

Aus dem Institut für Innere Medizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Betreuer: Priv. Doz. Dr. M. Buerke

Eingereicht über das Institut für Veterinärpathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Im Fachbereich vertreten durch Prof. Dr. M. Reinacher, Gießen

**Exotoxin-Schock, ausgelöst durch Staphylococcus aureus α -Toxin,
am Tiermodell Ratte - Auswirkungen auf Gefäßendothel,
Leukozytenakkumulation und Thrombozytenaggregation.**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
JUDITH WEGNER
Tierärztin aus Herchenbach (Saarland)

Gießen 2004

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Buerke

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Reinacher

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2005

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1.	Sepsis	3
2.1.1.	Definitionen	3
2.1.2.	Prävalenz	4
2.1.3.	Pathophysiologie der Sepsis	5
2.1.3.1.	Mediatoren	9
2.1.4.	Zytotoxische Wirkung von α -Toxin	11
2.2.	Endothelzellen, Granulozyten, Thrombozyten und deren Interaktionen	13
2.2.1.	Endothelzellen	13
2.2.2.	Granulozyten	15
2.2.3.	Interaktionen zwischen Granulozyten und Endothelzellen	17
2.2.4.	Thrombozyten	21
2.2.5	Übersicht: Einfluß von α -Toxin auf verschiedene Zelltypen und Entstehung eines „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS)	24
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	25
3.1.	Material und Methoden	25
3.1.1.	Tiermodell Ratte	25
3.1.1.1.	Operation der Versuchstiere	25
3.1.1.2.	Zytokinbestimmung mittels Serum-ELISA	26
3.1.1.3.	Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität in den Organen	27
3.1.1.4.	Durchführung der histologischen Untersuchungen	28
3.1.1.5.	Untersuchungen zur Proteinexpression mittels Western-Blot	31
3.1.2.	Aggregation humaner Thrombozyten	35
3.1.3.	Statistische Auswertung der Ergebnisse	37
3.2.	Ergebnisse	38
3.2.1.	Untersuchungen am Tiermodell Ratte	38
3.2.1.1.	Hämodynamische Parameter und Überlebenszeit	40

3.2.1.2.	Zytokinkonzentrationen im Serum	48
3.2.1.3.	Myeloperoxidaseaktivität in den Organen	49
3.2.1.4.	Pathologisch-anatomische Befunde	51
3.2.1.5.	Histopathologische Befunde	51
3.2.1.6.	Western-Blot	63
3.2.2.	Einfluß unterschiedlicher Inhibitoren auf die α -Toxin-induzierte Thrombozytenaggregation	64
4.	DISKUSSION	68
4.1.	Untersuchungen am Tiermodell Ratte	68
4.1.1.	Hämodynamik	68
4.1.2.	Zytokinmessungen im Serum	70
4.1.3.	Myeloperoxidaseaktivität in den Organen	71
4.1.4.	Histopathologische Befunde	72
4.1.4.1.	H.E.-Färbung der Herzen	72
4.1.4.2.	Nachweis der Adhäsionsmoleküle in der Immunhistochemie	74
4.1.4.3.	Untersuchung der NO-Synthasen in der Immunhistochemie und im Western-Blot	75
4.2.	Einfluß unterschiedlicher Inhibitoren auf die α -Toxin-induzierte Thrombozytenaggregation	77
5.	ZUSAMMENFASSUNG	80
6.	SUMMARY	83
7	LITERATURVERZEICHNIS	86
8	ANHANG	100
8.1.	Bezugsquellen für benötigte Geräte, Einmalartikel und Chemikalien	100
8.2.	Anhang zum Ergebnisteil	106
8.3.	Abkürzungsverzeichnis	111

1. Einleitung

Beim Schock handelt es sich um ein akutes generalisiertes Kreislaufversagen mit kritischer Mangel durchblutung der terminalen Strombahn lebenswichtiger Organe und einer fortschreitenden Ischämie [Pohlenz und Sandersleben, 1990].

Im septischen Schock ist die Ursache ein gestörter Gefäßtonus und eine Dysregulation der Mikrozirkulation als systemische Antwort auf eine Infektion.

Die Inzidenz der Sepsis in der Humanmedizin liegt in den USA bei fast 500 000 Fällen und in Deutschland bei 75000 Fällen pro Jahr [Klosterhalfen, 1998]. In der Tiermedizin ist der septische Schock die häufigste Schockform, wobei Jungtiere, v.a. Kälber und Ferkel, in den ersten Lebenswochen besonders anfällig sind [Pohlenz und Sandersleben, 1990].

Als sepsisinduzierende Bakterientoxine spielen neben Endotoxinen auch Exotoxine eine wichtige Rolle, z.B. α -Toxin, ein Exotoxin von *Staphylococcus aureus*. α -Toxin zeichnet sich durch seine hämolytischen, zytotoxischen, dermonekrotischen und letalen Eigenschaften aus [Bhakdi und Trantum-Jensen, 1991]. Es bildet nichtselektive Poren in den Zellmembranen [Füssle et al., 1981]. Es schädigt somit durch Einstrom von extrazellulärer Flüssigkeit (bis hin zur Zytolyse), Ca^{2+} -Einstrom und Ausstrom wichtiger intrazellulärer Moleküle. Ca^{2+} fungiert als Trigger für viele sekundäre Reaktionen in der Zelle [Johnson und Chang, 2000].

Eine Versuchsreihe mit Schafen zeigte, daß α -Toxin abhängig vom Immunstatus der Tiere und der Dosis eine Toxämie, bei ungünstigen Bedingungen sogar ein direktes Herzversagen auslösen kann [Harshmann et al., 1992]. Studien an isolierten Rattenherzen sowie an humanen Endothelzellen zeigten eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen und eine vermehrte Akkumulation von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) [Grandel et al., 2002; Krull et al., 1996]. Andere Studien zeigten, daß α -Toxin in Endothelzellen die NO-Produktion sowie die eNOS-Expression steigert [Suttorp et al., 1993; Grandel et al., 2001; Buerke et al., 2002].

Es gibt nur unzureichend Studien, die in einem Tiermodell die Interaktion der zirkulierenden Blutzellen mit dem Gefäßendothel nach Verabreichung von α -Toxin untersuchten.

Ziel dieser Arbeit war es, an einem Tiermodell den direkten Zusammenhang zwischen der durch α -Toxin hervorgerufenen Toxämie und Veränderungen am Endothel sowie der Akkumulation von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) herzustellen. Außerdem sollte der Pathophysiologie der α -Toxin-induzierten Thrombozytenaggregation durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren auf den Grund gegangen werden. Die Thrombozytenaggregation ist in der Humanmedizin ein wichtiger Aspekt der α -Toxinwirkung, da menschliche Thrombozyten empfindlich auf das Toxin reagieren.

Aufgrund der herausgefundenen Ergebnisse sollten neue Ideen für Therapiekonzepte entstehen, die in weiteren Studien an den vorgeführten Modellen erprobt werden könnten.

2. Literaturübersicht

2.1 Sepsis

2.1.1. Definitionen

Schock kann definiert werden als akutes generalisiertes Kreislaufversagen, gefolgt von kritischer Mangel durchblutung der terminalen Strombahn lebenswichtiger Organe und einer fortschreitenden Ischämie [Pohlenz und Sandersleben, 1990].

Im septischen Schock ist die Ursache ein gestörter Gefäßtonus und eine Dysregulation der Mikrozirkulation als systemische Antwort auf eine Infektion. Schottmüller hat die Sepsis 1914 so definiert: "Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, und zwar derart, daß durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden." Später wurde der Begriff der Sepsis auf eine systemische Entzündungsreaktion auf eine Infektion durch Mikroorganismen (d.h. Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten) erweitert [Bone, 1992].

Handelt es sich um ein Toxin, das im Blut zirkuliert, so spricht man von einer Toxämie [Pschyrembel, 2002].

Bei tierischen sowie menschlichen Patienten mit protrahiertem Schock stellt sich das sogenannte multiple Organversagen (MOF; „multiple organ failure“) ein. Es ist ein Syndrom mit sequenziellem Versagen von zwei oder mehr Organsystemen bei Patienten mit den klinischen Zeichen der Sepsis [Baue, 1975]. Normalerweise ist die respiratorische Dysfunktion (adult respiratory distress syndrome (ARDS)) die erste Ausfallserscheinung.

Viele MOF-Patienten zeigen systemische Reaktionen wie bei einer Sepsis, jedoch ohne infektiöse Ursache, wofür der Begriff „systemic inflammatory response syndrome (SIRS)“ geprägt wurde [Bone, 1992]. SIRS kann bei folgenden Erkrankungen auftreten: Pankreatitis, Ischämie, multiple Traumen und Gewebsverletzungen, hämorrhagischer Schock, immunbedingte Organschäden sowie nach exogener Zufuhr von potenten Entzündungsmediatoren oder Toxinen (was der Toxämie durch α -Toxin, die in dieser Arbeit induziert wird, entspräche).

2.1.2. Prävalenz

Die Inzidenz der Sepsis in der Humanmedizin liegt in den USA bei fast 500 000 Fällen und in Deutschland bei 75000 Fällen pro Jahr [Klosterhalfen, 1998]. Etwa die Hälfte dieser Patienten erleidet im Verlauf der Erkrankung einen septischen Schock mit einer Mortalitätsrate von 50% und mehr [Parrillo, 1993; Klosterhalfen, 1998].

Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Zunahme der septischen Erkrankungen und den Fortschritten, die die Medizin in den letzten Jahrzehnten gemacht hat. Durch die steigenden Resistenzen entwickelt sich der Hospitalismus zu einer stetig anwachsenden Problematik. Außerdem weist das Patientenkollektiv immer mehr Menschen mit reduzierter immunologischer Abwehr, wie z.B. ältere Menschen, immuninkompetente Frühgeborene, Patienten mit schweren Grunderkrankungen, auf.

Die Prävalenz von gramnegativen Erregern beim septischen Schock variiert zwischen 30% und 80% der Patienten, die von grampositiven Organismen zwischen 6% und 24%. Traditionell wurde der septische Schock als Konsequenz einer Infektion mit gramnegativen Bakterien angesehen, aber er kann ebenfalls von grampositiven Bakterien, Pilzen, Viren oder Parasiten ausgelöst werden [Glauser et al., 1991]. Häufig kommt es auch zu Mischinfektionen von gramnegativen und grampositiven Erregern.

In der Tiermedizin ist der septische Schock die häufigste Schockform, wobei Jungtiere, v.a. Kälber und Ferkel, in den ersten Lebenswochen besonders anfällig sind [Pohlenz und Sandersleben, 1990].

Staphylococcus aureus ist bei Tier und Mensch als Kommensale auf Haut und Schleimhaut, im vorderen Nasenbereich und beim Menschen im Gastrointestinaltrakt zu finden [Kloos und Schleifer, 1981]. Bei Tieren tritt Staphylococcus aureus v.a. im Zusammenhang mit Mastitis, Synovitis, Furunkelbildung, eitriger Dermatitis, Abszessen, Pyämie und Septikämie auf [Rolle und Mayr, 1993]. Beim Hund sind Pyodermien von großer Bedeutung, beim Pferd die sogenannte Botryomykose (chronische, abszedierend-granulomatöse Entzündung mit starker Bindegewebszubildung) und beim Rind Mastitiden. Bei den kleinen Wiederkäuern sind Staphylococcus aureus-Mastitiden oft gangränösierend und ziehen häufig den Verlust der betroffenen Euterteile nach sich bzw. führen zum Tod.

Eine Untersuchung bei Haushunden hat ergeben, daß 60% der isolierten Staphylococcus aureus-Stämme α -Toxin produzierten [Adesiyun und Usman, 1983]. Staphylococcus aureus Stämme, die bei gesunden Schafen vom vorderen Nasenbereich und bei solchen mit purulenter Mastitis vom Euter isoliert wurden, waren zu 89% vom C-Typ und produzierten

neben β -Hämolysin und Fibrinolytin auch α -Toxin [Hajek und Marsalek, 1976]. Bei Isolaten aus Kuheutern produzierten 94% der Stämme α -Toxin [Kenny et al., 1992].

Liegt bei den beschriebenen Erkrankungen eine Schwächung des Immunsystems vor oder eine starke Vermehrung des Erregers, so kann die lokale Infektion sich zu einer systemischen ausdehnen und zum septischen Schock führen. Denkbar ist auch eine Erregervermehrung und Toxinbildung in unsauberen Injektions- und Infusionsflaschen.

2.1.3. Pathophysiologie der Sepsis

In der Pathophysiologie unterscheidet sich die Sepsis als systemische Entzündung kaum von einer lokalen Entzündungsreaktion.

Abhängig von der Virulenz des Erregers und der Immunkompetenz des Wirtes können die lokalen Abwehrmechanismen durchbrochen werden und die Mikroorganismen in den Blutkreislauf gelangen. Denkbar ist auch eine iatrogene Einbringung der Erreger durch unsaubere Eingriffe. Sind nur die Bakterientoxine im Blut (Toxämie), so ist die systemische Entzündungsreaktion (in dem Fall als „systemic inflammatory response syndrome“, SIRS, bezeichnet) mit einer Sepsis vergleichbar.

Bakterientoxine werden in Endo- und Exotoxine eingeteilt. Endotoxine sind Lipopolysaccharide, die bei Zerstörung aus der gramnegativen Bakterienwand und in geringen Mengen auch ohne Zellzerstörung freigesetzt werden. Sie sind nicht direkt zellschädigend, sondern wirken über Deregulation der Funktion von Wirtszellen durch Aktivierung des Kallikrein-Kinin-, Gerinnungs- und Komplementsystems, sowie durch Stimulation der Synthese bestimmter Mediatoren, z.B. TNF- α , IL-1 und IL-6. Exotoxine sind Proteine, die von Bakterienzellen sezerniert werden. Sie besitzen eine direkt zellschädigende Wirkung. Es sind entweder Enzyme, Porenbildner oder Superantigene. Sie üben im Vergleich zu den Endotoxinen allerdings mehr Einfluß auf die Mediatorfreisetzung als auf die unterschiedlichen Kaskaden aus [Bhakdi, 1998].

Die toxischen Bakterienprodukte in der Blutbahn aktivieren die systemischen Körperabwehrmechanismen, sowohl Plasmasysteme (Komplement-, Kallikrein-Kinin- und Gerinnungs-Fibrinolyse-System) als auch zelluläre Systeme (neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen). Abhängig von Dauer und Stärke der Noxe und der Immunitätslage des Patienten kann es zu einer inadäquaten, exzessiven Ganzkörperentzündungsreaktion kommen, so daß die Abwehrsysteme mit ihren Mediatoren

selber zur Noxe werden. Je nach Zeitpunkt stehen unterschiedliche Mediatoren im Vordergrund [Neugebauer et al., 1995].

Bisher wurden mehr als 150 verschiedene Mediatoren beschrieben, die im Rahmen der Sepsis eine wichtige Rolle spielen [Neugebauer et al., 1991]. Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF- α) und Interleukine (IL-1 bis IL-13), verschiedene Proteine (Elastase, Faktoren des Komplementsystems), Eicosanoide, plättchenaktivierender Faktor (PAF), Sauerstoffradikale und Stickstoffmonoxid gehören zu den wichtigsten Systemen.

Die kausale Beteiligung eines einzelnen Mediators am septischen Schock kann durch die Koch-Dale Kriterien [King, 1957] gesichert werden:

- Anwesenheit des Mediators bei Krankheit
- Abwesenheit des Mediators bei Gesundheit
- Auslösung der Krankheit durch exogene Gaben
- Blockade der Wirkung und Verhinderung bzw. Abschwächung der Krankheit durch Hemmstoffe der Synthese/Freisetzung oder durch spezifische Rezeptorantagonisten

Nach diesen Kriterien kann zum momentanen Zeitpunkt bei Lipopolysacchariden, den Komplementfaktoren C3a und C5a, TNF- α und den Zyklooxygenase-Metaboliten (Thromboxan und Prostaglandine) auf eine kausale Beteiligung am septischen Schock geschlossen werden. Über Endorphine, Zytokine (außer TNF- α), Peptidleukotriene, PAF und Kalzium existieren zwar klinische Studien, aber der kausale Nachweis gilt noch nicht als ausreichend gesichert [Neugebauer et al., 1995].

Das in die Blutbahn gelangte Exotoxin kommt in Kontakt mit Monozyten und Makrophagen, die es phagozytieren, um seine antigene Komponente zusammen mit dem Histokompatibilitätskomplex zu präsentieren und somit für die T-Zellen erkenntlich zu machen [Stadler et al., 1995]. Wichtiger für den Verlauf des septischen Schocks ist, daß diese stimulierten Makrophagen und T-Zellen Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6 als zelluläre Signale freisetzen [Nathan et al., 1991]. Die Anwesenheit dieser Zytokine ist der hauptsächliche Initiator der intravasalen Aktivierung weiterer Entzündungssysteme.

Die meisten Mediatoren haben direkte Auswirkungen auf das Endothel. TNF- α [Stephens et al., 1988] und PAF [Ibbotson et al., 1989] erhöhen die Gefäßpermeabilität. Auch für IL-1 scheint das Endothel ein primärer Zielort zu sein [Jacobs et al., 1989]. Reaktionen des Endothels sind: Freisetzung von Mediatoren [Zuckerman et al., 1989; Lefer et al., 1989; Utsumi et al. 1990], u.a. auch NO und Endothelin-1. NO relaxiert die glatten Muskelzellen

[Ignarro and Kadowitz, 1985] und verhindert die Plättchenaggregation [Mellion et al. 1981].

Endothelin-1 ist ein potenter Vasokonstriktor [Miyauchi et al., 1990].

Neutrophile Granulozyten können von den meisten Mediatoren direkt aktiviert werden. Diese schädigen durch ihre Einwanderung und Degranulation (freie Sauerstoffradikale, Elastase) wiederum Endothel, Gewebe und Organe [Jacobs et al., 1989; Frank et al., 1987].

Es kommt zu einer Permeabilitätsstörung im Endothel, was zum Verlust von Flüssigkeit, also zur Steigerung des Hämatokrit führt. Darauf reagiert der Körper mit einer Ausschüttung von Katecholaminen, welche eine Vasokonstriktion in der Peripherie herbeiführen. In diesem Stadium der Zentralisation soll die Durchblutung der lebenswichtigen Organe (v.a. Herz, Lunge, Gehirn, Darm) gesichert werden. Dies geht einher mit einer Steigerung des Blutdrucks und der Herzfrequenz.

Zunächst kommt es durch Mediatoren zur Aktivierung des Endothels, im weiteren Verlauf können zytotoxische Mediatoren wie z.B. Proteasen das vaskuläre Endothel irreversibel schädigen. Freigesetztes NO bewirkt eine Vasodilatation und das geschädigte Endothel wird durchlässig. Blutplasma tritt aus, der Blutdruck fällt [Bone et al., 1991]. Organgewebe kann durch die vorhergehende Hypoxie soweit geschädigt werden, daß die Reaktionsfähigkeit der glatten Gefäßmuskulatur auf Katecholamine abnimmt [Pohlenz und Sandersleben, 1990]. In einigen Studien wurde festgestellt, daß der Abfall des peripheren Gefäßtonus durch Toxin- und Mediatorwirkungen (finaler Effektor NO) 1-1,5 Stunden nach Toxinfreisetzung eintritt [Goldfarb et al., 1986; Ridings et al., 1995].

Diesen Zustand der Dezentralisation versucht der Körper durch Steigerung der Herzfrequenz und des Schlagvolumens auszugleichen (hyperdynamische Antwort). Wegen der multifaktoriellen Herzschiidigung (s.u., septische Kardiomyopathie) kann diese Steigerung der Herzaktivität die gestörte Gewebepfusion nicht kompensieren [Parillo et al., 1989; Werdan et al., 1991]. Die Myokarddepression wird erklart durch Desensibilisierung der Myozyten gegen Katecholamine. Die α -Adrenorezeptoren werden reduziert und die inhibitorischen G-Proteine an der inneren Zellmembran nehmen zu [Böhm et al., 1989; Reithmann et al., 1992; Reithmann et al., 1993]. TNF- α kann die beschriebene Reaktion direkt hervorrufen [Reithmann et al., 1994]. In früheren Studien hat man festgestellt, daß im Serum septischer Patienten eine Substanz ist, die myokarddepressiv wirkt und sie „myocardial depressant factor“ genannt. Später konnte gezeigt werden, daß TNF- α und IL-1 die myokarddepressiven Substanzen im septischen Serum sind [Kumar et al., 1996]. Einzelne Exotoxine wie z.B. α -Toxin können ebenfalls direkt myokarddepressiv wirken [Sibeliu et al., 2000].

Die allgemeine Vasodilatation zieht ein Versacken des Blutes im peripheren Kapillarbett nach sich. Es kommt zur Leukozytenanhäufung, Thrombenbildung und disseminierten intravasalen Gerinnung. Die Sauerstoffversorgung des Gewebes ist nicht mehr gewährleistet. Sauerstoffunterversorgung und Schäden durch Mediatoren und Toxin bewirken eine Desintegration der Endothelzellen, die Gefäßpermeabilität steigt und es kommt zur weiteren Extravasation von Plasma.

Infolge der gesteigerten Gefäßpermeabilität entsteht in der Lunge ein interstitielles Ödem, das zusammen mit der disseminierten intravasalen Gerinnung zu einem Anstieg des Gesamtströmungswiderstandes in der Lunge führt [Sibbald *et al.*, 1983; Dhainaud *et al.*, 1988]. Dadurch wird der Gasaustausch in der Lunge reduziert. Meßbar ist das an einem reduzierten arteriellen Sauerstoffpartialdruck. Das klinisch korrelierende Bild dieser Lungenaffektion ist die Schocklunge, auch als "adult respiratory distress syndrome" (ARDS) bezeichnet.

Mit Nachlassen der Herzkraft und dem Versagen der zentralen Regulationsmechanismen wird das Geschehen für den Körper irreversibel, der Tod tritt ohne Eingreifen von außen unweigerlich ein (Dekompensation).

2.1.3.1. Mediatoren

IL-1 und TNF- α sind als bedeutendste endogene proinflammatorische Zytokine schon im Bereich von picomolaren Konzentrationen biologisch wirksam. TNF- α wird vorwiegend von Zellen der Monozyten-/Makrophagen-Zelllinie gebildet. Es löst bei Kontakt mit seinen Rezeptoren, die sich auf der Oberfläche aller Zellen außer der Erythrozyten befinden, eine intrazelluläre Signaltransduktion mit Aktivierung der Phospholipase A2 und von Proteinkinasen aus. Dies wiederum führt zur Freisetzung der second messenger, welche die biologischen Wirkungen von TNF- α vermitteln. Diese biologischen Effekte von TNF- α sind bei jeder Infektion klinisch zu beobachten und konnten durch die isolierte Applikation von TNF- α in verschiedenen Studien nachvollzogen werden [Natanson, 1989]. Schock, ARDS, Fieber, Anorexie, Stresshormon-Freisetzung, Induktion der Akute-Phase-Proteine, gesteigerter Zellmetabolismus, Insulin-Resistenz und erhöhte Zytotoxizität der Leukozyten sind Reaktionen auf TNF- α . Viele Effekte von TNF- α werden auch über die sekundär freigesetzten Mediatoren (z.B. IL-1, IL-6, PAF, LT) vermittelt. Nach einer LPS-Exposition erreicht die TNF- α -Liberation innerhalb von 1,5 bis 2 Stunden ihr Maximum, fällt danach ebenso rasch wieder ab und ist nach 4 Stunden fast nicht mehr nachzuweisen [Hesse, 1988; Michie, 1988]. Die biologische Halbwertszeit von TNF- α liegt bei etwa 15 Minuten.

TNF- α und IL-1 wirken myokarddepressiv, dabei potenziert sich die Wirkung bei gleichzeitiger Anflutung an die Myokardzelle [Kumar, 1996].

IL-1 gleicht in seinen Effekten weitgehend TNF- α . Nach intravenösen Applikationen bei Krebspatienten konnten folgende Symptome provoziert werden: Fieber, Müdigkeit, Anorexie, generalisierte Muskel- und Gelenkschmerzen, Kopfschmerzen, Neutropenie und Thrombozytopenie sowie bei höherer Dosierung ein dramatischer Abfall des Blutdruckes [Smith, 1992]. Während der Peak von TNF- α im Plasma bei 1,5 bis 2 Stunden liegt, erreicht IL-1 seinen Maximalwert nach etwa 3 Stunden [Wakabayashi, 1991] und wird in erster Linie von monozytären Zellen, aber auch von Fibroblasten, Endothelzellen, Granulozyten und einigen anderen Zellen der lokalen und systemischen Abwehrsysteme gebildet.

IL-6 besitzt zwar nicht die kreislaufwirksame Potenz wie IL-1 und TNF- α , es gehört aber dennoch zu den proinflammatorischen Zytokinen. IL-6 wird v.a. von monozytären Makrophagen und im weiteren Verlauf der Sepsis auch von T-Zellen freigesetzt. Maximalwerte werden in der Regel etwa sechs Stunden nach einem Entzündungsreiz gemessen und die Höhe des Anstiegs ist mit dem fatalen Ausgang einer Sepsis positiv korreliert [Fisher, 1993].

Für nahezu alle entzündungsfördernden Zytokine wurde ein positiver Feedback Mechanismus beschrieben, so daß sich in Folge einer massiven Stimulierung des Systems, beispielsweise durch Exotoxin, eine Zytokinkaskade entwickelt. Das biologische System aus inflammatorischen Zytokinen hat sich aber im Verlaufe der Evolution auch eigene Gegenregulatoren geschaffen. Dazu gehören die antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-10, IL-13 und auch Wirkstoffe direkt gegen eine zu hohe Konzentration der proinflammatorischen Zytokine [Klosterhalfen, 1998]. Zu diesen gehören einerseits lösliche Rezeptoren von IL-1 und TNF- α , welche auf eine übermäßige Stimulierung der Zielzellen hin abgestoßen werden und im Kreislauf zirkulieren. Ein anderer Weg ist die Freisetzung von Antagonisten auf einen anhaltend hohen Reiz hin, wie dies beim Interleukin-1 Rezeptorantagonisten (IL-1ra) beschrieben ist.

Die endogenen Mediatoren stimulieren rezeptortragende Zellen und Organe, was zu den sekundären und klinisch relevanten Reaktionen führt.

Die Wirkungen von einigen Mediatoren werden im Folgenden kurz zusammengefasst [nach Bone et al., 1991]:

- TNF- α :
- stimuliert Freisetzung von IL-1, IL-6, IL-8, PAF, LT, PG
 - induziert gesteigerte Produktion von Adhäsionsmolekülen (Endothelzellen, PMN, Lymphozyten, eosinophile und basophile Granulozyten)
 - Aktivierung des Komplementsystems auf klassischem Weg und des Gerinnungssystems
 - direkt toxisch für Endothelzellen (Permeabilitätssteigerung)
 - hauptsächlich betroffene Organe: Niere, Lunge, Leber
 - senkt transmembrane Potentiale von Muskelzellen (myokarddepressiv)
 - direkte Wirkung auf Hypothalamus (Fieber)
- IL-1:
- stimuliert Freisetzung von TNF- α , IL-6, IL-8, PAF, LT, TXA₂, PG und eigene Produktion
 - aktiviert T-Zellen und unterstützt die Entwicklung der B-Zellen
 - induziert gesteigerte Produktion von Adhäsionsmolekülen (Endothelzellen, PMN, Lymphozyten, eosinophile und basophile Granulozyten)
 - PMN-Aktivierung und –Akkumulation

- verstärkt die Wirkung von TNF- α
 - direkte Wirkung auf den Hypothalamus (Fieber)
- IL-6:
- Helfer für T- und B-Zell-Aktivierung
 - unterstützt PMN-Aktivierung und –Akkumulation

2.1.4. Zytotoxische Wirkung von α -Toxin

α -Toxin ist ein Exotoxin von *Staphylococcus aureus*. Es wurde entdeckt nachdem 1928 in Bundaberg (Australien) 12 Kinder nach einer Diphtherieimpfung mit einem Toxoidimpfstoff, in dessen Präparation *Staphylococcus aureus* war, gestorben waren [Burnet, 1929].

Es ist ein hydrophiles Protein mit einem Gewicht von 34000 g/mol, das neben seiner antigenen Eigenschaft auch direkt zytotoxisch durch Bildung von Poren in der Zellmembran wirkt [Füssle et al., 1981]. Die zytotoxische Zellattacke durch α -Toxin verläuft je nach Zellart nach zwei verschiedenen Mechanismen. Bei manchen Zellen, z.B. Kaninchenerythrozyten, sind spezifische Bindungsstellen involviert, so daß schon relativ geringe Toxinkonzentrationen (1-2 nM) deutliche Schäden hervorrufen. An andere Zellen, z.B. humane Erythrozyten, bindet das Toxin absorptiv und nicht spezifisch, so daß Schädigungen, in diesem Fall Hämolyse, erst bei höheren Toxinkonzentrationen (1 μ M) manifest werden. α -Toxin attackiert also eigentlich alle Säugerzellen, jedoch mit großer Variabilität in der Effizienz [Hildebrand et al., 1991].

Die Toxinmonomere binden an Zellmembranen und schließen sich dort durch laterale Diffusion zu Hexameren zusammen [Reichwein et al., 1987]. Im Elektronenmikroskop zeigen sich die Hexamere als dickwellige Zylinder, die 4 nm hoch sind, 10 nm Durchmesser haben und eine zentrale Pore mit 1-2 nm Durchmesser aufweisen [Füssle et al., 1981]. Bei diesen Poren handelt es sich um wassergefüllte Kanäle [Belmonte et al., 1987], die nicht-selektiv Ionen und kleinere Moleküle (Molekulargewicht von 1000 bis 4000) passieren lassen.

Der Zelltod erfolgt durch den schnellen Verlust von lebenswichtigen Molekülen wie z.B. ATP und durch Veränderung des intrazellulären Milieus nach Wassereinstrom. Bei Erythrozyten ist die Zellschwellung so stark, daß die Membran dem Druck nicht standhalten kann und reißt (Hämolyse). Kernhaltige Zellen und Plättchen können nicht bis zur Lyse anschwellen, da ihr Gehalt an zytoplasmatischen Makromolekülen geringer ist [Bhakdi et al., 1988 und 1989c]. Diese Zellen sterben also einen langsameren Tod. Somit gewinnen sekundäre zelluläre Reaktionen, hervorgerufen durch die Porenbildung, an Bedeutung [Bhakdi und Trantum-Jensen, 1991].

Kalziumionen diffundieren sehr schnell entlang dem Konzentrationsgradienten durch die geschädigte Membran in die Zellen und sind wohl die wichtigsten Trigger für sekundäre Reaktionen. Ca^{2+} reguliert viele von Ca^{2+} abhängige Enzyme, wie z.B. die Adenylatcyclase, die Phospholipase A2 und die Phospholipase C. Außerdem ist es beteiligt an der Muskelkontraktion und an Sekretionsvorgängen. Es ist weiterhin Bestandteil intrazellulärer Signalwege sowie der Zelladhäsion und -motilität [Johnson and Chang 2000]. Da viele zytoplasmatische Proteine nicht durch die Poren austreten können, bleiben diverse zelluläre Prozesse intakt.

Kommt es zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, so wird u.a. die Kontraktionen der glatten Muskulatur der Widerstandsgefäße (Hypertonie), Entwicklung von Nekrosezonen im Myokard, Bildung aktiver Sauerstoffmetaboliten in den Leukozyten und Aggregation der Thrombozyten vermittelt [Borchard 1995].

2.2. Endothelzellen, Granulozyten, Thrombozyten und deren Interaktionen

2.2.1. Endothelzellen

Die Endothelzellen kleiden als polarisierte einschichtige Zellschicht Gefäße und Kapillaren aus. Ihre abluminale Seite steht über die extrazelluläre Matrix mit der Lamina elastica interna des Gefäßes in Verbindung. Die luminalen Seite ist dem Blut zugewandt. Das Endothel greift in viele Vorgänge, wie z.B. den Aufbau eines Gefäßtonus, die Koagulation oder die Invasion von Leukozyten ins Gewebe, regulatorisch ein.

