

α -Toxin von *Staphylococcus aureus* induziert ein
Nierenversagen durch Aktivierung der intrarenalen
Thromboxansynthese im Modell der isolierten Rattenniere

Melanie Eva Maria Simon



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Justus Liebig Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

und

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik IV/V
Klinikum der Justus Liebig Universität Gießen
Betreuer: PD Dr. med. Ulrich Grandel

**α - Toxin von *Staphylococcus aureus* induziert ein Nierenversagen
durch Aktivierung der intrarenalen Thromboxansynthese im Modell
der isolierten Rattenniere**

INAUGURAL-Dissertation
zur Erlangung des Grades
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig Universität Gießen

eingereicht von
Melanie Eva Maria Simon
Tierärztin aus Düren

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus Liebig Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer
Gutachter: Prof. Dr. R. Gerstberger
PD Dr. med. U. Grandel

Tag der Disputation: 15. Juli 2010

Meiner Familie

Inhalt

Inhalt	4
1 Abkürzungsverzeichnis	6
2 Abbildungsverzeichnis	7
3 Vorwort.....	8
4 Einleitung	9
4.1. Sepsis.....	9
4.1.1. Klinik	9
4.1.2. Pathophysiologie	10
4.2. Das septische Nierenversagen.....	12
4.2.1. Klinik und Pathophysiologie.....	12
4.3. Vasoaktive Substanzen in der Sepsis	14
4.3.1. Eicosanoide	14
4.3.2. Endothelin.....	16
4.3.3. PAF.....	17
4.3.4. Stickstoffmonoxid	17
4.4. Bakterielle Pathogenitätsfaktoren in der Sepsis	18
4.4.1. Bakterielle Toxine	18
4.4.2. α -Toxin.....	19
4.5. Pharmaka	21
4.5.1. Arachidonsäurestoffwechsel.....	21
4.5.2. Indomethazin	24
4.5.3. Daltroban	26
4.5.4. Picotamid.....	26
4.6. Fragestellung	27
5. Material und Methoden	28
5.1. Material	28
5.1.1. Tiere	28
5.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> α -Toxin	28
5.1.3. Pharmaka	28
5.1.4. Material und Geräte der Organperfusion.....	29
5.2. Methoden.....	32
5.2.1. Die Perfusion der isolierten Rattenniere.....	32
5.2.2. Messung der GFR	40

5.2.3.	Bestimmung von Thromboxan A ₂	41
5.2.4.	Messung der Natriumkonzentration im Urin	42
5.3.	Messung regionaler Blutflüsse in Organen mittels gefärbter Mikrosphären	42
5.3.1.	Einsatz gefärbter Mikrosphären an der isolierten Rattenniere	45
5.4.	Versuchsgruppen.....	49
5.5.	Statistische Datenauswertung	50
6.	Ergebnisse	51
6.1.	Übersicht.....	51
6.2.	Wirkung von Staphylococcus aureus α-Toxin	53
6.3.	Modifikation des toxininduzierten Nierenversagens	57
6.3.1.	Indomethazin	59
6.3.2.	Picotamid.....	59
6.3.3.	Daltroban	60
6.4.	Nachweis von TxA ₂ im organeffluenten Perfusat	60
6.5.	Umverteilung der regionalen Perfusion	62
7.	Diskussion.....	64
7.1.	Septisches Nierenversagen: Entwicklung der Fragestellung	64
7.2.	α-Toxin von Staphylococcus aureus induziert eine renale Dysfunktion	65
7.3.	Staphylococcus aureus α-Toxin ruft eine renale Vasokonstriktion hervor...	66
7.4.	Staphylococcus aureus α-Toxin führt zu schweren glomerulären und tubulären Funktionsausfällen isoliert perfundierter Rattennieren.....	68
7.5.	Staphylococcus aureus α-Toxin führt zur Umverteilung der regionalen Perfusion.....	69
7.6.	Klinische Relevanz der Ergebnisse.....	69
8.	Zusammenfassung.....	73
9.	Summary	75

1. Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ca	Kalzium
CHF	chronic heart failure
cNOS	konstitutionelle Stickstoffmonoxidsynthase
COX-1	konstitutionelle Cyclooxygenase
COX-2	induzierbare Cyclooxygenase
EDHF	endothelin derived hyperpolarizing factor
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
ET	Endothelin
FeNa	fraktionelle Natriumausscheidung
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
LTA	Lipoteichonsäure
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NSAID	nicht steroidale Antiphlogistika
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Protein
PG	Prostaglandin
RBF	Regionaler Blutfluss
RPF	Renaler Perfusionsfluß
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TxA	Thromboxan
TNa	Natriumretention
UFR	Urinflussrate

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die häufigsten Ursachen einer Sepsis in den USA	10
Abbildung 2 Schema zur toxinvermittelten Porenbildung	20
Abbildung 3 Schema zur Synthese wichtiger Eicosanoide.....	23
Abbildung 4 Thromboxan A ₂	24
Abbildung 5 Indomethazin.....	25
Abbildung 6 Daltroban.....	26
Abbildung 7 Picotamid.....	26
Abbildung 8 Die isoliert perfundierte Rattenniere	36
Abbildung 9 Schematischer Versuchsaufbau.....	37
Abbildung 10 Standardversuchsprotokoll.....	39
Abbildung 11 Schematische Darstellung unterschiedlich gefärbter Mikrosphären.....	44
Abbildung 12 Konzentrationsabhängige Reaktion der Niere.....	52
Abbildung 13 Beeinflussung der Nierenfunktionsparameter durch die Perfusion mit α -Toxin.....	54
Abbildung 14 Fraktionelle Natriumausscheidung	56
Abbildung 15 Beeinflussung der Nierenfunktion	58
Abbildung 16 Renale Thromboxansynthese	61
Abbildung 17 Veränderungen des regionalen Perfusionsflusses.....	63

3. Vorwort

Die Experimente, die der folgenden Arbeit zu Grunde liegen, wurden im Zeitraum vom 15.07.2003 bis zum 14.07.2005 in den Laborräumlichkeiten der Medizinischen Klinik IV/V der Justus-Liebig-Universität Gießen (Leiter Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. F. Grimminger) in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ulf Sibelius durchgeführt und von PD Dr. Ulrich Grandel betreut. Die Grundlage der Arbeit bildet die Tatsache, dass das septische Nierenversagen sehr häufig den Krankheitsverlauf der Sepsis verkompliziert und somit in vielen Fällen die Prognose deutlich verschlechtert. Trotz großer Bemühungen, dem septischen Nierenversagen durch entsprechende therapeutische Maßnahmen entgegen zu treten, hat sich die Situation bis dato nur wenig verbessert. Eine renale Minderperfusion der Niere, verursacht durch den generellen Blutdruckabfall im septischen Schock, wurde lange Zeit als alleinige Ursache für das Nierenversagen angesehen. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass bei normotensiven septischen Patienten ein Nierenversagen auftreten kann und dass nach Rekompensation eines hypotensiven Zustandes ein Nierenversagen oft noch über einen längeren Zeitraum persistieren kann. Diese und weitere experimentell erhobene Daten lassen vermuten, dass sowohl intrarenale als auch systemische Faktoren bei der Entstehung eines septischen Nierenversagens eine wesentliche Rolle spielen müssen.

Die Untersuchungen dieser Arbeit haben zum Ziel, die Wirkung des porenbildenden Exotoxins *Staphylococcus aureus* α -Toxin auf die Funktionsfähigkeit der isoliert perfundierten Rattenniere zu untersuchen. Besonderes Augenmerk wurde hierfür auf physiologische Parameter und klinisch chemische Untersuchungen gerichtet. Ergänzend wurden mit Hilfe unterschiedlich farbiger Mikrosphären die Veränderungen im regionalen Blutfluss nach Toxingabe untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass *Staphylococcus aureus* α -Toxin über eine unphysiologische Aktivierung des renalen Prostanoidstoffwechsels starke Veränderungen der regionalen renalen Perfusion hervorruft, über die schwerwiegende Störungen der Nierenfunktion im Sinne eines akuten Nierenversagens ausgelöst werden. Da porenbildende Exotoxine von einer Vielzahl klinisch relevanter Sepsiserreger gebildet werden, könnten die hier aufgezeigten Pathomechanismen zum septischen Nierenversagen *in vivo* beitragen.

4. Einleitung

4.1. Sepsis

4.1.1. Klinik

Die Sepsis und der septische Schock sind auch heute häufige Komplikationen bei Intensivpatienten. Studien in den USA zeigen eine Inzidenz dieser Ereignisse auf, die deutlich macht, dass diese Erkrankungen auch aktuell ein großes Problem darstellen. Jährlich erkranken in den USA mehr als 750000 Menschen an einer Sepsis. Das bedeutet, dass 3 von 1000 Menschen oder 2 von 100 Krankenhauspatienten jährlich betroffen sind. Das Alter dieser Patienten beträgt durchschnittlich 64 Jahre; Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen. 45% der Betroffenen erkranken aus voller Gesundheit an einer Sepsis, bei den übrigen 55% verkompliziert die Sepsis eine bereits bestehende Vorerkrankung. Die Mortalitätsrate liegt bei ca. 30%. Es sterben demnach in den USA jährlich mehr Patienten an den Folgen einer Sepsis als an einem akuten Herzinfarkt, was gleichzeitig bedeutet, dass die Sepsis und der septische Schock über 9% aller Todesfälle in den USA verursachen. Beobachtungen in den Jahren 1979- 2001 zählen 10.320.000 Krankheitsfälle, was in den USA 1,3% aller stationären Aufnahmen ausmacht. Trotz verbesserter medizinischer Bedingungen hat sich in diesem Zeitraum die Zahl der Fälle verdreifacht. So hat besonders auf Intensivstationen das Risiko zugenommen, an einer Sepsis zu erkranken. Diese Steigerung ist darauf zurückzuführen, dass in zunehmendem Maße alte, immunsupprimierte und multimorbide Patienten auf den Intensivstationen behandelt werden.

Dieses Phänomen steht aber wahrscheinlich auch in Zusammenhang mit der steigenden Resistenzentwicklung und der Ausbildung von multiresistenten nosokomialen Infektionserregern. Die häufigste Ursache septischer Erkrankungen stellen inzwischen Gram-positive Erreger dar (1). Die Abbildung 1 zeigt die wichtigsten Infektionen, die für eine Sepsis prädisponieren.

Pneumonie	44%
Bakteriämie(positive Blutkultur)	17%
Infektionen der Harnwege und Geschlechtsorgane	9%
Infektionen der Bauchorgane	9%
Wund- und Weichteilinfektionen	7%
Katheterinfektionen	2%
Infektionen des Nervensystems	1%
Endokarditis	1%
andere	11%

Abbildung 1: Die häufigsten Ursachen einer Sepsis in den USA im Jahr 1995 (nach Angus DC. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit. Care. Med.2001; 29: 1303-1310)

4.1.2. Pathophysiologie

Unter dem Krankheitsbild der Sepsis versteht man die Reaktion des Körpers auf eine generalisierte Infektion mit Nachweis von Mikroorganismen oder dem hochgradigen Verdacht auf das Vorhandensein von Mikroorganismen. Pathophysiologisch liegt der Sepsis zunächst eine zielgesteuerte Abwehrreaktion des Körpers zu Grunde, die sich im Laufe der Erkrankung der physiologischen Regulation entzieht und in eine generalisierte Form übergeht und sich somit nicht nur gegen die Pathogenitätsfaktoren, sondern auch gegen körpereigene Zellen und Organe richtet (2).

Voraussetzung für das septische Geschehen ist die Einschwemmung pathogener Keime oder ihrer Pathogenitätsfaktoren in die Blutbahn. Den infektiösen Fokus stellt

i.d.R. eine primär lokal umschriebene Entzündung dar, wie zum Beispiel eine Pneumonie oder ein Abszess.

Das klinische Bild der Sepsis resultiert aus einer komplexen Kaskade von proinflammatorischen, antiinflammatorischen, humoralen, zellulären und zirkulatorischen Ereignissen (3). Die Reaktionen des Organismus manifestieren sich dabei auf verschiedenen Ebenen. Durch eine gesteigerte anaerobe Glykolyse in den Geweben und den verminderten Laktatstoffwechsel in der meist geschädigten Leber steigt der Laktatgehalt im Blut an. Als Folge der Akut-Phase-Reaktion sinkt die Synthese von Albumin ab. Im Gegensatz dazu kann man steigende Konzentrationen von C-reaktivem Protein, Fibrinogen, Transferrin und den Komplementfaktoren beobachten. Durch die Freisetzung bakterieller Endo- und Exotoxine kommt es zusätzlich zu einer Stimulation von Makrophagen, Endothelzellen, Granulozyten und Lymphozyten (4). Diese Stimulation bewirkt an diesen Zellen die Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Mediatoren. Beispiel hierfür sind der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), der sämtliche Symptome des septischen Schocks im Tierversuch auslöst, und das Lipid A der bakteriellen Lipopolysaccharide (LPS), das u.a. vasomotorische Phänomene wie eine generalisierte Vasodilatation auslöst (5) und zudem am Entstehen einer Verbrauchskoagulopathie beteiligt sein kann. Die Verbrauchskoagulopathie stellt eine der schwersten Komplikationen der Sepsis dar. Durch eine verstärkte Aktivierung von Granulozyten kommt es im septischen Geschehen zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen sowie lysosomal wirksamen Proteasen. Diese verursachen schwere Gewebsschädigungen. Zusätzlich werden aus den Granulozyten proinflammatorisch wirksame Metabolite des Arachidonsäurestoffwechsels freigesetzt. Hierbei handelt es sich v.a. um Prostaglandine und Leukotriene. Zudem kommt es in der Sepsis initial zu einer unphysiologischen Synthese von Zytokinen. Wichtige Zytokine in diesem Zusammenhang sind der bereits erwähnte Tumornekrosefaktor- α sowie die Interleukine IL-6 und IL-8.

Zusammen führen die aufgezählten Mechanismen zu einer Störung der Organperfusion und damit zu einer inadäquaten Versorgung vitaler Organe mit Sauerstoff.

Folgen dieser komplexen Vorgänge beim Entstehen der Sepsis sind das akute Nierenversagen, das akute respiratorische Distress-Syndrom und das Leberversagen. Auf der Ebene hämostaseologischer Vorgänge kommt es zur

disseminierten intravasalen Gerinnung im Rahmen der oben beschriebenen Verbrauchskoagulopathie. Im schlimmsten Fall kommt es im Rahmen des septischen Schocks zu einem therapieresistenten Multiorganversagen (4).

4.2. Das septische Nierenversagen

4.2.1. Klinik und Pathophysiologie

Das septische Nierenversagen ist eine klinisch bedeutende Organkomplikation der Sepsis und des septischen Schocks. Für die Funktionsbeeinträchtigung der Niere werden hämodynamische Faktoren der Sepsis verantwortlich gemacht, die zur renalen Minderperfusion und Ischämie führen (6). Als Ursache hierfür wurde bisher die systemische Hypotension im septischen Schock gesehen. Möglicherweise kann allerdings die Aktivierung zellulärer Effektor- und humoraler Mediatorsysteme durch die systemische Einschwemmung bakterieller Pathogenitätsfaktoren auch ohne signifikanten Blutdruckabfall ein akutes septisches Nierenversagen induzieren (7-9). Das akute Nierenversagen tritt bei bis zu 20% der intensivmedizinisch betreuten Patienten auf. Die häufigste Ursache für dieses Phänomen ist ein septisches Schockgeschehen. Die hohe Mortalität dieses Krankheitsbildes bei septischen Patienten verringert sich nicht parallel zur Verbesserung der Sepsisbehandlung. Die Ursache dafür liegt darin begründet, dass die Mechanismen, die in der Sepsis das akute Nierenversagen herbeiführen, bis dato nicht geklärt und verstanden sind (10).

In den letzten fünfzig Jahren wurde die Entstehung des septischen Nierenversagens vor allem als Folge von hämodynamischen Veränderungen verstanden (10). Im Zuge der Sepsis kommt es im Körperkreislauf zu einer generalisierten Vasodilatation und als Folge davon zum Blutdruckabfall. Bei Unterschreiten eines kritischen renalen Perfusionsdrucks kann sich dann ein Nierenversagen ausbilden. Demnach geht man von einem prärenalen Nierenversagen aus. Verschiedene Studien belegen jedoch, dass sich ein septisches Nierenversagen auch bei erhaltenem, systemischem Blutdruck entwickeln kann. So konnten in normotensiven septischen Tiermodellen die Abläufe des septischen Nierenversagens reproduziert werden (11).

Auch Studien an septischen Patienten, bei denen mit Hilfe intravasaler Katheter der renale Blutfluss gemessen werden konnte, haben gezeigt, dass sepsisinduzierte renale Dysfunktionen trotz normalen renalen Blutflusses auftreten können (12).

Weitere experimentelle Arbeiten weisen auch darauf hin, dass die Nierenstrombahn nicht an der systemischen Vasodilatation in der hyperzirkulatorischen Phase der Sepsis teilnimmt. Stattdessen scheint die Niere zu einer selektiven renalen Vasokonstriktion fähig zu sein, die vermutlich die afferente Arteriole stärker als die efferente betrifft und somit erheblich zum Abfall der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) und zur Entstehung tubulärer Funktionsstörungen beiträgt (13,14). Zudem scheint es auch bei erhaltener Nierenperfusion durch eine Umverteilung des renalen Blutflusses aus kortikalen in medulläre Nierenabschnitte zu einer zusätzlichen, funktionellen renalen Beeinträchtigung zu kommen (15, 16).

