbung eines α -Toxinherzens mit PMN Perfusion

Schnitt durch den linken Ventrikel eines α -Toxinherzens bei 200-facher Vergrößerung. Im Vergleich zu dem Kontrollherzen ist eine größere Ansammlung von PMN im Myokard erkennbar.

Bei dem Schatten am rechten Bildrand handelt es sich um ein Mikroskop-Artefakt.

Da es mit Hilfe dieser histologischen Methode nur begrenzt möglich ist, über die Quantität der akkumulierten PMN eine genauere Aussage zu treffen, wurde die MPO-Aktivität als Vergleich herangezogen.

Als Grundwert der MPO-Aktivität wurde mit $0,166 \pm 0,021$ U/g Feuchtgewicht der Mittelwert von α -Toxin Herzen nach Zugabe von fMLP und Arachidonsäure ohne PMN Zusatz vorgegeben.

Es konnte auch in den Kontrollherzen ein Zuwachs der MPO Aktivität auf $0,3 \pm 0,05$ U/g Feuchtgewicht nachgewiesen werden. Aber mit einem Anstieg auf $0,45 \pm 0,05$ U/g Feuchtgewicht bei den α -Toxinherzen war der Zuwachs der MPO-Aktivität signifikant erhöht (siehe Abbildung 7). Dies stimmte mit den Beobachtungen der HE-Histologie dahingehend überein, dass es auch ohne Toxin zu einer Akkumulation der Granulozyten kommt, diese aber durch α -Toxin verstärkt wird.

Interessanterweise konnte dieser Effekt durch Hinzufügen des anti-ICAM-1 Antikörpers praktisch aufgehoben werden, da die MPO Aktivität auf $0,25 \pm 0,03$ U/g Feuchtgewicht sank. In Anwesenheit des 5-Lipoxygenasehemmers MK-886 konnte kein Unterschied im Anstieg der MPO-Aktivität beobachtet werden (nicht dargestellt).

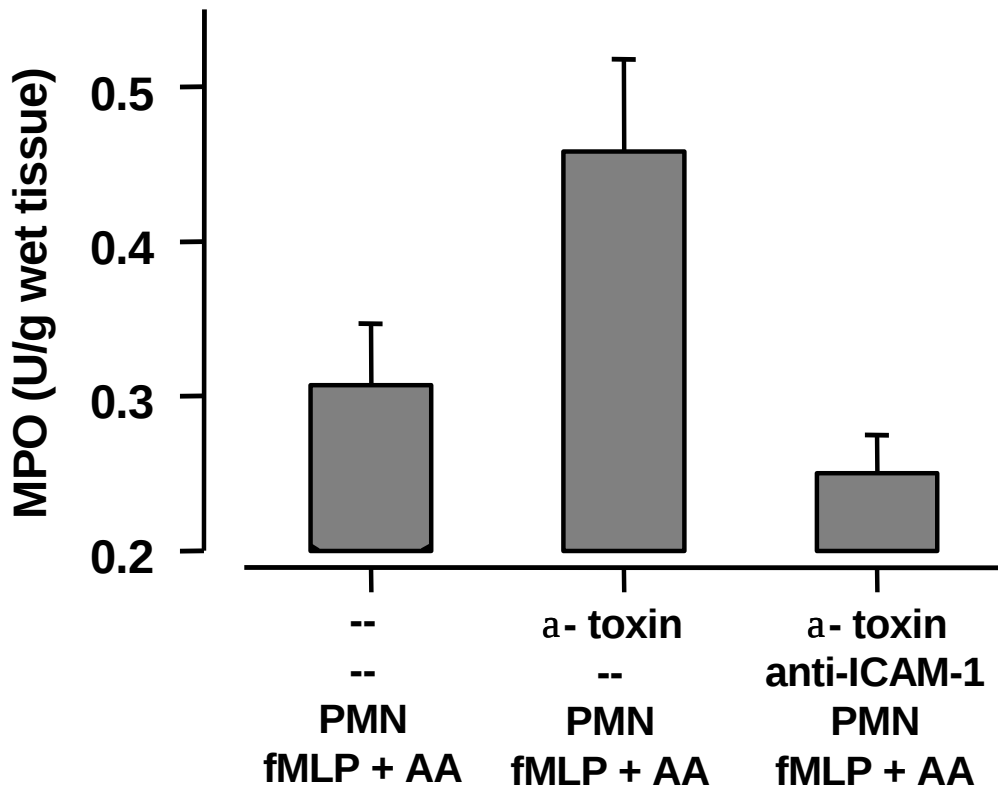


Abbildung 7: Akkumulation von PMN in α -Toxin-Herzen

Die PMN Akkumulation wurde anhand der Zunahme der kardialen Myeloperoxidasen-Aktivität (MPO) nach Beendigung des Experimentes gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM von mindestens fünf unabhängigen Experimenten

4.6 Nachweis von Cysteinyl-Leukotrienen, LTB_4 und 5-HETE in α -Toxin perfundierten Herzen

Ohne vorherige Applikation von PMN zu den Herzen, konnten nur sehr geringe Mengen der Cysteinyl-Leukotriene nachgewiesen werden. Dabei spielte es keine Rolle, ob es sich um Kontroll- oder α -Toxinherzen handelte. LTD_4 lag mit 0,16 pg/ml gerade noch über der Nachweisgrenze, die restlichen (LTE_4 , LTC_4) konnten nicht mehr nachgewiesen werden.

In den Kontrollherzen konnte nach Applikation von PMN, fMLP und Arachidonsäure ein Anstieg von LTD_4 auf $0,4 \pm 0,02$ ng/ml und LTE_4 auf $1,6 \pm 0,4$ ng/ml gemessen werden. Im Gegensatz dazu, lag der gemessene Wert für LTC_4 mit 0,04 ng/ml nur knapp über der Nachweisgrenze.

In den Herzen jedoch, die mit α -Toxin vorbehandelt waren und denen man PMN, gefolgt von fMLP und Arachidonsäure infundierte, konnte ein Anstieg aller drei Cysteinyl-Leukotriene erfasst werden. LTC_4 stieg auf $0,77 \pm 0,34$ ng/ml, LTD_4 auf $0,82 \pm 0,2$ ng/ml und LTE_4 auf $3,69 \pm 0,46$ ng/ml.

Durch das Hinzufügen des ICAM-1 Antikörpers vor der PMN Applikation konnte die Produktion der Cysteinyl-Leukotriene als Antwort auf eine fMLP und Arachidonsäuren Zugabe signifikant gesenkt werden. Im Einzelnen sank der gemessene Wert für LTC_4 wieder auf den Ausgangswert von 0,04 ng/ml, die LTD_4 Produktion reduzierte sich auf $0,28 \pm 0,13$ ng/ml und LTE_4 wurde mit einer Konzentration von $0,92 \pm 0,31$ ng/ml nachgewiesen. Diese Unterdrückung der Cysteinyl-Leukotrien-Produktion wurde noch verdeutlicht durch den Austausch des anti-ICAM-1 Antikörpers mit dem 5-Lipoxygenasehemmers MK-886. Durch Einsatz dieses Lipoxygenasehemmers reduzierten sich LTC_4 mit 0,04 ng/ml und LTE_4 mit 0,1 ng/ml auf Werte, die noch unter denen der Ausgangswerte lagen. Nur für LTD_4 wurde mit $0,36 \pm 0,18$ ng/ml Mengen nachgewiesen, die im Bereich des Ausgangswertes lagen (siehe Abbildung 8 A-C).

Folgende Seite

Abbildung 8: Freisetzung von Cysteinyl-Leukotriene in das Perfusat nach Applizierung von PMN, fMLP und Arachidonsäure in mit α -Toxin perfundierten Herzen.

Auswirkungen eines Anti-ICAM-1 Antikörpers und eines Lipoxygenaseninhibitors

Die Quantifizierung der Cysteinyl-Leukotriene erfolgte im Perfusat mittels Festphasenextraktion unter Zuhilfenahme der reversed-Phase-HPLC (high pressure liquid chromatography) und zusätzlicher UV-Spektrenanalyse. Dargestellt sind die absolut Werte der Cysteinyl-Leukotriene nach Versuchsende, ermittelt aus den Mittelwerten $\pm$ SEM von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Mit * markierte Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle ($p < 0,05$).