Sein Beitrag zur Leukozyteninfiltration ist die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen aus der Gruppe der Selektine (z.B. P-Selektin) und der Immunglobulinsuperfamilie (z.B. ICAM-1) [Malik and Wang, 1991].

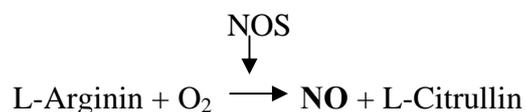
Zur Regulation des Gefäßtonus bildet das Endothel vasokonstriktorische Substanzen wie das Endothelin-1 sowie vasodilatatorische Substanzen wie das PGI₂ und das NO (Stickoxid, nitric oxide, endothelium derived relaxing factor) [Brenner et al., 1989].

2.2.1.1. NO Synthesen

NO wird in verschiedenen Geweben von unterschiedlichen NO Synthasen produziert. Die wichtigsten Enzyme in Säugerzellen sind nNOS (NOS I, neuronale NOS), eNOS (NOS III, constitutive oder endotheliale NOS) und iNOS (NOS II, induzierbare NOS).

Sie bilden NO nach dem selben Prinzip, unterscheiden sich jedoch in der Gewebeexpression und in ihrer Abhängigkeit von intrazellulärem Ca²⁺ sowie der Menge an produziertem NO [Förstermann et al., 1995].

Die NO Synthasen katalysieren folgende Reaktion [Palmer et al., 1988]:



NO aktiviert die Guanylatzyklase [Ignarro, 1991], die GTP in cGMP umwandelt. Über erhöhte intrazelluläre cGMP-Spiegel wird eine Vasorelaxation [Ignarro und Kadowitz, 1985], eine Hemmung der Plättchenaggregation [Mellion et al., 1981] und der Leukozytenadhäsion [Lindemann et al., 2000] vermittelt. NO-Radikale können O_2^- binden und es somit inaktivieren. Höhere Konzentrationen des Radikals können Bakterien, Parasiten und Tumorzellen zerstören [Förstermann, 1995].

Die Auswirkungen des NO treten meist schon nach weniger als 5 Sekunden ein und sind von sehr kurzer Dauer [Gruetter et al., 1981; Ignarro et al., 1981]. NO hat ein sehr geringes Molekulargewicht und ist stark lipophil, so daß es leicht durch die Zellmembran eindringen kann. Da es sehr kurzlebig ist, erreicht es nur die unmittelbar benachbarten Zellen.

In der Sepsis schreibt man NO durch die vasorelaxierende Wirkung eine wichtige Beteiligung bei der Entstehung der Hypotension zu [Shan und Bourreau, 2000; Strunk et al., 2001]. α -Toxin steigert die NO-Produktion in den Endothelzellen [Suttorp et al., 1993; Grandel et al., 2001]. Die Hemmung der Leukozytenakkumulation durch NO hat bei der Sepsis gewebeprotectiven Charakter [Lelamali et al., 2001].

nNOS

Die nNOS liegt konstitutiv in verschiedenen Zelltypen wie Neuronen, Skelettmuskelzellen, Lungenepithel u.a. vor. Sie hat ein Molekulargewicht von 155 kDa und ist, ähnlich wie die eNOS, ein Ca^{2+} - und calmodulinabhängiges Enzym [Förstermann et al., 1995].

eNOS

Die eNOS liegt konstitutiv in Endothelzellen, einigen Neuronen und Herzmuskelzellen vor. Sie hat ein Molekulargewicht von 135 kDa. In ruhenden Zellen ist die eNOS gebunden an Caveolin und an die Zellmembran [Pollock et al., 1992, Robinson et al., 1995]. Die Interaktionen mit Caveolin inhibieren ihre Aktivität. Die Expression von eNOS wird u.a. durch „shear stress“ gesteigert und durch TNF- α verringert [Försterman et al., 1995].

Steigt intrazellulär Ca^{2+} an, so bewirkt dieses zusammen mit Calmodulin eine Trennung des Caveolin-eNOS-Komplexes und aktiviert somit die eNOS [Förstermann et al., 1991, Pollock et al., 1991]. Die Bindungen an die Zellmembran werden aufgelöst. Es findet eine Translokation der eNOS ins Zytoplasma statt. Aufgrund noch nicht vollständig verstandener Mechanismen kehrt die eNOS wieder zur Membran zurück und bindet an Caveolin.

Die eNOS produziert also kontinuierlich geringe Mengen von NO.

iNOS

Die iNOS befindet sich in Makrophagen, aber auch in vielen anderen Zellen wie z.B. Endothelzellen [Bandaletova et al., 1993]. Sie hat ein Molekulargewicht von 125 bis 135 kDa. In der ruhenden Zelle ist keine iNOS vorhanden, erst eine Aktivierung bewirkt deren Translation. Es konnte gezeigt werden, daß Zytokine (TNF- α und IL-1) sowie mikrobielle Produkte (LPS) eine Induktion der iNOS bewirken [Förstermann et al., 1995].

Die iNOS bindet Calmodulin auch ohne erhöhte Ca²⁺-Spiegel, so daß sie direkt nach der Synthese aktiv ist [Lyons et al., 1992]. Auch Membranpräferenzen sind nicht vorhanden. Die iNOS liegt sowohl zytosolisch als auch in Membrannähe vor [Förstermann et al., 1995].

Aufgrund dieser Unterschiede produziert die iNOS im Vergleich zur eNOS größere Mengen von NO über längere Zeiträume.

2.2.2. Granulozyten

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) werden durch viele Mediatoren, u.a. auch durch α -Toxin und LPS, über CD-14-Rezeptoren aktiviert. Zu den humoralen Stimuli der Neutrophilen gehören nahezu alle in den pathophysiologischen Mechanismus der Entzündung involvierten Mediatoren wie z.B. die Chemotaxine C3a, C5a und Leukotrien B₄, Opsonine und Immunglobuline (Fc-Region), Kinine, die Zytokine IL-1 und TNF- α sowie die Wachstumsfaktoren GM-CSF und G-CSF [Bone, 1991, Roitt, 1991]. Diese lösen bei PMN die Expression verschiedener Rezeptoren, die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen (CD11/CD18-Komplex), die Steigerung der Phagozytoserate sowie die Bildung und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (respiratory burst) und proteolytischen Enzymen (Degranulation) aus. In den primären (azurophilen) Granula (Lysosomen) befinden sich saure Hydrolasen, Myeloperoxidase und Muraminidase (Lysozym), während die sekundären oder spezifischen Granula zusätzlich zum Lysozym Lactoferrin enthalten [Gallin, 1989].

Der aktive Eingriff der Neutrophilen in das Immunsystem besteht in der Ausschüttung von Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α), Wachstumsfaktoren (G- und M-CSF) und anderer Mediatoren (Leukotrien B₄).

Einmal aktiviert, tragen sie durch Freisetzung von zellschädigenden Mediatoren (z.B. TNF- α , IL-1 β), freien Sauerstoffradikalen (OH⁻), Lipiden und proteolytischen Enzymen (z.B. Elastase) für einen wesentlichen Teil des Reperfusionsschadens die Verantwortung. Zusammen mit Antikörpern und Komplement helfen sie üblicherweise bei der akuten

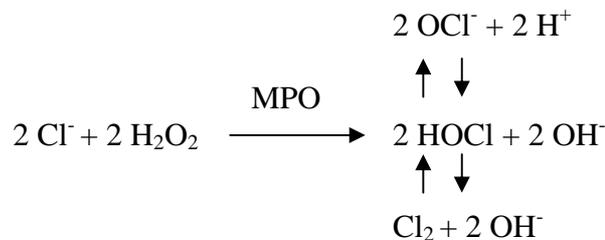
Entzündung und bei der unspezifischen Abwehr von Mikroorganismen. Eine wichtige Aufgabe der polymorphkernigen Granulozyten ist die Phagozytose.

Myeloperoxidase

Die Myeloperoxidase (MPO) ist in der azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten lokalisiert, aber auch in wesentlich geringeren Mengen in Monozyten, anderen Makrophagen und eosinophilen Granulozyten zu finden. Die primäre Funktion der MPO ist die Beteiligung am bakteriziden System im Phagosom.

Phagozyten antworten auf Stimulation mit einem sehr starken Sauerstoffkonsum („oxidative burst“). Überschüssiger Sauerstoff wird erst zu Superoxidanionen (O_2^-) und dann in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt.

Die MPO katalysiert nun u.a. bei Anwesenheit von Chloridionen folgende Reaktion:



Die primären Produkte der Chloridoxidation (HOCl , OCl^- , Cl_2) sind noch stärkere Oxidantien als H_2O_2 und sind maßgebend für die Toxizität des MPO-Systems [Klebanoff, 1999].

In vielen Studien konnte gezeigt werden, daß PMNs durch α -Toxin aktiviert werden, so daß bei einem α -Toxin-induzierten SIRS mit einer vermehrten PMN-Infiltration in die Gewebe zu rechnen ist [Grandel et al., 2002; Suttorp und Habben, 1988a]. Folge davon ist, daß in diesen Geweben auch vermehrt Oxidantien frei werden. Neben der wichtigen Aufgabe der Bakterienbekämpfung schädigen diese Oxidantien natürlich auch die eukariotischen Zellen, was bei einer überschießenden Reaktion zu massiven Organschäden führen kann [Klebanoff, 1999].

2.2.3. Interaktionen zwischen Granulozyten und Endothelzellen

2.2.3.1. Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle vermitteln die Adhärenz von Blutzellen (Leukozyten, Thrombozyten) an das Endothel. Es gibt drei große Familien: Die Integrine, die Selektine und die Immunglobulinsuperfamilie [Malik and Wang, 1991; Lefer et al., 1994].

Selektine

Selektine sind Glycoproteine von sehr ähnlicher chemischer Struktur mit einem Molekulargewicht von 90-140 kDa. Zu dieser Gruppe gehören das P-Selektin, das E-Selektin und das L-Selektin. Die bezeichnenden Buchstaben sind wahrscheinlich ausgewählt worden nach dem Ort der ersten Entdeckung (P für Plättchen, E für Endothelium und L für Lymphozyten), sagen jedoch nicht aus, daß die Selektine nur auf diesen Zelltypen auftreten [Bevilacqua et al., 1991]. Selektine erkennen sialyl-haltige Glykane, die an komplexere Strukturen auf den Zielzellen gebunden sind. E- und P-Selektin binden an gereinigte Zucker wie Sialyl-Lewis^x (s-Le^x), Sialyl-Lewis^a, an Glykolipide und Glykoproteine [Varki, 1992].

E-Selektin ist in Endothelzellen nicht konstitutiv vorhanden, es wird nach einer Aktivierung innerhalb von 6 Stunden neu synthetisiert. Interaktionen zwischen Endothelzellen und PMN, Monozyten sowie einigen Lymphozyten werden durch das E-Selektin vermittelt. Das L-Selektin befindet sich konstitutiv auf PMNs, Monozyten und Lymphozyten und bindet an konstitutive und induzierbare Endothelzelliganden. Es wird bei Aktivierung sehr schnell auf die Zelloberfläche transloziert [Malik and Wang, 1991].

P-Selektin ist konstitutiv in Thrombozyten und Endothelzellen vorhanden. In Endothelzellen befindet es sich in den Weibel-Palade-Körperchen, in den Thrombozyten in der α -Granula und kann in 10-20 Minuten auf die Zelloberfläche transloziert werden. P-Selektin vermittelt Interaktionen mit PMN, Monozyten und einigen Lymphozyten. Die Aktivierung wird über den Nuklearfaktor κ B (NF- κ B) vermittelt [Armstead et al., 1997].

P-Selektin wird in aktivierten Endothelzellen immer mit PAF (Plättchen-aktivierender Faktor) coexprimiert, welches die Granulozyten bei Kontakt aktiviert und so zur Aktivierung von CD11/CD18 führt [Lorant et al., 1993].

Integrine

Integrine sind heterodimere Glykoproteine. Eine Gruppe der Integrine, die β 2-Integrine, besteht aus unterschiedlichen α -Ketten wie CD11a (LFA-1) oder CD11b (MAC-1). Jede dieser α -Ketten besitzt die gleiche β -Kette, nämlich CD18. Der CD11a/CD18-Komplex befindet sich auf allen Leukozyten, CD11b/CD18 vorwiegend auf Neutrophilen und Monozyten, CD11c/CD18 auf Granulozyten und Monozyten. Während CD11a/CD18 und CD11b/CD18 an immunglobulinartige Liganden (ICAM-1/2) koppeln, bindet CD11c/CD18 vorwiegend an den Komplementfaktor C3b [Malik and Wang, 1991].

Immunglobulinsuperfamilie

Mitglieder dieser Familie sind ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1; „intercellular adhesion molecule-1“; CD54) und ICAM-2. Sie binden an andere Proteine der Ig-Superfamilie, Selektine und Integrine, besonders CD18-Integrine und sind bedeutend für die Adhäsion und Migration von Leukozyten [Malik and Wang, 1991].

ICAM-1 ist auch auf nicht aktivierten Endothelzellen und Monozyten in geringen Mengen vorhanden. Seine Produktion wird über Zytokine (TNF- α , IL-1) oder bakterielle Endotoxine induziert [Okada, 1997]. Nach ca. 4 Stunden beginnt die Oberflächenexpression und ist nach 24 Stunden am Maximum, das bis zur 48. Stunde gehalten wird [Pober und Cotran, 1991].

2.2.3.2. Eintritt der Leukozyten ins Gewebe

Das Eindringen von Leukozyten in das entzündete Gewebe läuft nach einem bestimmten über Adhäsionsmoleküle vermittelten Schema ab.

Erste Phase ist das Rolling: Die Leukozyten „rollen“ mit um 80-90% verminderter Geschwindigkeit an der Gefäßwand entlang. Später erfolgt die Adhäsion, d.h. die Leukozyten sind fest an einer Stelle der Gefäßwand angeheftet. Sie beginnen, sich zwischen den Endothelzellen hindurchzudrängen, die sogenannte Migration oder Diapedese. Von Chemotaxinen angelockt wandern sie nun durch das Gewebe zum Bestimmungsort, um dort im Fall der PMN phagozytotisch tätig zu werden.

Das **Rolling** wird vorwiegend über Moleküle der Selektinfamilie vermittelt [Ley and Tedder 1995]. Das schnell mobilisierbare (10 bis 20 Minuten) P-Selektin vermittelt das Rolling im frühen Entzündungsstadium. E-Selektin, das auf dem Transkriptionsweg produziert werden muß, kommt später hinzu (bei Stimulation durch Zytokine nach 4-6 Stunden). Beide binden bei PMN an die s-Le^x-Komponente des L-Selektin [Hogg, 1992]. L-Selektin findet sich konstitutiv auf den meisten zirkulierenden Leukozyten. Auch Integrine können Rolling

vermitteln, z.B. in Verbindung mit VCAM. ICAM allein kann kein Rolling hervorrufen [Ley and Tedder, 1995].

Für die feste Anheftung (**Adhäsion**) der Leukozyten ans Endothel müssen auch diese aktiviert sein. Aktivierung der PMN mit Mediatoren, Thrombin oder Komplementfaktoren führt zu L-Selektin-Shedding, der Translokation von $\beta 2$ -Integrinen (CD11a/CD18, CD11b/CD18 und CD11c/CD18) aus den subzellulären Granula und somit einer Steigerung der Membranaktivität [Malik and Wang, 1991]. PAF, das mit P-Selektin coexprimiert [Lorant et al., 1993], sowie aktivierte Thrombozyten [Mc Ever, 1991; Ruf, 1992] können ebenfalls eine PMN-Aktivierung auslösen.

Bei der Adhäsion treten meist Integrine mit Mitgliedern der Ig-Superfamilie in Kontakt, so z.B. ICAM-1 mit CD11a/CD18, CD11b/CD18 und CD11c/CD18 auf den Leukozyten [Malik and Wang, 1991].

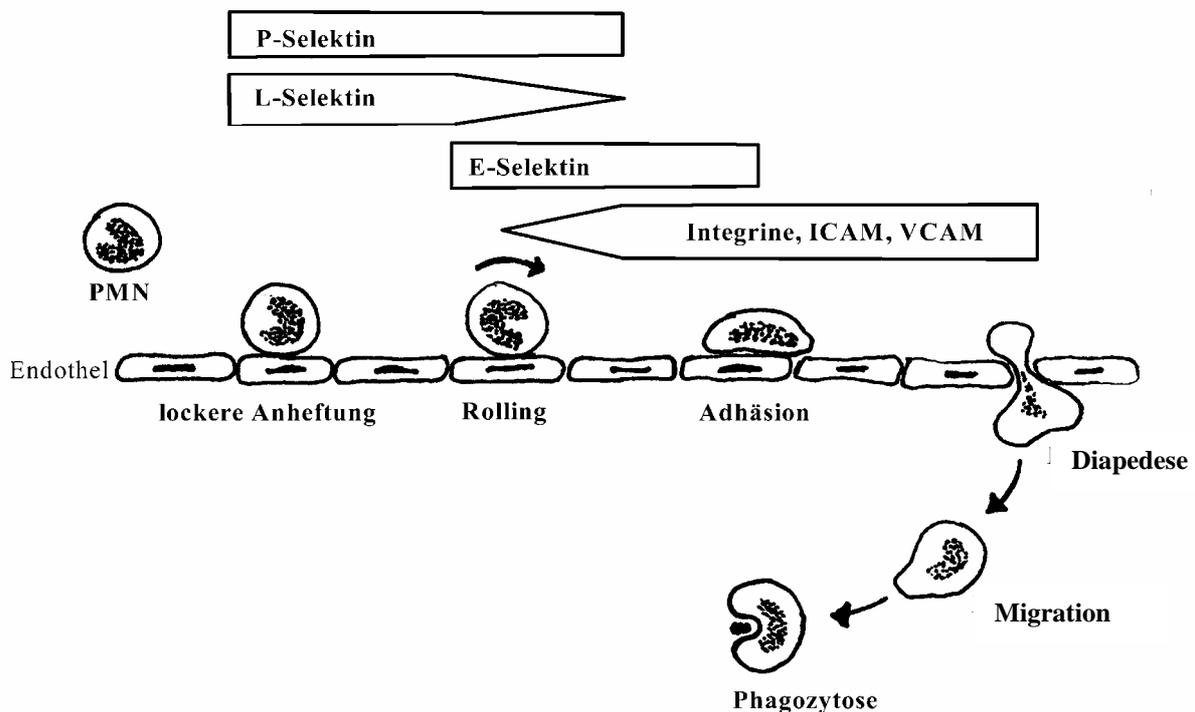


Abb. 1: Beteiligung der verschiedenen Adhäsionsmoleküle an lockerer Anheftung, Rolling und Adhäsion von Leukozyten (modifiziert nach Ley und Tedder, 1995)

Die **Diapedese**, also die Migration weißer Blutzellen durch unverletzte Gefäßwand, wird über PECAM-1 vermittelt. Entlang des Mediatorenkonzentrationsgefälles wandern die Leukozyten zum Entzündungsort (**Chemotaxis**). Neben bakteriellen Bestandteilen und von phagozytierenden Zellen freigesetzten Faktoren wie LTB₄, Prostazyklin und IL-8 sind die Komplementfaktoren C3a und C5a die Hauptquellen der chemotaktischen Aktivitäten.

Der Kontakt zwischen der Zellmembran des Phagozyten (Histiozyten, Makrophagen, PMN) und des zu phagozytierenden Partikels löst die **Phagozytose** aus. Pseudopodien (Zellmembranausstülpungen) schieben sich um das Partikel und verschmelzen an den Enden zur phagozytischen Vakuole. Dieses Phagosom verschmilzt mit dem Lysosom zum Phagolysosom in dem das Partikel verdaut wird. Es kommt zu einer explosionsartigen Zunahme des oxidativen Stoffwechsels im Phagozyten („respiratory burst“), wobei Sauerstoff zu Wasser reduziert wird. Ein Teil des Sauerstoffs wird nur partiell reduziert. Es entstehen aggressive Radikale, die bei der Abtötung von Bakterien eine Rolle spielen, aber auch Schädigungen im Wirtsgewebe hervorrufen können.

Aktivierete PMN setzen Mediatoren frei, die weitere PMN und Thrombozyten anlocken. Außerdem setzen sie aggressive Wirkstoffe (Elastase, Kollagenase, O₂-Radikale) frei, die direkte Gewebsschädigungen bewirken können. Herzmuskelzellen können ICAM-1 exprimieren, was eine Adhärenz der PMN und somit eine direkte Myokardschädigung möglich macht [Entmann, 1992].

Bei einer α -Toxin-induzierten SIRS ist zu erwarten, daß es zu einer Aktivierung von PMN und Endothel kommt. Es migrieren also viele PMN in alle Gewebe, die unweigerlich infolge des „respiratory burst“ große Schäden anrichten und somit nicht unwesentlich zum Multiorganversagen beitragen [Klebanoff, 1999]. In etlichen Studien konnte in vitro gezeigt werden, daß α -Toxin eine gesteigerte Adhärenz von PMN an Endothelzellen bewirkt und im Endothel selbst ein vermehrtes P-Selektin-Shedding hervorruft [Buerke et al., 2002; Krull et al., 1996]. Der Einsatz von Antikörpern gegen P-Selektin reduziert die Gefäßschäden deutlich [Buerke et al., 2002]. Es gibt auch Studien, die einen Anstieg der ICAM-Expression durch α -Toxin beschreiben [Grandel et al., 2002].

2.2.4. Thrombozyten

2.2.4.1. Morphologie

Thrombozyten (Blutplättchen) sind kernlose, diskoide Zytoplasmaabschnürungen von Megakariozyten. Sie haben einem Durchmesser von 2 bis 4 μm . Die Außenseite ihrer Zellmembran ist mit einer 20-50 nm dicken Schicht amorphen Materials (Glycocalix, v.a. aus Glykoproteinen bestehend) besetzt. Im Randbereich befinden sich Mikrotubuli umgeben von einem Netzwerk aus verschiedenen Strukturproteinen (Zytoskelett).

Im zentralen Granulomer des Thrombozyten sind drei Arten von Granula: α -Granula, δ -Granula (dichte Granula) und χ -Granula (primäre Lysosomen). In den α -Granula befinden sich Gerinnungsfaktoren (Fibrinogen, Faktor V, Faktor VII, Von-Willebrand-Faktor), plättchenspezifische Proteine (Plättchenfaktor 4, PDGF, β -Thromboglobulin). Die dichten Granula enthalten Ca^{2+} , ATP, ADP, Serotonin und Katecholamine, welche eine positive Rückkopplung in der Thrombozytenaggregation bewirken indem sie neue Plättchen aktivieren. In den primären Lysosomen sind unter anderem saure Hydrolasen und Phosphatasen, Phospholipase A2 sowie heparinabbauende Enzyme vorhanden [Gawaz, 1999; Meyers et al., 1982].

2.2.4.2. Thrombozytenaggregation

Die Adhäsion der Thrombozyten erfolgt über Glycoproteine (GP), die überwiegend der Integrinfamilie angehören und an extrazelluläre Matrixbestandteile nach Zerstörung des Endothels (wobei auch die Aggregationshemmung durch NO und Prostazyklin aus den Endothelzellen wegfällt) binden, sowie an Zellen des strömenden Blutes. So bindet z.B. der Rezeptor GPIa/IIa an Kollagen und GPIc/IIa an Fibronectin [Darius und Grosser, 1998]. Der einzige Rezeptor, der Thrombozyten direkt miteinander verbindet ist GPIIb/IIIa [Jennings und Phillips, 1982]. Plättchen werden durch diesen Rezeptor über Fibrinogenbrücken verbunden, zu zellulären und subendothelialen Strukturen stellt er Verbindungen über den Von-Willebrand-Faktor, Fibronectin und Vitronectin her. Der GPIIb/IIIa weist 4 extrazelluläre Bindungsmotive für divalente Kationen (Ca^{2+}) auf, die für die Ligandenbindung bedeutsam sind [Phillips et al., 1988]. Pro Thrombozyt findet man ca. 80000 dieser Rezeptoren [Wagner et al., 1996], ein kleinerer Teil ist in der α -Granula und im exkretorischen Kanalsystem.

GPIIb/IIIa bindet seine Liganden nicht immer mit gleicher Affinität. Voraussetzung für eine hochaffine Ligandenbindung ist die Aktivierung der Thrombozyten, z.B. mit Thrombin,

TXA₂ oder ADP. Über eine Kaskade intrazellulärer Signale („inside-out signaling“) kommt es zur Konformationsänderung des GPIIb/IIIa-Rezeptors in die hochaffine Form. Die Ligandenbindung der Integrinrezeptoren stehen am Anfang des Adhäsions- und Aggregationsprozesses. Die Adhäsion eines Thrombozyten führt zur Ausbreitung der sonst discoiden Zelle durch nach innen gerichtete Signaltransduktion der Integrinrezeptoren („outside-in signaling“) [Darius und Grosser, 1998].

Die Anlagerung der Thrombozyten ist zunächst reversibel (**Adhäsion**), dann kommt es zur Ausbildung von Pseudopodien und zur **Degranulation** der Thrombozyten. Ihre Verbindung wird irreversibel (**Aggregation**), da sie unter Membranauflösung miteinander verschmelzen („visköse Metamorphose“).

Bei einer SIRS, hervorgerufen durch α -Toxin, werden die Thrombozyten einerseits direkt durch das Toxin aktiviert [Bhakdi et al., 1988]. Zusätzlich kommt es im Zuge des Schockgeschehens durch die im Blut zirkulierenden Mediatoren zu Gerinnungsprozessen der sogenannten disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC). Die Perfusion der terminalen Strombahn wird durch die entstehenden Blutkoagel noch schlechter, was zu weiteren ischämischen Organschäden und zu einer Verbrauchskoagulopathie führt [Pohlenz und Sandersleben, 1990].

In vivo und *in vitro* ist eine Aktivierung der Thrombozyten durch lösliche Mediatoren wie Thrombin, Thromboxan A₂ (TXA₂) und Adenosindiphosphat (ADP) möglich.

Über verschiedene second-messenger-Systeme wird die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöht und somit die Arachidonsäurekaskade in Gang gesetzt [Gawaz, 1999; S. 15-17].

Das aus der Arachidonsäurekaskade hervorgehende Thromboxan A₂ (TXA₂) wirkt stark vasokonstriktorisch und ist die potenteste endogene proaggregatorische Substanz. Es wirkt über thrombozytenständige Rezeptoren [Hirata et al. 1996], ist also eine autokrine Aktivierung der Thrombozyten [Darius et al., 1992; Schror et al., 1991].

Da α -Toxin Ca²⁺-durchlässige Kanäle bildet und somit das intrazelluläre Ca²⁺ erhöht, ist ein Anwerfen der Arachidonsäurekaskade als Ursache für die Thrombozytenaggregation denkbar [Bhakdi et al., 1988]. Neben der Aggregation humaner Thrombozyten löst α -Toxin auch eine Aggregation und spätere Lyse der Thrombozyten von Rindern, Schweinen und Kaninchen aus [Machangu und Blobel, 1983].

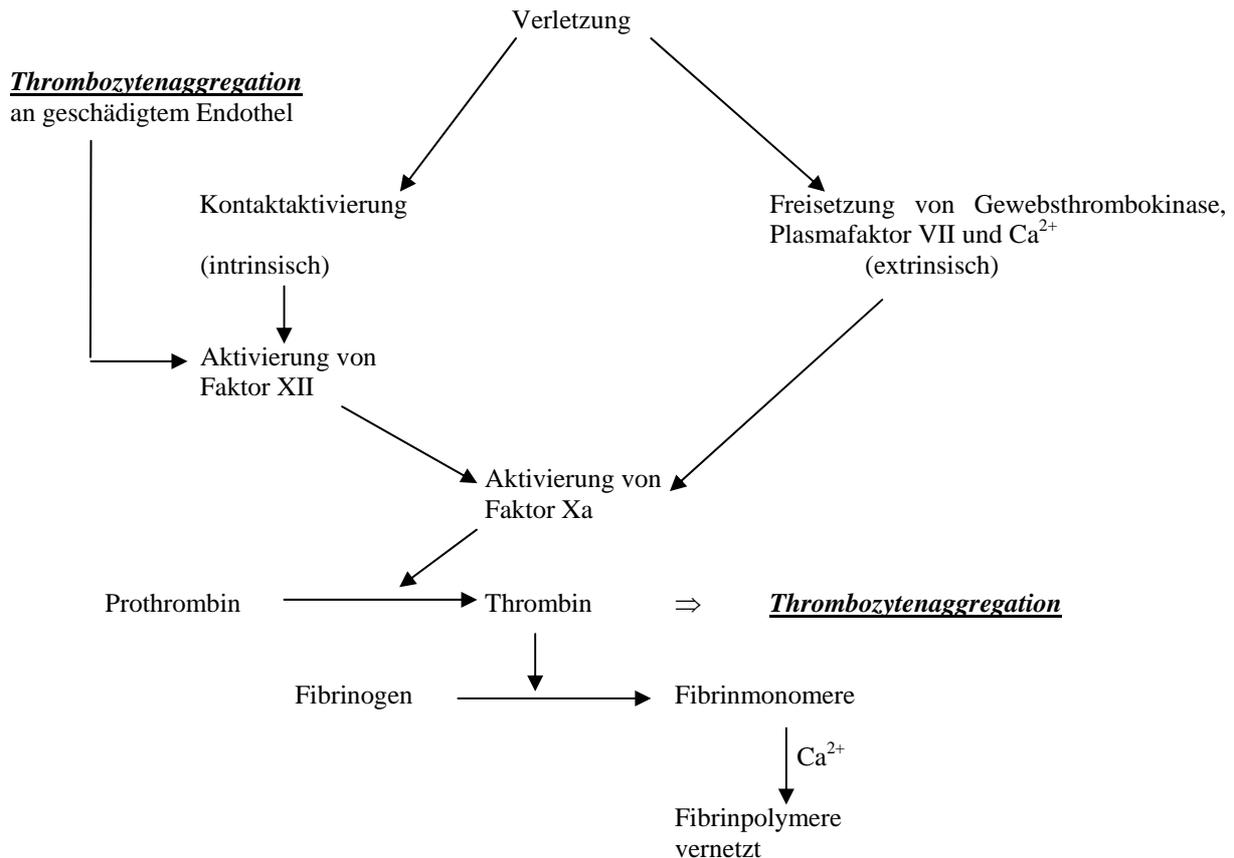


Abb. 2: Darstellung der Beteiligung der Thrombozyten am Blutgerinnungsprozess

2.2.4.3. Aggregationshemmer

Abciximab (ReoPro[®]) besteht aus dem Fab-Fragment eines monoklonalen Antikörpers gegen den GPIIb/IIIa-Rezeptor. Es blockiert diesen Rezeptor und hebt somit die Aggregation vollständig auf [Darius und Grosser, 1998].

Molsidomin (Sin-1[®]) ist ein NO-Donor [Yamamoto und Bing, 2000]. Es setzt spontan NO frei und aktiviert die zytosolische Guanylatzyklase und senkt somit das intrazelluläre Ca^{2+} .

Iloprost ist ein Prostazyklinanalogon mit längerer Halbwertszeit, jedoch gleicher Wirksamkeit [Steurer et al., 1988]. Es wirkt antagonistisch zum Thromboxan A_2 indem es die cAMP-Konzentration in der Zelle steigert und somit intrazelluläres Ca^{2+} senkt.

Bei Indomethacin handelt es sich um ein nichtsteroidales Antiphlogistikum, das die Zyklusoxigenase und damit die TXA_2 -Produktion hemmt [Fossilien, 2000].