An dieser renalen Vasokonstriktion sind nicht nur systemische, sondern auch intrarenale Mediatoren und Mechanismen beteiligt. Neben erhöhten Spiegeln von Noradrenalin, Angiotensin II und Vasopressin können besonders auch die intrarenal gebildeten vasoaktiven Mediatoren wie Eicosanoide (17-19), Plättchen-aktivierender-Faktor (PAF) (20), Endotheline (21) und Stickstoffmonoxid (NO) (22) zur Reduktion der renalen Perfusion, Modulation der glomerulären Filtration und zur Redistribution des intrarenalen Blutflusses auch bei erhaltenem systemisch-arteriellen Blutdruck beitragen. Zudem können Thromboxan, Cysteinyl-Leukotriene und Endotheline durch eine Kontraktion der Mesangiumzellen die GFR zusätzlich reduzieren (23).

Auch erhöhte Zytokinspiegel (z.B. Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin 1 (IL-1)), die in der Sepsis sowohl intra- als auch extrarenal gebildet werden, können zur Pathogenese des septischen Nierenversagens beitragen. TNF- α führt zur Freisetzung vasoaktiver Metabolite aus glomerulären Endothel- und Mesangiumzellen, induziert eine mesangiale Sauerstoffradikalbildung und führt zu glomerulärer Aggregation von neutrophilen Granulozyten. Zudem hat TNF- α indirekt durch die Induktion von „tissue factor“ und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Protein (PAI-1) prokoagulatorische Eigenschaften (21,24). Zusätzlich können toxische Produkte aktivierter neutrophiler Granulozyten (Proteasen, Sauerstoffradikale), Reperfusionsschäden und Mikrothromben ein septisches Nierenversagen aggravieren (25, 26, 27).

Es ist also davon auszugehen, dass dem septischen Nierenversagen ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster intrarenaler Pathomechanismen zugrunde liegt.

4.3. Vasoaktive Substanzen in der Sepsis

Vasoaktive Mediatoren spielen in der Pathogenese der Sepsis eine sehr große Rolle. Neben der Bildung von Mikrothromben führt v.a. die unphysiologische Freisetzung von vasoaktiven Mediatoren zu Mikrozirkulationsstörungen und somit zu schweren Funktionsbeeinträchtigungen einer Reihe von Organen in der Sepsis. Das septische Lungenversagen (28), die septische Kardiomyopathie (29), und die Darmschädigung in der Sepsis (30) lassen sich auf Mikrozirkulationsstörungen zurückführen. Beispiele für solche vasoaktiven Mediatoren sind der Plättchen-aktivierende-Faktor, Endothelin (ET), endothelin-derived-hyperpolarizing-factor (EDHF) und Stickstoffmonoxid. Diese Substanzen vermitteln an den Gefäßen sowohl konstriktive als auch dilatative Wirkungen. Weitere in diesem Zusammenhang bedeutsame Substanzen sind die Arachidonsäurederivate, die im Rahmen des aktivierten Arachidonsäure-metabolismus vermehrt in der Sepsis gebildet werden

4.3.1. Eicosanoide

Bei den Eicosanoiden handelt es sich um oxygenierte Derivate der Arachidonsäure (AA), die im Verlauf des Arachidonsäuremetabolismus anfallen können. AA wird enzymatisch aus den Phospholipiden der Zellmembran freigesetzt. Der erste Schritt der Oxygenierung erfolgt entweder über das Enzym Lipoxygenase, die Cyclooxygenase oder Cytochrom P450. In Abhängigkeit von diesem ersten Schritt teilt man alle danach entstehenden Produkte ein.

Lipoxygenase-Produkte

Zu den Derivaten dieses Zweiges des Arachidonsäurestoffwechsels gehören die Leukotriene LTA₄ und LTB₄ sowie die Cysteinyl-Leukotriene LTC₄, LTD₄ und LTE₄. Diese Leukotriene spielen im Verlauf einer Sepsis eine wichtige Rolle und werden unter anderem in Phagozyten, eosinophilen Granulozyten, Mastzellen und im

Endothel gebildet. Sie wirken unter anderem auf die glatte Muskulatur. Ihre Signalwege führen zu Chemotaxis, Vasokonstriktion, Bronchokonstriktion oder einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität (32,33).

Cyclooxygenase-Produkte

Verläuft die Oxygenierung der Arachidonsäure durch die Katalysierung von Cyclooxygenase, kommt es zur Bildung von Prostanoiden. Zwei wichtige Vertreter dieser Gruppe sind das Prostaglandin (PG), I_2 oder auch Prostacyclin und das Thromboxan A_2 (TxA_2). Das Prostacyclin wird vornehmlich in Endothelzellen gebildet und bewirkt eine Abnahme der endothelialen Permeabilität. Außerdem ruft es eine Vasodilatation hervor (34). Unter der Einwirkung von TxA_2 kommt es hingegen zur Thrombozytenaggregation, zur Bronchokonstriktion, zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität und zur Vasokonstriktion (35,36). Beide hier beschriebenen Prostanoiden werden in der Sepsis vermehrt gefunden. Dabei besteht zwischen dem Thromboxan A_2 und der Schwere und Mortalität der Erkrankung eine positive Korrelation, während man den Prostacyclinen gemäß ihrer Wirkweise eher protektive Eigenschaften zuspricht (34). Die Cyclooxygenase kann in zwei Isoformen auftreten. Es gibt auf der einen Seite die konstitutive Cyclooxygenase 1 (COX-1), die in den meisten Geweben des Körpers zu finden ist und auf verschiedene physiologische Reize reagiert (38). Auf der anderen Seite gibt es noch die induzierbare Cyclooxygenase 2 (COX-2). Diese wird in vielen Organen im Laufe einer Sepsis, Ischämie oder Entzündung vermehrt exprimiert (38).

Der vermehrten Bildung von TxA_2 könnte in der Sepsis eine bedeutsame pathophysiologische Rolle zukommen. So konnte auf experimenteller Ebene gezeigt werden, dass die exzessive Bildung von TxA_2 in der pulmonalen Strombahn zur Erhöhung des pulmonal-arteriellen Drucks und zur Lungenödembildung beiträgt. Beide Phänomene sind wesentliche Charakterzüge des septischen Lungenversagens (39). Am isoliert perfundierten Rattenherzen führte die Freisetzung von TxA_2 zu myokardialen Perfusionsstörungen und zur linksventrikulären Dysfunktion im Sinne einer septischen Kardiomyopathie (40). Zudem könnte die exzessive Freisetzung von TxA_2 zu hämodynamischen Veränderungen an der Niere führen. So wurde bei der Mikroperfusion einzelner Nephrone eine Ansprechbarkeit

auf die Wirkung von Thromboxan festgestellt (41). Andere Arbeitsgruppen konnten wiederum am Tiermodell eine renale Vasokonstriktion nach der Injektion von Thromboxan nachweisen (42). Diese Phänomene führen zudem zu Natrium- und Wasser-Retention, im Rahmen eines Rückgangs der GFR. Die Gabe von Thromboxan wurde des Weiteren unter zwei Gesichtspunkten betrachtet. Experimente, die unter physiologischen Rahmenbedingungen durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass Thromboxan in diesen Fällen keinerlei hämodynamische Bedeutung hat (43). Unter ohnehin schon pathophysiologischen Bedingungen dagegen führt die Anwesenheit von Thromboxan zu einer deutlichen Verschlechterung des Zustands der Niere (44).

Cytochrom P450 Produkte

Wird die Arachidonsäure durch ein Enzym der Cytochrom P450-Gruppe hydroxyliert, so kommt es zur Bildung von 19- und 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE). Diese stellt einen potenten Vasokonstriktor dar. Bei der Regulation des Gefäßtonus in den Nierengefäßen spielt 20-HETE ebenfalls eine Rolle.

4.3.2. Endothelin

Dieses Peptid wird überwiegend in den Endothelzellen gebildet und gehört wie PAF zu den vasoaktiv wirksamen Mediatoren, die v.a. vasokonstriktive Einflüsse nehmen. Die Wirkweise des Peptids wird über die Rezeptoren ET_A und ET_B an der glatten Gefäßmuskulatur vermittelt. In der Niere wird es v.a. in den Mesangiumzellen des Glomerulum als Reaktion auf Hypoxie – oder auch Ischämiereize hin – ausgeschüttet (4).

Die im Blut aktive Form des Endothelins ist das ET-1, welches in der Sepsis häufig erhöht gefunden wird. Der Zusammenhang zwischen seiner Wirkung und den Verschlechterungen im septischen Schockzustand werden v.a. dadurch deutlich, dass sich bei Patienten, denen Endothelinrezeptor Antagonisten verabreicht worden waren, daraufhin eine Besserung zeigte (31). Im gesamten Organismus scheint die vasokonstriktorische Wirkung des ET-1 auf einem entstehenden Missverhältnis zwischen NO und dem ET-1 zu resultieren.

4.3.3. PAF

Bei dem Plättchen aktivierenden Faktor (PAF) handelt es sich um ein Phospholipid, dass in verschiedenen Zellen des Körpers gebildet wird. Es erfüllt im Organismus verschiedenste Aufgaben und spielt auch in der Sepsis und im septischen Schockgeschehen eine große Rolle. In der Sepsis wird die Synthese des PAF über verschiedene Mediatoren und Mechanismen vermittelt. Sowohl die Endotoxine als auch die entstehenden Zytokine wirken direkt steigernd auf die PAF-Synthese. TNF- α und IL-1 fördern bei verschiedenen Zellen die Bildung des Phospholipids. Dazu gehören die Monozyten, Makrophagen, polymorphe Neutrophile, Endothelzellen und die Mesangiumzellen im Glomerulum. Ebenfalls erhöhen bakterielle Lipopolysaccharide die Konzentration des PAF im Blut. Sie wirken hierbei über den CD14-LPS-binding-protein Signalweg. Der Mediator ist in der Lage, als inter- und auch intrazelluläres Signalmolekül an spezifische PAF-Rezeptoren zu binden. Seine Wirkungen im Rahmen eines septischen Geschehens werden über die Aggregation von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten vermittelt. Ebenso schädigend wirkt sich aber auch sein Einfluss auf die Vasomotorik und die Gefäßpermeabilität aus. Außerdem kommt es zur Bildung von Sauerstoffradikalen. Diese Fähigkeiten lassen den PAF als Verursacher zahlreicher Organkomplikationen im Verlauf einer Sepsis vermuten.

4.3.4. Stickstoffmonoxid

Das Stickstoffmonoxid (NO) gilt als starker Vasodilatator. Gebildet wird es aus der Aminosäure L-Arginin in Anwesenheit des Enzyms NO-Synthase, welche in drei verschiedenen Isoformen auftreten kann. Diese Isoformen sind maßgeblich an der Regulation der NO-Produktion beteiligt und werden auf unterschiedliche Weisen aktiviert. Konstitutionelle NO-Synthasen (cNOS) befinden sich in Nervenzellen (nNOS) und in den Endothelzellen (eNOS) und sichern dort Ca^{2+} -abhängig eine relativ gleichbleibende NO-Synthese. Dieser basale NO-Spiegel bewirkt über eine Erhöhung des intrazellulären cGMP im Gefäßmuskel eine Relaxation der Muskelzelle und verursacht dadurch eine Vasodilatation. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wird über proinflammatorische Stimuli wie Zytokine oder LPS aktiviert. Sie verursacht

eine massive Produktion von NO und kann so die Gefäßregulation aus ihrem physiologischen Gleichgewicht bringen. Durch die massive und nicht regulierbare Vasodilatation kommt es zum septischen Schock (45).

An der Niere spielt die NO-Synthase eine lebenswichtige, regulierende Rolle im Rahmen der vaskulären Relaxation. Allerdings kann sowohl LPS als auch inflammatorische Zytokine die Synthese der induzierbaren NOS in der Niere steigern, was durch eine unphysiologische NO-Bildung zu Perfusionsstörungen auf mikrozirkulatorischer Ebene führen könnte (46).

4.4. Bakterielle Pathogenitätsfaktoren in der Sepsis

Das Krankheitsbild der Sepsis kann durch unterschiedlichste Bakterien, Pilze und Parasiten hervorgerufen werden. Die bedeutendste Rolle nehmen im klinischen Alltag sicherlich die positiven und negativen Bakterien ein. Interessanterweise erlaubt das Erscheinungsbild der Erkrankung in der Regel keinerlei direkten Rückschluss auf den auslösenden Erreger. Vielmehr ist es so, dass verschiedene Erreger eine Erkrankung mit weitestgehend gleicher Symptomatik verursachen (47, 49). Interessanterweise scheint die bakterielle Sepsis nicht an das Vorhandensein intakter Bakterien in der Blutbahn gebunden zu sein. Vielmehr könnte die systemische Einschwemmung bakteriell sezernierter Toxine aus einem infektiösen Fokus das Krankheitsbild der Sepsis und ihre Organkomplikationen hervorrufen.

4.4.1. Bakterielle Toxine

Bakterielle Toxine lassen sich in zwei Gruppen, die Endotoxine und die Exotoxine einteilen.

Die Exotoxine sind wirtsschädigende, bakterielle Proteine, die entweder vom Bakterium aktiv in die Umgebung sezerniert oder durch dessen Lyse freigesetzt werden (50). Der molekulare Aufbau dieser Exotoxine variiert von monomeren Proteinen, aufgebaut aus nur einer Proteinkette, bis zu oligomeren Proteinen, die aus zwei oder mehr Polypeptidketten bestehen. Häufig findet man funktionelle Untereinheiten, von denen die eine (A-Untereinheit) die Bindung an die Wirtszelle vermittelt. Die Wirkung der Exotoxine basiert auf verschiedenen Mechanismen. Hier

lassen sich Superantigene, enzymatisch aktive A/B Toxine, und membranschädigende Toxine unterscheiden (51). Zu den membranständigen Toxinen gehören die porenbildenden Exotoxine, deren prominentester Vertreter das unten beschriebene *Staphylococcus aureus* α -Toxin darstellt.

Die zweite große Gruppe neben den Exotoxinen bilden die Endotoxine. Prominentester Vertreter der Endotoxine sind die Lipopolysaccharide der Zellwände Gram-negativer Keime. Aber auch Gram-positive Keime besitzen „Endotoxinäquivalente“ wie Lipoteichonsäuren (LTA) und Peptidoglycane. Die Endotoxine Gram-negativer Bakterien zeichnen sich dadurch aus, dass sie bei der Zellteilung und bei der Zerstörung des bakteriellen Erregers frei werden. Es handelt sich bei ihnen um Lipopolysaccharide, aufgebaut aus einem Glycophospholipid (Lipid A), einem Kernpolysaccharid und einer terminalen Zuckerkette. Die toxische Wirkung wird durch das Lipid A vermittelt. Nach der rezeptorvermittelten Bindung von LPS, z.B. an CD14 und/oder Toll-like Rezeptoren wie TLRH in der Membran der Zielzellen, bei denen es sich vor allem um Monozyten, Makrophagen, aber auch andere Zellen handeln kann, werden diese zu einer Überproduktion von zelltypischen Mediatoren angeregt. Beispiele für solche übermäßig produzierten Mediatoren sind Interleukine (IL-1, IL-6, IL-8), TNF- α), sowie PAF. Die exzessive Freisetzung dieser proinflammatorischen Mediatoren kann die Organdysfunktion der Sepsis und ihre klinisch fassbaren Äquivalente hervorrufen (51).

Die oben erwähnten Endotoxinäquivalente Gram-positiver Bakterien wie LTA oder PG können ebenfalls die oben beschriebenen Entzündungskaskaden initiieren und somit ebenso zum septischen Schock führen (50).

4.4.2. α -Toxin

Einer der am häufigsten nachgewiesenen bakteriellen Erreger im septischen Geschehen ist *Staphylococcus aureus*, wobei ein Hämolysin, das sogenannte α -Toxin, einer seiner wichtigsten Pathogenitätsfaktoren ist (52). Dieses gehört zu den porenbildenden Exotoxinen und hat eine Größe von 34 KD. Zielzelle dieses Toxins sind prinzipiell alle Säugetierzellen, wobei die toxinvermittelten Auswirkungen zellabhängig stark variieren können. Beispiele für solche Symptome sind Hämolyse, starke Zytotoxizität und Dermonekrosen. Experimentell konnten lytische Eigenschaften des α -Toxins an Kaninchen-Erythrozyten schon in sehr geringen

Konzentrationen festgestellt werden. Die wichtigsten Zielzellen im menschlichen Organismus sind v.a. Thrombozyten (53), Monozyten (54) und Endothelzellen (52). Der primäre Angriffsort des α -Toxins ist die Plasmamembran der Zielzelle. Der Ablauf der Porenbildung ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Es kommt nach Anlagerung monovalenter Toxinmoleküle an die Membran zur Oligomerisierung (55-58) und schließlich zur Bildung stabiler transmembranöser Poren an der Zielzelle (58-61). Im Detail hat man den Mechanismus dieser entscheidenden Porenbildung folgendermaßen beschreiben: nach dem Freiwerden des hydrophilen α -Toxin Moleküls, das aus 293 Aminosäuren besteht, bindet dieses als Monomer an die Zielmembran (62). Durch Lateraldiffusion in der Membran oligomerisieren die Toxinmoleküle zu einem ringförmigen Heptamer, welches eine zentrale transmembranäre Pore umgibt (63).