A: LTC₄

B: LTD₄

C: LTE₄

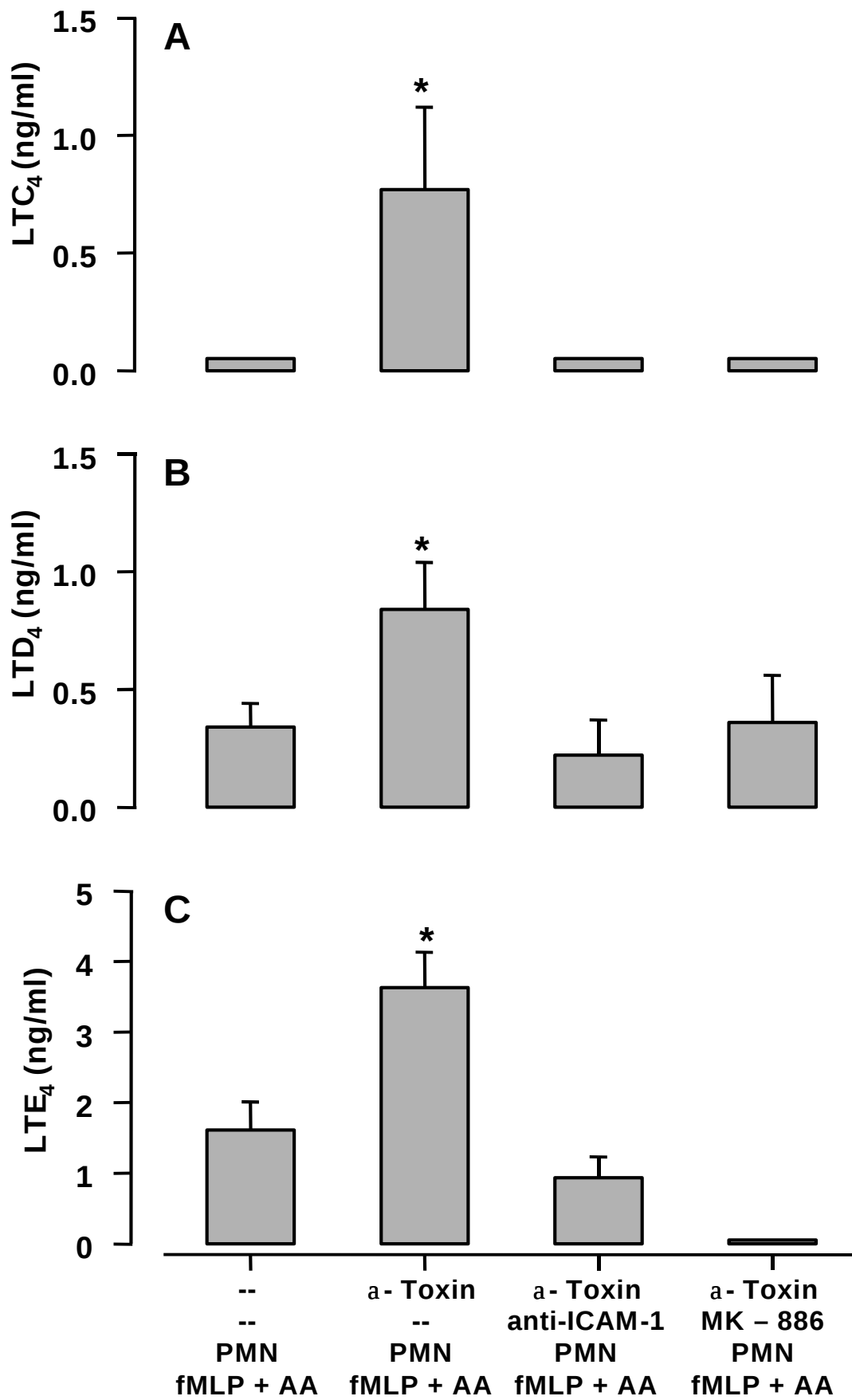


Abbildung 8

Aus einer Stimulation der Kontroll- und Toxinherzen mit fMLP und Arachidonsäure bei fehlender PMN Infusion, resultierten LTB₄ Konzentrationen von 1,18 pg/ml und 0,25 pg/ml. Die Anwesenheit von PMN jedoch führte bei α -Toxinherzen zu einem signifikanten Anstieg der LTB₄ Konzentration auf $4,55 \pm 0,91$ ng/ml, der bei den Kontrollherzen in dem Maße nicht nachweisbar war und $1,18 \pm 0,27$ ng/ml betrug. Eine Reduktion der LTB₄ Konzentration konnte durch Applikation des ICAM-1 Antikörpers auf Werte von $3,82 \pm 1,09$ ng/ml erreicht werden. Eine komplette Inhibierung der LTB₄ Produktion wurde jedoch praktisch mit MK-886 erreicht, so dass sich nur noch Konzentrationen von $0,63 \pm 0,09$ ng/ml nachweisen ließen (siehe Abbildung 9 A-B).

In Abwesenheit von PMN konnte weder in Toxinherzen noch in Kontrollherzen ein Anstieg von 5-HETE als Reaktion auf eine fMLP und Arachidonsäure Zugabe gemessen werden. In Kontrollherzen ergab sich nach Hinzufügen von PMN, fMLP und Arachidonsäure ein Anstieg von 5-HETE auf $5,77 \pm 2,69$ ng/ml. Aber auch hier war der Anstieg der 5-HETE Konzentration bei den Toxinherzen fast um ein dreifaches höher und lag bei $15,76 \pm 5,19$ ng/ml. Durch die Zugabe des ICAM-1 Antikörpers, blieb die 5-HETE Produktion mit $6,53 \pm 5$ ng/ml auf ein mit den Kontrollherzen vergleichbarem Niveau. Durch Zugabe von MK-886 anstatt des Antikörpers wurde die 5-HETE Produktion praktisch komplett inhibiert und betrug 0,77 ng/ml (siehe Abbildung 9 A-B).

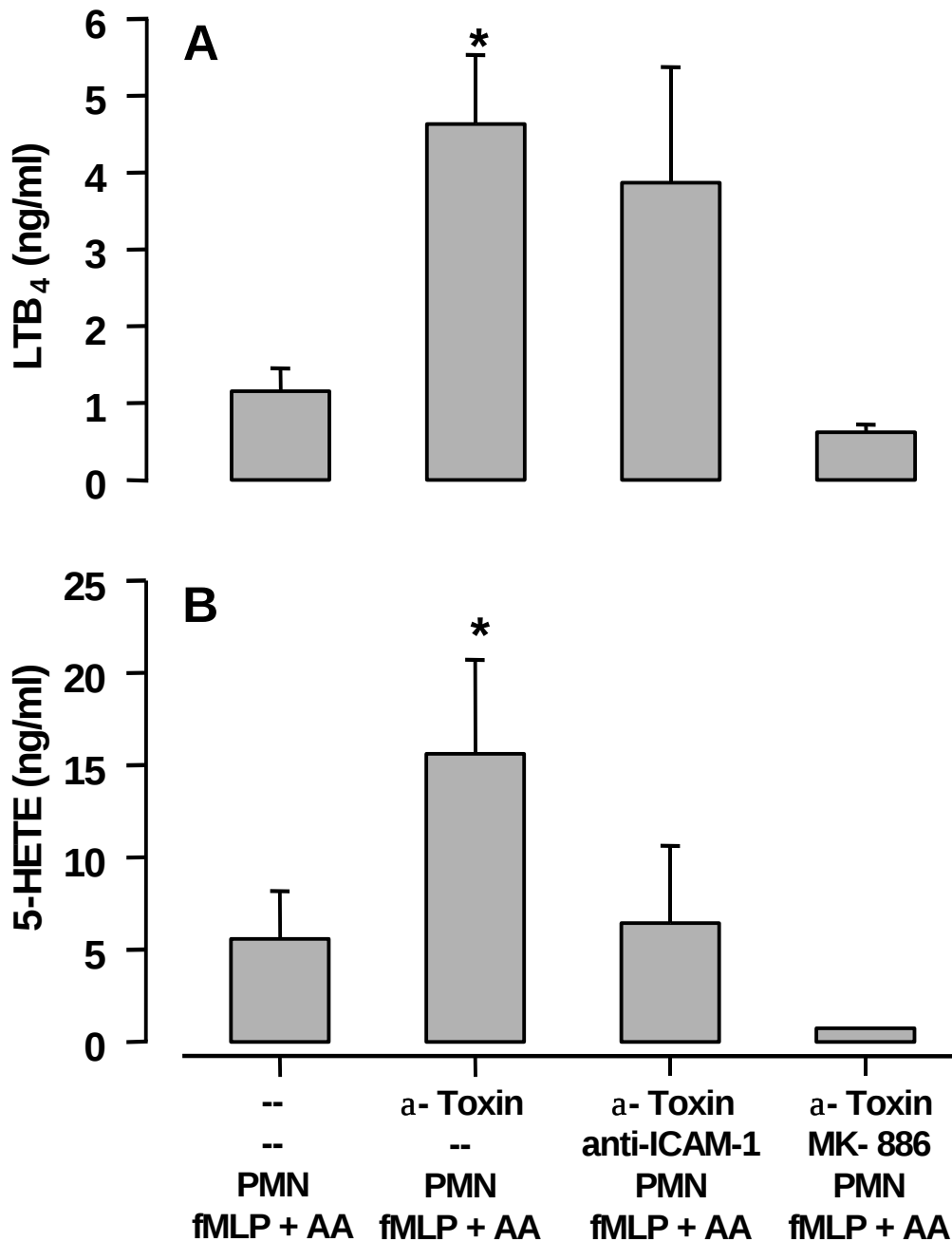


Abbildung 9: Freisetzung von LTB₄ und 5-HETE in das Perfusat, nach Applizierung von PMN, fMLP und Arachidonsäure in mit α -Toxin perfundierten Herzen – Auswirkungen eines Anti-ICAM-1 Antikörpers und einem Lipoxygenaseninhibitors

Die Quantifizierung von LTB₄ (A) und 5-HETE (B) erfolgte im Perfusat mittels Festphasenextraktion unter Zuhilfenahme der reversed-Phase-HPLC (high pressure liquid chromatography) und zusätzlicher UV-Spektrenanalyse. Dargestellt sind die absoluten Werte nach Versuchsende, ermittelt aus den Mittelwerten $\pm$ SEM von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Mit * markierte Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle ($p < 0,05$).

5. Diskussion

5.1 Pathophysiologische Grundlagen des septischen Herzversagens

In den letzten Jahren hat die Inzidenz der Sepsis deutlich zugenommen. Dadurch ist auch die klinische Bedeutung des septischen Schocks und seiner kardialen Komplikationen gestiegen. Zwar steigt das Herzzeitvolumen während der Sepsis in aller Regel an, aber im Verhältnis zu dem peripheren Widerstand ist diese Zunahme oft inadäquat und reicht nicht aus, um den Blutdruck konstant zu halten^{1,3,4}. Diese voll reversible Dysfunktion des Herzens während der Sepsis, wird im klinischen Sprachgebrauch auch als ‚septische Kardiomyopathie‘ bezeichnet⁵.

Die Ursachen für die beobachtete verminderte Herzleistung scheinen sowohl in der erhöhten Konzentration kardiodepressiver Cytokine zu liegen, als auch in einer Störung der kardialen Mikrozirkulation. Den Mikrozirkulationsstörungen in Lunge, Darm und Skelettmuskulatur vergleichbar, kommt es im Herzen während der Sepsis gleichzeitig zu einer Über- und Unterperfusion einzelner nebeneinanderliegender Kapillargebiete. Diese funktionelle Shuntperfusion in Kombination mit der Unfähigkeit des Myokards, die Sauerstoffextraktion zu steigern, führt zu regionalen Myokardischämien und kann auch ohne messbare Reduktion der Makrozirkulation zu einer Kardiodepression beitragen^{19,22,23,26,27,32}. Neuere experimentelle Arbeiten weisen darauf hin, dass auch in der koronaren Strombahn sequestrierten Granulozyten eine pathophysiologische Bedeutung zukommen könnte.