2.2.5 Übersicht: Einfluß von α -Toxin auf verschiedene Zelltypen und Entstehung eines „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS)

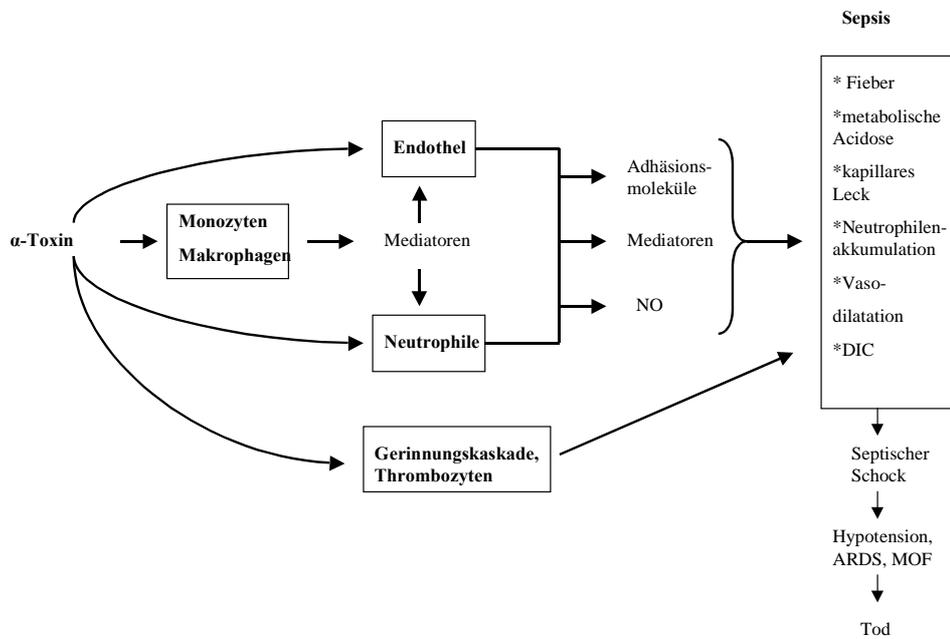


Abb. 3: Übersichtsdarstellung : α -Toxin aktiviert direkt und indirekt verschiedene Zelltypen und kann so ein SIRS (systemic inflammatory response syndrome) auslösen. (PMN=polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt, DIC=disseminierte intravasale Gerinnung, ARDS=adult respiratory distress syndrome, MOF=multiple organ failure)

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Tiermodell Ratte

3.1.1.1. Operation der Versuchstiere

Als Versuchstiere kamen männliche Ratten des Stammes Sprague Dawley mit einem Körpergewicht von 200–400 Gramm zum Einsatz.

Die Narkotisierung erfolgte intraperitoneal mit 1 ml Pentobarbital (Narcoren® 0,7 ml auf 10 ml mit NaCl verdünnt), welches bei Bedarf je nach Schmerzreaktion nachgegeben wurde.

Nach einer medianen Inzision an der Ventralseite des Halses wurde stumpf durch Thymus und Musculus sternocleidomastoideus bis zur Trachea vorpräpariert. Nachdem die Trachea mit einem Spatel vorgelagert worden war, wurden zwei Fäden im Abstand von ca. 1 cm um die Trachea gelegt. Zwischen den Fäden wurde die Trachea in einem Knorpelzwischenraum quer eröffnet und mit einem Polyethylenschlauch (Intramedic® Polyethylen Tubing PE 190) intubiert. Der Tubus wurde mit den zwei Fäden kaudal in der Trachea und kranial außerhalb fixiert.

Zur Freilegung der linken Arteria carotis communis wurde zwischen Trachea und der anliegenden Muskulatur in die Tiefe präpariert. Die Arterie wurde mit einem kleinen Spatel vorgelagert und möglichst weit kranial abgebunden, danach die Fadenenden mit einer Klemme auf Zug gehalten. Ein zweiter Faden wurde thoraxnah mit lockerem Knoten um die Arterie geschlungen. Das Gefäß wurde so weit kaudal wie möglich mit einer Bull-Klemme abgeklemmt und zwischen den Fäden mit einer Mikroschere eröffnet. Nun konnte ein Polyethylenkatheter (Intramedic® Polyethylen Tubing PE 50) mit einer Einführhilfe in kaudaler Richtung eingebracht und der thoraxnahe Knoten um Gefäß und Katheter gestrafft werden. Nach vorsichtigem Entfernen der Bull-Klemme konnte der Katheter ca. 1-2 cm eingeführt und mit beiden Fäden fixiert werden. Der Katheter wurde an den Druckaufnehmer angeschlossen. Nach 10-minütiger Stabilisierungsphase wurde mit der Messung begonnen. Zum Zeitpunkt „null“ erhielten die Tiere nach Entnahme von 1 ml Blut, Registrierung der Herzfrequenz (HR), des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP) und des Hämatokrits (HK), Staph. aureus α -

Toxin ((vgl. Anhang, Kap. 8.1.2.1.) in einer Dosierung von 0 µg pro kg KG (Kontrollgruppe), 20 µg pro kg KG oder 40 µg pro kg KG) in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung pro 300 Gramm Körpergewicht intraarteriell im Bolus.

HR und MAP wurden alle 20 Minuten, der HK jede Stunde über einen Zeitraum von 4 Stunden gemessen. Zum Todeszeitpunkt wurde erneut 1 ml Blut entnommen.

Nach der Beobachtungszeit oder wenn der MAP unter 40 mm Hg abgefallen war wurde das Experiment beendet und die Organe für die weiteren Untersuchungen entnommen.

Das entnommene Blut wurde für 5 Minuten bei 4000 X g zentrifugiert und das überständige Serum abpipettiert.

Die entnommenen Organe wurden in physiologischer NaCl-Lösung gespült, wie die Serumproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Die Serumproben wurden mit Hilfe eines ELISA-Tests auf den Gehalt an IL-1, IL-6 und TNF-α untersucht. Die entnommenen Organe wurden auf MPO-Gehalt untersucht. In Histologie und Western-Blot wurden hauptsächlich Adhäsionsmoleküle und NO-Synthasen nachgewiesen.

3.1.1.2. Zytokinbestimmung mittels Serum-ELISA

Serumproben wurden vor Gabe des Toxins und am Ende des Experiments entnommen. Diese wurden mit Hilfe eines ELISA-Tests auf den Gehalt an IL-1, IL-6 und TNF-α untersucht.

Alle Substanzen des ELISA-Testsystems (vgl. Anhang, Kap. 8.1.2.2.2.) wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht, die 96-Multititerplatten erst nach Erreichen dieser ausgepackt.

Belegung der Plattenvertiefungen:

A1-A8: Standardreihe (IL-1β, IL-6 oder TNF-α von der Ratte)

B7-B8: Chromogenblanks

Rest: Proben (Doppelbestimmung)

Für die Standardreihe wurden Verdünnungen mit 0, 31,2, 62,5, 125, 250, 500, 1000 und 2000 pg/ml hergestellt. Dann wurden folgende Substanzen (enthalten im Cytoscreen ELISA-Kit) in die Plattenvertiefungen gegeben:

Standard: jeweils 100 µl der entsprechenden Standardlösung

Proben: jeweils 50 µl Standard-Verdünnungspuffer und 50 µl Probe

Die Platte wurde bedeckt und für 2 (IL-6) bzw. 3 (IL-1 β) Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden in jede Vertiefung (außer zum Chromogen) 100 μ l biotinylierter IL-1 β - bzw. IL-6-Antikörper gegeben und wiederum für eine Stunde bedeckt inkubiert. Es wurde viermal gewaschen. Allen Vertiefungen (außer denen mit Chromogen) wurden 100 μ l Streptavidin HRP-Arbeitslösung zugeführt und 30 Minuten inkubiert. Nach einer weiteren Waschprozedur wurden 100 μ l stabiles Chromogen in alle Vertiefungen gegeben und nach 20-25 Minuten die Reaktion mit 100 μ l Stop-Lösung pro Vertiefung abgestoppt. Beim TNF- α -ELISA-Kit wurden 50 μ l Standardlösung und 50 μ l Probe in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert und direkt 50 μ l biotynlierter TNF- α -Antikörper hinzugegeben. Nach 1,5 Stunden bedeckter Inkubation bei Raumtemperatur wurde 4 Mal gewaschen. In jede Vertiefung (außer jenen mit Chromogen) wurde 100 μ l Streptavidin HRP-Arbeitslösung gegeben und für 45 Minuten bedeckt inkubiert. Nach einer weiteren Waschprozedur wurden 100 μ l stabiles Chromogen (Tetramethylbenzidine) in alle Vertiefungen gegeben und nach 30 Minuten die Reaktion mit 100 μ l Stop-Lösung pro Vertiefung abgestoppt. Die Absorption wurde mit dem Elisa-Reader 0 bei 450 nm innerhalb von zwei Stunden abgelesen.

3.1.1.3. Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität zur Quantifizierung der PMN-Akkumulation in den Organen

Der gesamte Ansatz wurde auf Eis durchgeführt. Verwendet wurde ca. 1 Gramm Gewebe. Den bei -70°C eingefrorenen Organen wurde das zehnfache Gewicht HTAB-Puffer (vgl. Anhang, Kap. 8.1.2.2.3.) zugesetzt. Die Proben wurden 10 Minuten mit dem Ultra-Turrax homogenisiert, worauf eine 30-minütige Zentrifugation bei 4°C und 20000 X g erfolgte. Der Überstand wurde dekantiert und erneut auf Eis verbracht. Die Bestimmung der MPO erfolgte im Photometer (vgl. Anhang, Kap. 8.1.1.3.) bei 460 nm. 950 μ l ODI-Lösung (vgl. Anhang, Kap. 8.1.2.2.3.) wurden mit 50 μ l Probenüberstand gemischt und die Absorbtion nach 60 und 120 Sekunden bestimmt. Die MPO-Aktivität ergab sich aus folgender Formel :

$$\begin{aligned} \text{MPO-Aktivität in [U/l]} &= \Delta\text{Abs.}/e \times d \times t \times q \\ &= \Delta\text{Abs} \times 17,7 \text{ U/l} \end{aligned}$$

$\Delta\text{Abs.}$ = Absorption nach 120 sec – Absorption nach 60 sec

e = molarer Extinktionskoeffizient von o-Dianisidine bei 460 nm (1,13 l/($\mu\text{mol} \times \text{cm}$))

d = Weglänge vom Spektrum (10 mm)

t = Reaktionszeit (1 Min)

q = Volumenfraktion der Probe (Probenvolumen in Küvette/ Totalvolumen in Küvette)

3.1.1.4. Durchführung der histologischen Untersuchungen

Herstellung von Gefrierschnitten

Die in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen und bei -70°C gelagerten Organstücke wurden mit Tissue Tec auf Metallblöckchen aufgefroren und dann in dieses eingegossen. Am Cryostaten wurden Herz und Darm bei -17°C bis -22°C 6 μm dick und die Lunge bei -15°C bis -19°C 8 μm dick geschnitten und auf einen zimmerwarmen Objektträger aufgenommen.

Die Schnitte wurden nach Trocknung über Nacht gefärbt oder bei -20°C gelagert.

Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Die Gefrierschnitte wurden direkt nach dem Schneiden für 1 Minute in 100 % Ethanol fixiert und dann in Aq. dest. gehängt. Danach wurden sie für eine Minute in Hämalaun nach Mayer gefärbt. Es folgte eine 10-minütige Spülung unter fließendem Leitungswasser, darauf eine erneute Spülung mit Aq. dest.. Es erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Kernfärbung. Die Schnitte wurden 10 Sekunden lang in Eosin (1,25 g in 250 ml Aq. dest. gelöst, 1/2 Stunde gerührt, mit einem Tropfen Essigsäure versetzt) inkubiert. Daraufhin wurden die Objekte für jeweils eine Minute in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 96%, 2 mal 100%) dehydriert. Danach folgte eine zweimalige Inkubation in Xylol für jeweils 5 Minuten. Zum Eindecken brachte man einen Tropfen Permount auf das Deckglas und deckte das Präparat unter Vermeidung von Luftblasen ab.

Naphthol-ASD-Chlorazetatesterase(N-ASD-C)-Färbung

Nach mindestens 12-stündiger Trocknung wurden die Schnitte für 10 Minuten in Aceton fixiert und in PBS (pH 7,45) für 5 Minuten gewässert.

Währenddessen wurden 100 µl des 4%-igen Pararosanilin-HCl (s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.4.) und 100 µl des frisch angesetzten 30%-igen Natriumnitrits (s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.4.) gemischt bis eine gelbe Farbe erschien und dann 1 Minute stehengelassen. Das Gemisch wurde mit 50 ml PBS versetzt und mit einigen Tropfen 1 M HCl auf einen pH-Wert von 6,3 eingestellt. Jetzt wurden 50 µl Naphthol-ASD-Chloralazetat-Konzentrat (s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.4.) hinzugegeben und sofort gründlich gemischt. Nach Filtrieren der Lösung wurde diese in eine Färbeküvette verbracht und die Objektträger darin für eine halbe Stunde bei RT auf den Schüttler inkubiert. Da die Lösung nach dieser Zeit anfängt zu kristallisieren, mußte sie für die zweite halbstündige Inkubation neu hergestellt werden. Danach wurden die Zellkerne 30 Sekunden mit Hämalaun gegengefärbt und kurz in Leitungswasser gebläut. Die Präparate wurden wässrig mit Aquatex eingedeckt.

Immunhistochemischer Antigennachweis

Nach mindestens 12-stündiger Trocknung wurden die Schnitte für 10 Minuten in Aceton fixiert und in PBS (pH 7,45) für 10 Minuten gewässert. Die Präparate wurden nun dreimal 2 Minuten in PBS ausgewaschen.

Die endogene Peroxidaseaktivität wurde mit 0,3 % H₂O₂ in 10 % Methanol gehemmt (für 30 Minuten bei 37°C in der feuchten Kammer). Die Schnitte wurden erneut drei Mal für 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Dann erfolgte eine 20-minütige Inkubation mit der Lösung I des Biotin-Avidin-Blocking-Systems (s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.4.), erneutes dreimaliges Spülen mit PBS (jeweils 5 Minuten) und eine Inkubation für 20 Minuten in Lösung II mit folgendem Waschschrift.

Es erfolgte eine 30-minütige Inkubation in der feuchten Kammer bei 37°C mit verdünntem Normalserum (Vectastain-ABC-Kit-Serva: 10 ml PBS mit 150 µl Normalserum; s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.4.) der Tierspezies, in der der Sekundärantikörper hergestellt worden ist.

Nachdem man den Normalserumüberschuß hatte ablaufen lassen, wurde mit dem Primärantikörper (1:50 in der Normalserumlösung bei P-Selektin, eNOS und iNOS;

1:200 bei ICAM-1) eine halbstündige Inkubation bei 37°C in der feuchten Kammer vorgenommen. Die Schnitte wurden wiederum 3 Mal mit PBS gespült.

Danach wurden die Präparate mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Vectastain-ABC-Kit-Serva: 50 µl biotinylierter Antikörper in 10 ml Normalserum-Lösung) bei 37°C in der feuchten Kammer 1 Stunde lang inkubiert. Währenddessen wurde das ABC-Reagenz angesetzt (5 ml PBS + 2 Tropfen Reagenz A + 2 Tropfen Reagenz B mischen), so daß es 30 Minuten vor Gebrauch fertig war. Die Schnitte wurden wiederum 3 Mal mit PBS gespült.

Der Vectastain ABC-Peroxidase-Komplex wurde aufgebracht, die Schnitte nun 30 Minuten bei 37°C in der feuchten Kammer belassen und dann wie oben gewaschen.

Die nachfolgende Inkubation mit Peroxidase-Substrat/Chromogengemisch dauerte 5-10 Minuten (= DAB-Färbung). Zur Herstellung des Peroxidase-Substrat/Chromogengemisches wurden 5ml Aq. dest. mit 100 µl Puffer-Stamm-Lösung gemischt, 100 µl DAB-Stamm-Lösung hinzugegeben und erneut gemischt, dann das Gemisch mit 100 µl H₂O₂ versetzt (alle benötigten Lösungen außer Aq. dest. im Peroxidase Substrate-Kit, DAB; s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.4.). Die Präparate wurden nun 5 Minuten mit Aq. dest. gespült.

Zum Abschluß erfolgte eine Kerngegenfärbung mit Hämatoxin von 3 Sekunden Dauer und 10-minütiges Bläuen in Leitungswasser bei Raumtemperatur.

Die Schnitte wurden direkt mit Permount eingedeckt.

Es wurden Primärantikörper gegen ICAM-1, P-Selektin, iNOS und eNOS eingesetzt (s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.4.).

Auswertung

Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Mikroskop (10-er, 40-er und 100-er Objektiv) mit den Kontrollen vergleichend betrachtet.

Die HE-Färbung diente der Ermittlung histopathologischer Veränderungen. Die Muskelfasernekrosen am Herzen wurden nach einem Score von 0-2 (0=nicht vorhanden, 1=sichtbar, 2= stark ausgeprägt) klassifiziert.

Die Naphthol-ASD-Chlorazetatesterase-Färbung brachte eine deutliche Darstellung von Granulozyten, deren Zytoplasma, wie auch das der Mastzellen, sich rot-orange färbte.

In der Immunhistologie lag der Hauptaugenmerk auf der Antigenpräsentation des Gefäßendothels, dessen Braunfärbung nach einem Score von 0 (keine Expression) bis 4 (sehr starke Expression) quantifiziert wurde.

3.1.1.5. Untersuchungen zur Proteinexpression mittels Western-Blot

Vorbereitung des Organmaterials

Für den Western-Blot wurden die bei -70 °C eingefrorenen Organproben verwendet. Es wurde ca. 1 Gramm Organmaterial (Herz, Lunge, Darm) mit einem ml Lysepuffer (s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.5.) aufgenommen und gründlich im Ultra-Turrax zerkleinert. Dann wurden die Proben im Wechsel jeweils 3 Mal für eine Minute ins Ultraschallbad und für 30 Sekunden in flüssigen Stickstoff verbracht. Es folgte eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei $14000 \times g$. Der Überstand wurde im Verhältnis 3:1 mit Vierfach-Loading-Puffer (Roti[®]-Load, s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.5.) versetzt und bei -20 °C gelagert, ca 10 μl wurden ohne Loading-Puffer für die Proteinbestimmung gesondert aufbewahrt.

BCA-Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteingehalte wurde mit dem Micro BCA ProteinAssay Reagent Kit (s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.5.) durchgeführt.

Zuerst wurden die Proteinstandards (Bovines Sernalbumin, BSA) mit Konzentrationen von 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 $\mu\text{g/ml}$ in Aq. dest. hergestellt.

Mit dem Mischen von 50 Teilen BCA-Reagent A mit einem Teil BCA-Reagent B erhielt man das BCA-Arbeitsreagenz.

Die Proben wurden mit Aq. dest. 1:25 verdünnt und im Doppelansatz untersucht.

Auf eine 96-Loch-Microtiterplatte wurde folgendes pipettiert:

- A1-H1 und A2-H2: absteigende Standardreihe
- G3, G4: Lösungsmittel
- Rest: Proben

In jede Vertiefung wurde dementsprechend 25 μl Standard, Probe oder Lösungsmittel pipettiert, jeweils 200 μl BCA-Arbeitsreagenz hinzugegeben und die Platte für 30 Sekunden geschüttelt. Die Platte wurde bedeckt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Absorption bei 562 nm mit dem Elisa-Reader (vgl. Anhang, Kap. 8.1.1.5.) gemessen. Dieser berechnete nun anhand der Standardkurve die Proteinkonzentrationen.

Gelvorbereitung

Die Bestandteile der Gelkammern wurden mit Spülmittel gereinigt und die Glasplatten zusätzlich mit Ethanol 70 % abgerieben, getrocknet und zusammengesetzt.

Es wurde ein 8%-iges Trenngel (s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.5.) gegossen. Die Substanzen wurden unter Vermeidung von Luftblasen gemischt und mit einer Plastikpasteurpipette bis ca. 0,5 bis 1 cm unterhalb des Kammes in die Gelkammern gegossen. Es erfolgte eine Überschichtung mit Isopropanol um die Polymerisierung zu verbessern.

Nach Polymerisation des Trenngels (ca. 35-40 Minuten) wurde das Isopropanol abgegossen, mit Aq. dest. und ein zweites Mal mit Sammelgel (ohne APS und TEMED; s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.5.) gespült. Es wurde ein 4%-iges Sammelgel (s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.5.) hergestellt. Die Substanzen wurden unter Vermeidung von Luftblasen gemischt. Die Gelkammer wurde mit Sammelgel gefüllt und die Kämme zur Herstellung der einzelnen Taschen eingesetzt .

Nach der Polymerisation (30-45 Minuten) wurden die Kämme vorsichtig entfernt und die Taschen mit Elektrophorese-Puffer gespült. Die Proben wurden mit Vierfach-Loading-Puffer im Verhältnis 3:1 versetzt und ca. 5 Minuten bei 95°C erhitzt, kurz zentrifugiert, dann mit dünnen Pipettenspitzen in die einzelnen Taschen des Gels eingebracht. Die Proben enthielten eine Gesamtmenge von 50 µg Protein in den aufgetragenen 20 µl. Als Standard wurden 10 µl High-Range (M.W. 46-210 kD; s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.5.) verwendet, als Positivkontrollen (5 µl) für eNOS und iNOS die beim Antikörper beiliegenden.

Gelelektrophorese

Die untere Elektrophoresekammer wurde mit Elektrophoresepuffer (vgl. Anhang, Kap. 8.1.2.2.5.) so aufgefüllt, daß die Gele gut eintauchten, die obere bis zum Maximum. Das Gel wurde nach Tabelle 1 mit Proben bestückt. Die Elektrophorese erfolgte in zwei Schritten bei konstanter Stromstärke: 10 Minuten bei 40 mA, dann ca. 3 Stunden bei 75 mA. Die elektrophoretische Trennung wurde beendet, wenn die Farbfront vom Molekulargewichtsmarker (High Range) (vgl. Anhang, Kap. 8.1.2.2.5.) das Ende des Geles erreicht hatte.

	Probe	Menge
Tasche 1	Loading-P. 1:4 verd.	20 µl
Tasche 2	High-Range	10 µl
Tasche 3	Loading-P. 1:4 verd	20 µl
Tasche 4	Positivkontrolle	5 µl
Tasche 5	Loading-P. 1:4 verd	20 µl
Tasche 6	Probe: 0 µg α-Toxin pro kg KG	50 µg Protein in 20 µl
Tasche 7	Probe: 0 µg α- Toxin pro kg KG	50 µg Protein in 20 µl
Tasche 8	Probe: 0 µg α- Toxin pro kg KG	50 µg Protein in 20 µl
Tasche 9	Probe: 20 µg α- Toxin pro kg KG	50 µg Protein in 20 µl
Tasche 10	Probe: 20 µg α- Toxin pro kg KG	50 µg Protein in 20 µl
Tasche 11	Probe: 20 µg α- Toxin pro kg KG	50 µg Protein in 20 µl
Tasche 12	Probe: 40 µg α- Toxin pro kg KG	50 µg Protein in 20 µl
Tasche 13	Probe: 40 µg α- Toxin pro kg KG	50 µg Protein in 20 µl
Tasche 14	Probe: 40 µg α- Toxin pro kg KG	50 µg Protein in 20 µl
Tasche 15	Loading-P. 1:4 verd	20 µl

Tab. 1: Belegung der Geltaschen beim Page-Western-Blot

Blotten

Die Transfermembran (Immobilon, s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.5.) wurde für 3 Sekunden in Methanol, dann für 5 Minuten in Transfer-Puffer (s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.5.) gelegt, Filterpapier und Schwämme 5 Minuten lang in Transfer-Puffer eingeweicht. Nun wurden die Gelkammern auseinandergebaut, die rechte obere Gelkante markiert, das Sammelgel abgekratzt und das Gel 10 Minuten lang in Transfer-Puffer gewaschen.

Nach Einschieben dieser Konstruktion in die Blotting-Kammer wurde diese mit 1 X-Transferpuffer aufgefüllt und die Elektroden angeschlossen. Der Transfer wurde über 1 Stunde bei 24 V vollzogen.

Nachweis von Proteinexpression durch Chemilumineszenz (ECL-System, vgl. Anhang, Kap. 8.1.2.2.5.)

Nach der Entnahme aus der Transferkammer wurde die Transfermembran mit TBS-T gespült und über Nacht bei 4°C in Blocking-Puffer (45 ml TBS-T + 1,25 Gramm Milchpulver + 5 ml Humanes Serum Albumin) inkubiert.

Die Blot-Membran wurde nun mit 1 x TBS-T gespült und für 90 Minuten mit dem primären Antikörper (1:1000 verdünnt in Blocking-Puffer) bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgten fünf fünfminütige Waschschrte mit TBS-T.

Als nächstes erfolgte eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper (10 ml Kaninchenserum + 40 ml TBS-T + 10 µl Sekundär-AK (z.B. Sekundär-AK: Rabbit anti Goat IgG HRP, vgl. Anhang, Kap. 8.1.2.2.5.) für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Wiederum wurde in fünf fünfminütigen Waschschrten mit TBS-T gewaschen.

In der Dunkelkammer wurde die Blot-Membran mit der Proteinseite nach oben eine Minute in ECL (je 7 ml Lsg. A + Lsg. B gemischt) inkubiert und gut abgetropft in eine Klarsichtfolie gelegt. Diese wurde in einer Röntgenkassette mit Klebestreifen befestigt und dann mit einem Röntgenfilm bedeckt. Die Belichtung erfolgte je nach Stärke der Signale über einen Zeitraum von 10 Sekunden bis einer Stunde.

3.1.2. Aggregation humaner Thrombozyten

3.1.2.1. Blutentnahme

Zur Blutentnahme wurden 50 ml Perfusorspritzen verwendet, in denen 10 ml PBS mit 50 µl Liquemin (s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.6.) als Antikoagulans vorgelegt waren. Als Blutspender dienten gesunde Frauen und Männer, denen Blut mittels einer Butterfly-Kanüle mit weitem Lumen (19 G) entnommen wurde.

3.1.2.2. Herstellung des plättchenreichen Plasmas (PRP)

Das gewonnene Blut wurde gleichmäßig auf 50 ml NUNC-Röhrchen verteilt und bei 180 g für 15 Minuten zentrifugiert. Danach konnte das PRP, welches sich oberhalb der Erythrozyten und des „buffy coats“ aus Leukozyten befand, vorsichtig abgenommen werden.

Vom PRP wurden 600 µl entnommen, die dann 5 Minuten mit 1500 X g zentrifugiert wurden. Der Überstand (plättchenarmes Plasma, PPP) konnte nun vorsichtig abpipettiert werden.

Das PRP wurde mit 1N HCl auf einen pH-Wert zwischen 7,35 und 7,45 eingestellt.

Bei jedem Arbeitsschritt mußte besonders vorsichtig mit den Thrombozyten umgegangen werden, um eine Aktivierung zu vermeiden.

3.1.2.3. Prüfung der Wirkung von α -Toxin auf die Thrombozytenaggregation und des Einflusses toxischer Inhibitoren auf dieses Geschehen

Es wurde der Einfluß von α -Toxin auf die Thrombozytenaggregation und die Beeinflussung dieses Geschehens durch verschiedene Inhibitoren überprüft.

Diese Relativmessung erfolgte nephelometrisch (Automated Platelet Coagulation Tracer =APACT; Labor, Hamburg; Software APACT II; s. Anhang, Kap. 8.1.1.6.). Hierbei war die Lichtdurchlässigkeit der Probe der Thrombozytenaggregation direkt proportional.

Als Kontrollwert diente die maximale Aggregation der Thrombozyten, die mit ADP in den Endkonzentrationen 1, 3,3, 10 und 20 µM stimuliert wurden. Das plättchenreiche Plasma wurde mit α -Toxin (vgl. Anhang, Kap. 8.1.2.1.) -Endkonzentrationen von 1-14 µg/ml inkubiert. In späteren Versuchen wurde es zuvor mit verschiedenen Inhibitoren versetzt.

Zu Beginn des Versuches wurde die Rührgeschwindigkeit des APACT auf 1000 U/Min eingestellt und mit PPP (s. Kap. 3.1.2.2.) auf eine Lichtdurchlässigkeit von 100% geeicht. 300 µl PRP wurden in den APACT-Küvetten für 60 Sekunden bei 37°C inkubiert und dann mit α -Toxin (s. Anhang, Kap. 8.1.2.1.) versehen, so daß in den 300 µl Konzentrationen von 1-14 µg/ml erreicht wurden.

Die Thrombozytenaggregation wurde am Computerbildschirm verfolgt und abgebrochen, sobald ein Plateau erreicht wurde, spätestens jedoch nach 6 Minuten Laufzeit.

In den Inhibitionsversuchen wurde die submaximale Konzentration (d.h. die Konzentration, bei der gerade noch keine maximale Thrombozytenaggregation erreicht wurde) von ADP (bei Indomethacin eine Kollagenemulsion, s. Anhang, Kap. 8.1.2.2.6.) bzw. α -Toxin ermittelt. Diese wurde dann dem mit Inhibitor für 30 Sekunden vorinkubierten PRP zugesetzt. Als Inhibitoren wurden eingesetzt: Iloprost, Sin-1[®], Indomethacin und ReoPro[®].

Iloprost und Sin-1 wurden nach einer Laufzeit von 30 Sekunden zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 60 Sekunden wurde mit ADP bzw. α -Toxin aktiviert. Es wurde mit Sin-1-Endkonzentrationen von 3,3-5000 µmol/ml, Iloprost-Endkonzentrationen von 0,01-300 nmol/ml und ReoPro-Endkonzentrationen von 0,1-33,33 µg/ml gearbeitet.

Bei Indomethacin wurde eine Inkubationszeit von 5 Minuten vor der Kollagenzugabe eingehalten und Endkonzentrationen von 3,3-100 nmol/ml eingesetzt.

Das Indomethacin wurde als 1,071 mg/ml-Lösung in DMSO hergestellt, Verdünnungen mit Tris-HCl-Puffer vorgenommen.

3.1.3. statistische Auswertung der Ergebnisse

Für alle quantitativen Merkmale wurden Anzahl der Beobachtungen, Minimum, Maximum und Median angegeben. Die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe von Box-and-Whisker-Plots. Der Box-and-Whisker-Plot besteht zunächst aus einem Rechteck, dessen untere Kante dem ersten Quartil und dessen obere Kante dem dritten Quartil entspricht. In diesem Rechteck befinden sich 50 % des Kollektivs. Ein Querstrich innerhalb der Box markiert den Median. Die Whiskers (Verlängerungen oberhalb und unterhalb der Box) beschreiben die Spannweite, sie ziehen somit bis zum Minimum bzw. Maximum. Lagen nur 5 Werte zugrunde, so entsprachen diese Werte genau den statistischen Kennwerten im Box-and-Whisker-Plot. Wenn weniger Werte zur Verfügung standen, konnte kein vollständiger Box-and-Whisker-Plot dargestellt werden.

Die Analyse der Überlebenszeiten erfolgte unter Berücksichtigung von Zensierungen gemäß Methoden von Kaplan-Meier. Die geschätzte Überlebenszeitfunktion wurde ebenfalls graphisch dargestellt.

Es wurde das statistische Programmpaket SPSS8 benutzt.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Untersuchungen am Tiermodell Ratte

Es wurde ein Kollektiv von 17 Ratten untersucht; das wiederum in 3 Gruppen, die verschiedene Dosierungen Staph. aureus α -Toxin pro Kilogramm Körpergewicht erhielten, aufgeteilt wurde:

Gruppe 0 (kein α -Toxin, 5 Tiere)

Gruppe 20 (20 μ g α -Toxin pro kg KG, 5 Tiere)

Gruppe 40 (40 μ g α -Toxin pro kg KG, 7 Tiere)

Das Gewicht der Tiere lag in einem Bereich von 232 – 411 Gramm.

Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck vor Toxingabe wiesen im Gruppenvergleich keine große Variabilität auf. Die Herzfrequenz lag am Anfang bei allen Tieren zwischen 257 und 480 Schlägen pro Minute. Der mittlere arterielle Blutdruck wies Werte zwischen 90 und 150 mm Hg auf. Der Pressure Rate Index (vgl. dieses Kap. bei Pressure Rate Index) zum Zeitpunkt 0 Minuten lag bei allen Gruppen zwischen 26 und 60. Der Anfangshämatokrit aller Gruppen bewegte sich in einem Bereich von 0,36 bis 0,47.