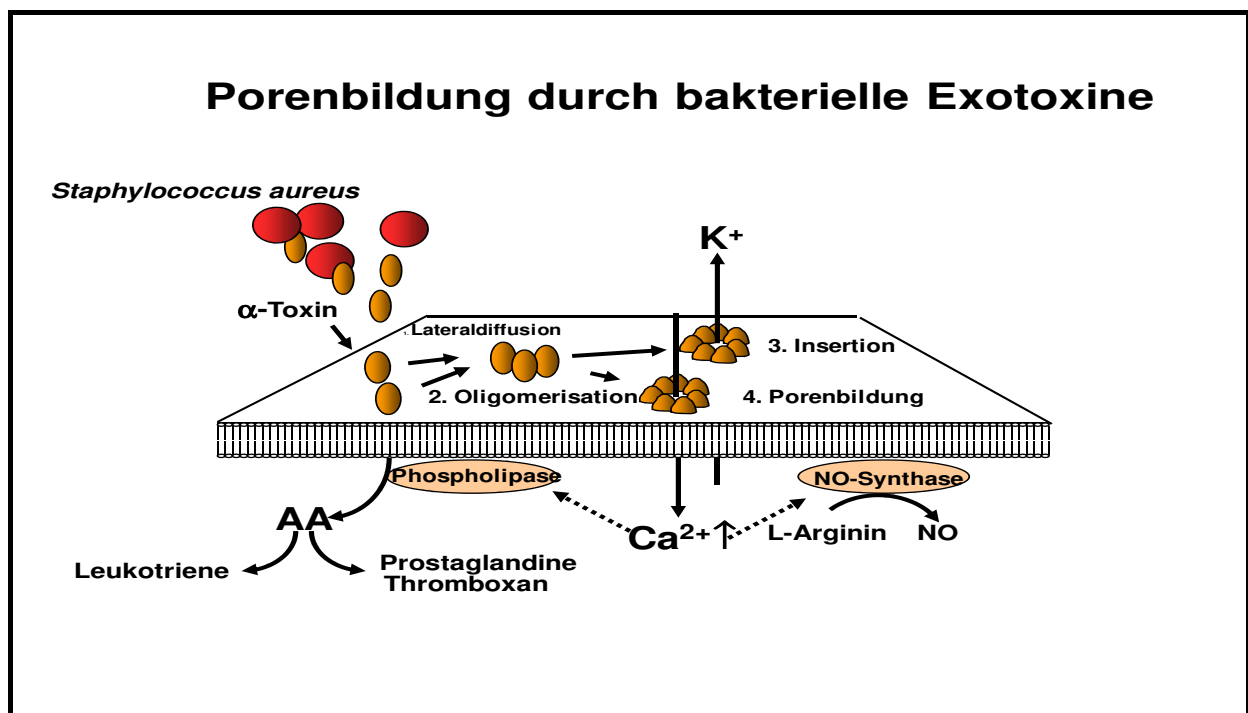


Abbildung 2: Schema zur toxinvermittelten Porenbildung an der Zellmembran am Beispiel von α -Toxin von *Staphylococcus aureus*. Die Zelle wird durch Störung der Natrium-Kalium-Homöostase aktiviert und reagiert mit der Produktion von Eicosanoiden. (AA= Arachidonsäure, NO= Stickstoffmonoxid)

Viele klinisch relevante Sepsiserreger wie *E.coli*, *Proteus*, *Actinobacter* oder *Pseudomonas* produzieren ähnliche porenbildende Exotoxine, so dass α -Toxin als Prototyp dieser Toxine angesehen werden kann (64).

Die pathogenetische Relevanz des *Staphylococcus aureus* α -Toxin ist gut belegt. Grimminger et al. (1997) konnten zeigen, dass α -Toxin an humanen Endothelzellen zur Freisetzung von PAF, NO und Prostaglandinen führt (52), was bei der vasoregulativen Dysfunktion der Sepsis eine große Rolle spielen könnte. Zudem kann α -Toxin die Thromboxanbildung isolierter Thrombozyten aktivieren, was erheblich zur disseminierten intravasalen Gerinnung der Sepsis beitragen könnte. Am Modell der isoliert perfundierten Rattenlunge führte α -Toxin zu einer thromboxanvermittelten Zunahme des pulmonalarteriellen Drucks und zu einer Zunahme der endothelialen Permeabilität mit Ausbildung eines Lungenödems (39). Auch am Modell des isoliert perfundierten Rattenherzens lässt sich die Virulenz des α -Toxins demonstrieren (40). Hier zeigte sich, dass es unter der Einwirkung von isoliertem α -Toxin zu ausgeprägten koronaren Perfusionsstörungen und schweren myokardialen Depressionen kommt. Pharmakologische Interventionen konnten zeigen, dass diese Effekte in engem Zusammenhang mit der toxinassoziierten Thromboxan A_2 -Bildung stehen und dass es zudem zu einer raschen Stimulation der NO-Synthese kommt (65). Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass diese Phänomene durch die Wirkung des isolierten Bakterientoxins in Abwesenheit des bakteriellen Gesamtorganismus hervorgerufen wurden.

4.5. Pharmaka

4.5.1. Arachidonsäurestoffwechsel

Die Intermediärmoleküle des Arachidonsäurestoffwechsels spielen in der medizinischen Forschung der letzten 25 Jahre eine immer größer werdende Rolle. Ihre Relevanz ergibt sich vor allem aus ihrem fast ubiquitären Auftreten im menschlichen Körper. Auch pharmakologisch sind sie heute von großem Interesse, da ihre Inhibition die Grundlage der nicht-Steroidalen Antiphlogistika (NSAID) ausmacht. Chemisch handelt es sich bei diesen Mediatoren um mehrfach

ungesättigte Fettsäuren, wie die Arachidonsäure. Ein Synonym für die Stoffe dieser Gruppe ist auch „Eicosanoide“, basierend auf der Tatsache, dass sie alle aus C₂₀-Fettsäuren entstehen. Im Stoffwechsel der Arachidonsäurederivate spielt das Enzym Cyclooxygenase (COX) eine bedeutende Rolle. Durch die Aktivität dieses Enzyms kommt es zur Entstehung von Prostaglandinen, Prostacyclinen und Thromboxan. Die Bildung von Hydroxyperoxyeicosatetraensäure (HPETE) und deren Derivaten hängt dagegen von der Aktivität verschiedener Lipoxygenasen (Lox) ab. In diesem Zweig des Stoffwechsels entstehen dann auch die Leukotriene. Ausgehend von dieser Tatsache kann man noch zwei Gruppen, nämlich die der cyclooxygenaseabhängigen und die der lipoxygenaseabhängigen Arachidonsäuremetaboliten einteilen. Der Stoffwechselweg lässt sich schematisch in Abbildung 3 verfolgen.

Die zweite dieser beiden Gruppen findet man nur in einer begrenzten Anzahl von Zelltypen wieder. Zu diesen gehören die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Retikulozyten, Thrombozyten und Makrophagen. Diese unterschiedlichen Zelltypen weisen auch unterschiedliche Lipoxygenasen auf. Das Ergebnis einer Lipoxygenaseaktivierung ist aber bei den verschiedenen Zellen immer die Leukotriensynthese. Die Wirkung dieser Leukotriene unterscheidet sich dann wiederum an der jeweiligen Zielzelle. Auf humane Leukozyten wirken sie z.B. chemotaktisch, chemokinetisch, proaggregatorisch und degranulierend. Eine ungleich weitere Verbreitung im Organismus weisen die cyclooxygenaseabhängigen Arachidonsäuremetabolite auf. Sie bestehen aus einem Cyclopentanring, einer Carboxyl- und einer Alkylseitenkette.

Die Substrate liegen vor allem in der Membran der Zellen vor. Als Substrat der Cyclooxygenase eignet sich aber nur die freie Arachidonsäure, weshalb der Stoffwechsel in erster Linie von der Freisetzung der Fettsäuren aus der Membranlipiddoppelschicht abhängt. Diese Freisetzung kann durch eine Aktivierung von Phospholipase A₂ oder Phospholipase C und Diacylglyceridlipase gestartet werden. Stimuli dieser Aktivierung können chemischen, physiologischen oder pharmakologischen Ursprungs sein und arbeiten über eine Erhöhung des intrazellulären Calciums. Die weitere Biosynthese der Arachidonsäurestoffwechselprodukte hängt von unterschiedlichen Enzymen ab. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Thromboxansynthase, die die Synthese von Thromboxanen katalysiert, welche einen vasokonstriktischen und auch plättchenaggregationsfördernden Effekt haben. Antagonistisch dazu wirkt das

Prostacyclin, welches wiederum in anderen Zellen aus den Prostacyclin-Endoperoxiden gebildet wird und dem Thromboxan-Effekt mit vasodilatatorischen Eigenschaften gegenüber steht.

Sowohl beim Thromboxan A_2 , als auch beim PGI_2 handelt es sich um chemisch sehr labile Stoffwechselprodukte, die schnell zu biologisch inaktiven stabilen Produkten, dem TxB_2 bzw. 6-keto- $PGF_{1\alpha}$, hydrolysiert werden.

Die Effekte der entstehenden Stoffwechselprodukte sind relativ organspezifisch.

An der Niere setzen PGE_2 , PGI_2 und PGD_2 Renin aus der Rinde frei. Es kommt zu einer Steigerung des renalen Blutflusses, sowie der Diurese. Die Wasserrückresorption in den Sammelrohren wird dagegen durch die Prostaglandine vermindert.

Für die Untersuchungen des septischen Nierenversagens ist eine Kenntnis der Arachidonsäure-Wirkung auf den Gesamtkreislauf notwendig. Es kommt hier durch die Einwirkung von PGE_2 und PGE_1 zu einer Vasodilatation und somit zu einem Absinken des peripheren Gefäßwiderstands und des zentralen Blutdrucks.

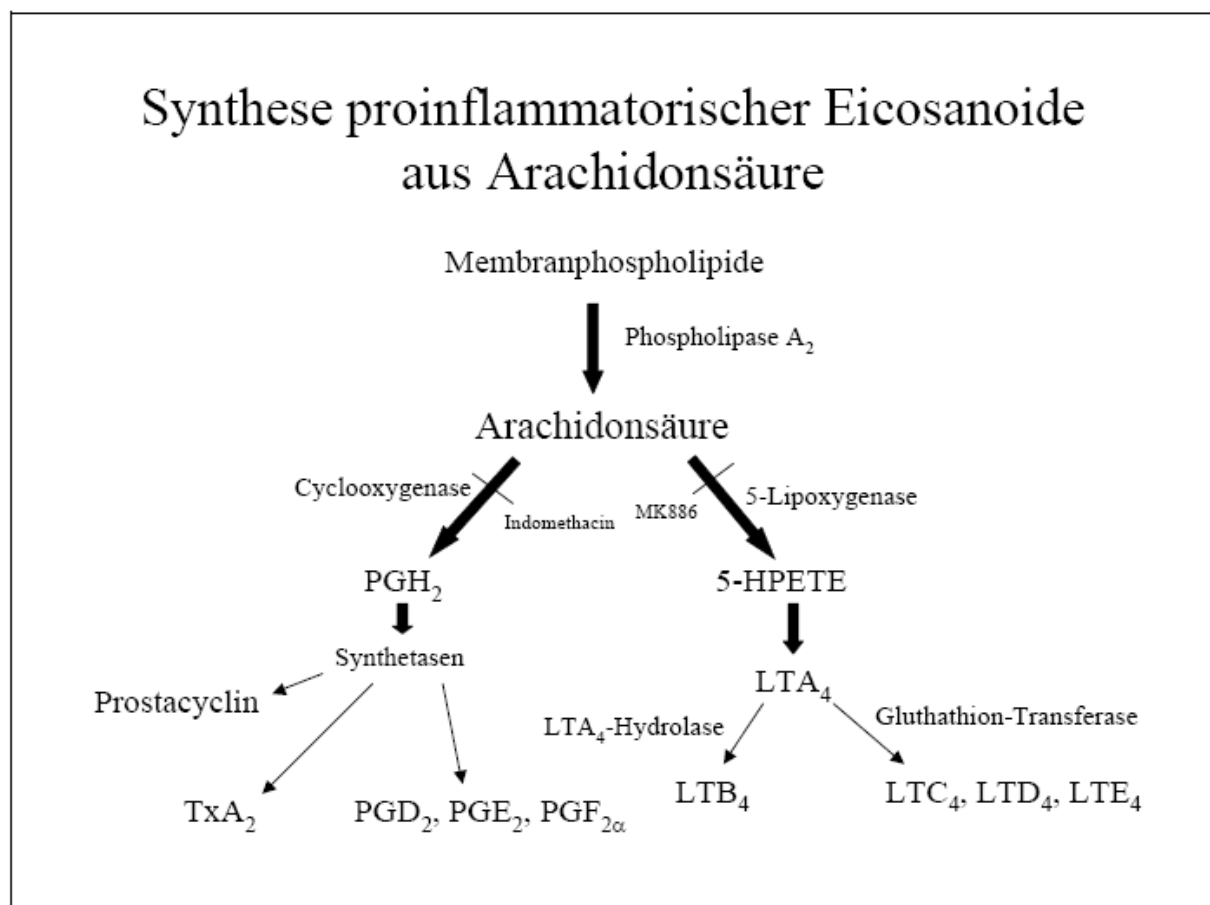


Abbildung 3: Schema zur Synthese wichtiger Eicosanoide aus Arachidonsäure. Prostaglandin (PG); Hydroxyperoxyeicosatetraensäure (HPETE), Leukotriene (LT),

Thromboxan (TxA). Nach U. Bennemann; Experimentelle Untersuchungen zur Mikrozirkulation isoliert perfundierter Rattenherzen unter Einfluss bakterieller Exotoxine.

Thromboxan A₂ dagegen zeigt starke vasokonstriktorische Kompetenzen. Diese Wirkung wird über den Thromboxan A₂- Rezeptor vermittelt. Pharmakologische Interventionsmöglichkeiten ergeben sich nun aus den Enzymen des Stoffwechselweges und den Wirkmechanismen der verschiedenen Metabolite.

Inhibitoren, die in dieser Arbeit eine Rolle spielen, vertreten drei Möglichkeiten dieser Inhibition. Zum einen die Hemmung der Cyclooxygenase. Die wichtigsten Hemmstoffe dieser Cyclooxygenase sind heute die sogenannten NSAIDs (nicht-steroidale Antiphlogistika). Es handelt sich dabei um antiphlogistisch wirksame Derivate organischer Säuren. Als weitere Ansatzpunkte neben der Hemmung der Arachidonsäure-Metabolite sind die Hemmung der Thromboxan-Synthase und ein Einschränken der Wirkung der entstandenen Cyclooxygenaseprodukte zusätzlich noch über eine Antagonisierung der TxA₂-Rezeptoren.

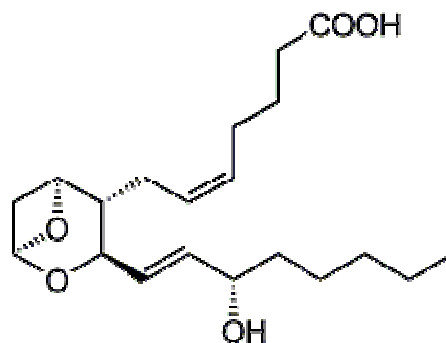


Abbildung 4: Thromboxan A₂

4.5.2. Indomethazin

Indomethazin ist ein Vertreter aus der Gruppe der nicht steroidalen Antiphlogistika, d.h. es handelt sich um ein antiphlogistisch wirksames Derivat einer organischen Säure, hier ein Indolessigsäurederivat.

Der antiphlogistische Effekt beruht auf einer Inhibition des Enzyms Cyclooxygenase und einer auf diesem Wege verringerten Biosynthese von Prostaglandinen. In der Praxis wird dieser Effekt leider von zahlreichen unerwünschten Nebenwirkungen begleitet. Zu diesen gehören neben einer nicht seltenen Schädigung der Magenschleimhaut auch bronchospastische und tokolytische Ereignisse. Trotzdem bleiben die nicht steroidalen Antiphlogistika die wichtigsten Hemmstoffe der Cyclooxygenase (66) und diese ist der limitierende Faktor für die Synthese der Prostaglandine (67). Man unterscheidet drei Cyclooxygenase (COX) Isoformen (68). Die COX-1 wird in fast allen Geweben des Organismus ständig gebildet und scheint Teil physiologischer Regulationsmechanismen zu sein (69). Die COX-2 dagegen ist eine Isoform, deren Synthese erst durch inflammatorische Stimuli induziert und hochreguliert wird (70-77). Die COX-3 ist gleichen genetischen Ursprungs wie die COX-1, trägt jedoch eine NH₂-terminale Verlängerung (68). Untersuchungen an verschiedenen Tier- und Organmodellen haben gezeigt, dass es unter pathologischen Bedingungen wie zum Beispiel der Herzinsuffizienz zu COX-abhängigen Hochregulierung der Prostaglandinsynthese und dadurch zu weiteren Einschränkungen auf Organebene wie z.B. Kardiodepression kommt (69). Man schreibt den antiphlogistischen Effekt allerdings funktional der Inhibition der COX-2 zu. Eine Hemmung der COX-1 dagegen scheint Auslöser der verschiedenen Nebenwirkungen zu sein.