5.1.1 Bedeutung des α -Toxins von *Staphylococcus aureus*

Eine Reihe bedeutender Sepsiserreger sind in der Lage, porenbildende Exotoxine als Pathogenitätsfaktoren zu bilden. Zu ihnen gehören u.a. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Streptococcus pyogenes*^{76,77,78}. Das α -Toxin von *Staphylococcus aureus* ist ein Prototyp dieser Porenbildner. Konsequenz der Porenbildung in den Zielzellen ist im Extremfall die Zytolyse, in vielen Fällen jedoch eine unphysiologische Aktivierung der

Zielzelle⁸². Werden zum Beispiel Endothelzellen α -Toxin ausgesetzt, so setzen diese die vasoaktiven Mediatoren PAF, Prostacyclin und NO frei^{139,140,141,142}.

Neben prokoagulatorische Eigenschaften über eine Aktivierung von Thrombozyten¹⁴³ regt α -Toxin humane Monozyten zur Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β an¹⁴⁴. Diese Zytokine entfalten unter anderem auf Endothelzellen ihre Wirkung dahingehend, dass vermehrt das Adhäsionsmolekül ICAM-1 exprimiert wird⁴³. Die Auswirkungen des α -Toxins auf isolierte Organsysteme, zum Beispiel die Lunge, entspricht im wesentlichen der Charakteristika des septischen Lungenversagens mit pulmonaler Hypertension, Lungenödem und Verteilungsstörungen von Ventilation und Perfusion^{21,23}. Isolierte Rattenherzen reagieren nach einer α -Toxin Gabe mit einer durch Thromboxan vermittelten Störung der koronaren Perfusion und einer assoziierten Kontraktilitätsabnahme¹³². Schafe, die eine Bolusinjektion des gereinigten α -Toxins erhielten, verstarben im akuten Herzversagen⁸³. Die Versuche unterstreichen die außerordentliche pathogenetische Bedeutsamkeit des α -Toxins im Zusammenhang mit septischen Erkrankungen durch *Staphylococcus aureus*.

Bisherige Untersuchungen zu den Auswirkungen von Endo- und/oder Exotoxinen auf Tier- oder isolierte Organmodelle, verwendeten außerordentlich hohe Toxinkonzentrationen. Inwieweit Toxinkonzentrationen, die noch nicht zu einer ausgeprägten physiologischen Reaktion am Organmodell führen, zu Reaktionen anderer Effektorsysteme führen, ist bisher wenig untersucht. Vor diesem Hintergrund war es ein Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, inwieweit lytische Konzentrationen des gereinigten α -Toxins in der Lage sind, die während einer Entzündung wichtigen Adhäsionsmoleküle zu aktivieren. Da im ersten Teil der Arbeit gezeigt werden konnte, dass es durch α -Toxin zu einer verstärkten Expression von ICAM-1 auf dem Endothel kommt, wurde weiterführend untersucht, ob diese vorhandenen Adhäsionsmoleküle auch zu einer verstärkten Adhäsion von aktivierten PMN imstande sind und ob dies dann zu messbaren Veränderungen der Herzphysiologie führt.

5.2 α -Toxin führt zu einer verstärkten koronaren Expression von ICAM-1

Wie Sibelius et al. zeigten, kommt es durch α -Toxin zu einer koronaren Vasokonstriktion und daraus resultierend zu einer Abnahme der myokardialen Leistung¹³².

Zusätzlich zu diesen Ergebnissen, konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass eine vierfach geringere Dosis des α -Toxins, die noch nicht in der Lage ist, signifikante Änderungen der Herzleistung hervorzurufen, eine verstärkte Expression von ICAM-1 auf dem koronaren Endothel hervorruft. Der endotheliale Ligand ICAM-1 wurde mit Hilfe einer immunhistochemischen Darstellung in postkapillären Venolen nachgewiesen. Dass die verstärkte Expression des ICAM-1 Liganden auf die Wirkung des α -Toxins zurückzuführen war, wurde durch Änderungen des Versuchsaufbaus kontrolliert. Eine Verunreinigung des α -Toxins durch das Endotoxin LPS, das auch für eine verstärkte Expression verantwortlich sein könnte, wurde durch eine *Limulus-based LPS-assay* des Perfusates ausgeschlossen. Desweiteren konnte in Kontrollherzen, die keinem Toxin ausgesetzt wurden, keine verstärkte Expression nachgewiesen werden. Daher war die beobachtete Hochregulation von ICAM-1 durch α -Toxin verursacht und nicht durch eine LPS-Verunreinigung.

Außerdem wurde eine Akkumulation von PMN nur in mit α -Toxin perfundierten Herzen nachgewiesen. Diese Akkumulation verschwand, sobald das Herz zusätzlich zu dem α -Toxin mit einem ICAM-1 Antikörper perfundiert wurde. Auch das dem Versuchsaufbau zugrundeliegende Zeitprotokoll ist vergleichbar mit dem von Weyrich et al. von 1995. Diese wiesen damals eine verstärkte Expression von ICAM-1 nach Ischämie mit anschließender Reperfusion im Katzenmyokard, bereits nach 150 min. Reperfusion, nach¹⁴⁵.

Auch wenn die vorgelegten Ergebnisse den Schluss zulassen, dass α -Toxin ein potenter Induktor für eine verstärkte ICAM-1 Expression auf dem Endothel koronarer Venolen ist, ist daraus nicht ableitbar, über welchen Mechanismus α -Toxin für diese verstärkte Expression des Liganden sorgt. Dass α -Toxin eine membranöse Pore in der Zielzelle hervorruft und dass diese wiederum verantwortlich ist für die Aktivierung verschiedenster Effektorsysteme durch den Einstrom von Elektrolyten, wurde von Bhakdi et al. 1996 als eine grundlegende Toxinwirkung identifiziert¹⁴⁶. Zur Klärung des Mechanismus sind aber weitere Untersuchungen notwendig.

5.3 In mit α -Toxin vorperfundierten Herzen kommt es zu einer verstärkten PMN-Akkumulation

Eine feste Bindung von PMN an Endothelzellen geht mit einer Verbindung von ICAM-1 und dem aktivierten CD11/CD18 Komplex des Granulozyten einher. In Tiermodellen zur kardialen Ischämie und Reperfusion, konnte ein Zusammenhang zwischen der Adhäsion von PMN an ICAM-1 und dem Maße der koronaren endothelialen Dysfunktion nachgewiesen werden. Desweiteren scheint es, dass diese Akkumulation zu einer Verstärkung des myokardialen Gewebsschadens beiträgt¹⁴⁷.

Vor diesem Hintergrund und um die funktionelle Bedeutung einer durch α -Toxin induzierten ICAM-1 Expression abschätzen zu können, wurden PMN in die Koronarien perfundiert. Während die Zugabe von PMN zu mit α -Toxin vorbehandelten Herzen zu keiner signifikanten Änderungen des Perfusionsdruckes und der kontraktile Funktion des Herzens führte, deutete eine gestiegene myokardiale MPO-Aktivität auf eine verstärkte PMN Retention hin. Die Tatsache, dass in Anwesenheit eines ICAM-1 Antikörpers der Anstieg der myokardialen MPO-Aktivität praktisch komplett aufgehoben wurde, unterstreicht nochmals die funktionelle Bedeutung der α -Toxin induzierten ICAM-1 Expression für die Retention neutrophiler Granulozyten in diesem Modell.

Allerdings bleibt noch zu klären, warum es in den Kontrollherzen, und in den mit dem ICAM-1 Antikörpern vorbehandelten Herzen (wenn auch auf einem niedrigeren Niveau) ebenso zu einer Retention von PMN gekommen ist. Möglicherweise kann diese Beobachtung dadurch erklärt werden, dass ICAM-1 konstitutiv in einer geringen Menge auf dem Endothel exprimiert wird und es zu einer Adhäsion an dieser Basisexpression kam⁴⁹. Es besteht die Möglichkeit, dass die angewandte immunhistochemische Nachweismethode nicht empfindlich genug ist, um auch diese basale Expression zu erfassen. Eventuell binden die PMN aber auch noch an andere endotheliale Liganden, was eine weitere Erklärung für die beobachtete Retention wäre.

5.3.1 Auswirkungen der PMN-Retention auf die kardiale Leistungsfähigkeit

Die pathophysiologische Bedeutung der Akkumulation der Granulozyten in den mit α -Toxin vorbehandelten Herzen wurde offensichtlich, nachdem der Granulozyteninfusion eine Zugabe von fMLP und Arachidonsäure folgte. Bei fMLP handelt es sich um einen repräsentativen Vertreter der formyl-Peptide, die von allen Bakterien gebildet werden^{95,96}. Diese sind in der Lage, neben verschiedensten Funktionen des Granulozyten auch den 5-Lipoxygenase (LO) Reaktionsweg zu stimulieren. Obwohl fMLP die neutrophilen 5-LO ausreichend stimuliert, ist eine exogene Zugabe seines Substrates Arachidonsäure notwendig, da die Phospholipase des neutrophilen Granulozyten nicht durch fMLP aktiviert wird, und so die für eine Synthese der Leukotriene (LTA₄, LTB₄, H-HETE) notwendige endogene Substanz nicht in ausreichender Menge bereit gestellt werden kann^{148,149}. Beachtenswert ist, dass die AA unmittelbar metabolisiert wird und in vivo nicht den Ort des entzündlichen Ereignisses überschreitet^{150,151}. Unter diesen Bedingungen führte die Aussetzung der mit α -Toxin vorbehandelter Herzen mit PMN, fMLP und AA zu einem Anstieg des koronaren Perfusionsdruckes und daraus resultierend zu einer Abnahme der kontraktilen myokardialen Leistung. Diese Veränderungen der physiologischen Daten des Herzens waren eindeutig einer Bildung von Leukotrienen und dabei vor allem den Cysteinyl-Leukotrienen zuzuschreiben.

Denn die Konkordanz zwischen Auftreten einer kardialen Dysfunktion und der Bildung von Cysteinyl-Leukotrienen wurde nur in mit α -Toxin vorbehandelten Herzen beobachtet. Sobald aber die Akkumulation der neutrophilen Granulozyten durch den ICAM-1 Antikörper geblockt wurde, konnte weder die Bildung von Cysteinyl-Leukotrienen noch eine Änderung des koronaren Perfusionsdruckes mit der daraus folgenden kardialen Depression beobachtet werden. Vergleichbare Ergebnisse konnten durch den Einsatz des spezifischen 5-Lipoxygenasen-Inhibitors MK-886 erreicht werden. Diese Resultate stimmen überein mit früheren Studien, die eine vergleichbare Kardioprotektion durch die Blockierung der Leukotrien Bioaktivität erreichten, wenn Cysteinyl-Leukotriene entweder perfundiert oder in Versuchsmodellen der kardialen Ischämie und Reperfusion gebildet wurden^{38,34,152,153}.