(vgl. Tab. 2)

Gruppe	Parameter	n	Median	Minimum	Maximum	MW	S
0	KG	5	318	233	340	298	42,29
20	KG	5	289	232	303	280,4	28,8
40	KG	6	305	249	362	308,67	45,9
0	HR	5	326	291	411	342,8	49,82
20	HR	5	377	326	480	390,8	58,53
40	HR	7	343	257	429	357,57	55,54
0	MAP	5	119	90	153	115,6	25,95
20	MAP	5	100	90	145	105,6	22,66
40	MAP	7	115	102	143	119,57	16,26
0	PRI	5	37	26	58	40,4	13,69
20	PRI	5	37	30	60	41,8	12,17
40	PRI	7	45	30	56	42,86	8,97
0	HK	5	0,44	0,41	0,47	0,44	0,02
20	HK	5	0,42	0,36	0,44	0,41	0,03
40	HK	7	0,42	0,41	0,44	0,42	0,01

Tab. 2: Zusammenfassende Darstellung des Medians, Mittelwertes (MW) und der Standardabweichung (S) der Parameter Gewicht (KG) in g, Herzfrequenz (HR) in Schlägen pro Minute, mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) in mmHg, Pressure Rate Index (PRI) und Hämatokrit (HK) der einzelnen Gruppen vor Toxingabe; n ist die Anzahl der untersuchten Tiere.

3.2.1.1. Hämodynamische Parameter und Überlebenszeit

In vivo wurden die Kreislaufparameter Herzfrequenz, mittlerer arterieller Blutdruck, Pressure Rate Index und Hämatokrit im zeitlichen Verlauf bestimmt, um die Auswirkungen der verschiedenen Toxinkonzentrationen auf die Kreislaufstabilität festzustellen.

Herzfrequenz

In der Kontrollgruppe blieb die Herzfrequenz im Median annähernd konstant (Abb. 4 a).

Die Tiere, die 20 µg α-Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatten (Gruppe 20), verhielten sich ähnlich wie die Kontrollgruppe. Sie zeigten im Median einen Anstieg der Herzfrequenz um 69 Schläge pro Minute bis zur 60. Minute, dann wieder einen Abfall auf das Ausgangsniveau und wiederum einen leichten Anstieg bis zum Ende der Beobachtungszeit (Abb. 4 b).

Die Box-and-Whisker-Plot-Darstellung der Gruppe, die 40 µg α-Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatte (Abb. 4 c), zeigt wie gruppentypisch die Herzfrequenz direkt nach Toxingabe abfiel, dann über den Ausgangswert hinaus ansteigt. Kurz danach trat der Tod ein. Da diese Veränderungen bei den einzelnen Tieren zeitlich versetzt eintraten, sind die gemachten Beobachtungen bei Betrachtung des Einzeltieres noch deutlicher (s. Anhang Kap. 8.2., Tab. 6 a). Der anfängliche Herzfrequenzabfall betrug bis zu 50 % der Frequenz vor Toxingabe.

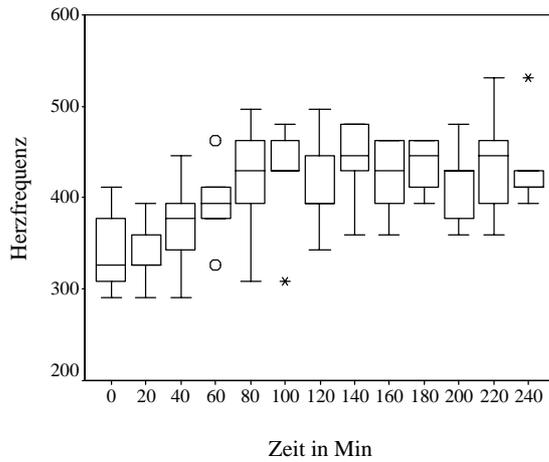
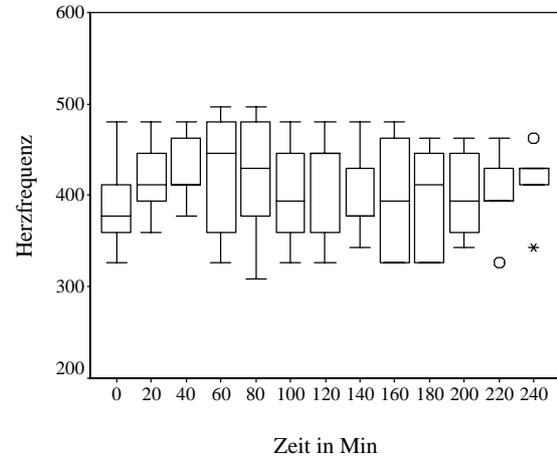
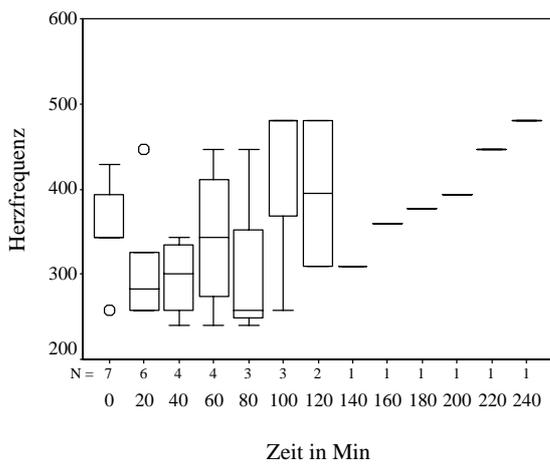
**Abb. 4 a****Abb. 4 b****Abb. 4 c**

Abb. 4 a-c: Box-and-Whisker-Plot-Darstellung (vgl. Kap. 3.1.3.) der Herzfrequenz in Schlägen pro Minute über den gesamten Beobachtungszeitraum; (Werte, die über das 1,5- bzw. 3-fache der Boxenlänge vom 1. oder 3. Quartil entfernt sind, sind als o bzw. * dargestellt)

Abb 4 a: Gruppe 0 (Kontrollgruppe)

Abb 4 b: Gruppe 20

(20 µg α-Toxin pro kg KG)

Abb 4 c: Gruppe 40

(40 µg α-Toxin pro kg KG)

Mittlerer arterieller Blutdruck

Der mittlere arterielle Blutdruck wies in der Kontrollgruppe eine im physiologischen Schwankungsbereich liegende Variabilität auf. Es trat teilweise eine Spannweite von 80 mm Hg auf. Der Druck fiel im Median nach 20 Minuten von 119 auf 107 mm Hg ab, stieg dann wieder zum Ausgangswert und fiel nach 3 Stunden erneut leicht ab (Abb. 5 a).

In der Gruppe, die mit 20 µg α-Toxin pro kg Körpergewicht behandelt wurde, war die Variabilität gering (Spannweite immer kleiner 40 mmHg). Im Median fiel der Blutdruck in den ersten 20 Minuten um ca. 20 % und blieb dann mit geringen Schwankungen auf einem Level bis zum Ende der Beobachtungszeit (Abb. 5 b).

Im Gesamtbild zeigte die Gruppe, die 40 µg α-Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatte, einen raschen und bedeutsamen Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks mit starker Streuung (Range fast 70 mm Hg) zur Zeit 20 Minuten (Abb. 5 c). Die Streuung entstand, da in diesem Zeitraum einige Tiere verstorben sind und somit zum Zeitpunkt 20 Minuten niedrige Blutdruckwerte aufwiesen. Beim Einzeltier war durchgehend ein Blutdruckabfall unterschiedlichster Ausprägung zu beobachten (zwischen ca. 20 und 100 % vom Ausgangswert) (s. Anhang Kap. 8.2., Tab. 6 b).

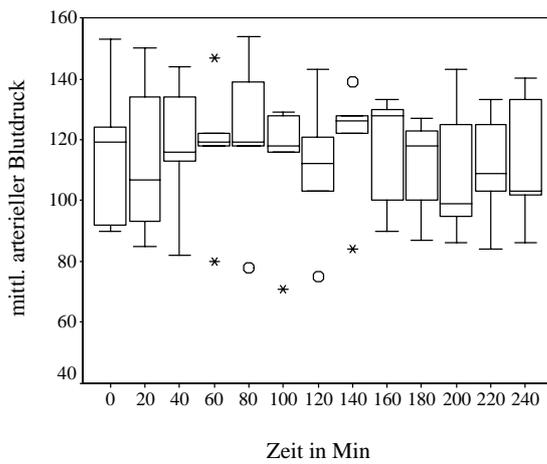


Abb. 5 a

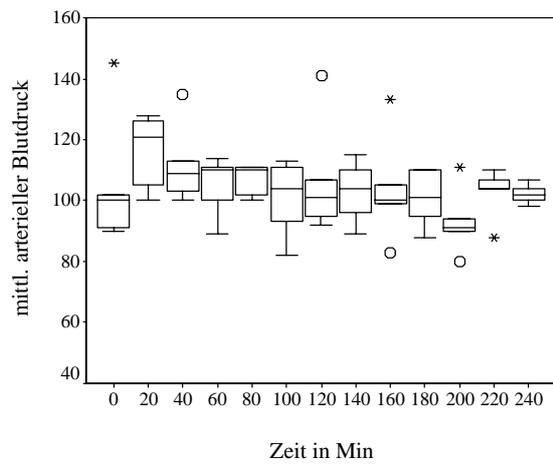


Abb. 5 b

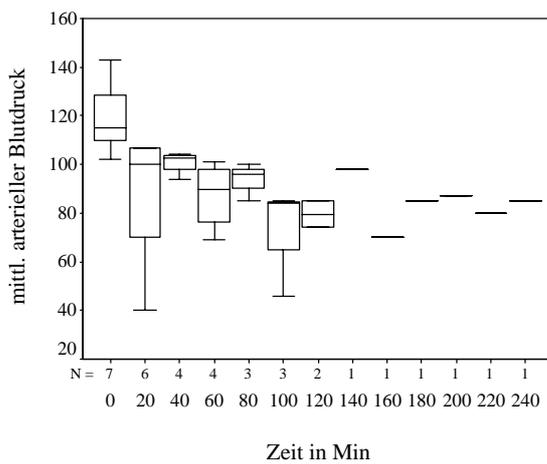


Abb. 5 c

Abb. 5 a-c: Box-and-Whisker-Plotdarstellung (vgl. Kap. 3.1.3.) des mittleren arteriellen Blutdrucks in mm Hg über den gesamten Beobachtungszeitraum; (Werte, die über das 1,5- bzw. 3-fache der Boxenlänge vom 1. oder 3. Quartil entfernt sind, sind als o bzw. * dargestellt)

Abb 5 a: Gruppe 0 (Kontrollgruppe)

Abb 5 b: Gruppe 20

(20 µg α-Toxin pro kg KG)

Abb 5 c: Gruppe 40

(40 µg α-Toxin pro kg KG)

Pressure Rate Index

Den Pressure Rate Index berechnet man, indem man Herzfrequenz in Schlägen pro Minute mit dem mittleren arteriellen Blutdruck in mm Hg multipliziert und durch 1000 teilt. Er trifft eine Aussage über die Höhe des Sauerstoffbedarfes zum gewählten Zeitpunkt.

In der Kontrollgruppe stieg der Pressure Rate Index im Median ab dem Zeitpunkt 40 Minuten an, um nach dem Zeitpunkt 100 Minuten schwankend auf den Ausgangswert zurückzufallen (Abb. 6 a).

In der Gruppe, die 20 μg α -Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hat, war im Median nach 20 Minuten ein Anstieg des Pressure Rate Index zu beobachten. Danach fiel er leicht schwankend ab, um zum Ende der Beobachtungszeit etwas oberhalb des Ausgangswertes anzulangen (Abb. 6 b).

Bei den Tieren, die 40 μg α -Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatten, kam es aufgrund der schweren hämodynamischen Beeinflussung zu einem Abfall des Pressure Rate Index (Abb. 6 c). Die jeweiligen Einzeltiere in Gruppe 40 zeigten nach 20 Minuten einen unterschiedlichen Abfall des Pressure Rate Index (ca. 10-80 %) (s. Anhang Kap. 8.2., Tab. 6 c). Danach trat ein Anstieg bis zum Ausgangswert oder darunter ein und dann bei allen außer einem Tier sehr schnell der Tod.

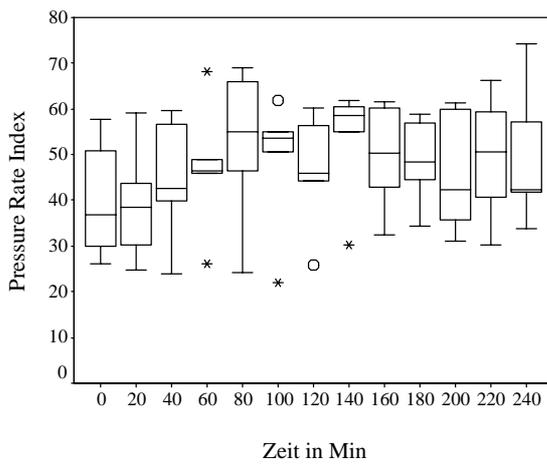


Abb. 6 a

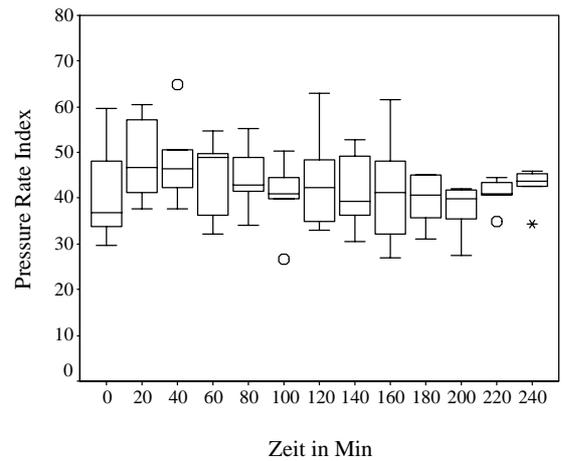


Abb. 6 b

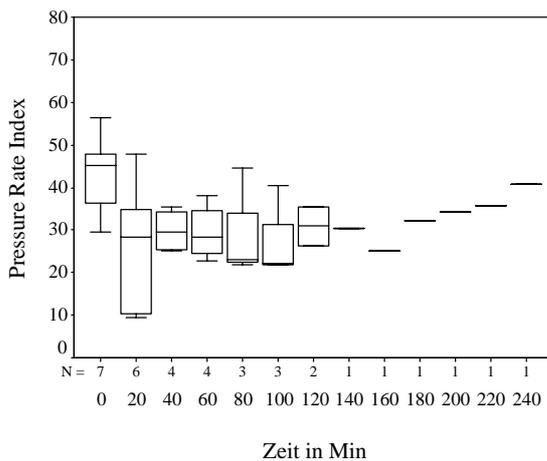


Abb. 6 c

Abb. 6 a-c: Box-and-Whisker-Plotdarstellung (vgl. Kap. 3.1.3.) des Pressure Rate Index über den gesamten Beobachtungszeitraum; (Werte, die über das 1,5- bzw. 3-fache der Boxenlänge vom 1. oder 3. Quartil entfernt sind, sind als o bzw. * dargestellt)

Abb. 6 a: Gruppe 0 (Kontrollgruppe)

Abb. 6 b: Gruppe 20

(20 µg α-Toxin pro kg KG)

Abb. 6 c: Gruppe 40

(40 µg α-Toxin pro kg KG)

Hämatokrit (Abb. 7)

Der Hämatokrit drückt den Anteil der korpuskulären Bestandteile am gesamten Blutvolumen aus, d.h. je höher der Hämatokrit ist, desto mehr Blutflüssigkeit ist durch toxin-geschädigte Gefäßwände verlorengegangen. Interessant war hier der Vergleich zwischen dem Hämatokrit vor Toxingabe und dem zum Todeszeitpunkt.

Der Ausgangshämatokrit der Tiere aller Gruppen lag zwischen 36 und 47%.

Bei der Kontrollgruppe blieb der Hämatokrit im Median konstant.

Die Gruppe mit 20 µg α-Toxin pro kg Körpergewicht wies eine geringe Streubreite auf. Der Hämatokrit stieg im Median an.

Die Tiere, die 40 µg α-Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatten, streuten stark in der Hämatokritdifferenz. Im Median stieg der Hämatokrit bis zum Tod weniger an als bei Gruppe 20. Die vier Tiere, die länger als 25 Min. überlebt hatten, zeigten einen besonders starken Hämatokritanstieg um bis zu 12 %.

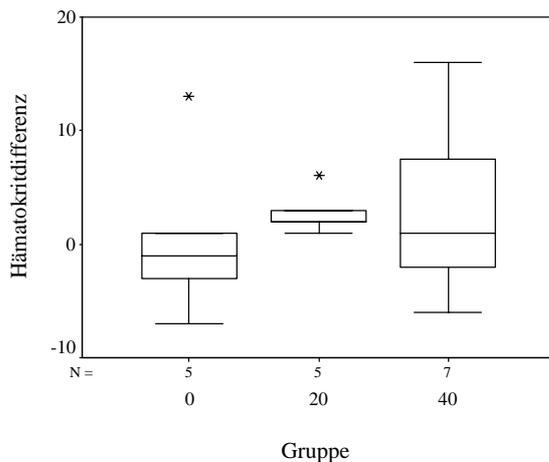


Abb. 7: Differenz zwischen Hämatokrit zum Todeszeitpunkt und vor Toxingabe im Gruppenvergleich in der Box-and-Whisker-Plotdarstellung (vgl. Kap. 3.1.3.) (Gruppe 0 = Kontrollgruppe; Gruppe 20 = Gruppe, die 20 µg α-Toxin pro kg KG erhalten hat; Gruppe 40 = Gruppe, die 40 µg α-Toxin pro kg KG erhalten hat) (Werte, die über das 1,5- bzw. 3-fache der Boxenlänge vom 1. oder 3. Quartil entfernt sind, sind als * dargestellt)

Überlebenszeit

Die Tiere der Kontrollgruppe und der Gruppe, die 20 μg α -Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatte, überlebten alle die 240-minütige Beobachtungszeit (Abb. 8).

Bei der Gruppe mit 40 μg α -Toxin pro kg Körpergewicht war die Überlebenszeit deutlich verkürzt (Abb. 8). Die mittlere Überlebenszeit lag zwischen der 25 und 70 Minuten. Bei 6 von 7 Tieren trat der Tod vor Ende der Beobachtungszeit ein. Nur das Tier mit der Nummer AT 38 hat den Beobachtungszeitraum überlebt.

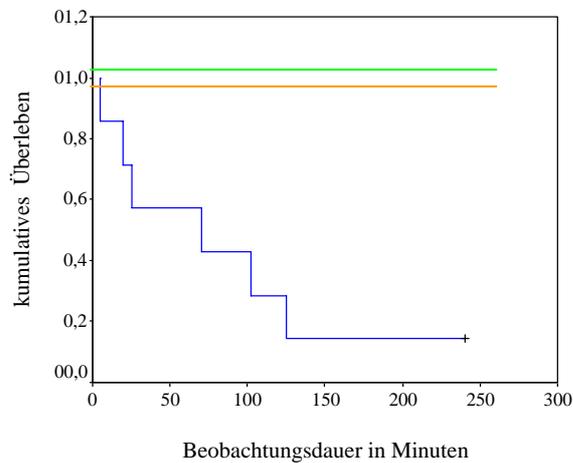


Abb. 8: Überlebenszeitenfunktion nach Kaplan-Meier: Die rote und die grüne Linie entsprechen Kontrollgruppe und Gruppe 20 (20 μg α -Toxin pro kg KG); die blaue Linie stellt die Gruppe 40 (40 μg α -Toxin pro kg KG) dar;

3.2.1.2. Zytokinkonzentrationen im Serum

Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) sind wichtige am Schockgeschehen beteiligte proinflammatorische Mediatoren.

Im Serum-ELISA für Tumornekrose-Faktor α , Interleukin 1 β und Interleukin 6 waren keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu beobachten (Tab. 3).

Bei TNF- α und IL-6 waren im Median die Werte der Kontrollgruppe höher als die der behandelten Gruppen. In Gruppe 40 zeigte sich jedoch bei einzelnen Tieren ein deutlicher Trend in Bezug auf die Erhöhung dieser proinflammatorischen Marker (vgl. Anhang, Kap. 8.2., Tab. 7).

IL-1 β stieg in keiner Gruppe an.

Gruppe	Zytokin	n	Median	Minimum	Maximum
0	TNF- α	4	64	0	183
20	TNF- α	5	29	0	222
40	TNF- α	6	48	0	2000
0	IL-1	4	0	0	115
20	IL-1	5	0	0	111
40	IL-1	6	0	0	128
0	IL-6	4	190	0	327
20	IL-6	5	97	0	396
40	IL-6	6	92	0	1018

Tab. 3: Statistische Kennwerte der Differenzen zwischen Gehalt an TNF α , IL-1 β und IL-6 in pg/ml zum Todeszeitpunkt und vor Toxingabe im Serum (negative Werte wurden auf 0 gesetzt); ; n ist die Anzahl der untersuchten Tiere; (Einzelwerte vgl. Anhang, Kap. 8.2., Tab. 7).

3.2.1.3. Myeloperoxidaseaktivität in den Organen

Die Myeloperoxidase ist ein Enzym, das in polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten enthalten ist. Mit ihrer Bestimmung kann eine Aussage über die Granulozyteninfiltration gemacht werden. Untersucht wurde der MPO-Gehalt von Herz, Lunge und Darm.

Der Myeloperoxidasegehalt wies organabhängig eine deutliche Steigerung bei den mit α -Toxin behandelten Tieren auf.

Bei der Untersuchung von Herz und Lunge (Abb. 9 a und 9 b) zeigte die Gruppe, die 20 μg α -Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatte, im Median fast doppelt so hohe Werte wie die Kontrollgruppe.

Die Tiere mit 40 μg α -Toxin pro kg Körpergewicht zeigten im Median in Herz und Lunge einen MPO-Gehalt zwischen den Werten der beiden anderen Gruppen, näher bei der Gruppe 20. Die Variabilität war v.a. bei der Lunge groß, wobei hier ein Zusammenhang mit der Überlebenszeit deutlich wurde. Die drei Tiere mit der kürzesten Überlebenszeit (zwischen 5 und 25 Minuten) zeigten kaum eine Zunahme der MPO-Aktivität.

Beim MPO-Gehalt im Darm (Abb. 9 c) war die Streuung in allen Gruppen groß, d.h. die Gruppen überschritten sich in ihren Wertebereichen. Im Median wies die Gruppe, die 40 μg α -Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatte, einen 3-4 mal höheren Wert auf als die anderen.

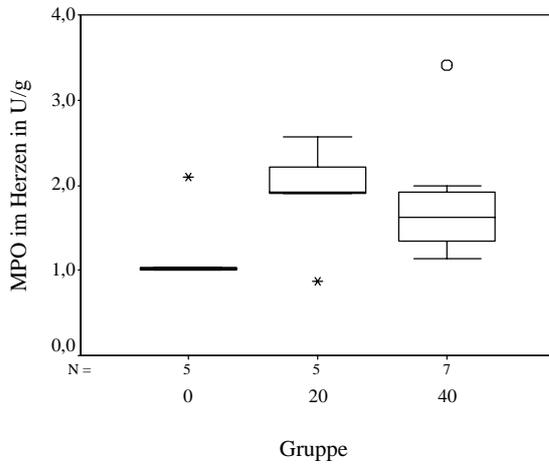


Abb. 9 a

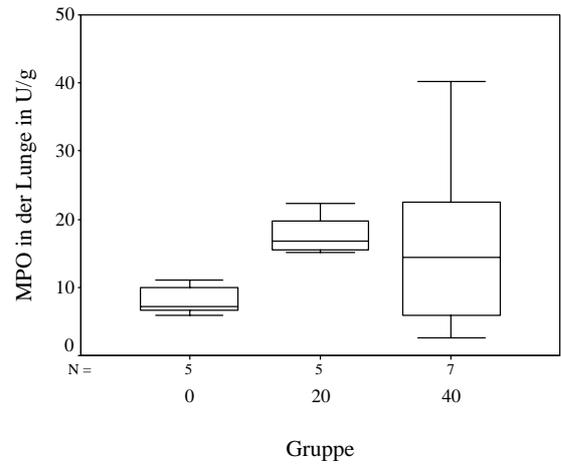


Abb. 9 b

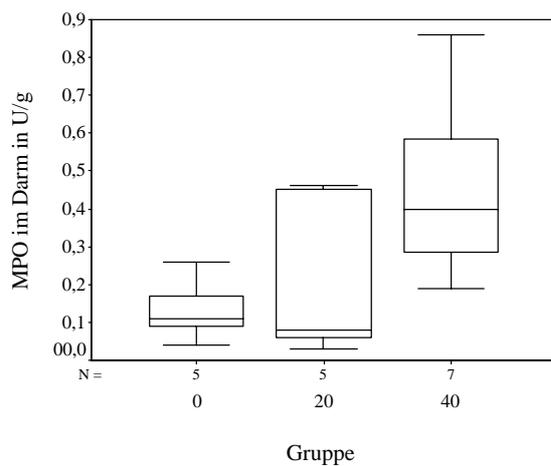


Abb. 9 c

Abb. 9 a-c: Box-and-Whisker-Plotdarstellung (vgl. Kap. 3.1.3.) der Myeloperoxidasegehalte von Herz (Abb. 9 a), Lunge (Abb. 9 b) und Darm (Abb. 9 c) der einzelnen Gruppen (Gruppe 0 = Kontrollgruppe; Gruppe 20 = Gruppe, die 20 μg α -Toxin pro kg KG erhalten hat; Gruppe 40 = Gruppe, die 40 μg α -Toxin pro kg KG erhalten hat) (Werte, die über das 1,5- bzw. 3-fache der Boxenlänge vom 1. oder 3. Quartil entfernt sind, sind als o bzw. * dargestellt)

3.2.1.4. Pathologisch-anatomische Befunde

Bei einigen der toxinbehandelten Tiere lagen makroskopisch sichtbare Organveränderungen vor, die auf das Vorliegen eines SIRS (systemic inflammatory response syndrome) hindeuteten. Bei zwei Tieren aus der Gruppe, die 20 µg α-Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatte, konnten petechiale Blutungen in der Lunge und ischämische Niereninfarkte beobachtet werden. Von der Gruppe, die 40 µg α-Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatte, wies ein Tier petechiale Blutungen in der Lunge und eine starke hämorrhagische Infarzierung des Darmes, ein zweites stark gerötete, ödematöse Darmabschnitte auf.

3.2.1.5. Histopathologische Befunde

3.2.1.5.1. H.E.-Färbung

In der H.E.-Färbung der Herzen waren bei den toxinbehandelten Tieren Muskelfasernekrosen zu beobachten (Tab 4).

Diese waren besonders stark bei einigen Tieren in der Gruppe mit 20 µg α-Toxin, also der Toxingruppe, die die gesamte Beobachtungszeit überlebt hat und somit dem Toxin am längsten ausgesetzt waren, und bei AT 38, dem Tier aus Gruppe 40, das die 240 Minuten ebenfalls überlebte.

Morphologisch kennzeichneten sich die Nekrosen durch Auflockerungen im Zellverband und Auflösung der Zytoplasmastruktur. In den Fällen mit starker Ausprägung (Score 2) waren ganze Gewebebereiche zu sehen, in denen die Zellen aus dem Verband gelöst als strukturlose Schollen vorlagen.

Gruppe 0	MN	Gruppe 20	MN	Gruppe 40	MN
AT 11	n.d.	AT 26	1	AT 28	1
AT 17	0	AT 27	1	AT 32	1
AT 24	0	AT 31	2	AT 33	1
AT 25	0	AT35	2	AT 34	1
AT 30	0	AT 36	1	AT 37	1
				AT 38	2
				AT 39	1

Tab. 4: Muskelfasernekrose (MN) am Herzen nach einem Score von 0-2 (0= nicht vorhanden, 1= sichtbar, 2= stark ausgeprägt, n.d.= nicht durchgeführt)

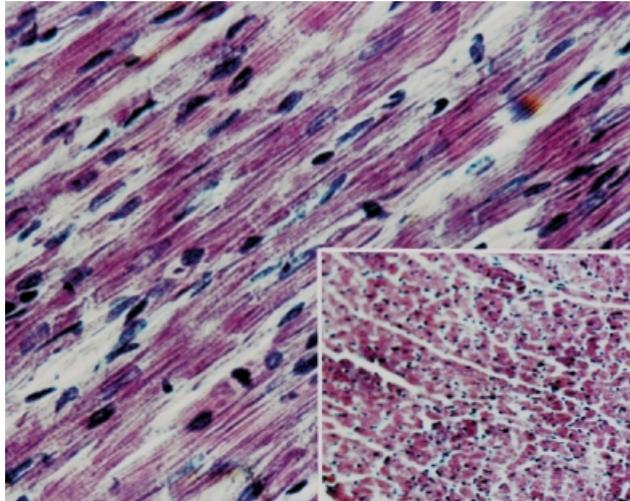


Abb. 10 a: H. E.-Färbung Herz, Kontrollgruppe (AT 24);
Vergrößerung: großes Bild 40er-Objektiv, eingesetztes Bild
10er-Objektiv;
Der Zellverband ist erhalten. Es sind keine pathologischen
Veränderungen zu sehen.

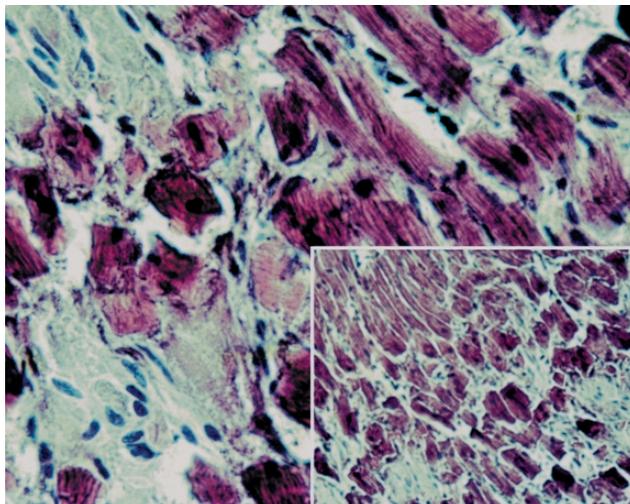


Abb. 10 b: H. E.- Färbung Herz, 20 µg α-Toxin pro kg
KG (AT 31);
Vergrößerung: großes Bild 40er-Objektiv, eingesetztes
Bild 10er-Objektiv;
Bei diesem Tier (Überlebenszeit 240 Minuten) sind
Auflockerungen des Zellverbandes bis hin zu scholligen
Veränderungen zu sehen. Es handelt sich hierbei um
Muskelfasernekrosen.

3.2.1.5.2. Naphthol-ASD-Chlorazetatesterasefärbung (N-ASD-C-Färbung)

Um in der H.E. Färbung nicht identifizierbare polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) besser zu zeigen, hat sich die N-ASD-C-Färbung bewährt, die deren Zytoplasma leuchtend orange darstellt. Im Zytoplasma von PMN und Mastzellen ist die Chloralazetatesteraseaktivität sehr hoch. Sie setzt Naphthol-ASD-Chloralazetat in eine leuchtend orange-farbige Substanz um.

In der ASD-Färbung der Herzen konnten nur vereinzelt ins Gewebe eingewanderte neutrophile Granulozyten beobachtet werden. Es war kein Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen.