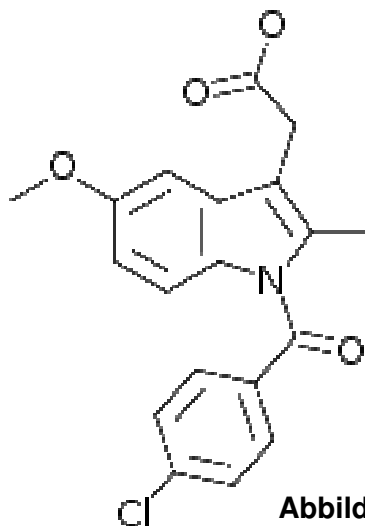


Abbildung 5: Indomethazin

4.5.3. Daltroban

Bei dem Wirkstoff Daltroban handelt es sich um einen Thromboxan A₂ Rezeptor-Antagonisten. Im Tiermodell zeigte es sich, dass dieser Antagonist die Antwort des pulmonalen Gefäßsystems auf das TxA₂ signifikant verringert. Die Antagonisierung verlief selektiv und war kompetitiv sowie auch reversibel (78).

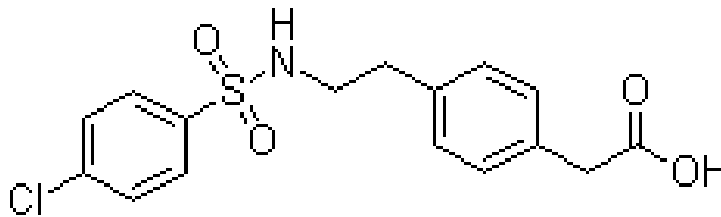


Abbildung 6: Daltroban

4.5.4. Picotamid

Das Picotamid greift in den TxA₂-Mechanismus sowohl auf der Ebene der Synthese als auch der Bioaktivitäten. Zum Einen kam es in Rattennieren zu einer Inhibition der TxA₂-Synthase, d.h. eine Bildung von TxA₂ wird verhindert oder abgeschwächt, jedoch nicht die des PGI₂ und des PGE₂ (79). Untersuchungen zeigten, dass TxA₂ induzierte Effekte, wie eine starke Einschränkung des renalen Perfusionsflusses, durch eine ausgeprägte Vasokonstriktion oder ein Absinken der Natrium- und Wasserretention durch den Einsatz von Picotamid deutlich gemildert werden konnten (80). Auch konnten verbesserte Effekte bei einer Behandlung von Patienten mit CHF mit Picotamid beobachtet werden (81,82).

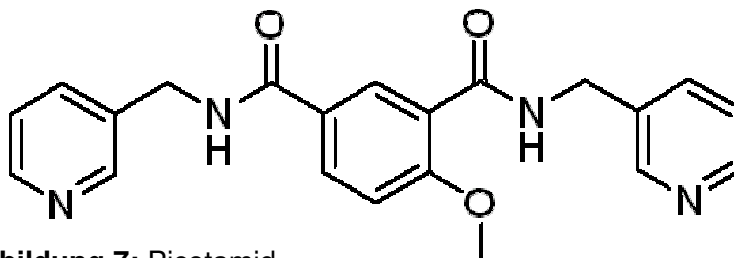


Abbildung 7: Picotamid

4.6. Fragestellung

Sepsis und septischer Schock stellen häufige Todesursachen in der Medizin dar. Der Verlauf einer Sepsis wird häufig durch ein septisches Nierenversagen erheblich kompliziert. Bei der Entstehung dieses septischen Nierenversagens könnte der intrarenalen Einschwemmung bakterieller Toxine eine entscheidende, pathogenetische Rolle zukommen. Vor allem porenbildende Exotoxine können septische Organkomplikationen im experimentellen Modell hervorrufen. So könnte die intrarenale Aktivierung vasoaktiver Effektorsysteme durch bakterielle Exotoxine erheblich zu Veränderungen der renalen Perfusion in der Sepsis beitragen. Dabei könnten v.a. intrarenal gebildete vasoaktive Mediatoren wie der Arachidonsäuremetabolit Thromboxan A₂ erhebliche, pathophysiologisch relevante Veränderungen induzieren. Vor diesem Hintergrund soll die vorliegende Arbeit die pathophysiologischen und pathobiochemischen Mechanismen untersuchen, die diesen Phänomenen zugrunde liegen könnten.

Die leitenden Fragestellungen sind:

- I. Kann das porenbildende Exotoxin α -Toxin des klinisch relevanten Sepsiserregers *Staphylococcus aureus* in Abwesenheit des bakteriellen Gesamtorganismus die typischen Veränderungen des akuten Nierenversagens wie eine Verschlechterung der Renalen Perfusionsrate oder der Urinproduktion in der Sepsis am Modell der isoliert perfundierten Rattenniere hervorrufen?
- II. Sind diese Veränderungen der Nierenfunktion auf die Zytotoxizität des bakteriellen Toxins allein zurückzuführen oder werden die Reaktionen durch intrarenal gebildete Mediatorsysteme vermittelt?
- III. Können diese Mediatorsysteme durch pharmakologische Interventionen an der isoliert perfundierten Rattenniere beeinflusst oder ausgeschaltet werden?
- IV. Kommt es im Rahmen der gestörten Mikrozirkulation zu einer Umverteilung des regionalen Blutflusses in der Niere unter den Bedingungen des septischen Nierenversagens am Modell der isoliert perfundierten Rattenniere?

5. Material und Methoden

5.1. Material

5.1.1. Tiere

Für die Experimente wurden männliche CD-Ratten der Firma Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland. verwendet. Das Gewicht der Tiere lag zwischen 200 g und 400 g. Die Ratten wurden bei einer Raumtemperatur von 22° Celsius bei einem 12 h Nacht/Tag- Rhythmus gehalten, mit Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*.

5.1.2. *Staphylococcus aureus* α-Toxin

Gereinigtes α-Toxin von *S. aureus* wurde freundlicherweise von Prof. Dr. S. Bhakdi, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz, zur Verfügung gestellt.

5.1.3. Pharmaka

5.1.3.1. Narkose der Versuchstiere

Forene® (Isofluran), Abbott, Wiesbaden, Deutschland.

Narcoren® (Pentobarbital-Natrium), Merial, Hallbergmoos, Deutschland.

5.1.3.2. Präparation

Heparin®, Ratiopharm, Ulm, Deutschland.

5.1.3.3. Perfusion

- Indomethazin (Cyclooxygenase-Inhibitor), ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA.

- Picotamid (Thromboxansynthase Inhibitor und Thromboxanrezeptor Antagonist), Biomol Research Labs Inc., Lörrach, Deutschland.
- Daltroban (Thromboxanrezeptor Antagonist), Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland.

5.1.4. Material und Geräte der Organperfusion

5.1.4.1. Organperfusat

Folgende Substanzen wurden für das Perfusat verwendet:

- 2-Oxoglutarsäure, Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Aminoplasma®-10%- Lösung Calciumchlorid-Dihydrat
- D-(+)-Glucose, Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Glutathion, Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Glutamat, Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Harnstoff, Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Hydroxyethylstärke (HES), Firma Braun, Melsungen, Deutschland.
- Inulin, Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Kaliumchlorid, Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Lactat, Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Malat, Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Natriumchlorid, Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Natriumhydrogencarbonat, Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Neomycinsulfat, Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Oxalacetat, Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Pyruvat, Fa. Sigma, München, Deutschland.

Folgenden Materialien und Gerätschaft wurden für die Perfusion verwendet:

- Wasserbad (30x30x40cm), Karstadt Warenhaus Ag, Giessen, Deutschland.
- 2x Enghalsstandflasche aus Kalksodaglas, 2,5 l, Firma MAGV, Rabenau, Deutschland.
- Begasungsfritte (Eigenbau)
- 2x Reglo-Analog-Rollerpumpe, Hugo-Sachs Harvard Elektroniks, March-Hugstetten, Deutschland.
- Windkessel, Anfertigung der Glasbläserei Amoglas, Wertheim-Dertingen, Deutschland.
- 2x Laborboy, Typ 116; Firma MAGV, Rabenau, Deutschland.
- Nierenperfusionskanüle modifiziert, I.D 1 mm, O.D 1,3 mm, Länge 2 cm mit seitlichem Ausgang, ohne Korb; Hugo-Sachs Harvard Electronics, March-Hugstetten, Deutschland.
- Polyethylenschlauch; I.D. 0,28 mm, O.D. 0,61 mm bzw. I.D. 0,58 mm, O.D. 0,96 mm; Fa. Neolab, Heidelberg, Deutschland.
- Brückenverstärker; Hugo-Sachs Harvard Electronics, March-Hugstetten, Deutschland.
- Druckaufnehmer, Hugo-Sachs Harvard Electronics, March-Hugstetten, Deutschland.
- Polycarbonatfiltrationsgerät; Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland.
- Cellulosenitratfilter, 8 µm Porenweite, 50 mm Durchmesser, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland.
- Carbogengas (95% O₂+ 5% CO₂), 50 l-Flaschen; Messer Griesheim, Siegen Deutschland.
- Kaltlichtquelle mit Schwanenhalslichtleiter (2-armig); Firma Fisher, Wohlen, Schweiz.
- Messkarte für PC; Firma Spectra Computersysteme GmbH, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland.
- Multilabpaket mit industriellem Anschluss, Firma Spectra Computersysteme GmbH, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland.
- Runtime-Lizenz zu Labtechnotebook, Firma Spectra Computersysteme GmbH, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland.
- Mikropipetten mit Ringmarke, Firma MAGV, Rabenau, Deutschland.

- Pumpenschläuche Tygon mit Stoppern, Typ AME 25 schwarz-weiß, I.D. 3,18 mm; Hugo-Sachs Harvard Electronics, March- Hugstetten, Deutschland.
- Pentium Personal Computer, Siemens Nixdorf, Paderborn, Deutschland.
- Eppendorfcups mit 1,5 ml Inhalt
- Baumwollfaden, herkömmlich

5.1.4.2. Substanzen und Geräte der GFR-Messung

- 30% H₂O₂; Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Citronensäure-Monohydrat; Fa. Roth, Mannheim, Deutschland.
- D-Glukose/D- Fructose; Fa. R-Biopharm, Eppelheim, Deutschland.
- Fructozyme; Fa. Novo Nordisk A/S, Norwegen.
- Inulin, Fa. Sigma, München, Deutschland.
- Photometer, Siemens Nixdorf, Paderborn, Deutschland.
- Trinatriumcitratdihydrat; Fa. Roth, Mannheim, Deutschland.

5.1.4.3. Testkit für die Thromboxan- Messung

- Thromboxan A₂-Elisa, Cayman Biochemicals, Michigan, USA.

5.1.4.4. Substanzen und Geräte zur Aufarbeitung der Rattennieren

- N,N- Dimethylformamid (DMF), Merck, Darmstadt, Deutschland.
- Kaliumhydroxidplättchen ; Fa. Roth, Mannheim, Deutschland.
- Ethanol, 70%

5.1.4.5. Material zur Ermittlung der Mikrosphärenzahl

In den Versuchen wurden Dye-Trak-Microspheres der Firma Triton-Technologies San Diego, Kalifornien, USA verwendet. Diese wurden in 2 ml Injektionsflaschen in den Farben blau, gelb und violett geliefert. In den Flaschen lagen die Mikrosphären

in einer Konzentration von 3 Mio/ml in 0,9 %iger NaCl-Lösung mit dem Zusatz von 0,02 % Tween 80 vor.

Zur besseren Haltbarkeit wurden die Mikrosphären ausaliquotiert und bei Kühlschranktemperatur gelagert.

Zur Ermittlung der Mikrosphärenzahl in einer Niere nach der Perfusion wurden folgende Materialien und Geräte verwendet:

- Uvikon 922A Spectrophotometer, Kontron Instruments, Milano, Italien.
- Ultra-Mikro-Quarzküvetten, 160µl, 15mm Zentrumshöhe, Bio-Tek-Kontron Instruments, Neufahrn, Deutschland.
- Pentium Personal Computer, Siemens Nixdorf, Paderborn, Deutschland.
- Triton3.xls Matrixinversionsprogramm, Firma Triton-Technologies, San Diego, Kalifornien, USA.

5.2. Methoden

5.2.1. Die Perfusion der isolierten Rattenniere

5.2.1.1. Das Modell

Bei der hier eingesetzten Methode handelt es sich um eine zellfreie, druckkonstante Perfusion der rechten Rattenniere über die *Arteria renalis*. Bei der druckkonstanten Perfusion ist es möglich, die Reaktion der Niere auf verschiedene Manipulationen wie Bakterientoxine oder Pharmaka zu untersuchen. Maßgeblich für eine Beurteilung sind dabei die physiologischen Parameter, die auch bei der klinischen Manifestation eines Nierenversagens eine Rolle spielen. So wurden der renale Perfusionsfluß und die Urinflussrate permanent dokumentiert und auch kleinste Änderungen ausgewertet. Diese Veränderungen wurden schon während des Versuchs manifest, da sich eine Vasokonstriktion der Nierengefäße, als Reaktion auf vasoaktiv wirkende Substanzen, unmittelbar in der renalen Perfusionsrate (RPR) niederschlug, da der

intrarenale Druck durch den Computer stetig gleich gehalten wurde. Die Urinflussrate war ebenso während des Versuches messbar und gab zusätzliche Auskunft über die Funktion der Niere.

Weitere entscheidende Anhaltspunkte gaben die Auswertung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) anhand der Messung der Inulinclearance sowie die Analyse der Natriumkonzentration im Urin als Messgröße für die tubuläre Funktion der Niere in verschiedenen Stadien der Versuchsdurchführung.

Ergänzend ließen sich sowohl die gesammelten Perfusat- wie auch die Urinproben biochemisch auf verschiedene Mediatoren untersuchen, die bei der Fragestellung eine Rolle spielen.

Das Modell der isoliert perfundierten Rattenniere ermöglichte es, die Zustände des septischen Nierenversagens relativ einfach zu simulieren und gab gleichzeitig guten Zugang zu den verschiedenen relevanten Parametern.

5.2.1.2. Das Perfusat

Die Niere wurde mit einer frisch angesetzten Elektrolyt- und Aminosäurenlösung, die zur Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks einen großen Anteil Hydroxyethylstärke (HES) enthielt, perfundiert. Um einen blutähnlichen pH- Wert zu erreichen, wurde die Lösung vor und während der Perfusion mit 5% CO₂ in Sauerstoff begast. Der pH-Wert wurde vor Beginn der Perfusion an einem Blutgasmeßgerät kontrolliert.

Im Folgenden ist die Zusammensetzung des Perfusats wiedergegeben:

• Na ⁺	138 mM	• HPO ₄ ²⁻	0.66 mM
• K ⁺	5.05 mM	• Glukose	8.3 mM
• Cl ⁻	124 mM	• Glutathion	0.98 mM
• HCO ₃ ⁻	18.1 mM	• Pyruvat	0.71 mM
• Mg ²⁺	0.98 mM	• Lactat	2.1 mM
• Ca ²⁺	1.24 mM	• Glutamat	1.66 mM
• Harnstoff	6.0 mM	• α-Ketoglutarat	1.0 mM
• H ₂ PO ₄ ⁻	0.08 mM	• Malat	0.84 mM

• Oxalacetat	1.0 mM	• pH	7.4 +/- 0.03
• Aminoplasma E 5%	22 ml/l	• pO ₂	450 +/- 50 mmHg
• Neomycin	0.01 g/l	• pCO ₂	32 +/- 4 mmHg
• Inulin	2 g/l	• Temp.	37°C
• HES	60 g/l		

5.2.1.3. Vorbereitungen

Das Versuchstier wurde zunächst in einer abgedichteten Plexiglasbox (30 cm x 15 cm x 5 cm) mit 1 ml verdampften Isofluran narkotisiert. Erhaltend wurde dann das schlafende Tier mit der intraperitonealen Gabe von Pentobarbital (0,375 g/kg KG) behandelt.