5.4 Trans-celluläre Kooperation als möglicher Reaktionsweg der Cysteinyl-Leukotrien Synthese

Da PMN keine Glutathion-S-Transferase besitzen, sind sie selbst nicht in der Lage, Cysteinyl-Leukotriene zu synthetisieren. Aus diesem Grund ‚kooperieren‘ sie zur Produktion der Cysteinyl-Leukotriene mit Zellen ihrer unmittelbaren Umgebung. Sie sezernieren das sehr instabile Zwischenprodukt LTA_4 in den Extrazellulärraum, das von benachbarten Akzeptorzellen aufgenommen und weiter metabolisiert werden kann. Zu diesen Akzeptorzellen gehören, wie Feinmark et al. 1986 zeigte, vor allem Endothelzellen, die dann die weitere Metabolisierung des LTA_4 zu den Cysteinyl-Leukotriene vornehmen können¹⁵⁴. Die Beobachtung, dass es nur dann zu einer Bildung von Cysteinyl-Leukotriene kommt, wenn es vorher zu einer Retention von PMN im koronaren Gefäßbett gekommen war, spricht eindeutig für diesen Erklärungsansatz. Aufgrund der geringen Halbwertszeit des LTA_4 kommen als Sekretoren nur adhärente PMN in Betracht, da nur diese entsprechend nahen Kontakt zu den Endothelzellen besitzen, um einen Transport der extrem labilen LTA_4 von Donor- zur Akzeptorzelle zu erlauben.

Diese Annahme wird noch unterstützt durch die Beobachtung, dass es in Abwesenheit von PMN zu keiner Freisetzung von Cysteinyl-Leukotrienen aus dem Herzen kam.

In diesem Zusammenhang steht noch eine weitere interessante Beobachtung dieser Studie: die nachgewiesene Bildung von LTB_4 und 5-HETE im organeffluenten Perfusat. Beide Metabolite sind bekanntermaßen potente Chemotaxine für neutrophile Leukozyten.

Da ihre Freisetzung zu einer weiteren Rekrutierung und Aktivierung von Granulozyten führt, könnte es dadurch zu einem Circulus vitiosus kommen, der die kardiale Dysfunktion noch verstärkt. Überraschenderweise wurde quantitativ die größte Menge dieser Metabolite im Serum von Herzen gemessen, bei denen es zu einer Akkumulation von PMN gekommen war. Für dieses Phänomen besitzen wir keine hinreichende Erklärung. Möglicherweise kommt es zu einer zusätzlichen Freisetzung von Arachidonsäure durch Endothelzellen, die von den adhären PMN für die Synthese von LTB_4 und 5-HETE genutzt wird.

Der definitive zelluläre Ursprung der im organeffluenten Perfusat nachgewiesenen Cysteinyl-Leukotriene bleibt letztlich ungeklärt. Allerdings scheint es sehr wahrscheinlich, dass die Cysteinyl-Leukotriene durch eine kooperative transzelluläre Synthese zwischen PMN und koronaren Endothelzellen gebildet werden.

5.5 Die Freisetzung der Leukotriene spielt für die Änderungen der kontraktile Funktion der Herzen im vorliegenden Modell eine bedeutende Rolle

Eine der interessantesten Beobachtung der Studie war der enge Zusammenhang zwischen der Freisetzung der Leukotriene und dem Anstieg des koronaren Perfusionsdruckes. Dieser Zusammenhang wurde dadurch verdeutlicht, dass die koronare Widerstandszunahme sowohl durch die Applikation ICAM-1 Antikörpers, als auch durch den Zusatz des Lipoxygenaseinhibitors MK 886 vollständig verhindert wurde. Auch konnten unter diesen Bedingungen keine Cysteinyl-Leukotriene nachgewiesen werden. Zwar sind die Leukotriene nicht in der Lage per se die Kontraktilität der Herzen zu senken³⁸, dennoch finden sich im verwendeten Versuchsmodell eindeutige Hinweise darauf, dass die beobachtete Kardiodepression in Zusammenhang mit der Bildung von Cysteinyl-Leukotrienen stand. Der Anstieg des koronaren Perfusionsdruckes wird über die vasokonstriktiven Cysteinyl-Leukotrienen vermittelt und könnte möglicherweise Ausdruck einer regionalen Perfusionsverteilungsstörung im Myokard sein.

Diese Befunde weisen eindeutig daraufhin, dass die Zunahme des koronaren Gefäßwiderstandes durch die Wirkung vasoaktiver Cysteinyl-Leukotriene getragen wurde. Einen weiteren wesentlichen Befund stellt die Tatsache dar, dass es mit Zunahme des koronaren Gefäßwiderstandes zu einer Abnahme der kardialen Pumpfunktion kam.

Dieses Phänomen, charakterisiert durch eine Koexistenz von unter- und überperfundierten Myokardarealen in enger nachbarschaftlicher Beziehung, könnte die beobachtete Kardiodepression in unserem Versuchsmodell erklären. Diese Annahme wird durch neuere Ergebnisse unterstützt, die eine Verschlechterung der koronaren Perfusion und Vasoregulation während der Sepsis in experimentellen Tiermodellstudien zur Sepsis und zum septischen Schock demonstrieren konnten^{20,29,155}.

Vergessen darf man dabei aber nicht, dass auch die innerhalb der koronaren Mikrozirkulation aufgestauten und ebenfalls von Granulozyten gebildeten reaktiven Sauerstoffabkömmlinge, einen Anteil an den beobachteten kardiodepressiven Effekten besitzen könnten. Die Tatsache, dass der Einsatz des 5-Lipoxygenasehemmers zu einer Aufhebung der Kardiodepression führte, steht dabei nicht unbedingt im Widerspruch zu dieser Annahme, da eine neutrophile LTB₄ Synthese möglicherweise die Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite auf einem parakrinen Weg aktiviert¹⁵⁶. Zur Klärung dieser Hypothese werden weitere Studien notwendig sein.

In welchem Ausmaß diese Mechanismen an der Entstehung der kardialen Dysfunktion während der Sepsis beitragen, ist gegenwärtig noch unklar. Nach aktuellem Kenntnisstand gibt es zur Zeit noch keine Forschungsergebnisse, die den Einfluß aktivierter Granulozyten auf die Entwicklung der septischen Kardiomyopathie während der Sepsis des Menschen untersucht haben.

Experimentelle Daten weisen aber eindeutig darauf hin, dass PMN nicht nur im koronaren Gefäßbett mit Endotoxin vorbehandelter Tiere zurückgehalten werden, sondern auch zum Verlust der kontraktile kardialen Leistung beitragen. Granton et al. perfundierten zwei isolierte Herzen mit Blut eines betäubten Kaninchen. Dem Kaninchen wurden kontinuierlich 1 mg/kg KG Endotoxin infundiert. Einem der externen Herzen war ein Leukozytenfilter vorgeschaltet, während das andere Herz ungefiltertes Blut des Kaninchen erhielt. Sie konnten eine signifikante Abnahme der kardialen Leistung nur bei dem Herzen nachweisen, das ungefiltertes Perfusat mit aktivierten PMN erhielt^{72,73,74}.

Offensichtlich unterstützen die von uns gewonnenen Ergebnisse dieses pathophysiologische Konzept.

5.6 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Es gilt als gesichert, dass porenbildende Exotoxine einen wesentlichen Beitrag zur Pathogenese der Sepsis leisten. Auch wurde hinreichend untersucht, dass sie in der Lage sind, in hohen Konzentrationen eine direkte kardiodepressive Wirkung zu entfalten. Zu der Fragestellung jedoch, inwieweit geringere Konzentrationen der Exotoxine, welche noch keine direkte Wirkung auf die Herzfunktion zeigen, zu der Entstehung und Unterhaltung der septischen Kardiomyopathie beitragen, ist bislang wenig bekannt.

Diesbezüglich brachte der Versuchsaufbau, der nicht nur eine eher geringe Toxinkonzentration benutzte, sondern auch noch mit typischen Entzündungszellen kombiniert wurde, interessante Denkanstöße.

Da nicht nur gezeigt werden konnte, dass es zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen kam, sondern dass diese auch dafür verantwortlich sind, dass es zu einer vermehrten Retention von Granulozyten kommt, stellt sich hier allerdings die Frage,

ob eine Blockierung von ICAM-1 während der Sepsis möglicherweise einen positiven Einfluß auf das Krankheitsgeschehen der septischen Kardiomyopathie besitzen könnte. Diese Möglichkeit wird noch unterstützt durch die Tatsache, dass es zu einer vermehrten Produktion der granulozytären Chemotaktoren LTB₄ und 5-HETE kommt. Dies könnte möglicherweise in vivo noch zu einer Zunahme der Granulozytenretention und der daraus folgenden Kardiodepression führen.

Des weiteren bekräftigen die vorgelegten Untersuchungen die grundlegende Bedeutung des α -Toxins im Rahmen der myokardialen Perfusionstörung während der septischen Kardiomyopathie, das als pathologisches Konzept der septischen Organschädigung für eine Reihe von Organen (Lunge, Skelettmuskulatur, Darm) gezeigt worden ist. Der Nachweis, dass die PMN adhären an dem Endothel werden und dass es dadurch sogar zu einer nachbarschaftlichen Kooperation in der Bildung von vasoaktiven Cysteinyl-Leukotrienen kommt, eröffnet neue Perspektiven im Verständnis der gestörten Mikrozirkulation.

6. Zusammenfassung

Im Zuge des vermehrten Einsatzes von invasiven therapeutischen und diagnostischen Maßnahmen, sowie durch den notwendigen Einsatz von immunsupprimierenden Therapien, konnte in den letzten Jahren eine Inzidenzzunahme der Sepsis verzeichnet werden. Durch den Abfall des systemischen Widerstandes und der daraus resultierenden Hypotension offenbart sich die inadäquate Steigerung des Herzzeitvolumens. Die durch diagnostische Maßnahmen nachweisbaren Veränderungen mit biventrikulärer Dilatation, Reduzierung der Ejektionsfraktionen und Wandbewegungsstörungen, werden unter der Bezeichnung der septischen Kardiomyopathie zusammengefasst. Nach dem Ausschluß einer Störung der Makrozirkulation liegt der direkte Einfluß von Zytokinen und Bakterientoxine auf die Mikrozirkulation als mögliche Ursache der septischen Kardiomyopathie im Vordergrund des wissenschaftlichen Interesse.