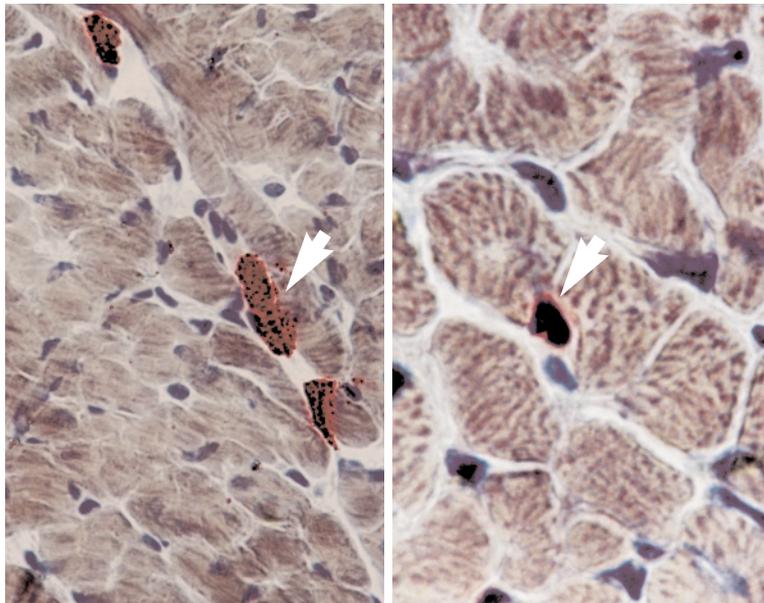


Abb. 11 : N-ASD-C-Färbung Herz (AT 38; 20 μg α -Toxin pro kg KG);
40er Objektiv;
Auf dem rechten Bild ist ein eingewandeter neutrophiler Granulozyt zu sehen (Pfeil). Auch die Mastzellen stellen sich orange dar (Pfeil, linkes Bild).

3.2.1.5.3. Immunhistochemie

3.2.1.5.3.1. Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle vermitteln die PMN-Akkumulation in entzündlichen Prozessen. Mithilfe der Immunhistochemie erfolgte die Bestimmung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und P-Selectin.

Die Braunfärbung der Endothelzellen der Arteriolen und Venolen, die man bei der Immunperoxidasefärbung erhielt, wurde nach einem Score von 0 (nicht vorhanden) bis 4 (sehr stark) ausgewertet.

P-Selektin

In allen untersuchten Organen (Herz, Lunge, Darm) der Kontrolltiere (0 μg α -Toxin) war ein geringgradiges Vorhandensein von P-Selektin in und auf den Endothelzellen der Arteriolen und Venolen sowie den Thrombozyten (Score 1, seltener Score 2) zu beobachten.

Insgesamt lag bei den Gruppen, die α -Toxin erhalten hatten, eine vermehrte Braunfärbung von Membran und Zytoplasma als Zeichen einer gesteigerten P-Selektin-Expression vor.

Im Herzen und v.a. in der Lunge (Abb. 12 a und 12 b) waren bei der Gruppe mit 40 μg α -Toxin pro kg Körpergewicht mehr stark positive Färbungen zu beobachten als bei den anderen Gruppen. Die Gruppe 20 lag nur minimal über der Kontrollgruppe.

Die Färbung des Darmes (Abb. 12 c) zeigte nur bei 2 Tieren der Gruppe 40 stärkere Färbungen als bei den Kontrolltieren. Bei der Betrachtung des Darmes war in der Gruppe, die 20 μg α -Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatte, deutlich mehr P-Selektin nachzuweisen.

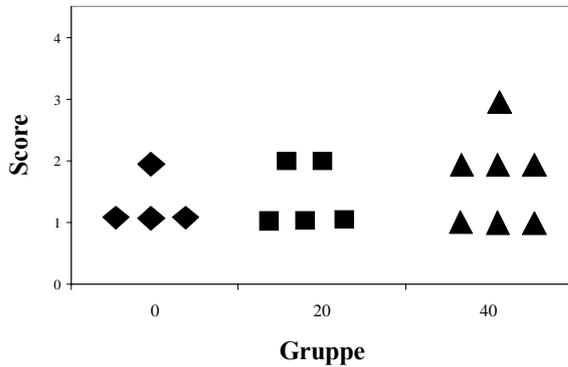


Abb. 12 a: Herz

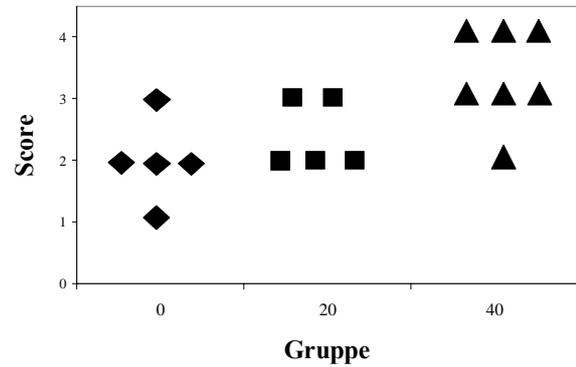


Abb. 12 b: Lunge

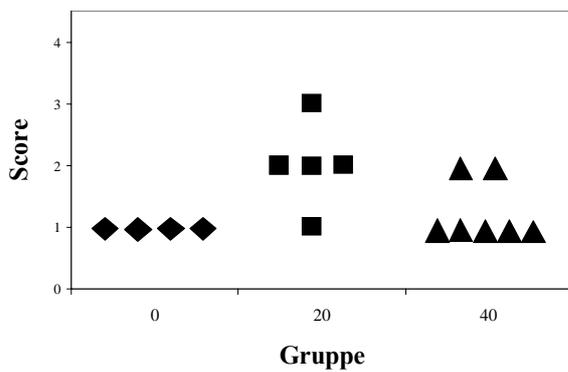


Abb. 12 c: Darm

Abb. 12: Diese Abbildungen zeigen das Vorhandensein von P-Selektin in den Organen der Tiere in den einzelnen Gruppen. (Gruppe 0 = Kontrollgruppe; Gruppe 20 = Gruppe, die 20 µg α-Toxin pro kg KG erhalten hat; Gruppe 40 = Gruppe, die 40 µg α-Toxin pro kg KG erhalten hat)
Ausgewertet wurde nach einem Score von 0 (keine Anfärbung) bis 4 (sehr starke Anfärbung).

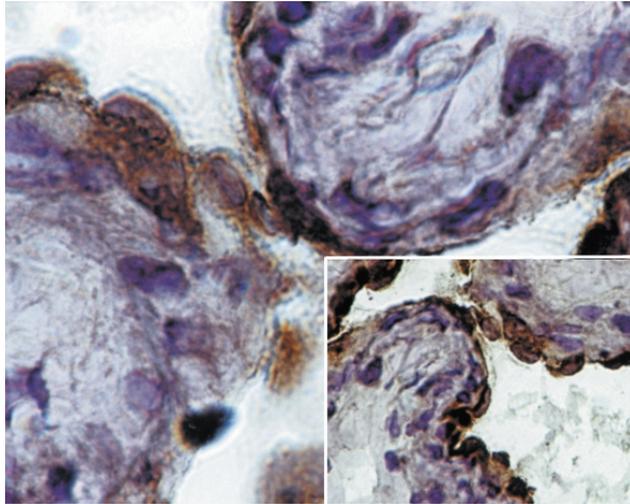


Abb. 13 a:

Immunperoxidase-Färbung; P-Selektin, Lunge; Kontrollgruppe (AT 30, Score: 2); Vergrößerung: großes Bild 40er-Objektiv, eingesetztes Bild 10er-Objektiv;

Die Endothelzellen sind hell- bis stellenweise dunkelbraun angefärbt und gut voneinander abzugrenzen.

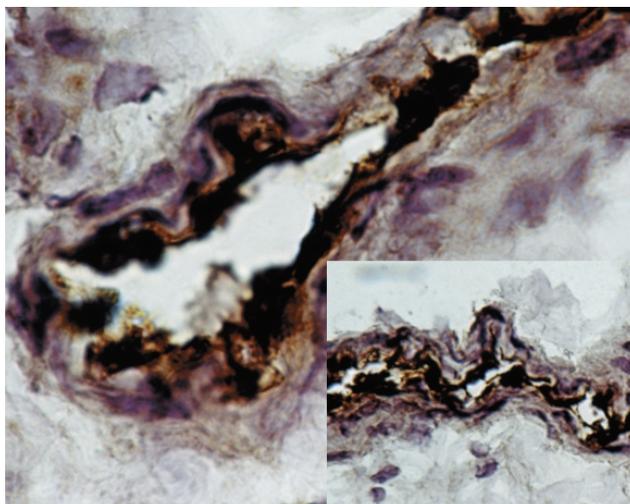


Abb. 13 b:

Immunperoxidase-Färbung; P-Selektin, Lunge; 40 µg α -Toxin pro kg KG (AT 33, Score: 4);

Vergrößerung: großes Bild 40er-Objektiv, eingesetztes Bild 10er-Objektiv;

Die Endothelzellen bilden ein kräftig schwarzbraunes Band und sind nicht mehr als Einzelzelle zu identifizieren.

Bei diesem Tier ist also deutlich mehr P-Selektin vorhanden als bei dem Kontrolltier (Abb. 13a).

ICAM-1

In allen untersuchten Organen (Herz, Lunge, Darm) der Kontrolltiere (0 µg α -Toxin) außer in einem Herzen war eine basale Expression von ICAM-1 in und auf den Endothelzellen der Arteriolen und Venolen (meist Score 1) zu beobachten.

In den Gefäßen des Herzens der Gruppe 20 konnte bei 3 von 5 Tieren eine stärkere ICAM-1-Expression nachgewiesen werden als in der Kontrollgruppe. Von den Tieren der Gruppe 40 zeigte nur eines eine stärkere ICAM-Färbung (Abb. 14 a).

Bei der ICAM-Färbung der Lunge konnten zwischen den Gruppen und zwischen den Tieren der jeweiligen Gruppe keine Unterschiede beobachtet werden (Abb. 14 b).

Im Darm von 6 Tieren der Gruppe 40 konnte kein ICAM-1 nachgewiesen werden, im Gegensatz zu den anderen Gruppen, die zusammen nur ein Tier ohne Nachweis verzeichneten (Abb. 14 c). D.h., in Lunge und Darm zeigte sich eine geringe Expression, die durch die α -Toxin-Einwirkung von bis zu maximal 4 Stunden nicht deutlich beeinflusst wurde.

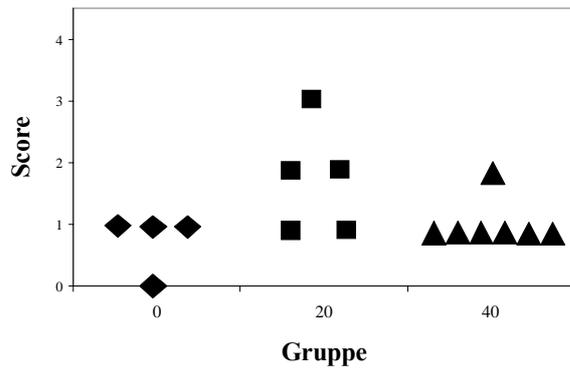


Abb. 14 a: Herz

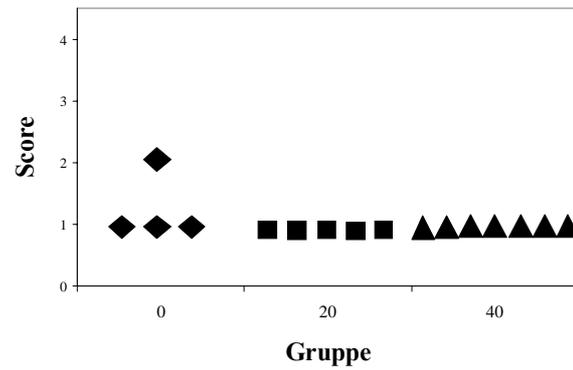


Abb. 14 b: Lunge

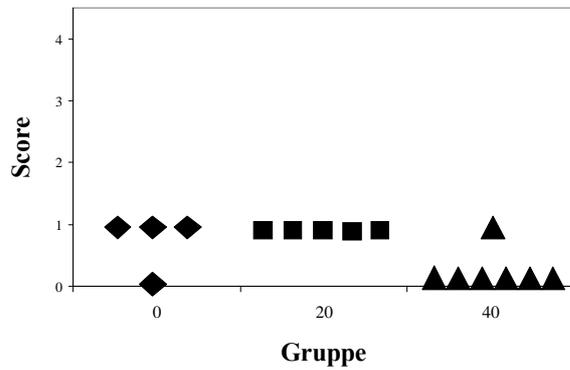


Abb. 14 c: Darm

Abb. 14: Diese Abbildungen zeigen das Vorhandensein von ICAM-1 in den Organen der Tiere in den einzelnen Gruppen (Gruppe 0 = Kontrollgruppe; Gruppe 20 = Gruppe, die 20 µg α-Toxin pro kg KG erhalten hat; Gruppe 40 = Gruppe, die 40 µg α-Toxin pro kg KG erhalten hat).

Ausgewertet wurde nach einem Score von 0 (keine Anfärbung) bis 4 (sehr starke Anfärbung).

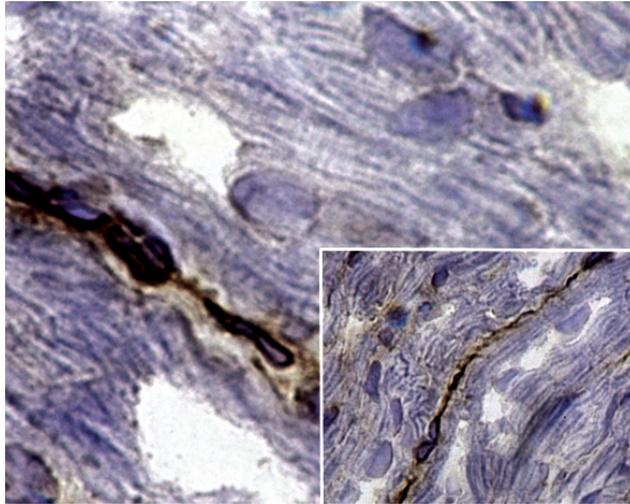


Abb. 15 a:

Immunperoxidase-Färbung;

ICAM-1, Herz; 40 µg α-Toxin pro kg KG (AT 32, Score: 1);

Vergrößerung: großes Bild 40er-Objektiv, eingesetztes Bild 10er-Objektiv;

Die Endothelzellen sind überwiegend hellbraun gefärbt und gut voneinander abzugrenzen.

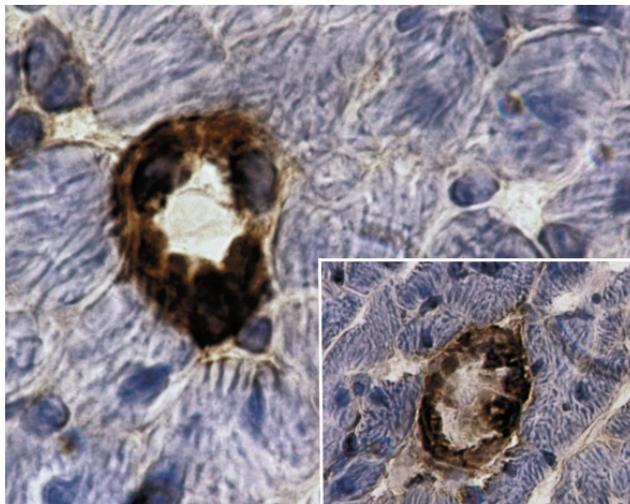


Abb. 15 b:

Immunperoxidase-Färbung;

ICAM-1, Herz; 20 µg α-Toxin pro kg KG (AT 35; Score: 3);

Vergrößerung: großes Bild 40er-Objektiv eingesetztes Bild 10er-Objektiv;

Die Endothelzellen stellen sich als überwiegend dunkelbraunes Band dar. Sie sind teilweise noch als Einzelzellen zu erkennen.

Bei diesem Tier ist deutlich mehr ICAM-1 vorhanden als bei AT 32 in Abb. 15 a.

3.2.1.5.3.2. NO-Synthasen

Außerdem wurden die NO-Synthasen eNOS und iNOS bestimmt, da ihr Produkt, das NO, bedeutsam auf das Geschehen im Gefäß einwirken kann (Vasodilatation, Hemmung der Leukozytenadhäsion und Plättchenaggregation). In der Sepsis wird ihm eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Hypotension zugeschrieben.

eNOS

Bei der eNOS-Färbung von Herz und Lunge konnten keine gruppenspezifischen Tendenzen ermittelt werden.

Bei der Untersuchung des Darmes waren in den toxinbehandelten Gruppen mehr Tiere ohne eNOS-Nachweis als in der Kontrollgruppe (Tab. 5 a).

Gruppe	Tier	eNOS <i>Herz</i>	eNOS <i>Lunge</i>	eNOS <i>Darm</i>
0 µg α-Toxin	AT 11	n.d.	1	0
	AT 17	1	1	1
	AT 24	1	0	1
	AT 25	1	1	1
	AT 30	1	1	1
20 µg α-Toxin pro kg KG	AT 26	1	1	1
	AT 27	2	1	0
	AT 31	0	1	0
	AT 35	0	1	0
	AT 36	1	0	0
40 µg α-Toxin pro kg KG	AT 28	1	1	0
	AT 32	0	1	1
	AT 33	1	1	0
	AT 34	1	1	0
	AT 37	1	1	0
	AT 38	0	1	0
	AT 39	1	2	n.d.

Tab. 5 a: Ausprägung der immunhistochemischen Anfärbung von eNOS in den Endothelzellen von *Herz*, *Lunge* und *Darm* der untersuchten Tiere nach einem Score von 0-4 (vgl. Abb. 14); n.d.= nicht durchgeführt

iNOS

In der Immunhistochemie konnte, wie Tab. 5 b zeigt, bei keinem Tier in einem der untersuchten Organe die Expression von iNOS nachgewiesen werden.

Gruppe	Tier	iNOS <i>Herz</i>	iNOS <i>Lunge</i>	iNOS <i>Darm</i>
0 µg α-Toxin	AT 11	0	0	0
	AT 17	0	0	0
	AT 24	0	0	0
	AT 25	0	0	0
	AT 30	0	0	0
20 µg α-Toxin pro kg KG	AT 26	0	0	0
	AT 27	0	0	0
	AT 31	0	0	0
	AT 35	0	0	0
	AT 36	0	0	0
40 µg α-Toxin pro kg KG	AT 28	0	0	0
	AT 32	0	0	0
	AT 33	0	0	0
	AT 34	0	0	0
	AT 37	0	0	0
	AT 38	0	0	0
	AT 39	n.d.	0	n.d.

Tab. 5 b: Ausprägung der immunhistochemischen Anfärbung von **iNOS** in den Endothelzellen von **Herz**, **Lunge** und **Darm** der untersuchten Tiere nach einem Score von 0-4 (vgl. Abb. 14); *n.d.* = nicht durchgeführt

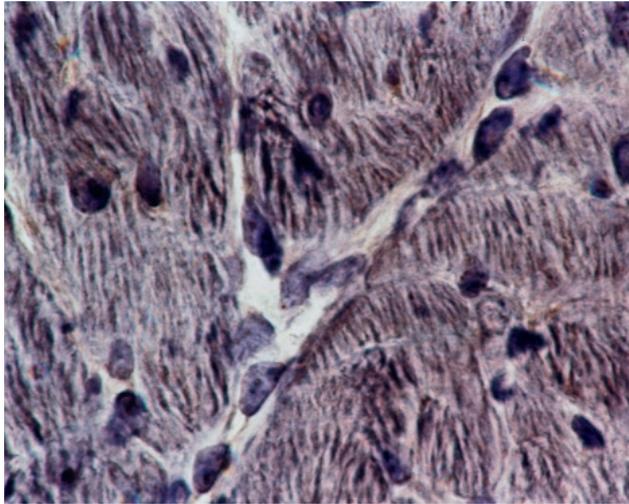


Abb. 16 a: Immunperoxidase-Färbung;
eNOS, Herz; 20 µg α-Toxin pro kg KG (AT 31; Score 0);
40er-Objektiv ;
Sowohl auf der Membran, als auch im Zytoplasma der Endothelzellen
sind nur sehr geringgradige Braunfärbungen zu sehen.

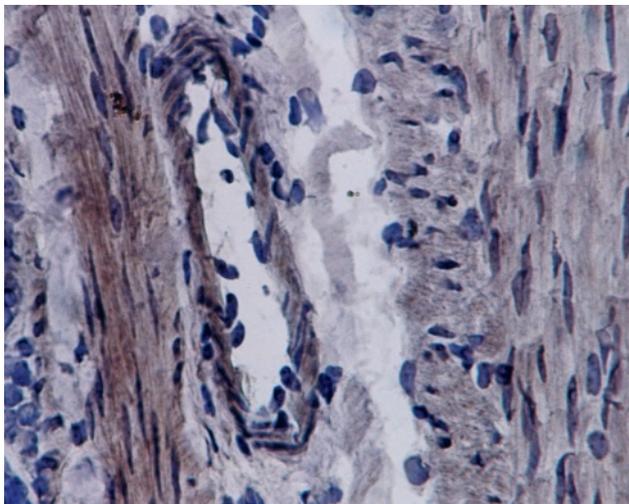


Abb. 16 b: Immunperoxidase-Färbung;
iNOS Darm; 20 µg α-Toxin pro kg KG (AT 27; Score 0);
40er-Objektiv ;
In den Endothelzellen ist INOS nicht nachweisbar.

3.2.1.6. Western-Blot

Da in der Immunhistochemie wenig eNOS und keine iNOS nachgewiesen werden konnte, wurde zu deren Nachweis ein sensitiverer Test, nämlich der Western-Blot, zusätzlich eingesetzt.

eNOS

Im Western-Blot auf eNOS konnten keine eindeutigen gruppenspezifischen Unterschiede festgestellt werden.

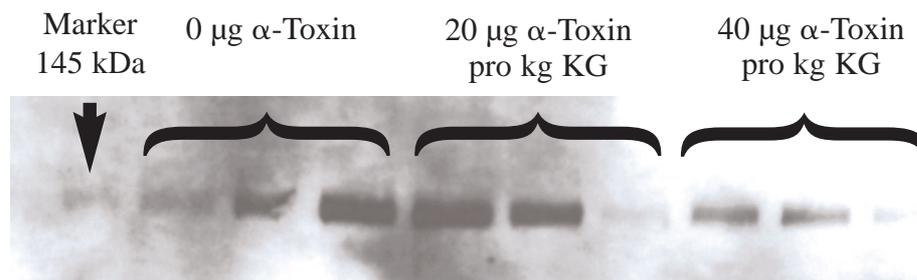


Abb. 17: Western-Blot: eNOS im Homogenat der Lungen von drei Tieren der jeweiligen Gruppe (jede Bande entspricht einem Tier); es sind keine deutlichen gruppenspezifischen Tendenzen zu beobachten.

iNOS

Im Western-Blot konnte, genau wie in der Immunhistochemie, bei keinem Tier in einem der untersuchten Organe iNOS nachgewiesen werden.

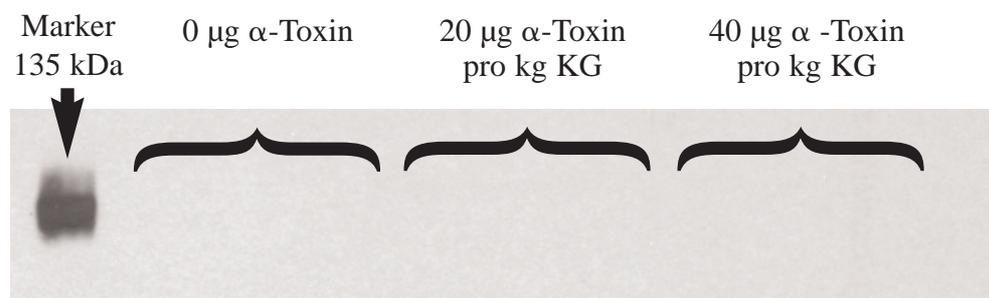


Abb. 18: Western-Blot: iNOS im Homogenat der Herzen von drei Tieren der jeweiligen Gruppe; in keiner Probe kann iNOS nachgewiesen werden.

3.2.2. Einfluß unterschiedlicher Inhibitoren auf die α -Toxin-induzierte Thrombozytenaggregation

Neben den Schädigungen am vaskulären Endothel und den PMN spielt auch der Einfluß von α -Toxin auf die Thrombozyten eine wichtige Rolle bei der Entstehung des septischen Schocks. α -Toxin kann durch Direkteinwirkung eine Thrombozytenaggregation herbeiführen, was in der Sepsis die disseminierte intravasale Gerinnung und den Verschluss der kleinen Blutgefäße verstärkt.

3.2.2.1. Thrombozytenaggregation durch α -Toxin

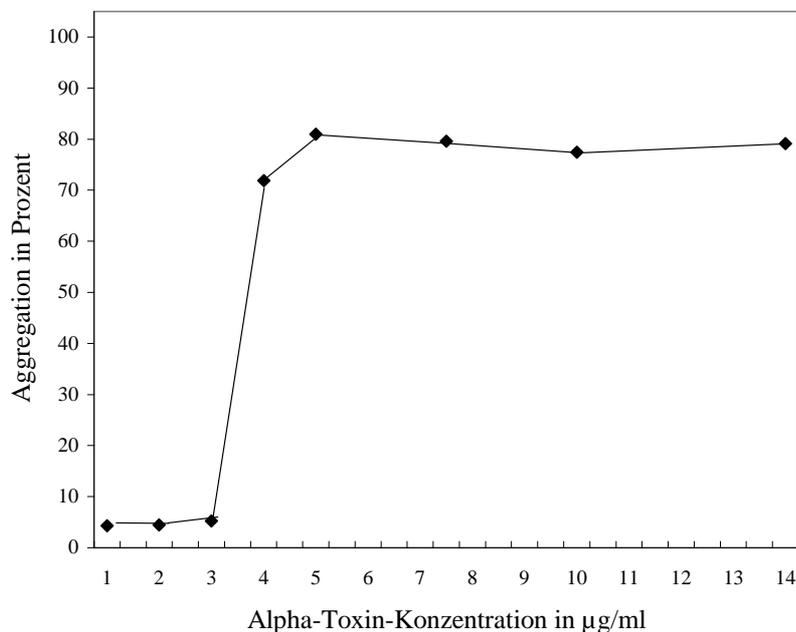


Abb. 19: Thrombozytenaggregation in heparinisiertem Blut, hervorgerufen durch α -Toxin (Darstellung der Mediane)

α -Toxin rief ab Dosen zwischen 3 und 4 $\mu\text{g/ml}$ eine Thrombozytenaggregation hervor. Die Dosis-Wirkungskurve wies eine sigmoide Form mit Höchstwerten bei 80 % Aggregation auf. Die Effektive Dosis (ED_{50}), d.h. die Dosis, die die halbe maximale Aggregation hervorruft, lag bei 3,5 $\mu\text{g/ml}$. In diesem Bereich war die Variabilität der Empfindlichkeit auf α -Toxin im Probandenkollektiv am größten (vgl. Anhang Kap. 8.2., Tab. 8 a).

3.2.2.2. Einfluß unterschiedlicher Inhibitoren auf die α -Toxin-induzierte Thrombozytenaggregation

Im septischen Geschehen kommt es neben einer PMN-Akkumulation auch zur Aktivierung des plasmatischen und auch des korpuskulären Gerinnungssystems. Um dem Mechanismus der Thrombozytenaggregation durch α -Toxin besser zu verstehen, wurden Inhibitoren eingesetzt, die an unterschiedlichen Stellen in die Aggregationskaskade eingreifen.

Iloprost (Prostazyklinanalogon) (Abb. 20 a)

Die Dosis-Wirkungskurve für Iloprost der Thrombozytenaggregation mit ADP war sigmoid und wies einen Aggregationsabfall ab einer Iloprostkonzentration von 3 nmol pro ml auf. Durch ADP war ab einer Iloprostkonzentration von 3 nmol pro ml keine Thrombozytenaggregation mehr auslösbar. Die Aggregation durch α -Toxin konnte durch Iloprost nur um ca. 25 % gehemmt werden, wobei eine sehr hohe Variabilität vorlag (vgl. Anhang Kap. 8.2., Tab. 8 b).

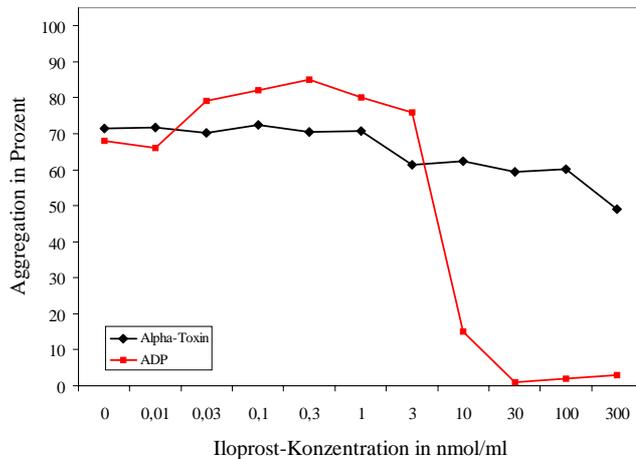


Abb. 20 a: Thrombozytenaggregation durch α -Toxin und ADP inhibiert mit Iloprost (Darstellung der Mediane)

Molsidomin (SIN-1-Metabolit, NO-Donor) (Abb. 20 b)

Es waren große Varianzen zu beobachten (vgl. Anhang, Kap. 8.2., Tab. 8 c). Die Aggregation durch ADP konnte mit Molsidomin um ca. 50 % gehemmt werden. Die Dosis-Wirkungs-Kurve für α -Toxin war schwankend. Die größte Aggregationshemmung, nämlich um 30 %, lag bei 1000 μmol pro ml Molsidomin vor.

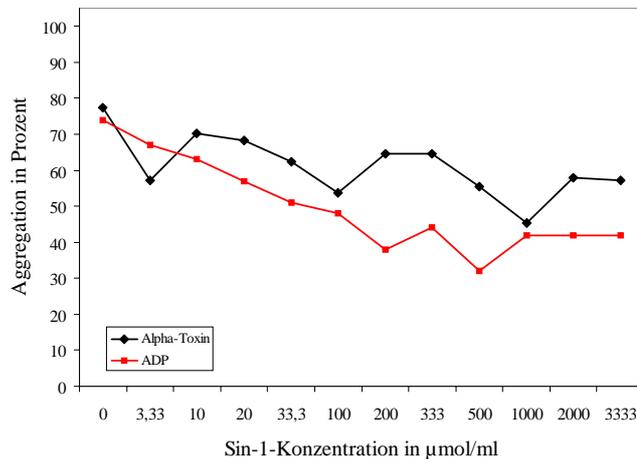


Abb. 20 b: Thrombozytenaggregation durch α -Toxin und ADP inhibiert mit Molsidomin (Darstellung der Mediane)

Indomethacin (Zyklooxygenasehemmer) (Abb. 20 c)

Indomethacin hatte in der Konzentration von 0-100 nmol/ml keinen Einfluß auf die Thrombozytenaggregation durch α -Toxin (vgl. Anhang, Kap. 8.2., Tab. 8 d). Die aggregierende Wirkung von Kollagen wurde ab 3,3 nmol pro ml gehemmt und ab 50 nmol pro ml völlig verhindert.

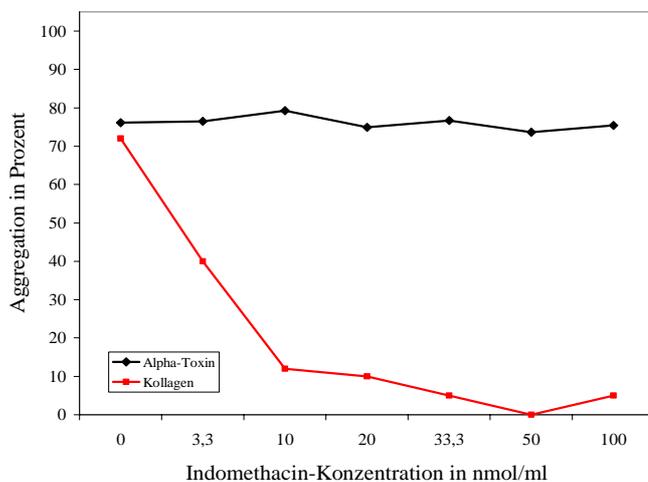


Abb. 20 c: Thrombozytenaggregation durch α -Toxin und Kollagen inhibiert mit Indomethacin (Darstellung der Mediane)

Abciximab (ReoPro[®], monoklonaler Antikörper gegen GPIIb/IIIa-Rezeptor) (Abb. 20 d)

Hier handelte es sich wie beim Iloprost um eine sigmoide Kurve. Es war ein Aggregations-Abfall ab einer Abciximab-Konzentration von 3 μg pro ml zu beobachten. Bei ADP fand ab 10 μg pro ml Abciximab keine Aggregation mehr statt. Die Thrombozytenaggregation durch α -Toxin konnte mit Abciximab nicht sichtbar gehemmt werden (vgl. Anhang Kap. 8.2., Tab. 8 e).