5.2.1.4. Präparation

Die narkotisierte Ratte wurde auf einem mit Kork gepolsterten Operationsbrett in Rückenlage fixiert. Die Bauchhöhle wurde entlang der *Linea alba* von der Nabelregion bis unterhalb des Xyphoids eröffnet und das Darmkonvolut aus der Bauchhöhle herausgenommen. Zum Schutz gegen das Austrocknen und Auskühlen wurde es mit Zellstoff bedeckt und mit 37° Celsius warmer isotonischer Kochsalzlösung befeuchtet. Das Operationsfeld wurde von Fett und Bindegewebe befreit und im Anschluss daran der Ureter auf einer Länge von ungefähr 2 cm proximal der Blase vorsichtig frei präpariert. Der Ureter wurde dann unter großer Vorsicht mit der Mikrofederschere von dorsal eröffnet und mit einem Polyethylenschlauch katheterisiert. Dieser musste dann mit einer Baumwollligatur fixiert werden. Diese Katheterisierung wurde unter der Stereolupe vorgenommen. Im Anschluss wurde die Kreuzung zwischen der *Aorta abdominalis*, *Arteria mesenterica superior* und der *Arteria renalis* ins Gesichtsfeld der Stereolupe gebracht. Die Gefäße mussten vorsichtig von ihrem Bindegewebe bereit und dann zunächst lose mit Baumwollligaturen versehen werden. Diese Ligaturen lagen entlang des Weges, den

später die Nierenperfusionskanüle nehmen sollte. Vor der Kanülierung wurde Heparinlösung (3000 IU/kg Körpergewicht) in die linke Nierenvene injiziert, um die Bildung von Mikrothromben im Zirkulationssystem der Niere zu verhindern. Zur Kanülierung der Nierenarterie wurde zunächst eine kleine Bulldog-Klemme an der *Arteria mesenterica superioris* direkt oberhalb des Aortenkreuzes angebracht. Diese verhinderte zum einen eine Blutung beim Einführen der Kanüle und war zum anderen ausschlaggebend für den Druckaufbau für die spätere druckkonstante Perfusion. Oberhalb dieser Klemme wurde die Arterie dann mit Hilfe der Federschere mit einer kleinen Inzision versehen. Durch diese wurde dann die Perfusionskanüle in das Kreislaufsystem eingeführt. Über den Druckaufnehmer und einem AD-Wandler, der dann sein Signal an den PC weitergab, wurde jetzt mit der Pumpe soviel Perfusat gefördert, dass der Druck im System und in der Kanüle ständig bei 100 mmHg lag. Entfernte man dann die Klemme von der Arterie, so gelangte das Perfusat mit der Flussrate, die zur Aufrechterhaltung des Perfusionsdruckes von 100 mmHg benötigt wurde, in das Kreislaufsystem. Vorsichtig wurde die Kanüle dann innerhalb des Blutgefäßes über die *Aorta abdominalis* hinaus in die *Arteria renalis* geschoben, die im günstigen Fall genau gegenüber der *Arteria mesenterialis superior* lag. Von diesem Moment an war dann der Gefäßwiderstand der intrarenalen Gefäße ausschlaggebend für die Flussrate, da der Druck von 100 mmHg automatisch konstant gehalten wurde.

Die Perfusionskanüle wurde dann zur Sicherheit mehrfach fixiert. Dabei war vor allem darauf zu achten, auch unterhalb der *Arteria suprarenalis* zu ligieren. Diese mündet nicht bei allen Ratten auf halbem Weg zwischen Niere und *Aorta abdominalis* in die Nierenarterie ein. Unterblieb das Abbinden unterhalb dieses Gefäßes, so konnte darüber Perfusat verloren gehen und die Werte für den renalen Perfusionsfluß (RPF) wurden verfälscht. Jetzt wurde die Ratte durch eine intrakardiale Überdosierung an Pentobarbital eingeschläfert. Unter laufender Perfusion wurde dann ein Katheter in die *V. renalis* eingefügt und fixiert. Die Niere wurde vorsichtig aus dem Körper der Ratte präpariert und in eine feuchte und konstant auf 37° Celsius gewärmte Schale überführt. Hier wurde sie gegen Austrocknung mit feuchtem Zellstoff abgedeckt. Der Ureter sollte jetzt frei und möglichst ohne Zug an der Niere auf einer dafür angebrachten Plexiglasplatte aufliegen. Wie sich die Niere während des Experiments darstellte, erkennt man auf dem Foto in Abbildung 8.

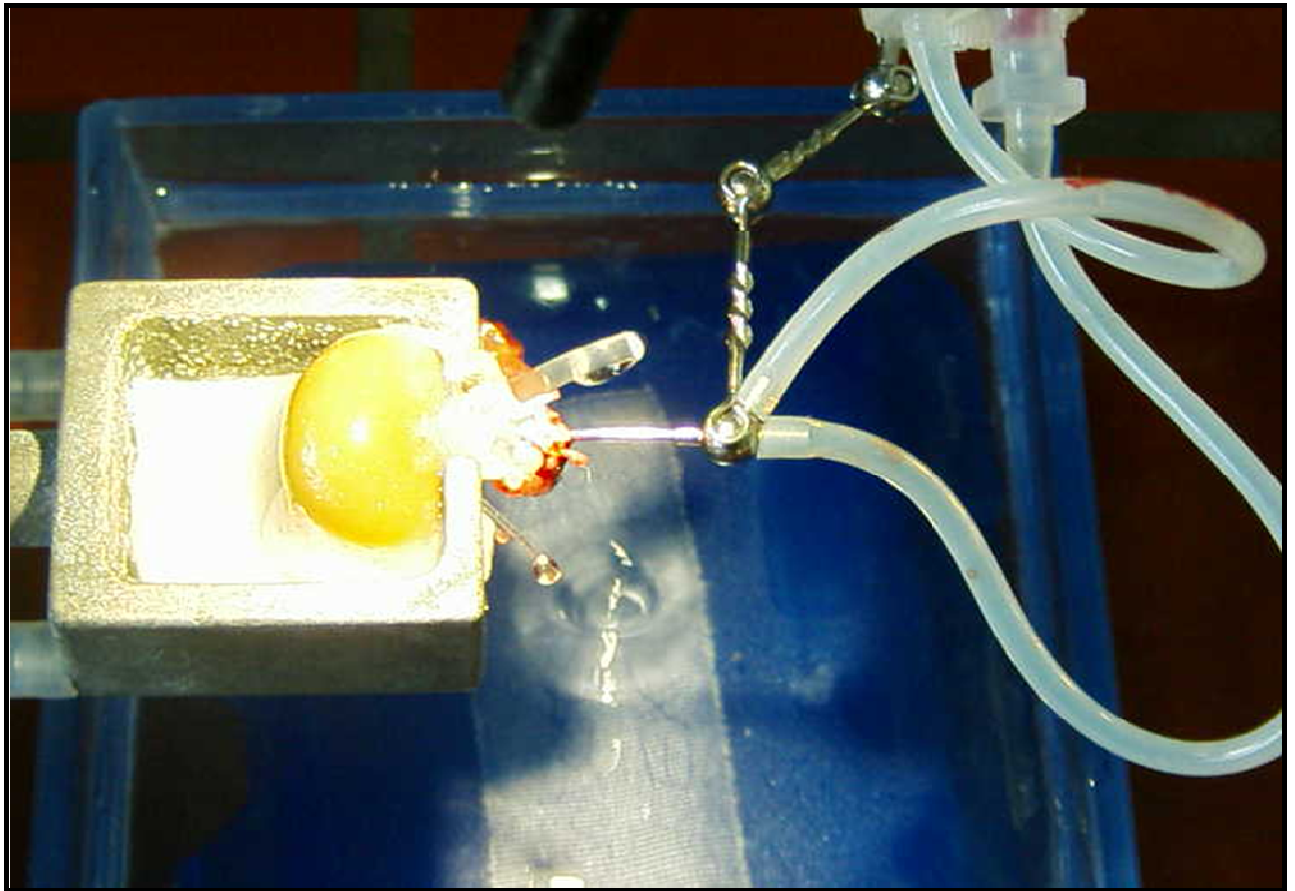


Abbildung 8: Die isoliert perfundierte Rattenniere während des Versuchs (sichtbar sind der arterielle Zufluss (Metallkanüle), der venöse Abfluss (Polyethylenschlauch, nach oben rechts zeigend), der katheterisierte Ureter (nach unten rechts zeigend, inklusive Urintropfen), sowie die perfundierte Niere in einer Wärmeschale).

Zum besseren Verständnis der Versuchsanordnung zeigt Abbildung 9 eine stark vereinfachte Darstellung der Apparatur, wie sie in den Experimenten zu dieser Arbeit verwendet wurde.

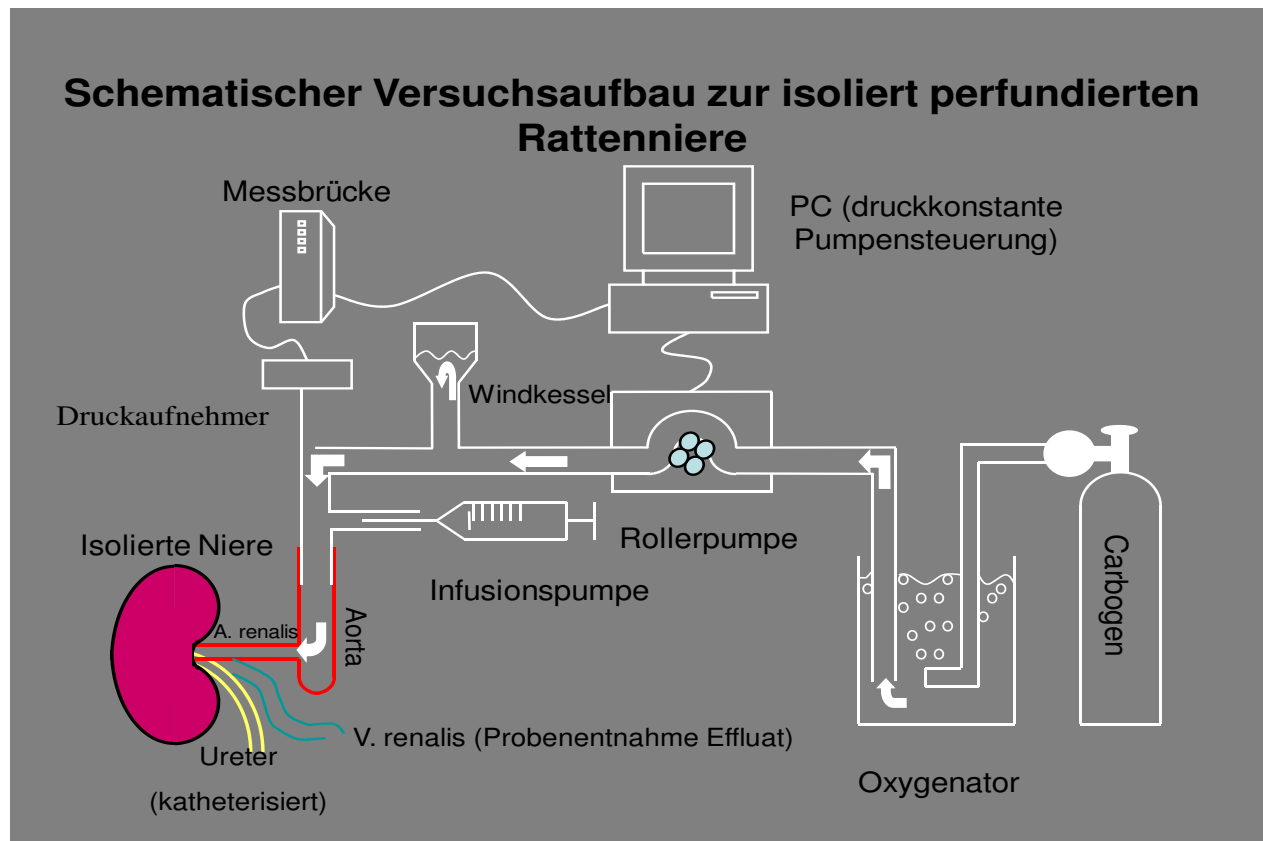


Abbildung 3: Schematischer Versuchsaufbau zur isoliert perfundierten Rattenniere. Das mit Carbogen kontinuierlich begaste Perfusat wurde über eine Rollerpumpe in die *Arteria renalis* transportiert. Der Druckaufnehmer meldete den Perfusionsdruck an die steuernde Einheit, so dass eine druckkonstante Perfusion des Organs gewährleistet war. Über Katheter waren sowohl das Sammeln des Organeffluats aus der *Vena renalis* als auch des Urins aus dem Ureter möglich.

5.2.1.5. Versuchsaufbau

Der Präparation schloss sich eine Äquilibrationsphase von 60 Minuten an, innerhalb derer es zu einer Stabilisierung von renalem Perfusionsdruck (RPF), Urinflussrate (UFR) und Glomerulärer Filtrationsrate (GFR) kommt. Nieren, die sich nicht stabilisierten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. In der 60. Minute nach Beginn der Perfusion wurde zunächst eine Leerwertprobe genommen. Bei der Probenentnahme wurden Urinproben, zur Bestimmung der UFR, der GFR und der Natriumkonzentration, sowie eine Perfusatprobe für die Mediatoranalytik gesammelt.

Je nach Versuchsgruppe wurde von der 85. Minute an für eine Dauer von 2,5 Minuten eine toxische Lösung zugegeben. Dies geschah über eine zweite Rollerpumpe, die auf Grund des Pumpenschlauchdurchmessers und der analogen Verknüpfung mit der ersten Rollerpumpe immer 4% deren Leistung förderte. In den Versuchsgruppen, in denen die Wirkung verschiedener Pharmaka auf die Reaktion der Niere unter der Einwirkung des Bakterientoxins dargestellt werden sollte, wurde bereits in der 70. Minute auf das mit dem Pharmakon versetzte Perfusat umgeschaltet. Hiernach fand dann in der 80. Minute eine Probenentnahme statt, die etwaige Reaktionen der Niere auf das Pharmakon aufdecken sollte. Nach der Einwirkung des Toxins wurde dann jeweils noch eine Probe unter der Einwirkung des Pharmakons auf die Niere in der 100. Minute und eine nach Umschalten auf das reine Perfusat, in der 110. Minute, genommen. Der renale Perfusionsfluß wurde mit Hilfe des Computers kontinuierlich aufgezeichnet.

5.2.1.6. Standardversuchsprotokoll

Gewicht [g]		Datum		Versuchsnummer:	
-------------	--	-------	--	-----------------	--

Narkose	Uhrzeit

Präparation	Uhrzeit	Dauer [min]
Anfang		-----
Ende Hals		
Ende Ligaturen		
Ende Ureter		
Anfang Perfusion		
Atemstillstand		-----
Gesamt	-----	

Auswert.
Inulin
Na ⁺
K ⁺

Kommentar:
Linke Niere [g]:

PHARMAKA:

	Versuchszeit [min]		RPF [ml/min]		Leck [ml/min]	RPF [ml*min ⁻¹ *g ⁻¹]	UFR [μl*min ⁻¹ *g ⁻¹]	Proben [Nr.]			
			Angezeigt	Gemessen				Inulin	Analytik		
									U	P	

Abbildung 10: Standardversuchsprotokoll

5.2.2. Messung der GFR

Die glomeruläre Filtrationsrate wurde über die Inulinclearance bestimmt. Das Inulin wurde vor Beginn der Perfusion dem Perfusat in einer Konzentration von 2 g/l Perfusat beigelegt, d.h. es fand eine dauerhafte Perfusion mit Inulin während des gesamten Perfusionszeitraums statt. Bei einer durchschnittlichen Perfusionsrate von 9,8 ml/min/g Niere für das gesamte Perfusat ergab sich also eine Perfusionsrate von 19,6 mg/min/g Niere an Inulin. Anschließend wurde der Inulingehalt im aufgefangenen Urin sowie vergleichsweise im gesammelten Organeffluat gemessen. Inulin besteht aus einem Gemisch von Polysacchariden aus Fruktosemolekülen mit einer Kettenlänge von bis zu 100 Molekülen. Die Verwendung von Inulin zur Bestimmung der Inulin-Clearance bei der exakten Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate ist möglich, weil Inulin im Glomerulum vollständig filtriert, im Tubulus weder zusätzlich sezerniert noch reabsorbiert wurde.

Verwendet wurde für diese Messung das D-Glucose/D-Fructose Testkit der Firma Boehringer Mannheim. Der Test arbeitet nach der UV-Methode. Das Prinzip beruht darauf, dass der D-Glucosegehalt vor und nach enzymatischer Hydrolyse des Inulins photometrisch bestimmt wurde.

1. D-Glucose vor Inversion:

Das Enzym Hexokinase katalysiert bei einem pH-Wert von 7,6 die Phosphorylierung von D-Glukose mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP) unter gleichzeitiger Bildung von Adenosin-5'-diphosphat (ADP). Es entsteht D-Glukose-6-phosphat, welches von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP) in Gegenwart von Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) spezifisch zu D-Gluconat-6-Phosphat oxidiert wird, wobei reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) entsteht. Die Menge dieses NADPH's ist der D-Glucose-Menge äquivalent und kann dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 334, 340 oder 365 nm gemessen werden. Dieses Ergebnis zeigt den Anteil der D-Glucose vor der Inversion.

2. Enzymatische Inversion:

Inulin wird durch das Enzym beta-Fructosidase (Invertase) bei einem pH-Wert von 4,6 zu D-Glucose und D-Fructose hydrolysiert. Die Bestimmung der D-Glucose nach

der enzymatischen Inversion erfolgt wieder nach dem oben beschriebenen Prinzip. Die Differenz aus beiden D-Glucose Werten dient als Grundlage für die Berechnung der Inulinkonzentration.