Die vorliegende Arbeit bearbeitete unter anderem die Fragestellung, ob Exotoxine in Konzentrationen, die noch keine messbaren physiologischen Veränderungen hervorrufen, zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen führen und ob daraus eine vermehrte Retention von polymorphkerniger Granulozyten im Myokard resultiert. Von besonderem Interesse war dabei aber die Frage, ob dies einen Einfluss auf die kardiale Zirkulation besitzt und ob es dadurch zu physiologische Änderungen der kardialen Performance kommt.

Die verwendeten Konzentrationen des α -Toxins führten zu keiner signifikanten Änderung weder der kardialen Kontraktilität noch des Perfusionsdruckes. Jedoch konnte immunhistochemisch eine Expression von ICAM-1 nachgewiesen werden. Nach Zugabe von PMN in das zirkulierende Perfusat wurde sowohl durch HE-Färbung, als auch durch einen Anstieg der MPO-Aktivität des Myokards eine vermehrte Retention von Granulozyten in mit α -Toxin vorbehandelten Herzen nachgewiesen. Die Zugabe von fMLP und Arachidonsäure zum Perfusat und die dadurch erfolgte Aktivierung der PMN, führte im Beobachtungszeitraum zu einer deutlichen kardialen Depression. Die gemessene Retention konnte durch die vorherige Gabe eines ICAM-1 Antikörpers deutlich vermindert werden. Dies verhinderte auch die kardiale Depression durch das Hinzufügen von fMLP und Arachidonsäure.

Diese Veränderungen der physiologischen Daten des Herzens waren eindeutig einer Bildung von Leukotrienen und dabei vor allem den Cysteinyl-Leukotriene zuzuschreiben.

Denn die Konkordanz zwischen dem Auftreten einer kardialen Dysfunktion und der Bildung von Cysteinyl-Leukotrienen, wurde nur in mit α -Toxin vorbehandelten Herzen beobachtet. Sobald es durch die Blockierung der Adhäsionsmoleküle mittels des ICAM-1 Antikörpers zu keiner Akkumulation von PMN im Myokard kam, wurde auch keine Cysteinyl-Leukotriene Produktion und keine kardiale Dysfunktion nachgewiesen. Unter Einsatz des spezifischen 5-Lipoxygenasen-Inhibitor MK-886 konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Sehr wahrscheinlich wurden die gemessenen Cysteinyl-Leukotriene in einer kooperativen, transzellulären Synthese zwischen adhären PMN und koronarer Endothelzelle gebildet.

Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung bakterieller Exotoxine im Zusammenhang mit den pathophysiologischen Veränderungen der Sepsis und der septischen Kardiomyopathie. Sie bieten aber auch neue Ansätze im Verständnis der komplexen Zusammenhänge der pathologischen Mikrozirkulation und der Bedeutung von PMN während der Sepsis.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Sands K.E., D.W. Bates, P.N. Lanken, P.S. Graman, For the Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group: Epidemiology of Sepsis Syndrom in 8 Academic Medical Centers. *JAMA* 1997;278: 234-240
- (2) E. Erdmann und E. Reuschel-Janetschek: Septische Herzschiädigung; Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern, Universität München, Deutschland
- (3) Bone R.C.: Important new findings in Sepsis. *JAMA* 1997;278: 249
- (4) Dunn DL.: Gram-negative bacterial sepsis and sepsis syndrom. *Surg. Clin. North Am.* 1994; 74:621-635
- (5) Bone, R.C.: Sepsis, the sepsis syndrome, multi organ failure: a plea for comparable definitions. *Ann. Intern. Med* 1991; 114:332-33
- (6) Parillo, J.E., moderator. Septic shock in humans: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction and therapy. *Ann. Intern. Med* 1990; 113:227-242
- (7) U. Müller-Werdan, R. Prondzinsky, R. Witthaut, N. Stache: Das Herz bei Sepsis und MODS. *Wien Klin. Wochenschr.* 1997: 3-24
- (8) Schuster, H.P., Schlussfolgerungen. IN: Werdan, K (ed) Sepsis: Toxinwirkung, Herzschiädigung, Quantifizierung, supportive Therapie mit Immunglobulinen. *Intensivmedizin.* 1989; 26: Suppl.1. S. 152-153
- (9) Parillo, J.E.: The cardiovascular pathophysiology of sepsis. *Ann. Rev. Med.* 1989; 40: 469-485

- (10) Parker M.M., K.E. Mc Carthy, F.P. Ognibene, J.E. Parillo: Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans. *Chest* 1990; 97:126-131
- (11) Feltes T.F., R. Pignatelli, S. Kleinert, M.M. Mariscalo: Quantitated left ventricular systolic mechanics in children with septic shock utilizing noninvasive wall-stress analysis. *Crit. Care Med.* 1994;22: 1647-1658
- (12) Hebert P.C., A.J. Drummond, J. Singer, G.R. Bernard, J.A. Russell: A simple multiple system organ failure scoring system predicts mortality of patients who have sepsis syndrome. *Chest* 1993;104: 230-235
- (13) Suffredini A.F., R.E. Frinm, M.M. Parker, et al: The cardiovascular response of normal humans to the administration of Endotoxin. *New Engl. J. Med.* 1989; 321: 280-287
- (14) Vincent J.L., P. Gris, M. Coffernils, et al.: Myocardial depression characterizes the fatal course of septic shock. *Surgery* 1992;105: 538-542
- (15) Ognibene, F.P., M.M. Parker, C. Natanson, J.H. Shelhamer, J.E. Parillo: Depressed left ventricular performance: response to volume infusion in patients with sepsis and septic shock. *Chest* 1988; 93: 903-910
- (16) Cunnion, R.E., G.L. Schaer, M.M. Parker, C. Natanson, J.E. Parillo: The coronary circulation in septic shock. *Circulation* 1986; 73: 637-644
- (17) Dhainaut, J.F., M.F. Huyghebaert, J.F. Monsallier, G. Lefevre, J. Dall'Ava-Santucci, F. Brunet, D. Villemant, A. Carli, D. Raichvarg: Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose and ketones in patients with septic shock. *Circulation* 1987; 75: 533-541
- (18) Glaese M.P., G. Zanetti, J.D. Baumgartner, J. Cohen.: Septic shock: pathogenesis *Lancet* 1991; 338: 732-736

- (19) Pilz G., P. Mc Ginn, P. Boestegers, S. Kaab, S. Weidenhofer, K. Werdan.: Pseudomonas sepsis does not cause more severe cardiovascular dysfunction in patients than not-Pseudomonas sepsis. *Circ. Shock* 1994; 42: 174-182
- (20) Natanson C., P.W. Eichenholz, R.L. Danner, P.Q. Eichacker, W. D. Hoffman, G.C. Kuo, J.E. Parillo: Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *The J. of experiment. Med.* 1989; 169: 823-832
- (21) Mc Donough K.H., C.H. Lang, J.J. Spitzer: Depressed function of isolated hearts from hyperdynamic septic rats *Circ. Shock* 1984; 12: 241-251
- (22) Shinji N., H. Noda, D.N. Herndorn, L.D. Traber, D.L. Traber: Left ventricular performance during continuous Endotoxin-induced hyperdynamic endotoxemia in sheep. *J. Appl. Physiol.* 1993; 74(4): 1528-1533
- (23) Masouye P., K. Gunning, J.F. Pittet, P.M. Suter, D.R. Morel: Xanthine derivative HWA 138 attenuates hemodynamic and oxygen uptake dysfunction secondary to severe endotoxin shock in sheep. *Circ. Shock* 1992; 36: 113-119
- (24) Pittet J.F., D.R. Morel: Imbalance between plasma levels of thromboxane B₂ and 6-ketoprostaglandin F₁ alpha during subacute Endotoxin-induced hyperdynamic sepsis or multiple organ failure syndrome in sheep. *Circ. Shock* 1991; 35: 65-77
- (25) Solomon A.M., R. Correa, H.R. Alexander, L.A. Koev, J.P. Cobb, D.K. Kim, W.C. Roberts, Z.M.N. Quezado, T.D. Scholz, R.E. Cunnion, W.D. Hoffman, J. Bacger, I. Yatsiv, R.L. Danner, S.M. Banks, V.J. Ferrans, R.S. Balaban, C. Natanson: Myocardial energy metabolism and morphology in a canine model of sepsis *Am. J. Physiol.* 1994; 266: H757-H768
- (26) Piper R.D., F.Y. Li, M.L. Myers, W.J. Sibbald: Structure-Function Relationship in the septic rat heart. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997;156: 1473-1482

- (27) Mc Donough, K.H., C.H. Lang, J.T. Spitzer: Depressed function of isolated hearts from hyperdynamic septic rats. *Circ. Shock* 1984; 12:241-251
- (28) Mc Donough, K.H., C.H. Lang, J.T. Spitzer: The effect of hyperdynamic sepsis on myocardial performance. *Circ. Shock* 1985; 15:247-259
- (29) Lee, K., H. van der Zee, S. W. Dzubian, K. Luhman, R.D. Goldfarb: Left ventricular function during chronic endotoxemia in swine. *Am. J. Physiol.* 1988; 254: H324- H330
- (30) Goldfarb, R.D., K.J. Lee, T. Andrejuk, S.W. Dzubian: End-systolic elastance as an evaluation of myocardial function in shock. *Circ. Shock* 1990; 30: 15-26
- (31) Bohs, C.T., M.E. Turbow, S.N. Kolmen, D.L. Traber: Coronary blood flow alterations in endotoxin shock and response to dipyridamole. *Circ. Shock* 1976; 3: 281-286
- (32) Fox, G.A., A. Berstem, C. Lam, A. Neal, F.S. Rutledge, K. Inman, W.J. Sibbald: Hematocrit modifies the circulatory control of systemic and myocardial oxygen utilization in septic sheep. *Crit. Care Med.* 1994; 22: 470-479
- (33) Eichenholz P.W., P.Q. Eichacker, W.D. Hoffman, S.M. Banks, J.E. Parillo, R.L. Danner, C. Natanson: Tumor necrosis factor challenges in canines: patterns of cardiovascular dysfunction. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: H668-H675
- (34) Tracey K.J., S.F. Lowry: The role of cytokine mediators in septic shock. *Adv. Surg.* 1990; 23: 21-56
- (35) Thijs L.G., C.E. Hack: Time course of cytokine levels in sepsis. *Intensive Care Med.* 1995; 21: S258-S263
- (36) Fraunberger P., A.K. Walli, D. Seidel: Stellenwert von Zytokinen in der Sepsis-Diagnostik. *Infusionsther. Transfusionsmed.* 1996; 23(suppl) 4: 109-116