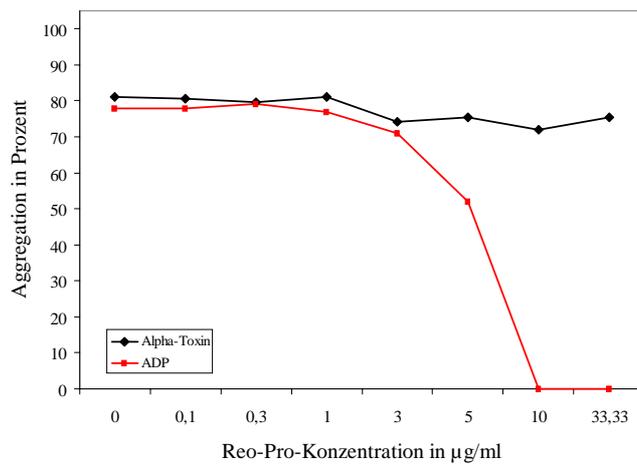


Abb 20 d: Thrombozytenaggregation durch α -Toxin und ADP inhibiert mit Abciximab (Darstellung der Mediane)

4. Diskussion

Im Hauptteil der Arbeit wurden die Auswirkungen einer intraarteriellen Applikation verschiedener Konzentrationen von Staph. aureus α -Toxin an narkotisierte Ratten untersucht. Der Schwerpunkt des Interesses lag dabei auf den zellulären Interaktionen zwischen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen und Thrombozyten.

Zusätzlich wurde *in vitro* die Wirkung von α -Toxin auf humane Thrombozyten untersucht. Durch den Einsatz verschiedener Aggregationshemmer sollte dem Wirkmechanismus des Toxins auf Thrombozyten näher auf den Grund gegangen werden.

4.1. Untersuchungen am Tiermodell Ratte

4.1.1. Hämodynamik

In einem Beobachtungszeitraum von 4 Stunden wurden Kreislaufparameter wie Herzfrequenz, mittlerer arterieller Blutdruck und Hämatokrit der Ratten aufgezeichnet, um sich ein Bild über die Ausmaße des durch das α -Toxin hervorgerufenen Schockgeschehens zu machen.

Nach einer Applikation von 40 μ g α -Toxin pro kg Körpergewicht zeigten die Ratten *in vivo* eine deutliche Kreislaufreaktion. Drei Tiere dieser Gruppe starben bereits in den ersten 25 Minuten nach der Toxingabe und zeigten unmittelbar nach Applikation einen kontinuierlichen Abfall der Herzfrequenz. Bei diesen Tieren war ein direkter Angriff des Toxins auf die Myokardzellen oder die Coronargefäße und ein daraus resultierendes Herzversagen zu vermuten. In einer *in vitro*-Studie an Rattenherzen konnte gezeigt werden, daß α -Toxin eine coronare Vasokonstriktion und direkt myokarddepressive Effekte auslösen kann [Sibeliuss et al., 2000]. Untersuchungen an Schafen zeigten, daß einige der Tiere ab einer Toxindosis von 20 μ g pro kg KG an einem akuten Herzversagen starben und legten die direkte Wirkung des Toxins auf den Herzmuskel und/oder auf die Coronargefäße nahe [Harshman et al., 1992].

Die restlichen 4 Tiere der Gruppe, die 40 μ g α -Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatte, zeigten hämodynamisch ein unterschiedlich stark ausgeprägtes Schockgeschehen.

Initial fiel bei ihnen die Herzfrequenz ab, was sich ebenfalls durch die direkt myokarddepressive Wirkung des Toxins erklären ließe.

Vermutlich durch die periphere Vasodilatation kam es zum Abfall des Gefäßwiderstandes, zu beobachten anhand des sinkenden mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP). Die Vasodilatation wäre durch eine erhöhte NO-Produktion zu erklären [Shan und Bourreau, 2000; Strunk et al., 2001]. α -Toxin steigert in vitro die NO-Produktion in Endothelzellen [Suttorp et al., 1993; Grandel et al., 2001]. In der vorliegenden Versuchsreihe konnte allerdings kein Anstieg der NO-Synthesen beobachtet werden. Ein weiterer Ansatz zur Erklärung der Hypotension wäre die Induktion der PGI₂-Produktion über Stimulation der Arachidonsäurekaskade durch α -Toxin, was ebenfalls in vitro nachgewiesen werden konnte [Grimminger et al., 1997].

Es trat dann eine kompensatorische Erhöhung der Herzfrequenz ein, der Pressure Rate Index, der eine Aussage über die Sauerstoffversorgung des Körpers macht, stieg ebenfalls wieder an. Trotz dieser kompensatorischen Maßnahmen fiel der MAP weiter ab, d.h. es fand keine regulatorische Vasokonstriktion statt. Nur ein Tier aus der Gruppe mit 40 μ g α -Toxin pro kg Körpergewicht überlebte die gesamte Beobachtungszeit. Die großen Unterschiede innerhalb der Gruppe (Überlebenszeiten zwischen 5 und 240 Minuten) können durch unterschiedliche Antikörpertiter gegen das Toxin erklärt werden, die aber aufgrund des hohen damit verbundenen Aufwandes nicht bestimmt wurden. So wurde in einer Studie mit Schafen beobachtet, daß ein direkter Zusammenhang zwischen der im Leben erworbenen Immunität (d.h. α -Toxin-AK-Spiegel im Blut) und der Ausprägung der Reaktion auf Toxingabe besteht [Harshman et al., 1992]. Eine andere Studie zeigte, daß man mit Hyperimmunglobulingaben gegen die Wirkungen des Toxins schützen kann [Bhakdi et al., 1989b].

Es kann also festgehalten werden, daß α -Toxin bei narkotisierten Ratten in einer Dosis von 40 μ g pro kg Körpergewicht intraarteriell im Bolus eine schwere kardiale Dysfunktion mit Entzündungsreaktion im Sinne eines SIRS, vergleichbar mit einer Sepsis durch α -Toxin-produzierende Staph. aureus-Stämme, auszulösen in der Lage ist. Hämodynamisch war zwischen der Kontrollgruppe und den Tieren, die 20 μ g α -Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatten, kein statistisch relevanter Unterschied zu sehen. Sie überlebten alle die Beobachtungszeit und zeigten im Median konstante Herzfrequenz- und MAP-Werte. Hämodynamisch waren also bei Ratten, die 20 μ g α -Toxin pro kg Körpergewicht erhalten haben, keine Anzeichen einer SIRS zu beobachten.

Betrachtet man die Hämatokritwerte im Vergleich, so zeigte sich bei den toxinbehandelten Ratten ein stärkerer Anstieg als bei der Kontrollgruppe.

Die Tiere, die 20 µg α-Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatten, wiesen im Median die stärkste Hämatokriterhöhung auf. Die Tiere aus der Gruppe mit 40 µg α-Toxin pro kg Körpergewicht zeigten im Median einen geringeren Anstieg des Hämatokrit. Bei den Tieren aus dieser Gruppe, die länger als 25 Min. überlebt hatten, war der Hämatokritanstieg jedoch deutlich höher als bei denen, die 20 µg α-Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatten. Das deutet darauf hin, daß die Permeabilitätsstörung der Gefäßwand und der daraus resultierende Hämatokritanstieg positiv mit der Toxinkonzentration und der Einwirkzeit korreliert sind.

Als Ursache für die Schrankenstörung kommt sowohl die direkte Einwirkung von α-Toxin auf das Endothel als auch der Einfluß der durch das Toxin freigesetzten Mediatoren [Grimminger et al., 1997] in Frage. Im Versuch an porcinen Endothelzellen konnte eine direkt durch α-Toxin hervorgerufene Permeabilitätserhöhung durch Zellretraktion und Formation großer interzellulärer Spalten gezeigt werden [Suttorp et al., 1988b]. In perfundierten Kaninchenlungen war ebenfalls eine erhöhte Gefäßpermeabilität nachweisbar [Seeger et al., 1990]. Auch viele Entzündungsmediatoren, wie z.B. TNF-α und PAF, lösen Permeabilitätsstörungen aus [Stephens et al., 1988; Ibbotson et al., 1989].

4.1.2. Zytokinmessungen im Serum

Das Blut für die Zytokinmessungen wurde am Anfang und am Ende der Beobachtungszeit entnommen. Von einer Blutentnahme in größerer Menge zwischendurch wurde abgesehen, um das intravasale Volumen nicht zu stark zu verändern.

Die Messung der Il-1-β-, Il-6- und TNF-α-Konzentration ergab keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. In keiner der drei Gruppen konnte von einem Anstieg gesprochen werden.

In vitro konnte festgestellt werden, daß α-Toxin humane Monozyten zur Freisetzung großer Mengen Il-1β stimulieren kann [Bhakdi et al., 1989a]. Il-1 erreichte nach einer LPS-Stimulation beim Kaninchen nach ca. 3 Stunden sein Maximum [Wakabayashi,

1991], so daß es denkbar ist, daß Il-1 zum Messzeitpunkt schon wieder aus dem Serum verschwunden war.

Auch die Freisetzung von TNF- α aus humanen Monozyten und von Il-6 aus Rattenpneumozyten nach α -Toxin-Stimulation konnte nachgewiesen werden [Bhakdi et al., 1989a; Rose et al., 2002]. Nach einer LPS-Stimulation lag das TNF- α -Maximum beim Menschen in einem Zeitrahmen von 1,5-2 Stunden, nach 4 Stunden war fast nichts mehr nachzuweisen [Hesse, 1988; Michie, 1988]. Es gibt aber auch Studien, die bei septischen Patienten keine erhöhten TNF- α -Werte zeigen konnten [Bone et al., 1991]. Il-6 erreicht sein Maximum in Studien am Menschen erst 6 Stunden nach der Stimulation [Fisher, 1993]. Es liegt also im Rahmen des Möglichen, daß zum Messzeitpunkt nach 4 Stunden die untersuchten Zytokine nicht maximal freigesetzt waren, aber dennoch im Verlauf des Schockgeschehens irgendwann ausgeschüttet worden sind. Um nachzuweisen, daß bei Ratten im α -Toxin-induzierten Schock überhaupt kein Il-1- β , Il-6 und TNF- α freigesetzt wird, müssten Messungen über den gesamten Untersuchungszeitraum durchgeführt werden. Für TNF- α konnte bereits eine kausale Beteiligung am septischen Schock nachgewiesen werden (Koch-Dale-Kriterien, vgl. Literaturübersicht, Kap. 2.1.3.), bei Il-1- β und Il-6 ist dies noch nicht gesichert [Neugebauer et al., 1995].

4.1.3. Myeloperoxidaseaktivität in den Organen

Die Myeloperoxidaseaktivität in den Organen der mit α -Toxin behandelten Tiere war deutlich höher als bei den Kontrolltieren. Daraus lässt sich schließen, daß bei den Toxintieren eine vermehrte Leukozytenwanderung in die Gewebe stattgefunden hat [Klebanoff, 1999]. Auch in anderen Studien konnte eine Steigerung der PMN-Akkumulation infolge der α -Toxin-Einwirkung festgestellt werden: an Rattenaorten [Buerke et al., 2002], an humanen Endothelzellen [Krull et al., 1996] und an isolierten Rattenherzen [Grandel et al., 2002]. In all diesen Studien stand die PMN-Akkumulation im Zusammenhang mit einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen, was in dieser Arbeit dazu bewogen hat, ICAM-1 und P-Selektin näher zu untersuchen.

Bei der differenzierten Betrachtung der Myeloperoxidasegehalte in den verschiedenen Organen ergab sich, daß bei Herz und Lunge der Tiere, die 20 μ g α -Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatten, im Median die höchsten MPO-Gehalte erreicht wurden.

Bei den Ratten, die 40 µg α-Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatten, zeigten die 4 Tiere, die länger überlebt haben auch höhere MPO-Werte. Das deutet darauf hin, daß die Einwirkzeit des Toxins mit dem Ausmaß der Leukozyteninvasion positiv korreliert ist.

Allerdings gab es dabei Ausnahmen, so z.B. das Tier aus der Gruppe mit 40 µg α-Toxin pro kg Körpergewicht, das den gesamten Untersuchungszeitraum überlebt hatte. Es unterschied sich, was die MPO-Gehalte betrifft, nicht wesentlich von den Tieren, die 20 µg α-Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatten. Mögliche Erklärung dafür wäre, daß das Ausmaß der Leukozytenakkumulation durch α-Toxin nicht von der Dosis abhängig ist. Dies widerspricht jedoch Studien, die genau diesen Zusammenhang gezeigt haben [Krull et al., 1996; Buerke et al., 2002]. Denkbar wäre auch, daß bei den gewählten Toxindosen schon das Maximum der Endothelzellaktivierung erreicht ist. Die verhältnismäßig geringe Leukozyteninfiltration bei dieser Ratte könnte auch durch vorherige Kontakte mit α-Toxin erklärt werden, d.h. daß das Tier einen relativ hohen Antikörpertiter besaß und daher eine bessere Immunität als die anderen Tiere aufwies [Harshmann et al., 1992; Bhakdi et al., 1989b].

Im Darm allerdings zeigte die Gruppe, die 40 µg α-Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatte, die höchsten MPO-Gehalte, wobei keine Abhängigkeit vom Todeszeitpunkt zu beobachten war.

4.1.4. Histopathologische Befunde

4.1.4.1. H.E.-Färbung der Herzen

Die zum Teil sehr kurzen Überlebenszeiten der Ratten legen einen direkten Einfluß von α-Toxin auf das Myokard nah, was eine histologische Betrachtung des Herzens in den Blickpunkt des Interesses rückt.

In den Herzen konnten bei den toxinbehandelten Tieren im Gegensatz zu den Kontrolltieren Myokardnekrosen festgestellt werden. D.h., durch die Toxineinwirkung sind Herzmuskelzellen zugrunde gegangen. Das Ausmaß der Herzmuskelfasernekrosen scheint um so größer zu sein, je länger die Einwirkzeit des Toxins (d.h. die Überlebenszeit des Tieres) ist.

Als Ursache für diese Veränderungen kommt die direkte Einwirkung von α-Toxin auf die Kontraktilität der Herzmuskelzellen und der Coronargefäße in Frage [Sibeliuss et al.,

2000]. Es kommt zu einer Vasokonstriktion der Coronargefäße und damit zu einer Ischämie im Herzmuskel. Daß auch die Tiere mit 40 µg α-Toxin pro kg Körpergewicht, die nur wenige Minuten überlebt haben, deutliche Nekrosen im Herzmuskel aufwiesen, belegt die Direkteinwirkung des Toxins, da in diesen Fällen kaum Zeit zur Mediatoreinwirkung oder sonstigen Folgewirkungen blieb.

Bei den Tieren mit längerer Überlebenszeit kommen noch andere mögliche Ursachen für die Nekrose der Herzmuskelzellen in Frage. Der Anstieg der MPO-Werte weist auf eine verstärkte PMN-Infiltration hin, welche durch den „oxidative Burst“ Organschäden auslösen kann. In einer Studie konnte nahegelegt werden, daß an α-Toxin-perfundierten Rattenherzen durch einwandernde PMNs eine Herzdysfunktion hervorgerufen wird [Grandel et al., 2002].

Weitere mögliche Ursachen für die Myokardnekrosen sind die im Lauf der Sepsis freigesetzten Mediatoren [Kumar et al., 1996] und die Anstrengung des Herzmuskels, der versucht, den Blutdruckabfall zu kompensieren und die O₂-Versorgung der Organe aufrecht zu erhalten [Dhainaud, 1988].

In der histologischen Untersuchung der Herzen konnten allerdings im Widerspruch zu allen anderen Untersuchungen dieser Arbeit (Anstieg der MPO und der Adhäsionsmoleküle) im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht mehr PMNs gefunden werden. Um ganz sicher zu gehen, daß eingewanderte PMN deutlich sichtbar werden, wurde auch die Naphthol-ASD-Chlorazetatesterase-Färbung hinzugezogen, die deren Zytoplasma leuchtend orange erscheinen lässt. Auch diese brachte nicht mehr PMN zum Vorschein.

Die hohen MPO-Gehalte in Verbindung mit dem nicht Vorhandensein von PMN wären dadurch zu erklären, daß Zellen Myeloperoxidase nach außen abgeben können, wenn ein löslicher Stimulus oder eine Antikörper/Komplement-besetzte Fläche oder ein Organismus, der zu groß ist zum Verdauen, vorliegt [Klebanoff, 1999]. α-Toxin wäre als löslicher Stimulus zu verstehen. Als Ursache für die erhöhten MPO-Werte bei den toxinbehandelten Tieren wäre ebenso denkbar, daß eine Leukozytose bzw. Granulozytose, hervorgerufen durch die Toxineinwirkung, vorlag. Allein ein Anstieg dieser Zellen im Blut könnte einen MPO-Anstieg in den ungespülten Organen bewirken.

4.1.4.2. Nachweis der Adhäsionsmoleküle in der Immunhistochemie

Mittels Immunhistochemie wurde die Expression von Adhäsionsmolekülen, die die Migration der Leukozyten in die Gewebe vermitteln, untersucht.

Insgesamt ist bei den Gruppen, die α -Toxin erhalten haben, vermehrt P-Selektin auf der Oberfläche der Endothelzellen vorhanden. In den Herz- und v.a. in den Lungengefäßen der Tiere, die 40 μ g α -Toxin pro kg Körpergewicht erhalten haben, ist der P-Selektin-Anstieg sehr stark ausgeprägt. Das ist möglich, da P-Selektin aus den Weibel-Palade-Körperchen sehr schnell innerhalb von 10 bis 20 Minuten translociert werden kann und nicht wie ICAM-1 erst neu synthetisiert werden muß [Armstead, 1997; Okada, 1997].

Analog zum hier beobachteten P-Selektin-Anstieg konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, daß α -Toxin-Stimulation von Endothelzellen auf deren Oberfläche ein P-Selektin-Shedding hervorruft [Krull et al., 1996, Prüfer et al., 2002] bzw., daß man mit monoklonalen Antikörpern gegen P-Selektin den gefäßschädigenden Effekt von α -Toxin signifikant reduzieren kann [Buerke et al., 2002]. Reperfusionstudien an Katzenherzen haben gezeigt, daß durch Ausschaltung von P- und L-Selektin cardioprotektive Effekte erreicht werden [Buerke et al., 1994a und b].

Mit der vermehrten P-Selektin Translokation auf die Oberfläche der Endothelzellen in den Organen von Ratten, die α -Toxin erhalten haben, ist die Grundlage für den ersten Schritt der Leukozytenmigration, das Rolling, gelegt. Rolling wird im frühen Entzündungsstadium über P-Selektin vermittelt [Hogg, 1992].

Auffällig ist auch hier wieder, daß, anders als bei der Myeloperoxidase, im Darm bei Gruppe 20 die höchste P-Selektin-Expression festgestellt wurde.

Der immunhistochemische Nachweis von ICAM-1 ergab bei den Herzen der Ratten, die 20 μ g α -Toxin erhalten hatten, ein Abweichen von den Basalwerten nach oben. Analog dazu konnte in einer Studie an α -Toxin-perfundierten Rattenherzen ebenfalls eine verstärkte Expression von ICAM-1 gezeigt werden [Grandel et al., 2002].

Auch das Tier aus Gruppe 40, das die gesamte Beobachtungszeit überlebt hatte, wies als einziges in seiner Gruppe eine vermehrte ICAM-1-Expression an den Gefäßen des Herzens auf. Diese Beobachtungen stimmen mit vorherigen Studien überein, die gezeigt haben, daß die ICAM-1-Oberflächenexpression erst 4 Stunden nach Eintritt des Stimulus beginnt [Pober und Cotran, 1991]. Bei den toxinbehandelten Ratten, die die gesamte Beobachtungszeit überlebt hatten, wären also die Voraussetzungen für eine Leukozytenakkumulation im Herzmuskelgewebe gegeben. ICAM-1 ist nämlich neben

anderen Mitgliedern der Immunglobulinsuperfamilie für die Adhäsion und Migration der Leukozyten zuständig [Malik und Wang, 1991]. Daß in den histologischen Gewebsschnitten keine PMN zu sehen waren, könnte auch darin begründet sein, daß zwar schon Adhäsionsmoleküle exprimiert sind, aber die Zeit für eine Zelldiapese noch zu kurz war.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen an Rattenorganen konnte eine Untersuchung an humanen Endothelzellen keinen Anstieg der ICAM-1-Expression nach Stimulation mit α -Toxin nachweisen [Krull et al., 1996; Pruefer et al., 2002]. Es ist denkbar, daß es vom Organ und von der untersuchten Spezies abhängt, ob und bis wann α -Toxin die Expression von ICAM-1 zu stimulieren vermag.

4.1.4.3. Untersuchung der NO-Synthasen in Immunhistochemie und Western-Blot

Um der bei den exotoxinbehandelten Ratten entstehenden Hypotension auf den Grund zu gehen, war die Bestimmung der NO-Synthasen naheliegend, da NO selbst eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt und daher schwierig zu messen ist.

Weder in der Kontrollgruppe noch in den toxinbehandelten Tiergruppen war eine Steigerung der Expression der NO-Synthasen eNOS und iNOS zu beobachten. Es war auch keine Umverlagerung der eNOS in dem Sinn zu beobachten, daß bei den toxinbehandelten Ratten mehr eNOS im Zytoplasma zu finden gewesen wäre als an der Zellmembran. Das bedeutet, daß auch nicht von einer Aktivierung der vorhandenen eNOS zu sprechen ist [Förstermann et al., 1991]. Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen ergab sich kein Hinweis, daß im septischen Schock eine erhöhte NO-Produktion stattfindet.

Zu dieser Beobachtung stehen viele Studien im Widerspruch. Es wird vermutet, daß NO eine essentielle Rolle bei der Entstehung der Hypotension in der Sepsis spielt [Schoenberg et al., 1995]. *In vitro* konnte häufiger gezeigt werden, daß α -Toxin in Endothelzellen die NO-Produktion steigert [Suttorp et al., 1993; Grandel et al., 2001]. Anzunehmen ist, daß α -Toxin die eNOS-Aktivität durch den Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} erhöht [Förstermann et al., 1991; Pollock et al., 1991]. Bestätigend haben Untersuchungen an isolierten Rattenherzen ergeben, daß eine Perfusion mit α -Toxin die eNOS-Expression steigert, wobei die iNOS unverändert bleibt [Grandel et al., 2001].

Zusammenfassend ist in den vorliegenden Untersuchungen über den α -Toxin-induzierten Schock bei der Ratte folgendes zu schließen:

Die Tiergruppe, die α -Toxin in hoher Dosierung (40 μ g α -Toxin pro kg Körpergewicht) erhalten hatte, zeigte in vivo deutliche Anzeichen eines SIRS, jedoch geringere Organschäden als die Gruppe, die weniger α -Toxin (20 μ g α -Toxin pro kg Körpergewicht) erhalten hatte. Bei hoher Toxingabe ist mit einem schnellen Tod durch die direkte Wirkung des Toxins auf das Herz zu rechnen, so daß die Zeit zur Ausprägung des Vollbildes des Kreislaufschocks nicht ausreicht.

Die Tiergruppe, die α -Toxin in geringerer Dosierung erhalten hatte, wies klinisch keine Anzeichen eines SIRS auf, hatte jedoch deutliche Organschäden. Hier ist der Verlauf schleichender, so daß sich langsamer entwickelnde Veränderungen manifest werden können.

Die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen lässt diese zum interessanten Zielpunkt für Therapieansätze werden. Vor allem P-Selektin, dessen Vorhandensein in beiden Gruppen, besonders aber in der Gruppe mit der hohen α -Toxin-Dosierung, erhöht war, könnte ein wichtiger Angriffspunkt für einen therapeutischen Eingriff in das Schockgeschehen sein. Weiterführend sollte am Tiermodell dem gewebeprotectiven Effekt von Antikörpern gegen P-Selektin und ICAM-1 auf den Grund gegangen werden.

Es wird schwierig bleiben, einer Einwirkung von α -Toxin in hohen Dosierungen entgegenzuwirken, da der Krankheitsverlauf sehr schnell sein kann. Das Toxin bindet direkt an die Zellen und entfaltet somit umgehend seine myokarddepressive Wirkung.

4.2. Einfluß unterschiedlicher Inhibitoren auf die α -Toxin-induzierte Thrombozytenaggregation

Da vom ursprünglichen Versuchstier Ratte nur geringe Blutmengen gewonnen werden können und vorerst Wege für die Bekämpfung der Sepsis in der Humanmedizin gesucht werden, wurde in der jetzt zu diskutierenden Versuchsreihe humanes Blut untersucht.

Bei einer SIRS, ausgelöst durch α -Toxin, werden die Thrombozyten direkt durch das Toxin, aber zusätzlich im Zuge des Schockgeschehens auch durch die freigesetzten Mediatoren, aktiviert. Ziel der Untersuchungen war es, den Einfluß verschiedener thrombozytenaggregationshemmender Substanzen auf die α -Toxin-induzierte Thrombozytenaggregation herauszufinden.

Bestätigend zu vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß α -Toxin *in vitro* eine Aggregation humaner Thrombozyten herbeiführt [Bhakdi et al., 1988]. α -Toxin-Monomere schließen sich in der Zellmembran zu Hexameren zusammen, die eine Ca^{2+} -Pore bilden [Reichwein et al., 1987; Bhakdi und Trantum-Jensen, 1991]. Entlang des Konzentrationsgefälles findet ein Ca^{2+} -Influx aus dem Extrazellulärraum statt. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration und Stimulierungsgrad des Thrombozyten [Gawaz, 1999]. Die Bindung von Fibrinogen an das GPIIb/IIIa ist streng abhängig von Ca^{2+} . Unter anderem bewirkt Ca^{2+} ab gewissen Konzentrationen eine Formveränderung der Thrombozyten und bringt die Arachidonsäurekaskade in Gang [Gawaz, 1999]. D.h. es kommt zur Aggregation der Thrombozyten.

Von den verwendeten Inhibitoren war keiner in der Lage, die durch α -Toxin ausgelöste Thrombozytenaggregation zu hemmen.

Iloprost ist ein Prostazyklinanalogon. Es senkt antagonistisch zu TXA_2 über eine Steigerung des cAMP das intrazelluläre Ca^{2+} [Steurer et al., 1988], d.h., der Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern wird entgegengewirkt. Der α -Toxin-induzierte Ca^{2+} -Einstrom erfolgt jedoch aus dem Extrazellulärraum. Sollte das Iloprost eine Aufnahme des einströmenden Ca^{2+} in die intrazellulären Speicher bewirken, so wird das Konzentrationsgefälle einen stetigen Neueinstrom von außen aufrechterhalten. Das Iloprost ist machtlos gegen den massiven Ca^{2+} -Einstrom. Daher kann es, wie aus den vorliegenden Untersuchungen ersichtlich, nur in sehr hohen Dosierungen eine geringgradige Aggregationshemmung herbeiführen.

Ähnlich wie mit Iloprost verhält es sich mit Sin-1 (Molsidomin): In sehr hohen Dosierungen wird nur eine geringgradige Hemmung der durch α -Toxin hervorgerufenen Thrombozytenaggregation bewirkt. Bei Sin-1 handelt es sich um einen NO-Donor, d.h., es setzt spontan NO frei [Yamamoto und Bing, 2000]. NO aktiviert die Guanylatzyklase, cGMP steigt [Ignarro, 1991; Mellion et al., 1981]. Dadurch wird das intrazelluläre Ca^{2+} gesenkt. Ähnlich wie das Iloprost kann auch Sin-1 dem massiven Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum nicht entgegenwirken. Es konnte in der vorliegenden Untersuchung keine mit anderen Studien vergleichbare Hemmung der ADP-induzierten Aggregation durch SIN-1 gezeigt werden [Yamamoto und Bing, 2000; Salvemini et al., 1996].

Indomethacin, ein Zykllooxygenasehemmer, hemmt die Thrombozytenaggregation durch α -Toxin in keiner Dosierung. Daß die α -Toxin-induzierte Thrombozytenaggregation am Zykllooxygenaseweg vorbeigeht, haben auch schon einige vorangehende Studien gezeigt [Bhakdi et al., 1988; Arvand et al., 1990]. In einer Studie, in der Thrombozyten mit Komplementfaktoren (davon fungieren auch einige, ähnlich dem α -Toxin, als Porenbildner) aktiviert wurden, war ein Hemmer der Proteinkinase C wirksam, Zykllooxygenaseinhibitoren jedoch nicht. Daraus wurde geschlossen, daß das Feedback durch Thromboxan (dieses entsteht auf dem Zykllooxygenaseweg) nicht erforderlich ist für die Thrombozytenaktivierung durch Komplementfaktoren [Wiedmer et al., 1987]. Ein analoger Schluß wäre im Fall des α -Toxin ebenfalls denkbar.

Selbst ReoPro[®], welches sich als Antikörper auf den GPIIb/IIIa-Rezeptor setzt [Darius und Grosser, 1998] und somit die einzige mögliche Bindungsstelle zwischen zwei Thrombozyten blockiert, vermag die α -Toxin-induzierte Thrombozytenaggregation nicht zu hemmen. Durch erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} kommt es zu einer Konformationsänderung des GPIIb/IIIa-Rezeptors in den hochaffinen Zustand [Darius und Grosser, 1998]. D.h., die Thrombozyten binden über Fibrinogenbrücken aneinander. Die Brückenbildung zwischen den Plättchen steht am Anfang des Adhäsions- und Aggregationsprozesses. Es ist mit dem bisherigen Wissen nicht zu erklären, wie α -Toxin einen Antikörper, der den GPIIb/IIIa-Rezeptor blockiert, umgeht und eine Aggregation der Thrombozyten auslöst.

Für die Zukunft wäre es interessant, dem Unvermögen von ReoPro[®], die α -Toxin-induzierte Aggregation zu hemmen, näher auf den Grund zu gehen. Auch die

Überprüfung von Inhibitoren der Arachidonsäure-Kaskade an früherer Stelle als die Zyklooxygenase, z.B. die von Proteinkinase C-Hemmern, könnte erfolgversprechend sein [Wiedmer *et al.*, 1987]. Selbst Antikörper gegen α -Toxin hemmten die Aggregation nur, wenn sie mit dem Toxin vorinkubiert wurden [Bhakdi *et al.*, 1988]. In der Praxis müsste der Patient die Antikörper also erhalten, bevor er mit α -Toxin Kontakt hat.

Humane Thrombozyten reagieren sehr stark auf α -Toxin. Es handelt sich um eine „Alles-oder-nichts-Antwort“, d.h. es besteht ein schmaler Wirkungsbereich zwischen Aggregationsbeginn und maximaler Aggregation. Das bedeutet für die α -Toxin-SIRS beim Menschen, daß schon allein durch das Toxin eine sehr starke disseminierte intravasale Gerinnung ausgelöst wird [Bhakdi *et al.*, 1988], deren Hemmung bei der Bekämpfung der Sepsis ein wichtiger Schritt nach vorn wäre. Da unterschiedliche Zellen verschiedener Spezies in ihrer Empfindlichkeit dem Toxin gegenüber sehr stark variieren [Hildebrand *et al.*, 1991], bleibt herauszufinden, wie wichtig die Thrombozyten bei der α -Toxin-induzierten SIRS der einzelnen Tierarten sind.

5. Zusammenfassung

1. Im Literaturteil wird ein Überblick über Vorkommen, Klinik und Pathogenese der Sepsis gegeben. Besonders berücksichtigt wird das durch *Staphylococcus aureus* α -Toxin induzierte SIRS (systemic inflammatory response syndrome) als Modell für eine Sepsis durch α -Toxin-bildende *Staphylococcus aureus*-Stämme.