Nach der Ermittlung des Inulingehalts von Urinprobe und Organeffluat errechnet sich die GFR nach folgender Formel:

$$\text{GFR } (\mu\text{l/min/g}) = \text{UFR } (\mu\text{l/min/g}) \times [\text{Inulin}] \text{ im Urin } (\mu\text{g/ml}) \times [\text{Inulin}] \text{ im Effluat } (\mu\text{g/ml})^{-1}$$

5.2.3. Bestimmung von Thromboxan A₂

Nach Abschluss der Versuche wurden die gesammelten Perfusatproben, die venös ausgeschieden wurden, auf Thromboxan A₂ (TxA₂) hin untersucht. Da TxA₂ in wässriger Lösung eine sehr geringe Halbwertszeit hat, wurde es anhand seines stabilen Abbauproduktes TxB₂ quantifiziert. Diese Analysen wurden mit Hilfe eines kommerziellen Testkit der Firma Cayman (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) durchgeführt. Es handelt sich bei diesem Kit um den TxB₂-Enzyme Immuoassay Kit; Cat 519031 mit 96 Proben. Dieser Messkit analysiert den Thromboxangehalt einer Lösung mittels ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), beruhend auf dem Prinzip einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Auf der Testplatte befinden sich eine definierte Anzahl TxB₂-spezifischer Kaninchen-Antiserum-Bindungsstellen. Nach der Zugabe der zu untersuchenden Probe konkurriert das enthaltene, freie TxB₂ mit einem Tracer-gebundenem TxB₂ um diese Bindungsstellen. Der Tracer hemmt also kompetitiv die Bindung des TxB₂ auf der Platte. Es handelt sich hierbei um an ein Acetylcholinesterase-Molekül gekoppeltes TxB₂ mit konstanter und definierter Konzentration. Die Menge des Tracers, der an die Bindungsstellen der Platte bindet ist umgekehrt proportional zu der freien Menge an TxB₂ in der analysierten Probe. Die ungebundenen Moleküle werden dann mit Hilfe mehrerer Waschvorgänge von der Platte entfernt. Um die Menge an gebundenen Tracermolekülen sichtbar zu machen, wird ein Substrat für die gebundene

Cholinesterase hinzu gegeben, das Acetylthiocholin, das von der Acetylcholinesterase enzymatisch zu Thiocholin degradiert wird. Das Substrat ist in der so genannten Ellman's-Reagenz enthalten. Dieses Reagenz enthält außerdem die 5,5'-Dithio-Bis-(2-Nitrobenzolsäure), die mit dem Thiocholin auf nicht-enzymatischem Weg zu 5-Thio-2-Nitrobenzolsäure reagiert. Das Ausmaß der enzymatischen Reaktion wird sichtbar durch die gelbliche Verfärbung der Flüssigkeit in den einzelnen Probenansätzen. Das Ausmaß der Verfärbung kann dann bei 412 nm, dem Absorptionsmaximum der 5-Thio-2-Nitrobenzolsäure, bestimmt werden. Die Intensität der Absorption ist proportional zur Menge des gebundenen Tracer-Thromboxans. Von diesem Wert kann dann umgekehrt proportional auf die Menge des gebundenen Thromboxans aus der Perfusatprobe und somit auf dessen Konzentration im Perfusat geschlossen werden.

5.2.4. Messung der Natriumkonzentration im Urin

Zur Messung der Natriumkonzentration im Urin wurden die gesammelten Urinproben so mit destilliertem Wasser verdünnt, dass je Probe ein Volumen von 200 µl zur Verfügung stand. Diese Lösungen wurden dann im Zentrallabor des Instituts für klinische Chemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Giessen gemessen. Verwendet wurde hierbei ein Advia der Firma Bayer Diagnostics, der die Messung mit Hilfe einer ionenselektiven Elektrode (ISE) durchführte. Diese ionenselektive Messung dient der Quantifizierung bestimmter gelöster Ionen, u.a. auch Natrium. Die Methode gehört zu den potentiometrischen Verfahren. Die gemessenen Natriumkonzentrationen wurden dann gemäß des Verdünnungsfaktors der Probe hochgerechnet.

5.3. Messung regionaler Blutflüsse in Organen mittels gefärbter Mikrosphären

Zur Untersuchung der Durchblutung verschiedener Organe im Körper bzw. Veränderungen in der Blutflussverteilung einzelner Organe bietet sich die Anwendung von Mikrosphären an. Generell unterscheidet man die Methoden mit radioaktiv-markierten und mit gefärbten Polystyrolmikrosphären. Die

Verfahrensweisen dieser beiden Möglichkeiten sind ähnlich. Das Prinzip beruht darauf, dass nach der Einschwemmung der Mikrosphären in die Zirkulation diese sich in den Blutgefäßen verteilen. In den einzelnen Geweben des Körpers embolisieren sie dann in der Mikrozirkulation. Bis zu einem gewissen Grad bleiben diese Embolisierungen ohne funktionelle Relevanz für das perfundierte Organ. Eine bessere Vorstellung der Funktionsweise der Mikrosphären erhält man durch die Darstellung in Abbildung 11. Auch die Schwierigkeiten in der Anwendung ähneln sich bei beiden Methoden. So ist zu beachten, dass die Zahl der verwendeten Mikrosphären zwar so gewählt werden muss, dass die Hämodynamik unbeeinträchtigt bleibt, jedoch die Präzision der gesamten Messung mit der Anzahl der Mikrosphären pro Probe abnimmt. Dieses Problem betrifft insbesondere die Anwendung bei kleinen Tieren, da durch das geringere Gewicht der einzelnen Gewebe bzw. Organe auch die Anzahl der wieder zu findenden Mikrosphären abnimmt. Weitere beachtenswerte Punkte ergeben sich ebenfalls aus der Verwendung der Methode am kleinen Tier. So weisen einzelne Gewebesorten eine sehr geringe Flussrate auf, was wiederum die Zahl der zu separierenden Mikrosphären senkt, und damit die Genauigkeit der Methode. Der Hauptunterschied der beiden Methoden besteht im Nachweis der Mikrosphären. Die Anzahl radioaktiv markierter Mikrosphären und damit indirekt die Durchblutungsrate des jeweiligen Organs können direkt im isolierten Gewebe durch Messung der Radioaktivität quantifiziert werden. Es handelt sich dabei um eine Methode, die zwar mit den Problemen des radioaktiven Abfalls belastet ist, aber eine höhere Messgenauigkeit liefert. Hier bietet der Einsatz farbig markierter Mikrosphären erhebliche Vorteile gegenüber der radioaktiven Methode. Das Messprinzip beruht darauf, dass die Mikrosphären zunächst aus den Gewebeproben isoliert werden. Dies geschieht durch chemische Lyse des zu untersuchenden Gewebes. Die so separierten Mikrosphären werden dann entfärbt und die isolierte Farblösung im Spektralphotometer gemessen. Die Farbintensität dieser Lösung korreliert dann mit der Anzahl der Mikrosphären in der Gewebeprobe (86). In den vorliegenden Untersuchungen wurden die farbig markierten Mikrosphären verwendet. Verschiedene Arbeitsgruppen haben diese Methode im Lauf der letzten Jahre verwendet. So wurde im Jahr 1988 die Methode der farbigen Mikrosphären zur Messungen des regionalen myokardialen Blutflusses beim Hund eingesetzt (84). Ebenfalls am Hundemodell wurden dann die Anwendung und die Möglichkeiten der

Auswertung farbige Mikrosphären 1991 weiter modifiziert. Auch in dieser Untersuchung lag der Fokus auf der Messung des regionalen myokardialen Blutflusses (85). Die Übertragung der Methode auf kleinere Spezies als Hund und Schwein nahm dann 1995 Hakkinen vor. Er sah die Notwendigkeit, die Anwendung den kleineren Dimensionen am Rattenmodell anzupassen, um auch hier Blutflussuntersuchungen durchführen zu können. Sein Interesse galt hierbei neben der Messung des myokardialen Blutflusses auch anderen Organen wie Niere, Leber und Magen. Außerdem ergänzte er seine Untersuchungen nochmals um eine genaue Gegenüberstellung der beiden Mikrosphärenvarianten (84). Anwendungen am Modell der isoliert perfundierten Rattenniere sind bis dato noch nicht beschrieben.

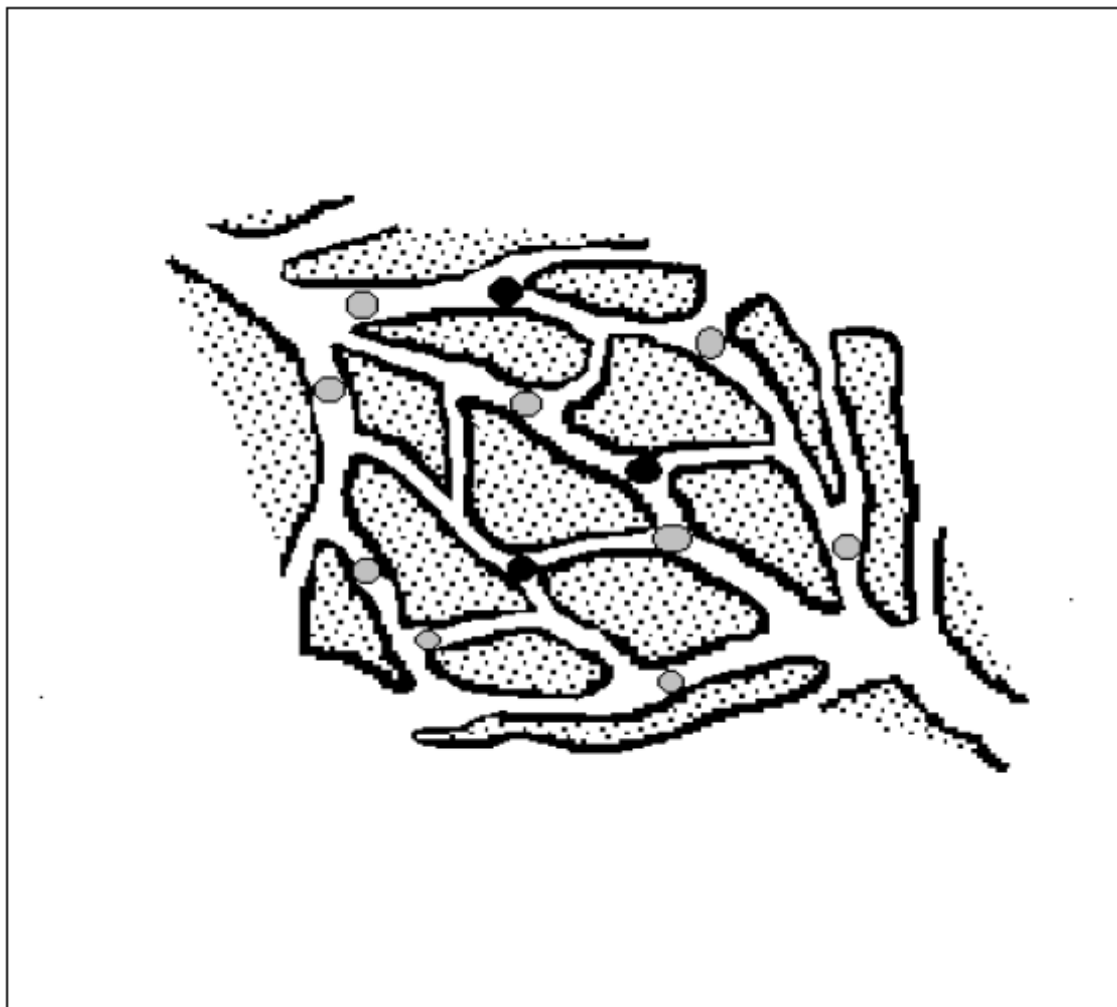


Abbildung 11: Schematische Darstellung unterschiedlich gefärbter Mikrosphären in einem Kapillargebiet. Während der Perfusion der Niere embolisieren die Mikrosphären die Kapillaren je nach Verteilung des regionalen Blutflusses. Die Verteilung der Mikrosphären im

Gewebe gibt bei der Analyse Aufschluss darüber, ob unter experimentellen Bedingungen eine Umverteilung der Regionalen Perfusion stattgefunden hat. Bei der vorliegenden Fragestellung wurde vor allem die regionale Perfusion von Nierenrinde und Nierenmark analysiert.

5.3.1. Einsatz gefärbter Mikrosphären an der isolierten Rattenniere

5.3.1.1. Prinzip

Bei den gefärbten Mikrosphären handelte es sich um $15 \pm 0,2 \mu\text{m}$ große Polystyrol-Kugeln. Werden diese in das Gefäßsystem eingebracht, embolisieren sie in der Mikrozirkulation eines Organs die Kapillaren, da sie diese aufgrund ihrer Größe nicht passieren können. Die Embolisationsraten steht in proportionalem Verhältnis zur Durchblutungsrate des Organs bzw. in dieser Versuchsanordnung zur Perfusionsrate. Dies bedeutet, dass die Menge der zurückgehaltenen Mikrosphären zum einen die Stärke der Durchblutung eines Organabschnittes darstellt, zum anderen aber auch genutzt werden kann, um unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen die Veränderung bzw. Umverteilung der Durchblutung bestimmter Abschnitte zu zeigen. Der Einsatz verschieden gefärbter Polystyrol-Kugeln dient dazu, Veränderungen der regionalen Perfusion im Versuchsverlauf zu quantifizieren.

Sichtbar werden die Mikrosphären, wenn sie aus den anatomischen Strukturen der Rattenniere isoliert werden. Hierzu wird das Gewebe verdaut, der Farbstoff aus den Polystyrol-Kugeln gelöst und dann mit Hilfe eines Spektralphotometers quantifiziert. Die Menge des Farbstoffes ist dann die Grundlage für die Errechnung des regionalen Blutflusses durch das Auswertungsprogramm.

5.3.1.2. Einsatz der Mikrosphären im Versuch

Die gefärbten Mikrosphären wurden über einen Drei-Wege-Hahn mit einer 1 ml Injektionsspritze unmittelbar vor der Perfusionskanüle manuell in das System

gegeben. Hierfür wurden die Mikrosphären so verdünnt, dass sich 5000 Mikrosphären in 1 ml befanden. Im Versuch wurden dann die so aufgenommenen Mikrosphären eingesetzt. Damit es durch die Öffnung des Drei-Wege-Hahns nicht zu einem Druckverlust im System kam, wurde ein Drei-Wege-Hahn verwendet, dessen eine Öffnung mit einer Gummimembran verschlossen war. Dieser Verschluss wurde dann mit einer Kanüle durchstoßen. So wurde gewährleistet, dass die Bedingungen während der Zugabe der Mikrosphären nicht vom normalen Status abwichen.

5.3.1.3. Aufarbeitung der Rattennieren

Die Analyse des regionalen Perfusionsflusses begann damit, dass Mark und Rinde einer gefrorenen Niere voneinander getrennt werden. Beide Anteile wurden ab hier getrennt betrachtet.

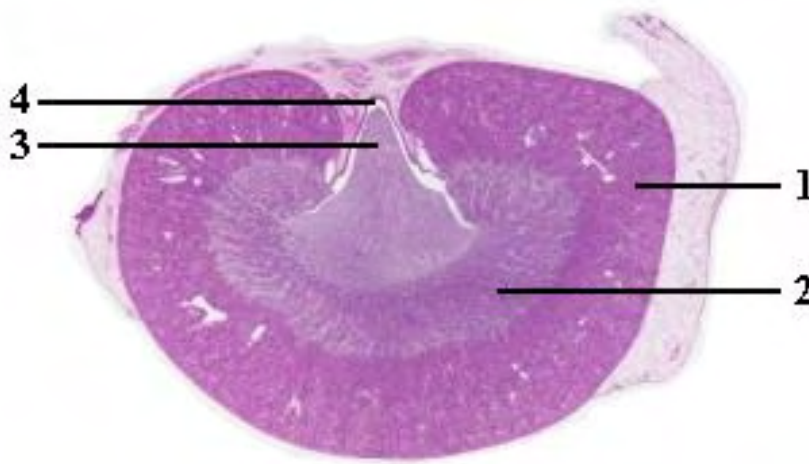


Abbildung 12: Niere (HE-gefärbt, Übersicht). 1 Nierenrinde, 2 Nierenmark, 3 Nierenpapille, 4 Nierenbecken. Zur Rückgewinnung der im Versuch zur Perfusion eingesetzten Mikrosphären aus den embolisierten Kapillargebieten wurden die Nieren bei -20° Celsius tiefgefroren und im gefrorenen Zustand Nierenmark und Nierenrinde getrennt präpariert.

Für die Rückgewinnung der Mikrosphären verdaute man zunächst das sie umgebende Gewebe der Niere mittels alkalischer Hydrolyse. Anschließend wurden in mehreren Schritten die Mikrosphären isoliert.

Die Hydrolyse geschah in zwei Schritten. Als erstes wurde das isolierte Gewebe mit 2 ml einer 4 molaren KOH-Lösung mit 0,02 % Tween 80 versetzt und für 1 Stunde bei 60°C im Wasserbad inkubiert, bis keine festen Gewebeanteile mehr sichtbar waren. Alle 15 min wurde dabei das Probengefäß geschwenkt.

Dann wurde das Homogenisat zusätzlich für 30 Sekunden mit einem Ultraschallstab (Stufe 3) behandelt. Nach vollständiger Gewebelyse lagen die Mikrosphären in freier Form vor. Die Probe wurde mit destilliertem Wasser weiter auf 9 ml Gesamtvolumen verdünnt und mit 1500 g 15 Minuten lang ohne Bremse abzentrifugiert.