- (37) Parker M.M., J.H. Shelhamer, S.L. Bacharach, M.V. Green, C. Natanson, T.M. Frederick, B.A. Damske, J.E. Parillo: Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann. Intern. Med.* 1984; 100: 483-490
- (38) Parker M.M., A.F. Suffredini, C. Natanson, F.P. Ognibene, J.H. Shelhamer, J.E. Parillo: Responses of left ventricular function in survivors and nonsurvivors of septic shock. *J. Crit. Care* 1989; 4: 19-25
- (39) Parillo J.E., C. Burch, J.H. Shelhamer, M.M. Parker, C. Natanson, W. Schuette: A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. *J. Clin. Invest.* 1985; 76: 1539- 1553
- (40) Hegewisch S., J.H. Weh, D.K. Hossfeld: TNF- α induced cardiomyopathy. *Lancet* 1990; 1: 294-295
- (41) Wu C.C., S.J. Chen, M.H. Yen: Nitric oxide-independent activation of soluble guanyl cyclase contributes to Endotoxin shock in rats. *Am. J. Physiol.* 1998; 275: H1148-H1157
- (42) Busse R., A. Mülsch: Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS-Lett.* 1990; 275: 87-90
- (43) Avontuur J.A.M., H.A. Bruining, C. Ince: Sepsis and nitric oxide. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996; 388: 551-567
- (44) Furchgott R.F., M.T. Khan, D. Jonathianandan: Evidence supporting that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide (abstract). *Thromb. Res.* 1987; Suppl. VII: 5
- (45) Stein B., P. Frank, W. Schmitz, H. Scholz, M. Thoenes: Endotoxin and cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. *J. Moll. Cell. Cardiol.* 1996; 28: 1631-1639

- (46) Ungureanu-Longrois D., J.L. Balligand, I. Okada, W.W. Simmons, L. Kobzik, C.J. Lowenstein, S.L. Kunkel, T. Michel, R.A. Kelly, T.W. Smith: Introduction of nitric oxide Synthase activity by cytokines in ventricular myocytes is necessary but not sufficient to decrease contractile responsiveness to β -adrenergic agonists.
Circ. Res. 1995; 77: 494-502
- (47) Sundrani R., C.R. Easington, A. Mattoo, J.E. Parillo, S.M. Hollenberg: Nitric oxide Synthase inhibition increases venular leukocyte rolling and adhesion in septic rats.
Crit. Care Med. 2000; 28: 2898-2903
- (48) Seeger, W., M. Bauer, S. Bhakdi: Staphylococcal α -toxin elicits hypertension in isolated rabbit lungs. *J. Clin. Invest.* 1984; 74:849-858
- (49) Seeger, W., H. Walter, N. Suttorp, M. Muhly, S. Bhakdi: Thromboxane-mediated hypertension and vascular leakage evoked by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in rabbit lungs. *J. Clin. Invest.* 1989, 84: 220-227
- (50) Walmrath, D., M. Scharmann, R. König, J. Pilch, F. Grimminger, W. Seeger: Staphylococcal α -toxin induced ventilation-perfusion mismatch in isolated blood-free perfused rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.* 1993; 74(4):1972-1980
- (51) Drazenovic, R., R.W. Samsel, M.E. Wylam, C.M. Doerschuk, P.T. Schumacher: Regulation of perfused capillary density in canine mucosa during endotoxemia. *J. Appl. Physiol.* 1992; 72:259-265
- (52) Farquahr, I., C.M. Martin, C. Lam, R. Potter, C.G. Ellis, W.J. Sibbald: Decreased capillary density in vivo bowel mucosa of rats with normotensive sepsis.
J. Surg. Res. 1996; 61 : 190-196
- (53) Bloos, F., and W.J. Sibbald: Cardiocirculation in sepsis. In: Reinhart, K., K. Eyrich, C. Sprung. Eds. Sepsis – current perspectives in pathophysiology and therapy.
Inten. Care and emergency medicine: Berlin, Heidelberg; Springer; 1994: 139-149

- (54) Hersch, M., A.A. Gnidec, A.D. Bersten, M. Troster, F. Rutledge, W.J. Sibbald: Histological and ultrastructural changes in nonpulmonary organs during early hyperdynamic sepsis. *Surgery* 1990; 107: 397-410
- (55) Avontuur, J. A.M., H. A. Bruining, C. Ince: Inhibition of nitric oxide synthesis causes myocardial ischemia in endotoxic rats. *Circ. Res.* 1995; 76: 418-425
- (56) Groeneveld A.B.J., A.A. van Lambalgen, G.C. van den Bos, W. Bronsveld, J.J.P. Nauta, L.G. Thijs: Maldistribution of heterogeneous coronary blood flow during canine endotoxin shock. *Cardiovasc. Res.* 1991; 25:80-88
- (57) Powell, R.J., G.W. Machiedo, B.F. Rush: Decreased red blood cell deformability and impaired oxygen utilization during human sepsis. *Am. Surg* 1993; 59: 65-68
- (58) Thomas. J.R., J.M. Harlan, C.L. Rice, R.K. Winn: Role of leukocyte CD11/CD18 complex in endotoxic and septic shock in rabbits. *J. Appl. Physiol.* 1992; 73 : 1510-1516
- (59) Bernard, G.R., H.D. Reines, P.V. Halushka, S.B. Higgins, C.A Metz, B.B. Swindell, P.E. Wright, F.L. Watts, J.L. Vrabanc: Prostacyclin and thromboxane A₂ formation is increased in human sepsis syndrome. Effects of cyclooxygenase inhibition. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 144: 1095-1101
- (60) Reid G.K., S. Kargman, P.J. Vickers, J.A. Mancini, C. Léveillé, D. Ethier, D.K. Miller, J.W. Gillard, R.A.F. Dixon, J.F. Evans: Correlation between expression of 5-lipoxygenase activating protein, 5-lipoxygenase and cellular Leukotriene synthesis. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 19818-19823
- (61) Maclouf J.A., R.C. Murphy, P. Henson: Transcellular sulfidopeptide Leukotriene biosynthetic capacity of vascular cells. *Blood* 1989; 74: 703-707
- (62) Feinmark S.J., P.J. Cannon: Endothelial cell leukotriene synthesis results from intracellular transfer of leukotrien A₄ synthesized by polymorphonuclear leukocytes *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 16466- 16472

- (63) Piper, P.J., L.G. Letts, and S.A. Galton: Generation of a leuktriene substance from porcine vascular and other tissues. *Prostaglandines* 25: 591-599, 1983
- (64) Sala, A., G. Rossoni, C. Buccellati, F. Berti, G. Folco, J. Macclouf: Formation of sulphidopeptide-Leukotriene by cell-cell interaction causes coronary vasoconstriction in isolated, cell-perfused heart of rabbit.
Br. J. Pharmacol. 1993; 110 : 1206-1212
- (65) Holroyde, M. C., P.E. C. Altounyan, M. Cole, M. Dixon, and E.V. Elliot: Leukotriene C and D induce bronchoconstriction in man.
Agents Actions 1981; 11: 573-574
- (66) Yokochi, K., P. M. Olley, E. Sideris, F. Hamilton, D. Hutanen, F. Cocceani. Leukotriene D₄: A potent vasoconstrictor of the pulmonary and systemic circulation in the new born lamb. *Leukotriene and other Lipxygenase products*, edited by B. Samuelsson and R. Paoletti. New York: Raven, 1982; 211-214
- (67) Woodman, O.L., G.J. Dusting: Coronary vasoconstriction induced by Leukotriene in the aenesthetized dog. *Eur. J. Pharmacol.* 1983; 86 : 125-128
- (68) Burke, J.A., R. Levi, Z. Guo, E.J. Corey : Leukotriene C₄, D₄ and E₄: effects on human and guinea pig cardiac preparation in vitro.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 1982; 221: 235-241
- (69) Michaelassi, F., G. Costorena, R. D. Hill, E. Lowenstein, D. Watkins, J. Petkau, W.M. Zapol: Effects of Leukotriene B₄ and C₄ on coronary circulation and myocardial contractility. *Surgery* 1983; 21: 315-321
- (70) Roth, D. M., D.J. Lefer, C.E Hock, A. Lefer: Effects of peptide Leukotriene on cardiac dynamics in rat, cat, and guinea pig hearts
Am. J. Physiol. 1985; 249: H477-H484,

- (71) Joris, I., G. Majno, E.J. Corey, R. A. Lewis: The mechanism of Vascular Leakage induced by Leukotriene E₄ *Am. J. Pathol* 1987; 126: 19-24
- (72) Barroso-Aranda, J., G.W. Schmid-Schönbein, B.W. Zweifach, J.C. Mathison: Polymorphonuclear neutrophil contribution to induced tolerance to bacterial lipopolysaccharide. *Circ. Res.* 1991; 69: 1196-1206
- (73) Goddard, C.M., M.F. Allard, J.C. Hogg, M.J. Herbertson, K.R. Walley: Prolonged leukocyte transit time in coronary microcirculation in endotoxemic pigs. *Am. J. Physiol.* 1995; 269: H1389-H1397
- (74) Granton, J.T., C.M. Goddard, M.F. Allard, S. van Eden, K.R. Walley: Leukocytes and decreased leftventricular contractility during endotoxemia in rabbits. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 155: 1977-1983
- (75) Albelda, S.M., C.A. Buck: Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 1990; 4: 2868-2880
- (76) Pober, J. S., R. S. Cotran: The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990; 50: 537-544
- (77) Butcher, E. C.: Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991; 67: 1033-1036
- (78) Albelda S.M., C. W. Smith, P.A. Ward: Adhesions molecules and inflammatory injury, *FASEB J.* 1994; 8: 504-512
- (79) Martin S.: Lösliche Formen von Adhäsionsmolekülen. *Dt. Ärztebl* 1995; 92: A-2984-2990 [Heft 44]
- (80) Zimmerman, G.A., S.M. Prescott, T.M. McIntyre: Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol. Today*, 1992; 13: 93-100