Weitere Schwerpunkte bilden die Interaktionen von Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten sowie die Thrombozytenaggregation und die Auswirkungen von α -Toxin auf diese Mechanismen.

2. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Auswirkung verschiedener α -Toxin-Dosierungen (20 und 40 μg α -Toxin pro kg Körpergewicht) an einem Tiermodell mit Sprague Dawley Ratten untersucht. *In vivo* wurde über eine Beobachtungszeit von 4 Stunden alle 20 Minuten Herzfrequenz, mittlerer arterieller Blutdruck und Pressure Rate Index aufgezeichnet und stündlich der Hämatokrit bestimmt. Im Blutserum, gewonnen vor Toxingabe und am Ende der Beobachtungszeit, wurde eine Bestimmung der Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 durchgeführt. In Herz, Lunge und Darm wurde die Myeloperoxidaseaktivität bestimmt. Außerdem wurden von den entnommenen Organen Gefrierschnitte angefertigt. Mithilfe der H.E.-Färbung wurden die morphologischen Veränderungen an den Herzen untersucht. Um einen vergleichenden Überblick über die Expression von Adhäsionsmolekülen (P-Selektin und ICAM-1) und der NO-Synthasen (eNOS und iNOS) zu erhalten, wurde eine Immunperoxidasefärbung von Herz, Lunge und Darm angefertigt. Die NO-Synthasen wurden zusätzlich im Western-Blot bestimmt.

3. Im zweiten Teil der Arbeit wurde mithilfe einer nephelometrischen Relativmessung die inhibitorische Auswirkung von Iloprost, Sin-1[®] (Molsidomin), Indomethacin und Reo-Pro[®] (Abciximab) auf die α -Toxin-induzierte Aggregation humaner Thrombozyten untersucht.

4. Die Ratten, die 40 μg α -Toxin pro kg Körpergewicht erhalten hatten, zeigten *in vivo* im Gegensatz zu denen mit der geringeren Toxindosis (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG) deutliche Anzeichen einer SIRS mit z.T. sehr kurzer Überlebenszeit. Erhöhte Myeloperoxidasegehalte bei den Tieren, die α -Toxin erhalten hatten, wiesen auf eine vermehrte PMN-Infiltration in Herz, Lunge und Darm hin. Diese konnte allerdings

morphologisch auch nach histochemischer Darstellung der Granulozyten mittels Naphthol-ASD-Chlorazetatesterase-Färbung nicht bestätigt werden. Morphologische Veränderungen am Herzen (Nekrosen) waren bei allen toxinbehandelten Tieren vorhanden, bei denen mit längerer Überlebenszeit jedoch ausgeprägter. Bei den Toxintieren konnte eine im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Expression der Adhäsionsmoleküle P-Selektin und ICAM-1 festgestellt werden. Weder der Zytokingehalt im Serum noch die NO-Synthasen wiesen bei den Ratten, die α -Toxin erhalten hatten, eine Veränderung gegenüber den Kontrolltieren auf.

5. α -Toxin löst bei Ratten in einer Dosierung von 40 μg pro kg Körpergewicht ein SIRS aus und kann durch direkte Effekte auf Coronargefäßen und Myokard einen sehr schnellen Tod durch Herzversagen herbeiführen. Bei einer Dosierung von 20 μg pro kg Körpergewicht werden *in vivo* keine Anzeichen einer SIRS und in der Histologie starke Myokardnekrosen beobachtet. Der Verlauf ist schleichender, so daß sich langsamer entwickelnde Veränderungen manifest werden können.

6. Mit α -Toxin in einer effektiven Dosis von ca. 3,5 μg pro ml konnte eine Aggregation humaner Thrombozyten herbeigeführt werden. Keiner der eingesetzten Inhibitoren konnte die α -Toxin-induzierte Thrombozytenaggregation vollständig hemmen. ReoPro, Iloprost und Sin-1 führten auch in sehr hohen Dosierungen nur zu einer schwachen Aggregationshemmung. Indomethacin hatte keinen inhibitorischen Effekt.

7. α -Toxin bewirkt durch Porenbildung in der Zellmembran einen extrem starken Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum. Aus diesem Grund können Inhibitoren, die über „second messenger“ Systeme das intrazelluläre Ca^{2+} senken (Prostaglandinanalogen Iloprost, NO-Donor Sin-1), die α -Toxin-induzierte Thrombozytenaggregation nur unwesentlich hemmen.

Die α -Toxin-induzierte Thrombozytenaggregation ist nicht auf das Feedback durch Thromboxan (dieses entsteht auf dem Zyklusoxigenaseweg) angewiesen. Deshalb sind Zyklusoxigenaseinhibitoren wie Indomethacin in diesem Fall unwirksam.

Warum ReoPro[®], das sich als Antikörper direkt auf die einzige bekannte Bindungsstelle zwischen zwei Thrombozyten (GPIIb/IIIa-Rezeptor) setzt, keinen Einfluß auf die Thrombozytenaggregation durch α -Toxin hat, ist mit bisherigem Wissen nicht zu erklären.

8. Auf der Basis dieser Arbeit tun sich noch viele Fragen auf. Im Tiermodell wäre herauszufinden, inwiefern Antikörper gegen P-Selektin und ICAM-1 das Krankheitsgeschehen beeinflussen können. Auch besteht die Frage weiterhin, woher die Hypotension kommt, wenn nicht durch NO. Ein Ansatz wäre hier die Untersuchung der PGI₂(Prostazyklin)-Freisetzung. Dem chronologischen Verlauf der Zytokinfreisetzung müsste ebenfalls genauer auf den Grund gegangen werden, um auch auf dieser Basis einem Therapiekonzept näher zu kommen.

Ganz wichtig ist auch die zukünftige Überprüfung der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Tierarten und den Menschen, da unterschiedliche Zellarten unterschiedlicher Spezies sehr verschieden auf α -Toxin reagieren.

Da humane Thrombozyten sehr empfindlich auf α -Toxin reagieren, ist die Hemmung der Thrombozytenaggregation in der α -Toxin-induzierten SIRS beim Menschen ein sehr wichtiger Aspekt. Weiterführend wäre es sinnvoll, die Wirkung von Inhibitoren, die früher in der Arachidonsäurekaskade ansetzen als Zyklooxygenasehemmer, zu untersuchen. Auch die Aufklärung des Mechanismus der Thrombozytenaggregation durch α -Toxin in Anwesenheit eines Antikörpers, der sich auf die einzige bekannte Bindungsstelle zwischen zwei Thrombozyten (GPIIb/IIIa-Rezeptor) setzt, beispielsweise ReoPro[®], könnte auf neue Wege führen.

6. Summary

1. In the literature section an overview is given of incidence, clinical signs and pathogenesis of sepsis. Particular attention is paid to SIRS (systemic inflammatory response syndrome) induced by the staphylococcus aureus α -toxin as a model for sepsis caused by α -toxin forming strains of staphylococcus aureus.

Other main focuses are the interaction of endothelial cells and neutrophil granulocytes, as well as platelet aggregation and the effects of α -toxin on these mechanisms.

2. In the first section of the thesis the effect of various dosages of α -toxin (20 and 40 μ g α -toxin per kg body weight) on an animal model were investigated using Sprague Dawley rats. Over an observation period of 4 hours *in vivo* heart rate, mean arterial blood pressure and pressure rate index were recorded every 20 minutes and haematocrit level determined hourly. The level of cytokines, TNF- α , IL-1 β and IL-6 were measured in blood serum taken before administration of the toxin and at the end of the observation period. Myeloperoxidase activity was measured in heart, lung and intestines. In addition, frozen sections of the removed organs were prepared. HE staining was used to determine morphological changes of the heart. In order to obtain a comparable overview of the expression of adhesion molecules (P-selectin and ICAM-1) and NO-synthases (eNOS and iNOS), an immunoperoxidase staining of heart, lung and intestines was performed. NO-synthases were also demonstrated using western blotting.

3. In the second section of the thesis the inhibiting effect of Iloprost, SIN-1[®] (molsidomin), Indomethacin and Reo-Pro[®] (abciximab) on the α -toxin induced aggregation of human platelets was investigated using relative nephelometric measurements.

4. The rats who were given 40 μ g α -toxin per kg body weight showed clear signs of SIRS *in vivo*, unlike those given the lower toxin dose (20 μ g per kg body weight), and, in some, survival time was very limited. Increased levels of myeloperoxidase in the animals given α -toxin indicated increased PMN infiltration of heart, lung and intestines. It was, however, not possible to obtain morphological confirmation of this, even by histochemical depiction of the granulocytes using naphthol ASD chloracetate esterase

staining. Morphological changes to the heart (necrosis) were to be seen in all animals given the toxin, but were more extensive in those with a longer survival time. Compared to the control group, the toxin animals were found to have increased expression of the adhesion molecules P-selectin and ICAM-1. There was no change either in the cytokine level in the serum or the NO-synthases of the rats who received the α -toxin in comparison to the control animals.

5. α -toxin causes SIRS in rats at a dosage of 40 μ g per kg body weight and can, in the case of direct effects on coronary vessels and the myocardium, lead to very rapid death through heart failure. At a dosage of 20 μ g per kg body weight there is no indication of SIRS *in vivo* and histology shows major myocardial necrosis. The onset is more insidious so that changes which develop more slowly can manifest themselves.

6. With α -toxin at an effective dose of approximate 3.5 μ g per ml, it was possible to induce an aggregation of human platelets. None of the inhibitors used were able to completely stop the α -toxin induced platelet aggregation. Even very high dosages of ReoPro, Iloprost and SIN-1 only resulted in minor inhibition of aggregation. Indomethacin had no inhibiting effect.

7. α -toxin causes an extremely powerful influx of Ca^{2+} from the extracellular space due to the formation of pores in the cell membrane. For this reason, inhibitors which reduce intracellular Ca^{2+} via 'second messenger' systems (prostaglandin analogon Iloprost, NO-donor SIN-1) are able to achieve only insignificant restriction of α -toxin induced platelet aggregation.

The α -toxin induced platelet aggregation is not reliant on the feedback of thromboxane (this is produced in the cyclooxygenase pathway). This is the reason that cyclooxygenase inhibitors such as Indomethacin are not effective here.

No explanation can be given on the current state of knowledge as to why ReoPro[®], which, acting as an antibody, attaches itself directly to the only known binding site between two thrombocytes (GPIIb/IIIa-receptor), has no effect on platelet aggregation as a result of α -toxin.

8. This thesis raises a number of questions. In the animal model, it should be ascertained to what extent antibodies against P-selectin and ICAM-1 are able to influence the course of the disease. And the question still remains: what causes the hypotension if it is not NO. One approach here would be to investigate the release of PGI₂ (prostacycline). The chronological sequence of cytokine release would also need to be studied in more detail to come closer to developing a therapy concept on this basis.

Another very important aspect for the future would be to ascertain whether the results in other animals are transferable to humans, since the different types of cells of various species react very differently to α -toxin.

Since human platelets react very sensitively to α -toxin, the inhibition of platelet aggregation in α -toxin induced SIRS in humans is a very important aspect. Moreover, it would be worth investigating the effect of inhibitors formerly used in the arachidonic acid cascade as cyclooxygenase inhibitors. In addition, an explanation of the mechanism of thrombocyte aggregation by α -toxin in the presence of an antibody which attaches to the only known binding site between two thrombocytes (GPIIb/IIIa-receptor), such as ReoPro[®], could indicate new paths to explore.

7. Literaturverzeichnis

- Adesiyun, A.A., Usman, B., 1983. Isolation of enterotoxygenic strains of staphylococci from dogs. *Vet. Microbiol.* 8 , 459-468.
- Armstead, V.E., Minchenko, A.G., Campbell, B., Lefer, A., 1997. P-Selektin is upregulated in vital organs during murine traumatic shock. *FASEB J.* 11, 1271-1279.
- Arvandt, M., Bhakdi, S., Dahlbäck, B., Preissner, K.T., 1990. Staphylococcus aureus α -toxin attack on human platelets promotes assembly of the prothrombinase complex. *J. Biol. Chem.* 265, 14377-14381.
- Bandaletova, T., Brouet, I., Bartsch, H., Sugimura, T., Esumi, H., Oshima, H., 1993. Immunohistochemical localisation of an inducible form of nitric oxide synthase in various organs of rats treated with propionibacterium-acnes and lipopolysaccharide. *APMIS* 101, 330-336.
- Baue, AE., 1975. Multiple, progressive, or sequential systems failure. A syndrome of the 1970s. *Arch. Surg.* 110, 779-781.
- Belmonte, G., Cescatti, L., Ferrari, B., Nicolussi, T., Ropele, M., Menestrina, G., 1987. Pore formation by Staphylococcus aureus alpha-toxin in lipid bilayers: temperature and toxin concentration dependence. *Eur. Biophys. J.* 14, 349-358.
- Bevilacqua, M., Butcher, E., Furie, B., Furie, Br., Gallatin, M., Gimbrone, M., Harlan, J., Kishimoto, K., Lasky, L., McEver, R., Paulson, J., Rosen, S., Seed, B., Siegelman, M., Springer, T., Stoolman, L., Tedder, T., Varki, A., Wagner, D., Weissman, I., Zimmerman, G., 1991. Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell* 67, 233
- Bhakdi, S, Muhly, M., Mannhardt, U., Hugo, F., Klappettek, K., Müller-Eckhardt, C., Roka L., 1988. Staphylococcal α -toxin promotes blood coagulation via attack on human platelets. *J. Exp. Med.* 168, 527-542.

- Bhakdi, S., Muhly, M., Korom, S., Hugo, F., 1989a. Release of interleukin-1 β associated with potent cytotoxic action of staphylococcal alpha-toxin on human monocytes. *Infect. Immun.* 57, 3512-3519.
- Bhakdi, S., Mannhardt, U., Muhli, M., Hugo, F., Ronneberger, H.-J., Hungerer, K.-D., 1989b. Human hyperimmune globulin protects against the cytotoxic action of staphylococcal alpha-toxin in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* 57, 3214-3220.
- Bhakdi, S., Greulich, S., Muhly, M., Eberspächer, B., Becker, H., Thiele, A., Hugo, F., 1989c. Potent leucocidal Action of Escherichia coli hemolysin mediated by permeabilisation of target cell membranes. *J. Exp. Med.* 169, 737-754.
- Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J., 1991. Alpha-Toxin of Staphylococcus aureus. *Microbiol. Rev.* 733-751.
- Bhakdi, S., 1998. Mikrobielle Toxine. *Wien. Klin. Wschr.* 110, 660-668.
- Böhm, M., Gierschik, P., Jakops, K.H., Kemkes, B., Schnabel, P., Erdmann, E., 1989. Mechanismus der verminderten Katecholaminwirkung im Schock und bei Herzinsuffizienz. *Intensivmedizin* 26, 55-59.
- Bone, R.C., 1991. The Pathogenesis of Sepsis. *Ann. Int. Med.* 115, 457-469.
- Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M.H., Sibbald, W.J., 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 101, 1644-1655.
- Borchard, U., 1995. Kalzium-Antagonisten. De Gruyter, Berlin-New-York (2. Auflage), pp. 3-11
- Brenner, B.M., Troy, J., Ballermann, B.J., 1989. Endothelium-dependant vascular responses. Mediators and mechanisms. *J. Clin. Invest.* 84, 1373-1378.

- Buerke, M., Weyrich, A.S., Murohara, T., Queen, C., Klingbeil, C.K., ,1994a. Humanized monoclonal antibody DREG-200 directed against L-selectin protects in feline myocardial reperfusion injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271, 134-142.
- Buerke, M., Weyrich, A.S., Zheng, Z., Gaeta, F.C., Forrest, M.J., Lefer, A.M., 1994b. Sialyl Lewisx-containing oligosaccharide attenuates myocardial reperfusion injury in cats. *J. Clin. Invest.* 93, 1140-1148.
- Buerke, M., Sibelius, U., Grandel, U., Buerke, U., Grimminger, F., Seeger, W., Meyer, J., Darius, H., 2002. Staphylococcus aureus alpha-toxin mediates polymorphonuclear leucocyte-induced vasocontraction and endothelial dysfunction. *Shock* 17, 30-35.
- Burnet, F.M., 1929. The exotoxins of Staphylococcus pyogenes aureus. *J. Pathol. Bacteriol.* 32, 717-734.
- Darius, H., Erbel, R., Belz, G.G., Meyer, J., 1992. Antikoagulantien und Thrombolytika bei kardialen Erkrankungen. *Internist* 33, 670-683.
- Darius, H., Grosser, T., 1998. Glycoprotein-IIb/IIIa-Antagonisten. *Hämostaseologie* 18, 171-179.
- Dhainaut, J.F., Lanore, J.J., de Gournay, J.M., Huyghebaert, M.F., Brunet, F., Villemant, D., Monsallier, J.F., 1988. Right ventricular dysfunction in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* 14, 488-491.
- Entman, M.L., Youker, K., Shoji, T., Kukielka, G., Shappell, S.B., Taylor, A.A., Smith, C.W., 1992. Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes. A compartmented system requiring CD 11b/ CD 18-ICAM adherence. *J. Clin. Invest.* 90, 1335-1345.
- Fisher, C.J.J., Opal, S.M., Dhainaut, J.F., Stephens, S., Zimmerman, J.L., Nightingale, P., Harris, S.J., Schein, R.M.H., Panacek, E.A., Vincent, J.L., Foulke, G.E., Warren, E.L., 1993. Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. *Crit. Care Med.* 21, 318-327.

- Frank, M.M., 1987. Complement in the pathophysiology of human disease. *N. Engl. J. Med.* 316, 1525-1530.
- Förstermann, U., Pollock, J.S., Schmidt, H.H.H.W., Heller, M., Murad, F., 1991. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor / nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1788-1792.
- Förstermann, U., Kleinert, H., 1995. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 352, 351-364.
- Fosslien, E., 2000. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molekular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 37, 431-502.
- Füssle, R., Bhakdi, S., Sziegoleit, A., Tranum-Jensen, J., Kranz, T., Wellensiek, H.L., 1981. On the Mechanism of membrane damage by *S. aureus* α -toxin. *J. Cell Biol.* 91, 83-94.
- Gallin, 1989. Imflammation. In: Gallin, *Fundamental immunologie*. Raven press Ltd. New York 2nd edition, pp. 721-733.
- Gawaz M., 1999. *Das Blutplättchen*. Thieme Verlag-Stuttgart, New York. pp., 1-41.
- Glauser, M.P., Zanetti, G. Baumgartner, J.D., Cohen, J., 1991. Septic shock: pathogenesis. *Lancet* 338, 732-736.
- Goldfarb, R.D., Nightingale, L.M., Kish, P., Weber, P.B., Loegering, D.J., 1986. Left ventricular function during lethal and sublethal endotoxemia in swine. *Am. J. Physiol.* 251, 364-373.
- Grandel, U., Sibelius, U., Schrickel, J., Schmidt, D., Buerke, M., Fink, L., Bournelis, E., Heep, M., Mayer, K., Bohle, R.M., Seeger, W., Grimminger, F., 2001. Biosynthesis of constitutive nitric oxide synthase-derived nitric oxide attenuates coronary vasoconstriction and myocardial depression in a model of septic heart failure induced by staphylococcus aureus alpha-toxin. *Crit. Care Med.* 29, 1-7.

- Grandel, U., Reutemann, M., Kiss, L., Buerke, M., Fink, L., Bournelis, E., Heep, M., Seeger, W., Grimminger, F., Sibelius, U., 2002. Staphylococcal alpha-toxin provokes neutrophil dependant cardiac dysfunction: role of ICAM-1 and cys-leukotrienes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282, 1157-1165.
- Grimminger, F., Rose, F., Sibelius, U., Meinhardt, M., Pötzsch, B., Spriestersbach, R., Bhakdi, S., Suttorp, N., Seeger, W., 1997. Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins escherichia coli hemolysin and staphylococcal α -toxin. *J. Immunol.* 159, 1909-1916.
- Gruetter, C.A., Gruetter, G.Y., Lyon, J.E., Kadowitz, P.J., Ignarro, L.J., 1981. Relationship between cyclic guanosine 3':5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: Effects of methylene blue and methemoglobin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219, 181-186.
- Hajek, V., Marsalek, E., 1976. Staphylococci outside the hospital. *Staphylococcus aureus* in sheep. *Zentralbl. Bakteriol.* 161, 455-461.
- Harshman, S., Lefferts, P.L., Snapper, J.R., 1992. Staphylococcal alpha-toxin: A study with chronically instrumented awake sheep. *Infect. Immun.* 60, 3489-3496.
- Hesse, D.G., Tracey, K.J., Fong, Y., Manouge, K.R., Palladino, M.A., Shires, G.T., Cerami, A., Lowry, S.F., 1988. Cytokine appearance in human endotoxemia and non-human primate bacteremia. *Surg. Gynecol. Obstet.* 166, 147-153.
- Hildebrand, A., Pohl, M., Bhakdi, S., 1991. *Staphylococcus aureus* α -Toxin. Dual mechanism of binding to target cells. *J. Biol. Chem.* 266, 17195-17200.
- Hirata, T., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Okuma, M., Narumiya, S., 1996. Two thromboxane A₂ receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *J. Clin. Invest.* 97, 949-956.
- Hogg, N., 1992. Roll, roll, roll your leucocyte gently down the vein... *Immunol. Today* 13, 113-115.

- Ibbotson, G.C., Wallace, J.L., 1989. Beneficial effects of prostaglandin E2 in endotoxin shock are unrelated to effects of PAF-acether synthesis. *Prostaglandins* 37, 237-250.
- Ignarro, L.J., Lippton, H., Edwards, J.C., Baricos, W.H., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J., Gruetter, C.A., 1981. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitrosothiols active intermediates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 218, 739-749.
- Ignarro, L.J., Kadowitz, P.J., 1985. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25, 171-191.
- Ignarro, L.J., 1991. Signal Transduction Mechanisms involving nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* 41, 485-490.
- Jacobs, R.F., Tabor, D.R., 1989. Immune cellular interactions during sepsis and septic injury. *Crit. Care Clin.* 5, 9-26.
- Jennings, L.K., Phillips, D.R., 1982. Purification of glycoproteins IIb and III from human platelet membranes and characterization of calcium-dependent glycoprotein IIb-III complex. *J. Biol. Chem.* 257, 10458-10466.
- Johnson, J.D., Chang, J.P., 2000. Function- and agonist-specific Ca^{2+} signalling: The requirement for and mechanism of spatial and temporal complexity in Ca^{2+} signals. *Biochem. Cell Biol.* 78, 217-240.
- Kenny, K., Bastida, F.D., Norcross, N.L., 1992. Secretion of alpha-hemolysin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Vet. Res.* 56, 265-268.
- King, L.S., 1957. Dr. Koch's Postulate. *J. Hist. Med. Allied Sci.* 7, 350.
- Klebanoff, S.J., 1999. Myeloperoxidase. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 111, 383-389.
- Kloos, W.E., Schleifer, K.H., 1981. The genus *staphylococcus*. In: *The Procarotes*, Springer Verlag; p. 1549-1569

Klosterhalfen, B., Bhardwaj, R.S., 1998. Septic Shock. *Gen. Pharmac.* 31, 25-32.

Krull, M., Dold, C., Hippenstiel, S., Rosseau, S., Lohmeyer, J., Suttorp, N., 1996. Escherichia coli hemolysin and staphylococcus aureus alpha-toxin potently induce neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J. Immunol.* 157, 4133-4140.

Kumar, A., Thota, V., Dee, L., Olson, J., Uretz, E., Parrillo, J. E., 1996. Tumor necrosis factor α and interleukin 1β are responsible for *in vitro* myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J. Exp. Med.* 183, 949-958.

Lefler, A.M., 1989. Induction of tissue injury and altered cardiovascular performance by platelet-activating factor: relevance to multiple systems organ failure. *Crit. Care Clin.* 5, 331-351.

Lefler, A.M., Weyrich, A.S., Buerke, M., 1994. Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Res.* 28, 289-294.

Lelamali, K., Wang, W., Gengaro, P., Edelstein, C., Schrier, RW., 2001. Effects of nitric oxide and peroxynitrite on endotoxin-induced leukocyte. Adhesion to endothelium. *J. Cell Physiol.* 188, 337-342.

Ley, K., Tedder, T.F., 1995. Leucocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *J. Immunol.* 155, 525-528.

Lindemann, S., Sharafi, M., Spiecker, M., Buerke, M., Fisch, A., Grosser, T., Veit, K., Gierer, C., Ibe, W., Meyer, J., Darius, H., 2000. NO reduces PMN adhesion to human vascular endothelial cells due to downregulation of ICAM-1 m-RNA and surface expression. *Thromb. Res.* 97, 113-123.

Lorant, D.E., Topham, M.K., Whatley, R.E., McEver, R.P. McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., 1993. Inflammatory Roles of P-Selectin. *J. Clin. Invest.* 92, 559-570.

- Lyons, C.R., Orloff, G.J., Cunningham, J.M., 1992. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 267, 6370-6374.
- Machangu, R., Blobel, H., 1983. Effect of *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin on blood platelets from various animals. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* 254, 318-325.
- Malik, A.B., Wang, Y., 1993. Cellular Mechanisms of Leukocyte Adhesion. In: Schlag G. und Redl H., Pathophysiology of shock, sepsis and organ failure, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York und Tokio, pp. 61-74.
- McEver, R.P., 1991. GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *J. Cell. Biochem.*; 45: 156-161
- Mellion, B.T., Ignarro, L.J., Ohlstein, E.H., Pontecorvo, E.G., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J., 1981. Evidence for the inhibitory role of cyclic GMP in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* 57, 946-955.
- Meyers, K.M., Holmsen, H., Seachord, C.L., 1982. Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am. J. Physiol.* 243, 454-461.
- Michie, H.R., Manogue, K.R., Spriggs, D.R., Revhaug, A., O'Dwyer, S., Dinarello, C.A., Cerami, A., Wolff, S.M., Wilmore, D.W., 1988. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N. Engl. J. Med.* 318, 1481-1486.
- Miyauchi, T., Tomobe, Y., Shiba, R., Ishikawa, T., Yanagisawa, M., Kimura, S., Sugishita, Y., Ito, I., Goto, K., Masaki, T., 1990. Involvement of endothelin in the regulation of human vascular tonus. *Circulation* 81, 1874-1880.
- Nathan, C., Sporn, M., 1991. Cytokines in context. *J. Cell Biol.* 113, 981-986

- Natanson, C., Eichenholz, P.W., Danner, R.L., Eichacker, P.Q., Hoffman, W.D., Kuo, G.C., Banks, S.M., MacVittie, T.J., Parrillo, J.E., 1989. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J. Exp. Med.* 169, 823-832.
- Neugebauer, E., Lechleuthner, A., Dietrich, A., Saad, S., Rixen, D., 1991. Mediatoren und ihre Antagonisten in der Schocktherapie. *Langenbecks Arch. Chir.*, 2, 309-318.
- Neugebauer, E., Dimmeler, S., Troidl, H., 1995. Mediatorensysteme und Sepsis. *Chirurg* 66, 2-10.
- Okada, M., Matsuto, T., Miida, T., Inano, K., 1997. Differences in the effects of cytokines on the expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Ann. Med. Interne* 148, 125-129.
- Palmer, R.M.J., Ashton, D.S., Moncada, S., 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664-666.
- Parrillo, J.E., 1989. The cardiovascular pathophysiology of sepsis. *Ann. Rev. Med.* 40, 469-485.
- Parrillo, J.E., 1993. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N. Engl. J. Med.* 328, 1471-1477.
- Phillips, D.R., Charo, I.F., Parise, L.V., Fitzgerald, G.A., 1988. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 71, 831-843.
- Pober, J.S., Cotran, R.S., 1991. What can be learned from the expression of endothelial adhesion molecules in tissues? *Lab. Invest.* 64, 301-305.
- Pohlenz, J., Sandersleben von, J., 1990. Septikämischer und/oder toxischer Schock. In: Stünzi, H., Weiss, E., *Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin* (8. Auflage), Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, pp. 218 und 226-228.

- Pollock, J.S., Förstermann, U., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Schmidt, H.H.H.W., Nakane, M., Murad, F., 1991. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10480-10484.
- Pollock, J.S., Klinghofer, V., Förstermann, U., Murad, F., 1992. Endothelial nitric oxide synthase is myristylated. *FEBS Lett* 309, 402-404.
- Pruefer, D., Makowski, J., Schnell, M., Buerke, U., Dahm, M., Oelert, H., Sibelius, U., Grandel, U., Grimminger, F., Seeger, W., Meyer, J., Darius, H., Buerke, M., 2002. Simvastatin inhibits inflammatory properties of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Circulation* 106, 2104-2110.
- Pschyrembel, 2002. *Klinisches Wörterbuch* (259. Auflage), Verlag de Gruyter, Berlin und New York, p. 1672.
- Reichwein, J., Hugo, F., Roth, M., Sinner, A., Bhakdi, S., 1987. Qualitative analysis of the binding and oligomerisation of staphylococcal alpha-toxin in target erythrocyte membranes. *Infect. Immun.* 55, 2940-2944.
- Reithmann, C., Panzner, B., Werdan, K., 1992. Distinct pathways for beta-adrenozeptor-induced up-regulation of muscarinic acetylcholine receptors and inhibitory G-protein alpha-subunits in chicken cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 345, 530-540.
- Reithmann, C., Hallstrom, S., Pilz, G., Kapsner, T., Schlag, G., Werdan, K., 1993. Desensitization of rat cardiomyocyte adenylyl cyclase stimulation by plasma of noradrenaline-treated patients with septic shock. *Circ. Shock* 41, 48-53.
- Reithmann, C., Werdan, K., 1994. Tumor necrosis factor alpha decreases inositol phosphate formation and phosphatidylinositol-biphosphate (PIP₂) synthesis in rat cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 349, 175-182.

- Ridings, P.C., Sugerman, H.J., Blocher, C.R., Fisher, B.J., Fowler, A.A., 1995. Hemodynamic effects of bradykinin antagonism in porcine gram-negative sepsis. *J. Invest. Surg.* 8, 115-122.
- Robinson, L.J., Busconi, L., Michel, T., 1995. Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 270, 995-998.
- Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.U., 1991. *Kurzes Lehrbuch der Immunologie (2. Auflage)*; Thieme Verlag Stuttgart-New York. pp. 24-26.
- Rolle, M., Mayr, A., 1993. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*; Enke-Verlag, Stuttgart. pp. 688-699.
- Rose, F., Dahlem, G., Guthmann, B., Grimminger, F., Maus, U., Hanze, J., Duemmer, N., Grandel, U., Seeger, W., Ghofrani, H.A., 2002. Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by *s. aureus* alpha-toxin. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 282, 207-214.
- Ruf, A., Schlenk, R.F., Maras, A., Morgenstern, A., Patscheke, H., 1992. Contact-induced neutrophil activation by platelets in human cell suspensions and whole blood. *Blood* 80, 1238-1246.
- Salvemini, D., Currie, M.G., Mollace, V., 1996. Nitric oxide-mediated cyclooxygenase activation: A key event in the antiplatelet effects of nitrovasodilators. *J. Clin. Invest.* 97, 2562-2568.
- Schoenberg, M.H., Nussler A.G., Beger H.G., 1995. Oxygen radicals and nitrogene monoxide in sepsis. *Chirurg* 66, 18-26.
- Schottmüller, H., 1914. Wesen und Behandlung der Sepsis. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* 31, 257.
- Schorr, K., 1991. Thromboxanantagonismus. In: *Thrombozyten-Pathophysiologie, Pharmakologie und mögliche klinische Bedeutung*, Wien. *Klin. Wschr.* 103, 543-553.