Nach dem Abdekantieren des Überstandes, versetzte man das verbleibende Pellet mit 3 ml Natriumdesoxycholatreagenz-Lösung und wiederholte die Ultraschallbehandlung, so dass sich das entstandene Pellet vollständig löste. Ein weiteres Abzentrifugieren und Dekantieren des Überstandes ergab ein Pellet, dass aus einem Gemisch von Mikrosphären verschiedener Färbungen bestand und sich grünlich bis braun darstellte. Dieses wurde erneut gelöst, diesmal in 70%igem Ethanol, und zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das finale Pellet unter kontinuierlichem Stickstoffstrom für eine Stunde getrocknet. Es lagen jetzt die isolierten Mikrosphären als trockenes Pellet ohne Nierenbestandteile vor.

Im nachfolgenden Schritt wurde aus diesem Pellet der Mikrosphärenfarbstoff mit Hilfe von 200 µl Dimethylformamid (DMF) je Probe herausgelöst. Die farbige Lösung wurde 4 Minuten lang bei 2000 g zentrifugiert. Danach bestand das Pellet aus farblosen Mikrosphären. Der Überstand stellte das Gemisch der verschiedenen Mikrosphären-Farbstoffe dar, die unter der Behandlung von den Polystyrol-Kugeln gelöst wurden. Im Anschluss wurde die Absorption des farbigen Überstandes mittels Spektrophotometrie bestimmt.

5.3.1.4. Herstellen der Referenzabsorptionsspektren

Zur späteren Berechnung der Anzahl an Mikrosphären, die aus dem jeweiligen Nierengewebe gelöst wurde, wurden bei jedem Verdauungsansatz Standardlösungen parallel zu den jeweiligen Proben behandelt. Diese Standardlösungen enthielten eine definierte Menge von Mikrosphären einer einzelnen Farbe. Mit Hilfe deren Absorptionsspektren konnten später die Absorptionen der Mikrosphäremischungen aus den Nierengeweben eingeordnet und berechnet werden.

Die Standards wurden wie folgt erstellt:

Die gelieferten Mikrosphären wurden mit einer Tween 80 haltigen 0,9%igen Kochsalzlösung auf eine Konzentration von 2000 Mikrosphären/ml verdünnt. Jeweils 1 ml dieser Lösung von jeder Farbe wurde in einem 15 ml Falcon Röhrchen derselben Behandlung unterzogen, wie die zu untersuchenden Proben (siehe 4.2.2.3.).

5.3.1.5. Berechnung der regionalen renalen Perfusion

Zur Berechnung des regionalen renalen Perfusionsflusses wurde folgende Gleichung eingesetzt:

$$\text{RBF} = \text{RPF} \times [(\text{MS}_{\text{Probe}} \times 1000) : (\text{MS}_{\text{gesamt}} \times \text{Gewicht}_{\text{Probe}})]$$

Diese Formel wurde auf jede einzelne Probe, d.h. jeweils auf Mark und Rinde einer Niere, und für die einzelnen Farben, die die verschiedenen Zeitpunkte der Injektion widerspiegeln, angewandt.

RBF = Regionaler Blutfluss zum Zeitpunkt der Mikrosphäreninjektion einer der Farben in ml/min

RPF = Renaler Perfusionsfluß zum Zeitpunkt der Mikrosphäreninjektion in ml/min/g Niere

MS_{Probe} = ermittelte Mikrosphärenzahl in einer Probe

MS_{gesamt} = Summe aller MS_{Probe} einer Niere

Gewicht_{Probe} = Gewicht der einzelnen Nierenproben in mg

1000 = Umrechnungsfaktor von mg zu g

Die Rechnung und Auswertung wurde durch das Verwenden eines Makros der Firma Triton Technologies stark vereinfacht.

5.4. Versuchsgruppen

- Kontrollgruppe ohne Manipulation
- Konzentrationsreihe mit absteigender α -Toxinkonzentration von 1,0 $\mu\text{g/ml}$ bis 0,125 $\mu\text{g/ml}$.
- α -Toxin 0,125 $\mu\text{g/ml}$ + Indomethazin 100 μM
- α -Toxin 0,125 $\mu\text{g/ml}$ + Picotamid 10 μM
- α -Toxin 0,125 $\mu\text{g/ml}$ + Daltroban 10 μM
- Indomethazin 100 μM
- Picotamid 10 μM
- Daltroban 10 μM

Die Experimente der Kontrollgruppe ergaben für die physiologischen Parameter folgende Absolutwerte (Mittelwert +/- SEM, n=6):

Zeit (min)	70	80	90	100	110
RPF (ml/min/g)	9,7 (1)	9,8 (1)	9,7 (1)	9,8 (1)	9,7 (1)
UFR ($\mu\text{l/min/g}$)	42,5 (10)	48,3 (11)	57,9 (11)	60,6 (13)	61,7 (13)
GFR ($\mu\text{l/min/g}$)	276 (61)	283 (48)	277 (50)	273 (51)	271 (48)
TxB ₂ (pg/min/g)	160 (48)	162 (33)	162 (33)	197 (33)	134 (30)

5.5. Statistische Datenauswertung

Die Nierenfunktionsparameter RPF, UFR, GFR und fraktionelle Natriumausscheidung (FeNa) wurden als prozentuale Abweichung vom Ausgangswert zum Zeitpunkt 70. Minute nach einem stabilisierenden 60 minütigen Vorlauf angegeben. Die im ELISA gemessenen Thromboxankonzentrationen wurden ebenfalls alle als Differenz zur Konzentration in der 70. Minute vor der Einwirkung des Toxins angegeben. Alle aufgeführten Daten sind arithmetische Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM), berechnet aus mindestens fünf Experimenten. Die erhobenen Daten wurden mit einer Varianzanalyse und anschließendem *Tukey's Honestly Significant Difference Test* als post-hoc-Test oder mit einem T-Test auf statistische Signifikanz untersucht. Werte von mindestens $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant beurteilt.

6. Ergebnisse

6.1. Übersicht

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob ein bakterieller Pathogenitätsfaktor (*Staphylococcus aureus* α -Toxin) eines klinisch relevanten Sepsiserregers in Abwesenheit des bakteriellen Gesamtorganismus in der Lage ist, Charakteristika eines akuten Nierenversagens am Modell der isoliert perfundierten Rattenniere hervorzurufen. Besonderes Augenmerk wurde auf die beteiligten intrarenalen Pathogenitätsmechanismen gerichtet. Genauen Beobachtungen unterlagen dabei die physiologischen Parameter der Nierenfunktion. Hierzu gehören zunächst der renale Perfusionsfluß (RPF), der eine Aussage über vasomotorische Ereignisse macht, die Urinflussrate (UFR) als Überwachungsmerkmal für eine Änderung der Nierenfunktion und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), die eine Einschätzung der glomerulären Funktion ermöglicht. Tubuläre Beeinträchtigungen lassen sich über eine Bestimmung der fraktionellen Natriumausscheidung (FeNa) und korrespondierend dazu der Natrium- und Wasserretention abbilden. Zusätzlich wurde der Thromboxan A₂-Gehalt im venösen Efflux quantifiziert, um die endotheliale Thromboxan A₂ Synthese zu quantifizieren.

Umverteilungen der intrarenalen Perfusion wurden durch Einsatz farbiger Mikrosphären quantifiziert. Das Versuchsprotokoll der unterschiedlichen Gruppen erstreckte sich jeweils über einen Zeitraum von 110 Minuten. Verschiedene Versuchsbedingungen wurden stets mit einer Anzahl von $n > 5$ durchgeführt.

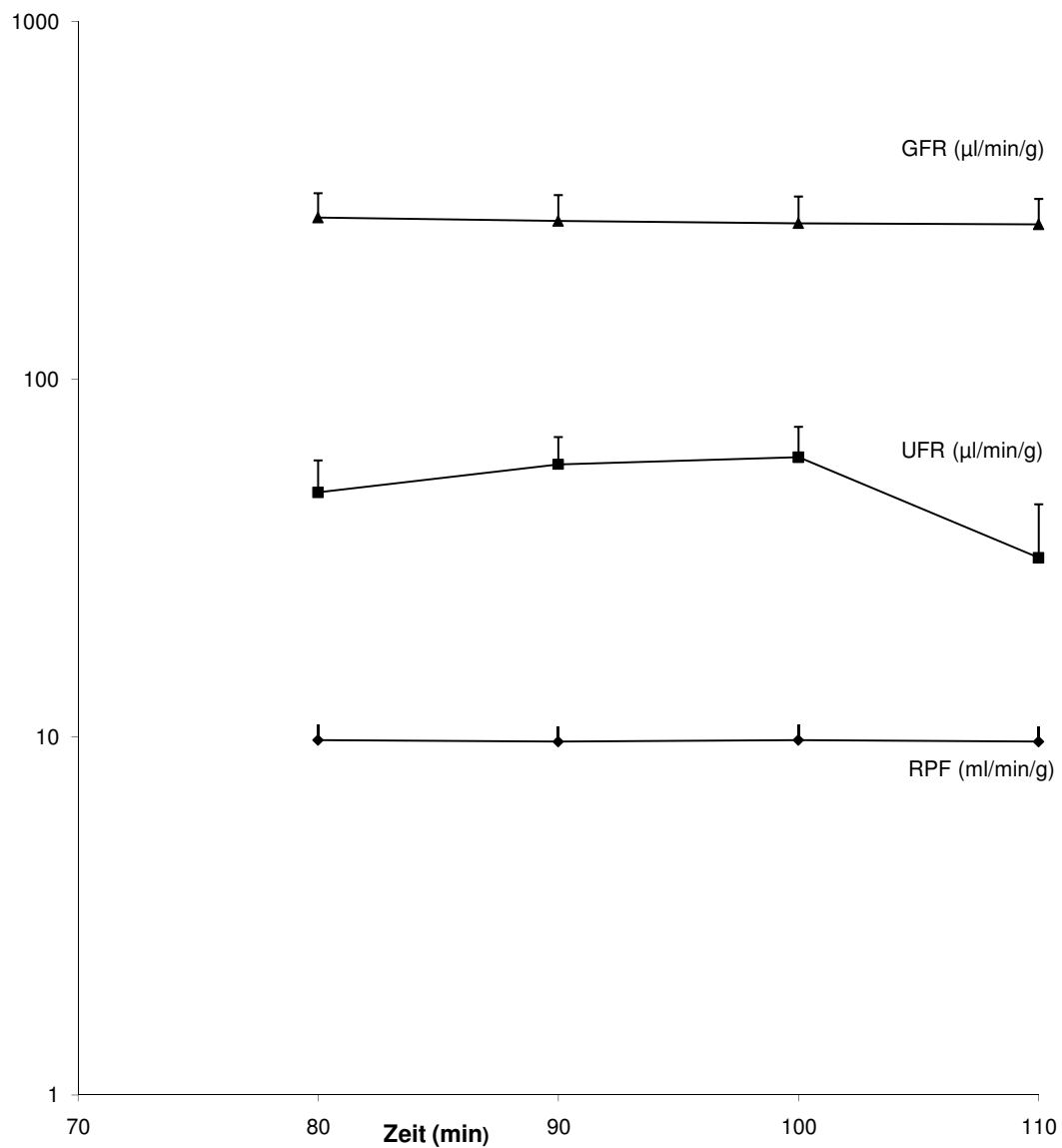


Abbildung 12: Verlauf der Nierenfunktionsparameter RPF, UFR und GFR als Reaktion auf die Perfusion in der Kontrollgruppe

Die graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt, wie die physiologischen Parameter renaler Perfusionsfluß (RPF), Urinflussrate (UFR) und glomeruläre Filtrationsrate (GFR) in den Kontrollversuchen konstant verlaufen. Die funktionelle Beeinträchtigung der Nieren war unter den Kontrollbedingungen nur gering.

6.2. Wirkung von *Staphylococcus aureus* α -Toxin auf isoliert perfundierte Rattennieren

Um den Einfluss von *Staphylococcus aureus* α -Toxin auf isoliert perfundierte Rattennieren zu untersuchen, wurden verschiedenen Toxinkonzentrationen nach Abschluss der 60-minütigen Stabilisierungsphase über einen Zeitraum von 150 Sekunden in die renale Zirkulation geschwemmt. Die Erfassung der physiologischen und biochemischen Parameter erfolgte vor und nach der Toxinperfusion.

Hierbei zeigte sich, dass α -Toxin erhebliche zeit- und dosisabhängige Veränderungen an isolierten Rattennieren hervorrief.

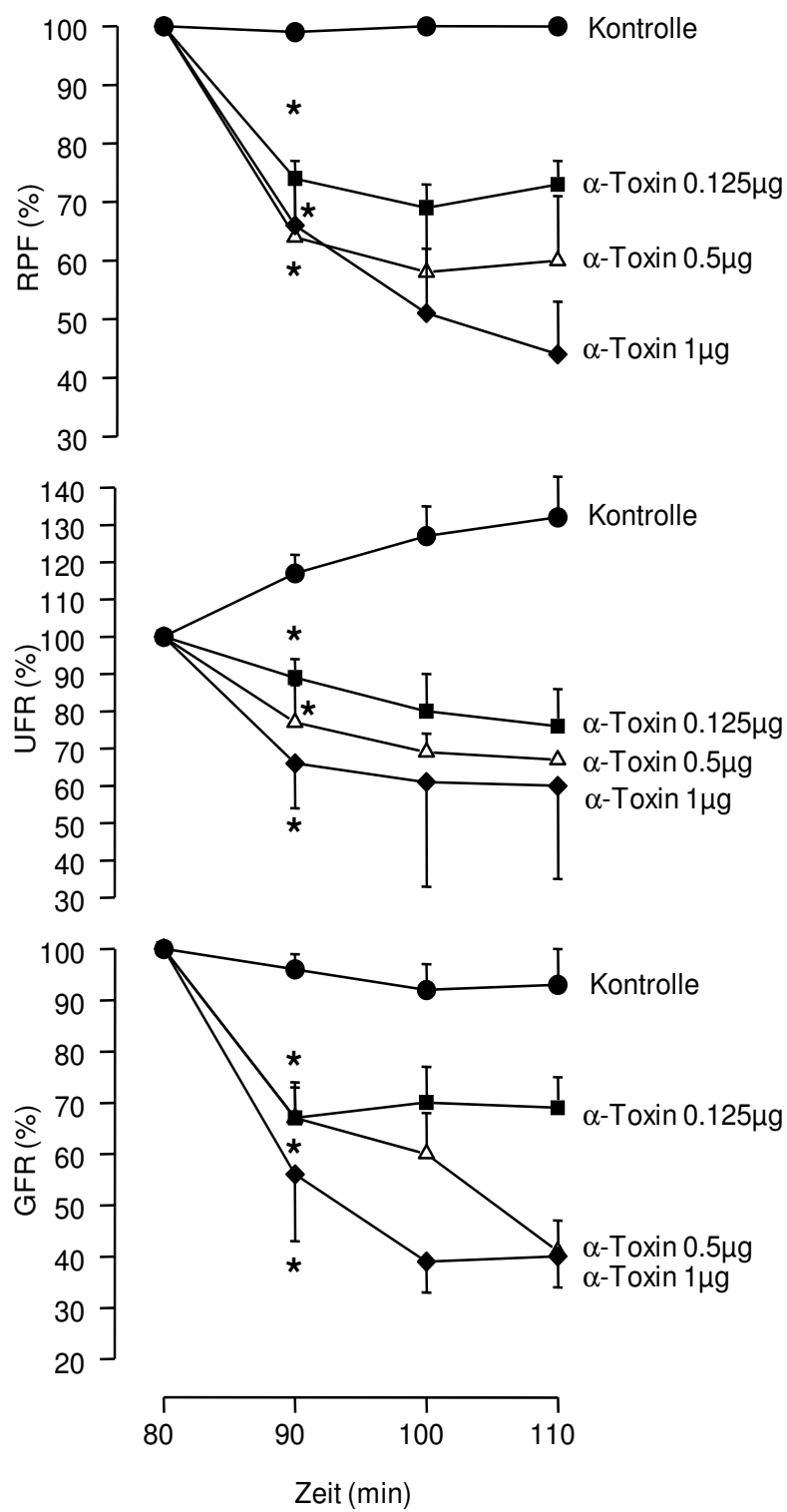


Abbildung 13: Konzentrationsabhängige Reaktion der Nierenfunktionsparameter RPF, UFR und GFR auf die Perfusion mit α -Toxin in unterschiedlichen Konzentrationen. Die graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt, wie sich die physiologischen Parameter renaler Perfusionsfluß (RPF), Urinflussrate (UFR) und glomeruläre Filtrationsrate (GFR) durch die Konfrontation mit den unterschiedlich hohen Konzentrationen von α -Toxin (0,125, 0,5, 0,1 $\mu\text{g/ml}$) verändern. Die mit * gekennzeichneten Punkte und die darauf folgenden unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

Bezüglich des renalen Perfusionsflusses (RPF) zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Ergebnissen der Kontrollgruppen und denen der toxinmanipulierten Versuche. Bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin kam es zu einem deutlichen Abfall des RPF auf 41 % des Ausgangswertes. Für die Dauer des Versuchsprotokolls hatte diese Entwicklung einen irreversiblen Charakter. Die Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin verursachte im Modell ein zunächst starkes Absinken des RPF auf 58% innerhalb der ersten zwanzig Minuten; die Werte für den RPF pendelten sich jedoch im Laufe der folgenden 10 Minuten bei einem Wert von 61 % der Ausgangswerte ein, ohne eine Reversibilität zu zeigen. Ein Absinken des RPF zeichnete ebenfalls die Reaktion auf 0,125 $\mu\text{g/ml}$ auf α -Toxin aus; hier kam es im Zeitraum der ersten zwanzig Minuten postexperimentell zu einer geringen Verbesserung des RPF. Entsprechende Beobachtungen ließen sich ebenso bei der Auswertung der Urinflussrate (UFR) unter den verschiedenen Bedingungen machen. Der Einsatz der höchsten Konzentration an α -Toxin führte auch hier wieder zum stärksten Abfall der UFR auf 59 % der Ausgangswerte bei Minute 70. Gefolgt wurde dies von der Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$, die eine immer noch deutliche Verminderung der UFR um 69 % zeigte. Der Kontrollgruppe am nächsten, aber immer noch mit einem signifikanten Niveauunterschied, lagen die Versuche mit 0,125 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin.