- (81) Tonnesen M.G.: Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanism of neutrophil adherence to vascular endothelium *J. Invest. Dermatol.* 1989; 93: 53s-58s
- (82) Ma X-I, Tsao PS, A.M. Lefer: Antibody to CD-18 exerts endothelial and cardiac protective effects in myocardial ischemia and reperfusion.
J. Clin. Invest. 1991; 88: 1237-1243
- (83) Thomas J.R, J.M. Harlan, C.L: Rice, R.K. Winn: Role of leukocyte CD11/CD18 complex in endotoxic and septic shock in rabbits.
J. Appl. Physiol. 1992; 73(4): 1510-1516
- (84) Gasic A.C., G. McGuire, S. Krater, A.I. Farhood, M.A. Goldstein, S.W. Smith, M.L. Entman, A.A. Taylor: Hydrogen peroxide pretreatment of perfused canine vessels induced ICAM-1 and CD18- dependent neutrophil adherence.
Circulation 1991; 84: 2154-2166
- (85) Argenbright L.W., L.G. Letts, R. Rothlein: Monoclonal antibodies to the leukocyte membrane CD18 glycoprotein complex and to intercellular adhesion molecule-1 inhibit leukocyte-endothelial adhesion in rabbits.
J. Leukocyte Biol. 1991; 49: 253-457
- (86) Xin-liang M.A., J.L. David, A.M. Lefer, R. Rothlein: Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to Intercellular-Adhesion-Molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1992; 86: 937-946
- (87) C.W. Smith, R. Rothlein, B.J. Hughes, M.M. Mariscallo, H.E. Rudloff, F.C. Schmalstieg, D.C. Anderson: Recognition of an endothelial determinant for CD18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration.
J. Clin. Invest. 1988; 82: 1746-1756
- (88) Rothlein R., E.A. Mainolfi, T.K. Kishimoto: Treatment of inflammation with anti-ICAM-1. *Res. Immunol.* 1993; 144: 735-739

- (89) Chilton, F.H., J.M. Ellis, S.C. Olson, R.L. Wykle: 1-O-alkyl-2-arachdonyl-sn-glycero-3-phosphocholin. A commone source of platelet activating factor and arachnoidate in human polymorphnuclear leukocytes.
J. Biol. Chem. 1984; 259: 12014-12019
- (90) Mueller, H.W., J.T. O'Flaherty, R.L. Wykle: Biosynthesis of platelet activating factor in rabbit polymorphonuclear neutrophils.
J. Biol. Chem. 1983; 258: 6213-6218
- (91) Whatley, R.E., G.A. Zimmerman, T.M. McIntyre, S.M. Prescott: Endothelium from diverse vascular sources synthesizes platelet activating factor.
Arteriosclerosis 1988; 8: 321-331
- (92) Mc Ever R.P.: GMP-140, a receptor that mediates interactions of leukocytes with activated platelet and endothelium. *Trends Cardiovasc. Med.* 1991; 1: 152-156
- (93) Davidson, D., M. Sing, G.F. Wallace.: Role of leukotriene C4 in pulmonary hypertension: platelet-activating factor versus hypoxia.
J. Appl. Physiol. 1991; 68: 1628
- (94) Hu, W., A.A. Kinnaird, R.Y.K. Man: Mechanism of the coronary vascular effects of platelet-activating factor in the rat perfused heart.
Br. J. Pharmacol. 1991; 103: 1097-1102
- (95) Schiffmann, E., B.A. Corcoran, S.M. Wahl.: N-Formyl methionyl peptides as chemoattractants for leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975; 72: 1059-1062
- (96) Marasco, W.A., S.H. Phan, H. Krutzsch, H.J. Showell, D.E. Feltner, R. Nairn, E.L. Becker, P.A. Ward.: Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide chemotactic factor produced by escherichia coli.
J. Biol. Chem. 1984; 259: 5430-5439

- (97) Nidel J.S., S. Wilkinson, P. Cuatrecasas: Receptor-mediated uptake and degradation of ^{125}I -chemotactic peptide by human neutrophils.
J. Biol. Chem. 1979; 254: 10700
- (98) Schiffmann E, B.A. Corcoran, S.M. Wahl: N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1975; 72: 1059
- (99) Worthen G.R., B. Schwab, E.L. Elson, G.P. Downey: Mechanics of stimulated neutrophils: cell stiffening induces retention in capillaries.
Science 1989; 245: 183-186
- (100) Mullmann T.J., B. Cheewatrakoolpong, J.C. Anthes, M.I. Siegel, R.W. Egan, M.M. Billah: Phospholipase-C and Phospholipase-D are activated independently of each other in chemotactic peptide stimulated human neutrophils.
J. Leukoc. Biol. 1993; 53: 630
- (101) Jacobson P.B., D.J. Schrier: Regulation of CD11b/CD18 expression in human neutrophils by phospholipase A2 *J. Immunol* 1993; 10: 5639
- (102) Hellberg C., L. Molony, L.M. Zheng, T. Andersson: Ca^{2+} signalling mechanism of the beta(2)integrin on neutrophils- Involvement of Phospholipase C-gamma-2 and INS(145)P-3. *J. Biochem.* 1996; 317: 403
- (103) Kanner S.B., L.S. Gosmarie, J.A. Ledbetter, N.K. Damle: Beta-2-integrin LFA-1 signaling through Phospholipase c-gamma-1 activation.
Proc. Nat. Acad. Sci. 1993; 90: 7099
- (104) Walzog B., R. Seifert, A. Zakrzewicz, P. Gaehtgens, K. Ley: Cross-linking of CD 18 in human neutrophils induces an increase of intracellular free Ca^{2+} , exocytosis of azurophilic granules, quantitative up-regulation of CD 18, Shedding of L-Selectin and actin polymerisation. *J. Leukoc. Biol.* 1994; 56: 625

- (105) Kanner S.B.: Focal adhesion kinase-related FAKB is regulated by the integrin LFA-1 and interacts with the SH3 domain of Phospholipase C-gamma-1
Cell Immunol. 1996; 171: 164
- (106) Galkina S.I., G.F. Sud`ina, L.B. Margolis: Regulation of intracellular pH by phospholipase A2 and protein kinase C upon neutrophil adhesion to solid substrate.
FEBS Lett. 1996; 393: 117
- (107) Hamilton J.R., J.L. Hart, O.L. Woodman: Degranulation enhances release of a stable contractile factor from rabbit polymorphonuclear leukocytes
Am. J. Physiol. 1998; 274: H1545-H1551
- (108) Harris A.G., J.J. Costa, F.A. Delano, B.W. Zweifach, G.W. Schmid-Schönbein: Mechanism of cell injury in rat mesentery and cremaster muscle
Am. J. Physiol. 1998; 274: H1009-H1015
- (109) Raininger G.E., A.F. Rowley, G. B. Nash: Adhesion-dependent release of Elastase from human neutrophils in a Novel, flow-based model: Specificity of different chemotactic agents *Blood* 1998; Vol. 92, No 12: 4819-4827
- (110) Pilz G., P. McGinn, P. Boestegers, S. Kaab, S. Weidenhofer, K. Werdan: Pseudomonas sepsis does not cause more severe cardiovascular dysfunction in patients than not-Pseudomonas sepsis. *Circ. Shock* 1994; 42: 174-182
- (111) Natanson C., R.L. Danner, R.J. Elin, J.M. Hosseine, K.W. Peart, S.M. Banks, T.J. MacVittie, R.I. Walker, J.E. Parillo: Role of endotoxemia in cardiovascular dysfunction and mortality. Escherichia coli and Staphylococcus aureus challenges in a canine model of human septic shock. *J. Clin. Invest.* 1989; 83: 243-251
- (112) Suffredini A.F., R.E. Fromm, M.M. Parker, M. Brenner, J.A. Kovacs, J.E. Parillo: The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *Engl. J. Med.* 1989; 321: 280-287

- (113) Mc Donough K.H., B.A. Brumfield, C.H. Lang: In vitro performance after lethal and nonlethal doses of endotoxin. *Am. J. Physiol.* 1986; 250: H240-H246
- (114) Natanson C., P.W. Eichenholz, R.L. Danner, P.Q. Eichhacker, W.D. Hoffman, G.C. Kuo, S.M. Banks, T.J. MacVittie, J.E. Parillo: Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs stimulate the cardiovascular profile of human septic shock
J. Exp. Med. 1989; 169: 823-832
- (115) Brenner M., M.E. Doerfler, R.L. Danner: Determination of direct myocardial contractile effects of eicosanoids, endotoxin, tumor necrosis factor and other mediators using a newly designed quantitative cellular contractile assay
Clin. Res. 1987; 35: 785 A.
- (116) Kayser F.H., K.A. Bienz, J. Eckert, J. Lindenmann Medizinische Mikrobiologie; 8. überarbeitete Auflage –Stuttgart; New York: Thieme, 1993
- (117) De Kimpe S.J., M.L. Hunter, C.E. Bryant, C. Thiemermann, J.R. Vane: Delayed circulatory failure due to the induction of nitric oxide Synthase by lipoteichoic acid from staphylococcus aureus in anaesthetized rats.
Br. J. Pharmacol. 1995; 114: 1317-1323
- (118) Reithman C., K. Werdan.: Noradrenalin-induced desensitization in cultured heart cells as a model for the defects of the adenylate cyclase system in severe heart failure. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1989; 339: 138-144
- (119) Reithman C. P. Gierschik, U. Müller, K. Werdan, K.H. Jakobs: Pseudomonas exotoxin a prevents β -adrenoreceptor-induced upregulation of Gi protein α -subunits and adenylyl cyclase desensitization in rat heart muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 1990
- (120) Thompson A., S.P. Halbert, U. Smith: The toxicity of streptolysin O for Beating mammalian heart cells in tissue culture. *J. Exp. Med.* 1970; 131: 745-763