- Seeger, W., Birkemeyer, R.G., Ermert, L., Suttorp, N., Bhakdi, S., Duncker, H.R., 1990. Staphylococcal alpha-toxin-induced vascular leakage in isolated perfused rabbit lungs. *Lab. Invest.* 63, 341-349.
- Shan, Q., Bourreau, J., 2000. Cardiac and vascular effects of nitric oxide synthase inhibition in lipopolysaccharide-treated rats. *Eur. J. Pharmacol.* 406, 257-264.
- Sibbald, W.J., Driedger, A.A., Myers, M.L., Short, A.K., Wells, G.A., 1983. Biventricular function in the adult respiratory distress syndrome: hemodynamic and radionuclide assessment, with special emphasis on right ventricular function. *Chest* 84, 126-134.
- Sibelius, U., Grandel, U., Buerke, M., Mueller, D., Kiss, L., Kraemer, H.J., Braun-Dullaeus, R., Haberbosch, W., Seeger, W., Grimminger, F., 2000. Staphylococcal α -toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation. *Circulation* 101, 78-85.
- Smith II, J.W., Urba, W.J., Curti, B.D., Elwood, L.J., Steis, R.G., Janik, J.E., Sharfman, W.H., Miller, L.L., Fenton, R.G., Conlon, K.C., Sznol, M., Creekmore, S.P., Wells, N. F., Ruscetti, F.W., Keller, J.R., Hestdal, K., Shimizu, M., Rossio, J., Alvord, W.G., Oppenheim, J.J., Longo, D.L., 1992. The toxic and hematologic effects of interleukin-1 alpha administered in a phase I trial to patients with advanced malignancies. *J. Clin. Oncol.* 10, 1141-1152.
- Stadler, J., Heidecke, C.D., Bartels, H., Holzmann, B., Wagner, H., Siewert, J.R., 1995. Immunsuppression und Sepsis. *Chirurg* 66, 11-17.
- Stephens, K.E., Ishizaka, A., Larrick, J.W., Raffin, T.A., 1988. Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema. Comparison to septic acute lung injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137, 1364-1370.
- Steurer, G., Fitscha, P., Sinzinger, H., 1988. The platelet rebound phenomenon during PGI₂-infusion occurs at the receptor level. *Folia Haematol.* 115, 435-438.

- Strunk, V., Hahnenkamp, K., Schneuing, M., Fischer, L.G., Rich, G.F., 2001. Selective iNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium-dependant vasodilatation. *Anesth. Analg.* 92, 681-687.
- Suttorp, N., Habben, E., 1988a. Effect of staphylococcal alpha-toxin on intrazellular Ca^{2+} in polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 56, 2228-2234.
- Suttorp, N., Hessz, T., Seeger, W., Wilke, A., Koob, R., Lutz, F., Drenckhahn, D., 1988b. Bacterial exotoxins and endothelial permeability for water and albumin in vitro. *Am. J. Physiol.* 255, 368-376.
- Suttorp, N., Fuhrmann, M., Tannert-Otto, S., Grimminger, F., Bhakdi, S., 1993. Pore-forming bacterial toxins potently induce release of nitric oxide in porcine endothelial cells. *J. Exp. Med.* 178, 337-341.
- Utsumi, K., Takai, Y., Tada, T., Ohzedi, S., Fujiwara, H., Hamaoka, T., 1990. Enhanced production of IL-6 in tumor-bearing mice and determination of cells responsible for this augmented production. *J. Immunol.* 145, 397-403.
- Varki, A., 1992. Selectins and other mammalian sialic acid-binding lectins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 257-266.
- Wagner, C.L., Mascelli, M.A., Neblock, D.S., Weisman, H.F., Collier, B.S., Jordan, R.E., 1996. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 88, 907-914.
- Wakabayashi, G., Gelfand, J.A., Jung, W.K., Connolly, R.J., Burke, J.F., Dinarrello, C.A., 1991. Staphylococcus epidermidis induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. *J. Clin. Invest* 87, 1925-1935.
- Werdan, K., Boekstegers, P., Müller, U., Pfeifer, A., Pilz, A., Reithmann, C., Hallström, S., Koidl, B., Schuster, H.P., Schlag, G., 1991. Akute septische Kardiomyopathie: Bestandteil des Multiorganversagens in der Sepsis? *Med. Klin.* 86, 526-534.

Wiedmer, T., Ando, B., Sims, P.J., 1987. Complement C5b-C9-stimulated platelet secretion is associated with a Ca^{2+} -initiated activation of cellular protein kinases. *J. Biol. Chem.* 262, 13674-13681.

Yamamoto, T., Bing, R.J., 2000. Nitric oxide donors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 225, 200-206.

Zuckerman, S.H., Sheelhaas, J., Butler, L.D., 1989. Differential regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-1 and tumor necrosis factor synthesis: effects of endogenous glucocorticoids and the role of the pituitary-adrenal axis. *Eur. J. Immunol.* 19, 301-305.

8. Anhang

8.1. Bezugsquellen für benötigte Geräte, Einmalartikel und Chemikalien

8.1.1. Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Es sind nur die über eine Laborgrundausrüstung (insbesondere eines Zell-, Histologie- und Tierversuchslabors) hinausgehenden Geräte aufgeführt:

8.1.1.1. Tiermodell Ratte

Intramedic[®] Polyethylen Tubing PE 50; Becton Dickinson, Heidelberg

Intramedic[®] Polyethylen Tubing PE 190; Becton Dickinson, Heidelberg

8.1.1.2. Serum-Elisa

ELISA-Reader, SPECTRAFLUOR PLUS; Tecan, Männedorf, Schweiz

Software, Easy WIN Kinetiks Vers. 6,0

8.1.1.3. Myeloperoxidasebestimmung

UVICON Spectralphotometer 940; (Kontron Instruments) Bio-Tek, Frankfurt

8.1.1.4. Histologie

Superfrost Plus-Objektträger; Menzel-Gläser, Braunschweig ; # 041300

8.1.1.5. Western-Blot :

Blot Kammer; Ideascientific Company, Minneapolis, Minnesota, USA

Digi Block[®]JR; Laboratory Devices Inc., Holliston, Massachusetts, USA

Elektrophoresis Unit; Hoefer; SE600 Series, San Francisco, California, USA

ELISA-Reader, SPECTRAFLUOR PLUS; Tecan, Männedorf, Schweiz

ImmobilonTM-P; Millipore, Eschborn; # IPVH 00010

Power Pac 200; BioRad, München

Power Pac 3000; BioRad, München

X-Omat; Kodak, Stuttgart; #165-1496

8.1.1.6. Thrombozytenaggregation

APACT

Automated Platelet Aggregation Coagulation Tracer

Laborgeräte und Analysensysteme Vertriebsgesellschaft GMBH, Hamburg

APACT Software Version 1.0; Labor, Ahrensburg

Küvetten; Labor, Hamburg

Rührfische; Labor, Hamburg

8.1.2. Lösungen und Chemikalien

8.1.2.1. Allgemein benötigte Lösungen und Chemikalien

α-Hemolysin; Sigma, Deisenhofen; # H-9395
Ethanol absolut; Riedel-de Haen, Seelze; # 32205
HCl 1N; Merck, Darmstadt; # 1.09057.1000
NaCl-Lösung, Isotone Kochsalzlösung 0,9 %; B. Braun, Melsungen AG; # 45342
NaOH 1N; Merck, Darmstadt; # 1.09137.1000
Natriumchlorid; Roth, Karlsruhe; # 3957.1
pH-Eichlsg. 10; Merck, Darmstadt; # 1.09438.1000
pH-Eichlsg. 4; Merck, Darmstadt; # 1.09439.1000
pH-Eichlsg. 7; Merck, Darmstadt; # 1.09435.1000
Trispuffer Hydrochlorid; Sigma, Deisenhofen; # T-3253

8.1.2.2. Speziell benötigte Kits, Lösungen und Chemikalien

8.1.2.2.1. Tiermodell Ratte

Narcoren® (Pentobarbital), Merial, Halbergmoos

8.1.2.2.2. Serum-ELISA

Cytoscreen Immunoassay-Kit, rat IL-1β; BioSource, Camarillo, California; # KRC0012
Cytoscreen Immunoassay-Kit, rat IL-6; BioSource, Camarillo, California; # KRC0062
Cytoscreen Immunoassay-Kit, rat TNF-α; BioSource, Camarillo, California; # KRC3012

8.1.2.2.3. Myeloperoxidase-Bestimmung

30 % H_2O_2 ; Apotheke des Uniklinikums, Mainz
Hexadecyltrimethylammoniumbromid; Sigma, Deisenhofen; # 54H0997
KH₂PO₄ (50 mM); Merck, Darmstadt; # 1.04873.1000
O-Dianisidine; Sigma, Deisenhofen; # 92H505

HTAB-Puffer: 250 mg Hexadecyltrimethylammoniumbromid
 45 ml Aqua dest.
 5 ml KH_2PO_4 (50 mM)
 (über Nacht rühren, auf pH 6,0 mit 1M HCl oder 1M NaOH einstellen)

ODI-Solution: 8,35 mg O-Dianisidine
 5 ml PBS
 0,5 ml 0,5% H_2O_2
 (bevor Dianisidine zugegeben wird mit 1M HCl oder 1M NaOH auf pH 6,0 einstellen, in brauner Flasche ansetzen)

8.1.2.2.4. Histologie

Aceton; Riedel-de Haen, Seelze; # 32201
Ampuwa, Aqua ad injectabilia; Braun, Melsungen
Eosin G; Merck, Darmstadt; # 15935
Essigsäure, Rotipuran® 100% p.a.; Roth, Karlsruhe; # 37381

Mayers Hämalaunlösung; Merck, Darmstadt ; # 1.09249.0500
Permout®; Fisher Chemicals; Frankfurt; # SP15100
Tissue Tek®; OCT Compound; Zoeterwoude, NL; # 4583
Xyloersatz, *Roticlear*; Roth, Karlsruhe ; # A.5381

Naphthol-ASD-Chlorazetatesterase(N-ASD-C)-Färbung

Aquatex®; Merck, Darmstadt; # 1.08562.
Naphthol-ASD-Chloralazetat; Sigma, Deisenhofen; # N 0758
 1 g N-ASD-C + 2 ml Dimethylformamid ; Lagerung bei -20 °C
Natriumnitrit (NaNO₂); Roth, Karlsruhe; # 8604.1
 0,3 g auf 1 ml Aq. dest.
Pararosanilin; Sigma, Deisenhofen; # P 3750
 (0,5 g auf 10 ml Aq. dest.+ 2,5 ml HCl konz.
 Unter Erwärmen lösen, abkühlen, filtrieren,
 im Kühlschrank dunkel aufbewahren)

Immunhistochemie

30 % H₂O₂; Apotheke des Uniklinikums, Mainz
Anti Rat-ICAM-1, Mouse monoclonal; Pharmingen (Beckton Dickinson), Hamburg; # 2249D
Anti-NOS II, rabbit polyclonal; Santa Cruz, Heidelberg; # sc-8310
Anti-NOS III, rabbit polyclonal; Biomol, Hamburg; # KAP-NO 002
Biotin-Avidin-Blocking-System; DAKO, Hamburg; # X0590
Gills No.3 Hematoxilin-Lösung, Accustain; Sigma, Deisenhofen; # GHS-3-16
Methanol; Baker Analyzed[®] Reagent; Deventer, NL; # 8045
normal mouse IgG; Santa Cruz, Heidelberg; # sc-2025
normal rabbit IgG; Santa Cruz, Heidelberg; # sc-2027
PBS(Phosphate Buffered Saline)-Tabletten (PH 7,45); Sigma, Deisenhofen; # P-4417
Peroxidase Substrate Kit, DAB; Vector, Burlingame, USA; # SK-4100
Purified anti-human P-Selectin, rabbit polyclonal ; Pharmingen (Beckton Dickinson), Hamburg ; # 2249D
Vectastain-ABC-Kit, Peroxidase Mouse IgG; Vector, Burlingame, California, USA; # PK-4010
Vectastain-ABC-Kit, Peroxidase Rabbit IgG; Vector, Burlingame, California, USA; # PK-6101

8.1.2.2.5. Western-Blot

2β-Mercaptoethanol; Merck, Darmstadt; # 15433
 30% Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1); BioRad, München; # 161-0158
Anti goat IgG HRP; Santa-Cruz, Heidelberg; # sc-2020
Anti mouse IgG HRP; Santa-Cruz, Heidelberg; # sc-2025
Aprotinin; Sigma, Deisenhofen; # A 3428
APS (Ammoniumpersulfat); BioRad, München; # 161-0700
CHAPS ((3-(3-Cholamidpropyl)-dimethylammonium)-1-propansulfonat); BioRad, München; # 161-0460
Coomasie brilliant blue R250; BioRad, München; # 161-0400
DTT (Dithiotreitol); Sigma, Deisenhofen; # 708984
ECLTM (1+2); Amersham, Braunschweig; # RPN-2106

ECNOS/NOS Type III; Transduction Laboratories (Becton Dickinson), Hamburg; # N 30020
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure); Sigma, Deisenhofen; # E-5134
EGTA (Ethylenglycolbis (succinimidyl succinat)); Sigma, Deisenhofen; # E-3889
Essigsäure 100%; Roth, Karlsruhe; # 3738.1
Glutathion; Sigma, Deisenhofen; # G-5817
Glycerin; Merck, Darmstadt; # 1.00327
Glycerol; Sigma, Deisenhofen; # G 5516
Glycin Rotipuran; Roth, Karlsruhe; # 3908.2
Goat-Serum donor herd; Sigma, Deisenhofen; # G-6767
HCl 37 %; Merck, Darmstadt; # 1.00317
INOS/NOS Type II; Transduction Laboratories (Becton Dickinson), Hamburg; # N 309120
Isopropanol (2-Propanol); Sigma, Deisenhofen; # I-405-7
Kaleidoskope Prestained Standards; BioRad, München; # 74815
Leupeptin; Boehringer, Mannheim; # 1017101
Magermilchpulver; Fluka, Neu-Ulm; #70166
Methanol; Riedel-de Häen, Seelze; # 8402
Micro BCA Protein Assay Reagent Kit; Pierce, Rockfort, Illinois, USA; # 23235
NaCl; Roth, Karlsruhe; # 3957
Pepstatin; Boehringer, Mannheim; # 353286
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid); Boehringer, Mannheim; # 837091
Protein Assay Reagent; Bio Rad, München; # 500-0006
*Roti®-Load (4*konz.)*; Roth, Karlsruhe; # K929.1
SDS (Natriumdodecylsulfat); Bio Rad, München; # 161-0301
Sodium orthovanadate; Alfa Aesar, Karlsruhe; # 81104
Standard High-Range; Bio Rad, München; # 161-0303
TEMED (Tetramethylendiamin); Bio Rad, München; # 161-0801
Tris Buffered Saline; Roth, Karlsruhe; # 4855.2
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan; Roth, Karlsruhe; # 4855.2
Tris-Base; Sigma, Deisenhofen; # T-3253
Trypsininhibitor; Sigma, Deisenhofen; # T-3429
Tween (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat) 20; Sigma, Deisenhofen; # P 9416

Lysepuffer: 605 mg Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
 14 mg EDTA
 19 mg EGTA
 2 M DTT (*Dithiotreitol*)
 215 mg Glutathion
 10 ml Glycerin
 1,229 g CHAPS

in 100 ml Aq. dest lösen, pH mit 1 M HCl oder 1 M NaOH auf 7,4 einstellen, dann Inhibitorcocktail hinzufügen

Inhibitorcocktail: 250 µl Leupeptin (5 mg/ml Stock in Aq. dest.)
 250 µl Pepstatin (5 mg/ml Stock in Ethanol)
 250 µl Aprotinin (1 mg/ml Stock in 1M HCl, pH<6,5)
 250 µl Trypsininhibitor (5 mg/ml Stock in Aq. dest.)
 10 ml Aq. dest.

1,5% APS (Ammoniumpersulfat)

(150 mg APS in 10 ml Aq. dest. lösen; 1 Woche haltbar bei 4°C)

10 x SDS Elektrophoresepuffer: 30,29 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
144 g Glycin
10 g SDS (0,1%) (Mundschutz!)

in 900 ml Aq. dest. lösen, pH mit 1 M HCl oder 1 M NaOH auf 8,3 einstellen; auf 1000 ml mit Aq. dest., bei 4°C lagern

10 X Transferpuffer: 30,29 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
144 g Glycin

in 900 ml Aq. dest. lösen, pH 8,3; auf 1000 ml mit Aq. dest. auffüllen, bei 4 ° C lagern

1 x Transferpuffer (frisch ansetzen!): 100 ml 10 x Transfer-Puffer
200 ml Methanol
700 ml Aq. dest.

pH 8,3 kontrollieren und mit 1 M HCl oder 1 M NaOH einstellen

10 X Tris-Buffer-Saline (TBS): 2,10 g *Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan*
90 g NaCl

in 1000 ml Aq. dest. lösen, bei Raumtemperatur lagern

TBS-T: 1000 ml 1xTBS

0,025 % Tween 20 (0,25ml), bei Raumtemperatur lagern

Trenngelpuffer: (Endkonzentration im Gel: 375 mM Tris-HCl, pH 8,8)
363 g Tris Base
in 900 ml Aq. dest. lösen

(mit konz. HCl auf pH 8,8 einstellen, auf 1000 ml mit Aq. dest. auffüllen, filtrieren; bei 4°C lagern)

Sammelgelpuffer: (Endkonzentration im Gel: 125 mM Tris-HCl, pH 6,8)
30 g Tris Base

in 450 ml Aq. dest. lösen

mit konz. HCl auf pH 6,8 einstellen

auf 500 ml mit Aq. dest. auffüllen, filtrieren; bei 4°C lagern

Trenngel (8%): 12 ml Acrylamid-Bis (37,5:1)
24,75 ml Aq. dest.
5,62 ml Trenngelpuffer 3X
0,45 ml SDS 10%
2,25 ml APS 1,5%
0,025 ml TEMED

Sammelgel (4%): 2,67 ml Acrylamid-Bis (37,5:1)
11,13 ml Aq. dest.
5 ml Sammelgelpuffer 2X
0,2 ml SDS 10%
1 ml APS 1,5%
0,01 ml TEMED

Färbefixierlösung : (0,2% Coomassie Blau in 45% Methanol, 10% Essigsäure)

0,4 g Coomassie Brillant Blue R-250

90 ml Methanol

20 ml Eisessig

90 ml Aq. dest.

Farbstoff sorgfältig unter Rühren lösen, anschließend Lösung durch Watmann 3 MM-Papier filtrieren.

Entfärbelösung: 10 ml Methanol

20 ml Eisessig

170 ml Aq. dest.

Konservierungslösung: 100ml Glycerin

250ml Ethanol

750ml Aq.dest.

8.1.2.2.6. Thrombozytenaggregation

Liquemin[®] N25000; Roche, Grenzach-Wyhlen; # 57740

Kollagen-Reagenz; Rolf Greiner BioChemica GMBH, Flacht; # 5368

8.2. Anhang zum Ergebnisteil

	Zeit/ Min	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240
Tier														
AT 28		343	274	343	446									
AT 32		394	326	377	446	480								
AT 33		394												
AT 34		343	137	137										
At 37		429	446	240	240	240	480	480						
AT 38		257	274	309	257	257	309	309	360	377	394	446	480	480
AT 39		343	257											

Tab. 6 a: Herzfrequenz (HR) in Schlägen pro Minute der Ratten, die 40 µg α-Toxin pro kg KG erhalten haben

	Zeit/ Min	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240
Tier														
AT 28		102	102	103	69									
AT 32		143	107	102	101	100	46							
AT 33		115	11											
AT 34		142	70	23										
At 37		110	107	104	95	96	84	74						
AT 38		115	97	94	84	85	85	85	88	70	85	87	80	85
AT 39		110	40											

Tab. 6 b: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) in mm Hg der Ratten, die 40 µg α-Toxin pro kg KG erhalten haben

	Zeit/ Min	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240
Tier														
AT 28		35	28,2	35,3	30,8									
AT 32		56,3	34,9	33,2	38,1	44,6	22,1							
AT 33		45,3												
AT 34		48,7	9,6	31,5										
At 37		47,2	47,7	25	22,8	23	19,2	35,5						
AT 38		29,6	26,6	29,1	21,6	21,9	26,3	26,3	31,7	26,4	33,5	38,8	38,4	40,8
AT 39														

Tab. 6 c: Pressure Rate Index (PRI) der Ratten, die 40 µg α-Toxin pro kg KG erhalten haben

Gruppe	Tier	TNF- α		IL-6		IL-1 β	
		vor	nach	vor	nach	vor	nach
0	AT 17	0	0	0	0	0	0
	AT 24	0	0	0	59	0	0
	AT 25	0	183	0	320	0	0
	AT 30	0	127	0	327	0	114
20	AT 26	0	0	0	0	0	0
	AT 27	19	240	0	396	0	0
	AT 31	0	77	0	253	0	0
	AT 35	0	29	0	0	0	111
	AT 36	0	0	0	97	0	0
40	AT 28	0	308	360	910	0	0
	AT 32	0	2000	0	1018	0	128
	AT34	0	0	0	0	0	0
	AT 37	0	33	0	92	0	0
	AT 38	9	72	0	437	0	0
	AT 39	5	4	0	0	0	0

Tab. 7 : Zytokingehalte in pg/ml im Serum der Ratten vor Toxingabe (vor) und zum Todeszeitpunkt (nach); (Gruppe 0 = Kontrollgruppe; Gruppe 20 = Gruppe, die 20 μ g α -Toxin pro kg KG erhalten hat; Gruppe 40 = Gruppe, die 40 μ g α -Toxin pro kg KG erhalten hat)

α -Toxin-Konz.	n	Min.	Max.	1. Quartil	3. Quartil	MW
1 μ g/ml	16	0	6,8	2,88	5,31	4,19
2 μ g/ml	20	1,6	89,85	3,13	10,33	14,87
3 μ g/ml	20	0	86,4	3,2	52,78	23,26
4 μ g/ml	19	2,8	85,1	13,98	80,75	50,23
5 μ g/ml	20	12,1	89,2	66,33	81,85	69,76
7,5 μ g/ml	19	31,65	85,8	68,98	82	72,49
10 μ g/ml	20	29,2	85,5	64,33	79,7	70,92
14 μ g/ml	15	31,1	84,5	65,5	80,4	72,98

Tab. 8 a: Thrombozytenaggregation durch α -Toxin in %

Iloprost®-Konz.	Aggregator	n	Min.	Max.	1. Quartil	3. Quartil	MW
0 nmol/ml	α -Toxin	6	53,4	88,4	65,33	80	71,87
0,01 nmol/ml	α -Toxin	5	60,5	81,4	64,83	81,33	72,79
0,03 nmol/ml	α -Toxin	6	52,55	84,45	65	82,54	71,43
0,1 nmol/ml	α -Toxin	7	59,9	85,1	62,05	82,7	72,74
0,3 nmol/ml	α -Toxin	7	26,6	85,25	57,1	81,75	66,91
1 nmol/ml	α -Toxin	7	19,1	84,85	65,95	84,5	67,24
3 nmol/ml	α -Toxin	7	15,1	82,4	47,3	75,05	57,88
10 nmol/ml	α -Toxin	6	24,05	79,1	44,68	75,69	59,02
30 nmol/ml	α -Toxin	6	15,8	70,95	37,48	70,2	53,39
100 nmol/ml	α -Toxin	6	17,65	66,6	36,29	64,39	51,76
300 nmol/ml	α -Toxin	6	17,6	61,7	29,45	61,14	45,27
0 nmol/ml	ADP	3	68	83	n.d.	n.d.	73
0,01 nmol/ml	ADP	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	66
0,03 nmol/ml	ADP	2	70	89	n.d.	n.d.	79
0,1 nmol/ml	ADP	3	70	86	n.d.	n.d.	79
0,3 nmol/ml	ADP	3	67	86	n.d.	n.d.	79
1 nmol/ml	ADP	3	70	86	n.d.	n.d.	79
3 nmol/ml	ADP	2	76	77	n.d.	n.d.	76
10 nmol/ml	ADP	3	9	46	n.d.	n.d.	24
30 nmol/ml	ADP	3	0	7	n.d.	n.d.	3
100 nmol/ml	ADP	3	1	3	n.d.	n.d.	2
300 nmol/ml	ADP	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3

Tab. 8 b: Thrombozytenaggregation durch α -Toxin sowie ADP inhibiert mit Iloprost in %; n.d.= nicht durchgeführt

Sin-1®-Konz.	Aggregator	N	Min.	Max.	1. Quartil	3. Quartil	MW
0 µmol/ml	α-Toxin	5	56,7	82,8	62	80,5	72,48
3,33 µmol/ml	α-Toxin	3	54	70,8	54,7	n.d.	60,93
10 µmol/ml	α-Toxin	3	7	72,15	54,2	n.d.	65,55
20 µmol/ml	α-Toxin	3	54,2	74	45,25	n.d.	62,48
33,3 µmol/ml	α-Toxin	4	45,25	67,85	50,65	67,18	60,05
100 µmol/ml	α-Toxin	5	47,7	67	42,65	67,1	54,64
200 µmol/ml	α-Toxin	5	37,1	9	37,03	68,13	54,97
333 µmol/ml	α-Toxin	5	27,1	69,1	48,9	67,68	59,54
500 µmol/ml	α-Toxin	5	47,7	68,05	42,95	69	55,86
1000 µmol/ml	α-Toxin	5	28,3	71,25	31,65	n.d.	48,96
2000 µmol/ml	α-Toxin	5	17,95	69,85	29,73	42	50,99
3333 µmol/ml	α-Toxin	5	30,6	69,8	37,48	42	53,33
5000 µmol/ml	α-Toxin	5	48,7	73,6	48,93	42	58,93
0 µmol/ml	ADP	4	61	83	63	82	73
3,33 µmol/ml	ADP	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	67
10 µmol/ml	ADP	2	54	71	n.d.	n.d.	63
20 µmol/ml	ADP	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	57
33,3 µmol/ml	ADP	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	51
100 µmol/ml	ADP	3	34	53	n.d.	n.d.	45
200 µmol/ml	ADP	3	37	53	n.d.	n.d.	43
333 µmol/ml	ADP	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	44
500 µmol/ml	ADP	2	16	48	n.d.	n.d.	32
1000 µmol/ml	ADP	3	36	50	n.d.	n.d.	43
2000 µmol/ml	ADP	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	42
3333 µmol/ml	ADP	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	42
5000 µmol/ml	ADP	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	42

Tab. 8 c: Thrombozytenaggregation durch α-Toxin sowie ADP inhibiert mit Sin-1® in %; n.d.= nicht durchgeführt

Indomethacin®-Konz.	Aggregator	n	Min.	Max.	1. Quartil	3. Quartil	MW
0 nmol/ml	α -Toxin	5	51	84,8	58,95	83,1	72,04
3,3 nmol/ml	α -Toxin	5	50,5	81,2	60,55	80,4	71,68
10 nmol/ml	α -Toxin	5	58,8	82,95	62,3	82,08	73,61
20 nmol/ml	α -Toxin	5	50,1	80,5	59,28	80,03	70,71
33 nmol/ml	α -Toxin	5	54,45	80,15	63,58	80	72,77
50 nmol/ml	α -Toxin	5	53,4	76,25	62,95	75,3	70,03
100 nmol/ml	α -Toxin	5	59,85	79,4	65,3	77,65	72,27
0 nmol/ml	Kollagen	5	45	84	48	83	67
3,3 nmol/ml	Kollagen	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	40
10 nmol/ml	Kollagen	5	3	29	6	24	15
20 nmol/ml	Kollagen	5	0	18	2	16	10
33 nmol/ml	Kollagen	5	0	9	0	9	4
50 nmol/ml	Kollagen	5	0	12	0	7	3
100 nmol/ml	Kollagen	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5

Tab. 8 d: Thrombozytenaggregation durch α -Toxin sowie Kollagen inhibiert mit Indomethacin in %; n.d.= nicht durchgeführt

ReoPro®-Konz.	Aggregator	n	Min.	Max.	1. Quartil	3. Quartil	MW
0 μ g/ml	α -Toxin	5	74,5	84,9	77,3	83,65	80,6
0,1 μ g/ml	α -Toxin	5	78	83,45	79,08	82,68	80,83
0,3 μ g/ml	α -Toxin	5	76,9	81,95	77,18	81,3	79,3
1 μ g/ml	α -Toxin	5	73,8	82,2	75,85	82	79,36
3 μ g/ml	α -Toxin	5	72,9	75,45	73,28	74,95	74,12
5 μ g/ml	α -Toxin	5	66	80,15	68,4	78,05	73,65
10 μ g/ml	α -Toxin	5	67,25	75,9	68,63	74,45	71,61
33,33 μ g/ml	α -Toxin	5	68,25	78,7	68,33	77,18	73,28
0 μ g/ml	ADP	5	74	82	76	82	79
0,1 μ g/ml	ADP	5	73	81	74	80	77
0,3 μ g/ml	ADP	5	74	83	76	81	78
1 μ g/ml	ADP	5	70	80	73	80	77
3 μ g/ml	ADP	5	68	72	68	72	70
5 μ g/ml	ADP	5	41	60	46	56	51
10 μ g/ml	ADP	5	0	4	0	2	1
33,33 μ g/ml	ADP	5	0	0	0	0	0

Tab.8 e: Thrombozytenaggregation durch α -Toxin sowie ADP inhibiert mit ReoPro® in %

8.3. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
A	Ampere
AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APACT	Automated Platelet Coagulation Tracer
Aq. dest.	Aqua destillata
ARDS	adult respiratory distress syndrome
AT	α-Toxin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Complementfaktor
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosilmonophosphat
Da	Dalton
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DMSO	Dimethylsulfoxyd
ED	effektive Dosis
EDRF	endothelium derived relaxing factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale (constitutive) NO-Synthase
Fc	fragment crystalline
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GMCSF	Granulocyte-monocyte-colony-stimulating-factor
GP	Glykoprotein
GTP	Guanosiltriphosphat
h	Stunde
HK	Hämatokrit
HR	Herzfrequenz
Hrg.	Herausgeber
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
ID	inhibitorische Dosis
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
Kap.	Kapitel
KG	Körpergewicht
l	Liter
LFA-1	lymphocyte function associated antigen-1
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leukotrien
M	Molar
MAC-1	macrophage antigen-1
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
mg	Milligramm
Min	Minute

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MN	Muskelfasernekrose
MOF	multiple organ failure
mol	Mol
MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Probanden pro Gruppe
N	normal
NFκB	Nuclear Faktor kappa B
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
nMol	nanomolar
nNOS	neuronale NO-Synthase
NOS	NO-Synthase
p	piko
p.	Seite
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	platelet derived growth factor
PECAM	Platelet-Endothelial Cell Adhesion-Molecule
PG	Prostaglandin
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
pp.	Seiten
PPP	Plättchenarmes Plasma
PRI	Pressure Rate Index
Prot.	Protein
PRP	Plättchenreiches Plasma
RES	Retikulo-Endotheliales System
S	Standartabweichung
s.	siehe
Sek.	Sekunde
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SLe ^x	Sialyl Lewis ^x
Staph.	Staphylococcus
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TXA ₂	Thromboxan A ₂
V	Volt
VCAM	vascular cell adhesion molecule
vgl.	vergleiche
vWF	von Willebrand-Faktor

Danksagung

Allen, die zum Gelingen und zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben, sei herzlich gedankt.

Für den freundlichen Beistand, die Vertretung vor dem Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen und für die Hilfe bei der Erstellung des Manuskriptes möchte ich Herrn Prof. Reinacher danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Buerke, der mir das Thema dieser Arbeit zur weitgehend selbständigen Bearbeitung überlassen hat, mir in zahlreichen Diskussionen beratend zu Seite stand und die Korrektur des Manuskriptes übernommen hat.

Frau Gärtner und Herrn Podlech für die Unterstützung bei den histologischen Untersuchungen; Frau Gröning für die Einweisung in die APACT-Methodik; Frau Loos für die Hilfe bei der statistischen Auswertung; Frau Längin für ihre stetige Hilfsbereitschaft; Frau Lorenz für ihre Anregung und ihre Unterstützung; Nele Engler und Uli Schödel für die geduldige Hilfe bei der Erstellung der Bilderseiten und allen guten Freunden für den moralischen Beistand; am Schluß und ganz besonders den Ratten, die ihr Leben gegeben haben; Ihnen allen sei an dieser Stelle vielmals gedankt.