- (121) Lai X.H., S.Y. Wang, B.E. Uhlin: Expression of cytotoxicity by potential pathogens in the standard *Escherichia coli* collection of reference (ECOR) strains *Microbiology* 1999; 145: 3295-3303
- (122) Elliot S.J., S. Srinivas, M.J. Albert, K. Alam, R.M. Robins-Browne, S.T. Gunzburg, S.T., B.J. Mee, B.J. Chang: Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. *Infect. Immun.* 1998; 66: 2040-2051
- (123) Bhakdi S., J. Traum-Jensen: Damage to mammalian cells by proteins that form transmembrane pore. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1987; 107: 147-223
- (124) Bhakdi S., J. Traum-Jensen: Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolysins. *Prog. Allergy* 1988; 40: 1-43
- (125) Bhakdi S., J. Traum-Jensen: Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* 1991; 55: 733-751
- (126) Gouaux, J.E., O. Braha, M.R. Hobaugh, L. Song, S. cheley, C. Shustak, H. Barley: Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 12828-12831
- (127) Song L., M.R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, J.E. Gouaux: Structure of Staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 1996; 274: 1859-1866
- (128) Valeva A., J. Pongs. S. Bhakdi, M. Palmer: Staphylococcal alpha toxin: The role of the N-terminus in formation of the heptameric pore – a fluorescence study *Biophys. Acta.* 1997; 1325: 281-286

- (129) Valeva A., A. Weisser, B. Walker, M. Kehoe, H. Bayley, S. Bhakdi, M. Palmer: Molecular architecture of a toxin pore: a 15-residue sequence lines the transmembrane channel of staphylococcal alpha-toxin. *EMBO-J.* 1996; 15:1857-1864
- (130) Hirshman S., P.L. Lefferts, J.R. Snapper: Staphylococcal alpha toxin: a study with chronically instrumented awake sheep. *Infect. Immun.* 1992; 60: 3489-3496
- (131) Adamo P., P.B. Taylor, H.B. Fackrell: Staphylococcal alpha toxin induced cardiac dysfunction. *Can. J. Cardiol.* 1989; 5: 395-400
- (132) Sibelius U., U. Grandel, M. Buerke, D. Müller, L. Kiss, H.J. Krämer, R. Braun-Dulläus, W. Haberbosch, W. Seeger and F. Grimminger: Staphylococcal α -toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts – role of thromboxane formation. *Circulation* 2000; 101: 78-85
- (133) Gemmel C. G., P.K. Peterson, D.J. Schmeling, P.G. Quie: Effect of staphylococcal α -toxin on phagocytosis of staphylococcus by human polymorphnuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 1982; 38: 975-980
- (134) Langendorff, O.: Untersuchung am überlebenden Säugetierherzen. *Pflüglers Archiv der gesamten Physiologie* 1895; 61:291-332
- (135) Beckstead, J.H. Stenberg, R.P. McEver, M.A. Shuman, and D.F. Bainton: Immunohistochemical localization of membrane and alpha-granule proteins in human megakaryocytes: application to plastic embedded bone marrow biopsy specimens. *Blood* 1986; 67:285-293
- (136) Boyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1968; 97: 77-89

- (137) Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD and Rothstein GR: Measurement of cutaneous inflammation : Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78:206-209
- (138) Mullane KM, Kraemer R and Smith B: Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J. Pharmacol. Methods* 1985; 14:157-167
- (139) Suttorp, N., W. Seeger, E. Dewein, S. Bhakdi, L. Rhoka: Staphylococcal α -Toxin stimulates synthesis of prostacyclin by cultured endothelial cells from pig pulmonary arteries. *Am. J. Physiol.* 1985; 248: C127-C135
- (140) Suttorp, N., T. Hessz, W. Seeger, A. Wilke, R. Koob, F. Lutz, D. Drenckhahn: Bacterial exotoxins and endothelial permeability for water and albumin in vitro. *Am. J. Physiol.* 1988; 255: C368-C376
- (141) Suttorp, N., M. Fuhrmann, S. Tannert-Otto, F. Grimminger, S. Bhakdi: Pore-forming bacterial toxins potently induce release of nitric oxide in porcine endothelial cells. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 337-341
- (142) Grimminger, F., F. Rose, U. Sibelius, M. Meinhardt, B. Pötzsch, R. Spriestersbach, S. Bhakdi, N. Suttorp, W. Seeger: Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins Escherichia coli hemolysin and staphylococcal α -toxin. *J. Immunol.* 1997, 159: 1909-1916
- (143) Bahkdi, S., M. Muhly, U. Mannhardt, F. Hugo, K. Klapettek, C. Müller-Eckhardt, L- Roka: Staphylococcus α -Toxin promotes blood coagulation via attack on human platelets. *J. Exp. Med.* 1988; 168: 527-542
- (144) Bhakdi, S, M. Muhly, S. Korom, F. Hugo: Release of interleukin-1 β associates with potent cytotoxic action of staphylococcal α -toxin on human monocytes. *Infect. Immun.* 1989; 57: 3512-3519

- (145) Weyrich, A.S., M. Buerke, K.H. Albertine, A.M. Lefer: Time course of coronary vascular endothelial adhesion molecule expression during reperfusion of the ischemic feline myocardium. *J. Leukoc. Biol.* 1995; 57: 45-55
- (146) Bhakdi, S., H. Bayley, A. Valeva, I. Walev, B. Walker, U. Weller, M. Kehoe, M. Palmer: Staphylococcal α -Toxin, streptolysin-O and Escherichia coli hemolysin: prototypes of poreforming bacterial cytolysins. *Arch. Microbiol.* 1996; 165: 73-79
- (147) Ma, X.L., D.J. Lefer, A.M. Lefer, R. Rothlein: Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1992; 86: 937-946
- (148) Clancy, R.M., C.A. Dahinden, T.E. Hugli: Arachidonate metabolism by human polymorphonuclear leukocytes stimulated by N-formyl-Met-Leu-Phe or complement C5a is independent of phospholipase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983; 80: 7200-7206
- (149) Grimminger, F., U. Dürr, W. Seeger: Ligand-operated synthesis of 4-series and 5-series Leukotriene in human neutrophils: critical dependence on exogenous free fatty acid supply. *Mol. Pharmacol.* 1992; 41: 757-766
- (150) Hammarström, S., M. Hamberg, B. Samuelsson, E. Duell, M. Stawski, J.J. Voorhes: Increased concentrations of non-esterified arachidonic acid, 12L-hydroxy-eicosatetraenoic acid, prostaglandin E₂ and prostaglandin F₂ α in the epidermis of psoriasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975; 72: 5130-5135
- (151) Unterberg, A., M. Wahl, F. Hammersen, A. Baethmann: Permeability and vasomotor response to cerebral vessels during exposure to arachidonic acid. *Acta. Neuropathol.* 1986; 73: 209-219
- (152) Lee, C.C., R.F. Appleyard, J.G. Byrne, L.H. Cohn: Leukotriene D₄ and E₄ produced in myocardium impair coronary flow and ventricular function after two hours of global ischaemia in rat heart. *Cardiovasc. Res.* 1993; 27: 770-773

- (153) Rossoni, G., A. Sala, F. Berti, C. Testa, C. Buccellati, C. Molta, R: Muller-Peddinghaus, J. Maclouf, G. C. Folco: Myocardial protection by leukotriene synthesis inhibitor BAY X1005: importance of transcellular biosynthesis of cysteinyl-Leukotriene. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1996; 276:335-341

- (154) Feinmark, S.J., P.J. Cannon: Endothelial cell leukotriene synthesis results from intracellular transfer of leukotriene A₄ synthesized by polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 16466-16472

- (155) Bloos, F.M., H.M. MorisaKI; A.M. Neal, C.M. Martin, C.G. Ellis, W.J. Sibbald: Sepsis depresses the metabolic oxygen reserve of the coronary circulation in mature sheep. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153: 1577-84

- (156) Grimminger, F., K. Hattar, C. Papavassilis, B. Temmesfeld, E. Csernok, W.L. Gross, W. Seeger, U. Sibelius: Neutrophil activation by anti-proteinase 3 antibodies in Wegener's granulomatosis: role of exogenous arachidonic acid and leukotriene B₄ generation. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 1567

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mir bei dem Gelingen dieser Arbeit geholfen haben:

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Friedrich Grimminger bedanke ich mich für die Bereitstellung, des interessanten Promotionsthemas, sowie der materiellen und apparativen Vorraussetzungen, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Herrn Dr. Ulf Sibelius danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung bei der Bearbeitung der Fragestellung meiner Promotionsarbeit.

Herrn Dr. Ulrich Grandel danke ich für seinen beispiellosen Einsatz und sein Engagement, sowie für seine wissenschaftliche Kritik, mit der er wesentlich zum Erfolg der Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. Michael Buerke danke ich für die Möglichkeit, immunhistochemische Untersuchungen durchzuführen und Herrn Ladislau Kiss für die Hilfe bei der Leukotrien-Analytik.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Martina Heep bedanken, die durch ihre routinierte technische Hilfe einen nicht unwesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte.

Insbesondere möchte ich mich jedoch bei meinem Vater bedanken, ohne dessen Unterstützung ich nicht in der Lage gewesen wäre, diese Arbeit zu beginnen und zu vollenden.

9. Lebenslauf

Name: Reutemann
Vorname: Mathias Arne
Geburtsdatum: 10.12.1972

Schulbildung

1979-1983 Grundschole Bobenheim-Roxheim
1983-1992 Gauß-Gymnasium-Worms

Zivildienst

1992-1994 Rettungsdienst, ASB-Worms mit der Ausbildung zum
Rettungssanitäter

Hochschulstudium

04/1994-09/2000 Studium der Humanmedizin
Vorklinischer und klinischer Studienabschnitt an der Justus-Liebig-
Universität, Gießen
10/1997-03/1998 Studium an der medizinischen Fakultät der Universität zu Granada,
Spanien im Rahmen des ERASMUS-Austausch-Programmes
10/2000-09/2000 Praktisches Jahr, Ruhr-Universität Bochum, Kliniken Bergmannsheil
19.10.2001 Ablegung des dritten Staatsexamens
Seit dem 01.01.2002 Arzt im Praktikum am Klinikum St. Georg, Leipzig