Am Beispiel der glomerulären Filtrationsrate (GFR) wiederholten sich diese Phänomene erneut. Auch hier zeigte sich ein deutlich konzentrationsabhängiger Effekt. Die GFR betrug bei der niedrigsten α -Toxin Konzentration in der 110. Minute noch 70 % der Ausgangswerte bei Minute 70.

Wichtig zur Einschätzung der Toxinwirkung war auch die Beurteilung der Tubulusbeeinträchtigung unter diesen Versuchsbedingungen. Als diagnostischer Parameter für die Tubulusfunktion der Niere in der vorliegenden Arbeit wurde die

fraktionelle Natriumausscheidung herangezogen. Die Grafik stellt die fraktionelle Natriumausscheidung sowie die Natriumretention, die eng an die Wasserretention geknüpft ist, in der Toxingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe dar (Abb. 16). Es ist erkennbar, dass es unter der Einwirkung von α -Toxin zu einer Erhöhung der fraktionellen Natriumausscheidung (FeNa) von 135 % in der Kontrollgruppe auf 168 % unter der Toxinperfusion kommt.

Gegenläufig dazu stellte sich das Absinken der Natriumretention (und somit auch der Wasserretention) dar. Hier sank das Retentionsvermögen der Nieren im Versuch von 89 % auf nur noch 67 % der filtrierten Menge an Natrium.

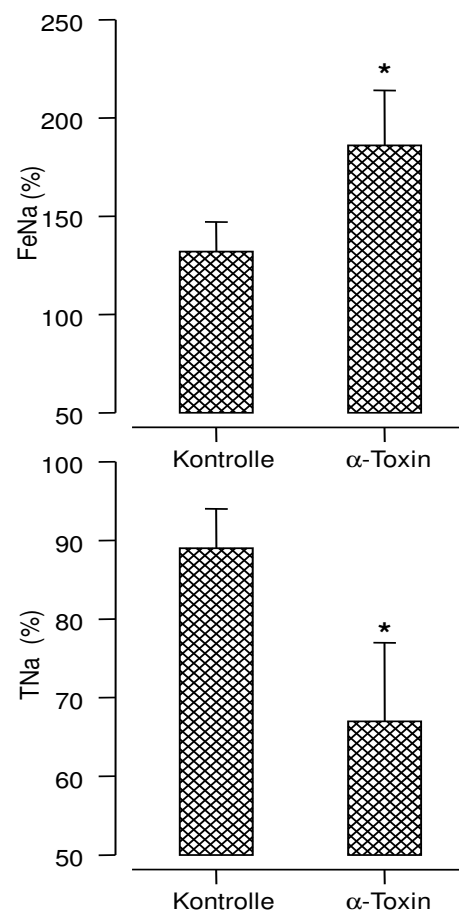


Abbildung 14: Fraktionelle Natriumausscheidung (FeNa) und Natriumretention (TNa) unter der Perfusion mit α -Toxin und in der Kontrollgruppe. Dargestellt ist die fraktionelle Natriumausscheidung sowie die Natriumretention, die eng an die Wasserretention geknüpft

ist, in der Toxingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unter der Einwirkung von α -Toxin kommt es zu einer Erhöhung der fraktionellen Natriumausscheidung (FeNa) von 135 % in der Kontrollgruppe und 168 % unter der Toxinperfusion. Die Natriumretention sinkt im Versuch von 89 % auf nur noch 67 %. * $p < 0,05$ vs Kontrolle.

6.3. Modifikation des toxininduzierten Nierenversagens durch Pharmakologische Interventionen

Zur Darstellung des Einflusses verschiedener Pharmaka auf die oben beschriebenen Reaktionen der Toxineinwirkung wurde die isolierte Rattenniere 10 Minuten vor und auch nach der Perfusion mit α -Toxin mit dem jeweiligen Pharmakon perfundiert.

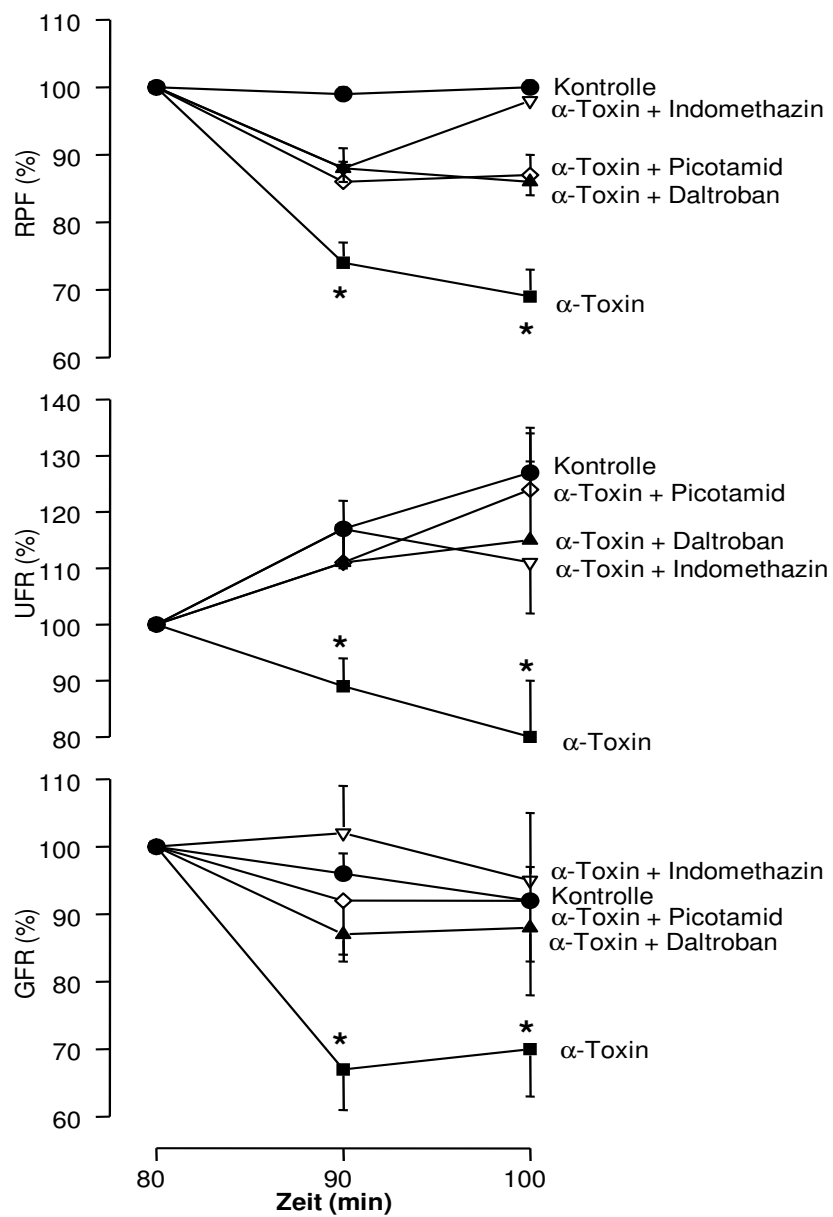


Abbildung 15: Beeinflussung der Nierenfunktionsparameter durch die Perfusion mit α -Toxin (0,125 μ g/ml). Auswirkung verschiedener pharmakologischer Interventionen. Die isolierten Nieren wurden mit Toxin in An- und Abwesenheit von Picotamid (10 μ M), Daltroban (10 μ M) und Indomethazin (100 μ M) perfundiert. Mit * gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

6.3.1. Indomethazin

Der Einsatz des Pharmakon Indomethazin erfolgte in einer Konzentration von 100 μM . Betrachtet man die Abbildung, so erkennt man, dass durch Indomethazin der Rückgang des RPF durch α -Toxin deutlich abgeschwächt werden konnte. Nach der 110. Minute wurde nahezu das Niveau des RPF vor der Toxinapplikation erreicht. Ebenso wurde bei der Auswertung der Urinflussrate eine starke Annäherung der jeweiligen Werte an die Kontrollgruppe sichtbar. Der Abfall der glomerulären Filtrationsrate durch α -Toxin konnte durch die Indomethazineinwirkung verringert werden. Keinen signifikanten Einfluss hatte Indomethazin auf die toxininduzierten Veränderungen von FeNa und TNa (Daten nicht dargestellt).

6.3.2. Picotamid

Auch durch eine Vorbehandlung mit dem kombinierten Thromboxan-Synthase-Inhibitor und Thromboxanrezeptor Antagonisten Picotamid (10 μM) ließ sich die durch α -Toxin hervorgerufene Nierenschädigung verringern. Die vasokonstriktorische Reaktion auf die Toxinperfusion, gekennzeichnet durch den Abfall des RPF, erwies sich als wesentlich geringer und hielt, auch wenn sich keine Reversibilität des Effekts über die Versuchsdauer einstellte, das Niveau bis zur 110. Minute. Betrachtet man die Entwicklung der Urinflussrate, so zeigte sich diese sogar bis zur 90. Minute wie bei der Kontrollgruppe. Erst dann kam es im Verlauf weiterer 10 Minuten zu einem Abfall von auf 84 % der Ausgangswerte bei Minute 70, wobei dieser noch immer signifikant von dem zeitgleichen Wert in der α -Toxin-Gruppe abwich. Bezüglich der glomerulären Filtrationsrate kam es zwar zunächst zu einem geringfügigen Abfall auf 97 % des Wertes im Vergleich zur Kontrollgruppe in der 90. Minute, nach 100 Minuten Perfusion dagegen lag die GFR durchschnittlich auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Picotamid hatte keinen Einfluss auf die toxininduzierten Veränderungen von FeNa und TNa (Daten nicht gezeigt).

6.3.3. Daltroban

Der Thromboxanrezeptor Antagonist Daltroban (10 μ M) zeigte bei der Betrachtung der physiologischen Parameter ähnliche Effekte wie das oben beschriebene Picotamid. Die α -Toxin-abhängige Verminderung des RPF konnte durch den Einsatz von Daltroban erheblich abgeschwächt werden. Ein ähnliches Phänomen war auch bei der Entwicklung der Urinflussrate zu verzeichnen. So konnte auch unter Daltroban die Toxin-vermittelte Abnahme des Urinflusses vermindert werden. In der 100. Minute lag die UFR bei 112 % des Ausgangswertes in der 80. Minute im Vergleich zu 137 % bei der Kontrollgruppe und nur 80 % bei der Toxingruppe. Die GFR stellte sich unter der Behandlung mit Daltroban und α -Toxin signifikant unterschiedlich zur Behandlung nur mit α -Toxin dar. Im Vergleich lag sie in der 100. Minute bei einem Wert von 89 % des Wertes vor der Toxineinwirkung. Die Kontrollgruppe erreichte ohne die Einwirkung des Toxins zum gleichen Zeitpunkt 94 %. Daltroban hatte keinen Einfluss auf die toxininduzierten Veränderungen von FeNa und TNa (Daten nicht gezeigt).

6.4. Nachweis von TxA_2 im organeffluenten Perfusat

Für den Nachweis einer potentiell modifizierten intrarenalen Bildung von Thromboxan A_2 wurden während jedes Versuchs Proben genommen; zum einen aus dem venösen Organeffluat, also Medium, das durch die *Vena renalis* das perfundierte Organ verließ, und zum anderen aus dem „Urin“, der über den Ureterkatheter aufgefangen werden konnte. Alle Proben wurden für die später durchgeführte Analytik zunächst bei -20°C eingefroren.

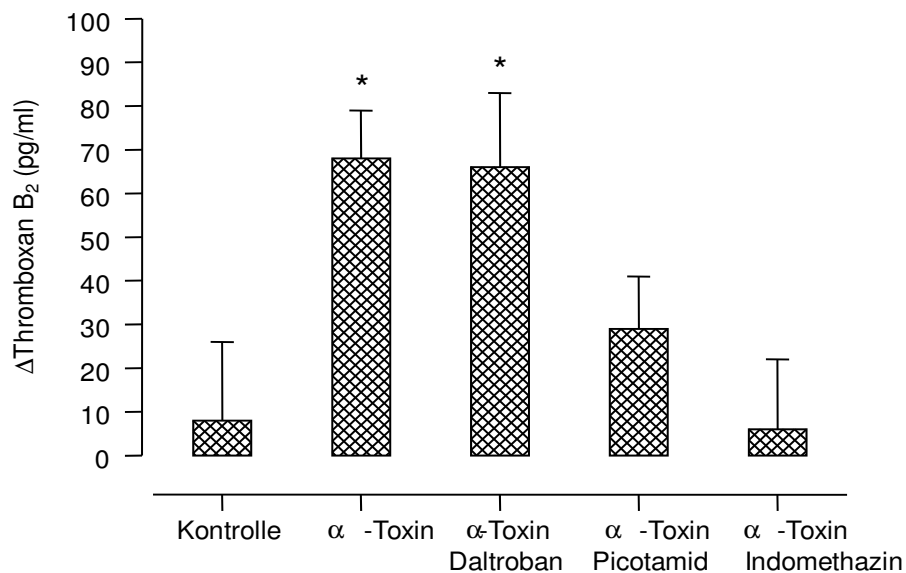


Abbildung 16: Renale Thromboxansynthese unter der Perfusion mit α -Toxin und unter pharmakologischen Interventionen gemessen am TxB_2 -Gehalt des venösen Effluats. Das Säulendiagramm zeigt die renale TxB_2 -Freisetzung unter Perfusion mit α -Toxin ($0,125 \mu\text{g/ml}$) in An- und Abwesenheit von Picotamid ($10 \mu\text{M}$), Daltroban ($10 \mu\text{M}$) und Indomethazin ($100 \mu\text{M}$). Mit * gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

Vergleichend fällt auf, dass sich die α -Toxin-Gruppe deutlich von der Kontrollgruppe abhebt. Es kommt also unter der Perfusion mit α -Toxin zu einem TxA_2 -Anstieg um 65

pg/ml im Gegensatz zu 7 pg/ml in der Kontrollgruppe. Die Veränderungen durch die verschiedenen pharmakologischen Interventionen stellen sich wie folgt dar.

Eine Vorbehandlung mit Daltroban erzielt keine Veränderung im Vergleich zur α -Toxin-Gruppe. Der kombinierte Thromboxansynthase und Thromboxanrezeptor Antagonist Picotamid hemmt die Bildung des vasoaktiven Mediators Thromboxan A_2 durch eine Inhibition der Thromboxansynthase, d.h. auf Ebene des Cyclooxygenase abhängigen Arachidonsäurestoffwechsels. Es kommt lediglich zu einem Anstieg von 28 pg/ml venösem Efflux.

Die stärkste Verminderung der TxA_2 -Synthese im Vergleich zur α -Toxin-Gruppe kann durch Indomethazin in 100 μ M Konzentration erreicht werden. Es kommt zu keiner toxin-abhängigen TxA_2 - Synthese unter Indomethazin.

6.5. Umverteilung der regionalen Perfusion durch *Staphylococcus aureus* α -Toxin

Der Einsatz der Mikrosphären am Modell der isoliert perfundierten Rattenniere gab Auskunft über die Verteilung des regionalen Blutflusses in den einzelnen Abschnitten des Nierenparenchyms und über eine eventuelle Umverteilung unter den Bedingungen des septischen Nierenversagens. Eine Auswertung des regionalen Blutflusses mit einer Unterscheidung in kortikale und medulläre Bereiche zeigte, dass es unter den Bedingungen des septischen Nierenversagens am isoliert perfundierten Rattennierenmodell zu einer Umverteilung dieses regionalen Blutflusses kam. In der Kontrollgruppe erhielt man weitestgehend stabile Werte für die kortikale und medulläre Perfusion.

Die dargestellten Diagramme (Abb. 18) spiegeln die Verteilung des regionalen Blutflusses in der 90. Minute wieder. Dies ist gemäß dem Versuchsprotokoll die Situation in der Niere direkt nach der Konfrontation mit dem α -Toxin bzw. in den Leerwertversuchen korrespondierend dazu die regionale Durchblutung an der isolierten Niere, die lediglich mit Medium perfundiert wurde. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe sank in der Gruppe der Toxinversuche die regionale Durchblutung der Nierenrinde von 115% auf 70 %, während das Nierenmark nahezu stabil perfundiert wurde.

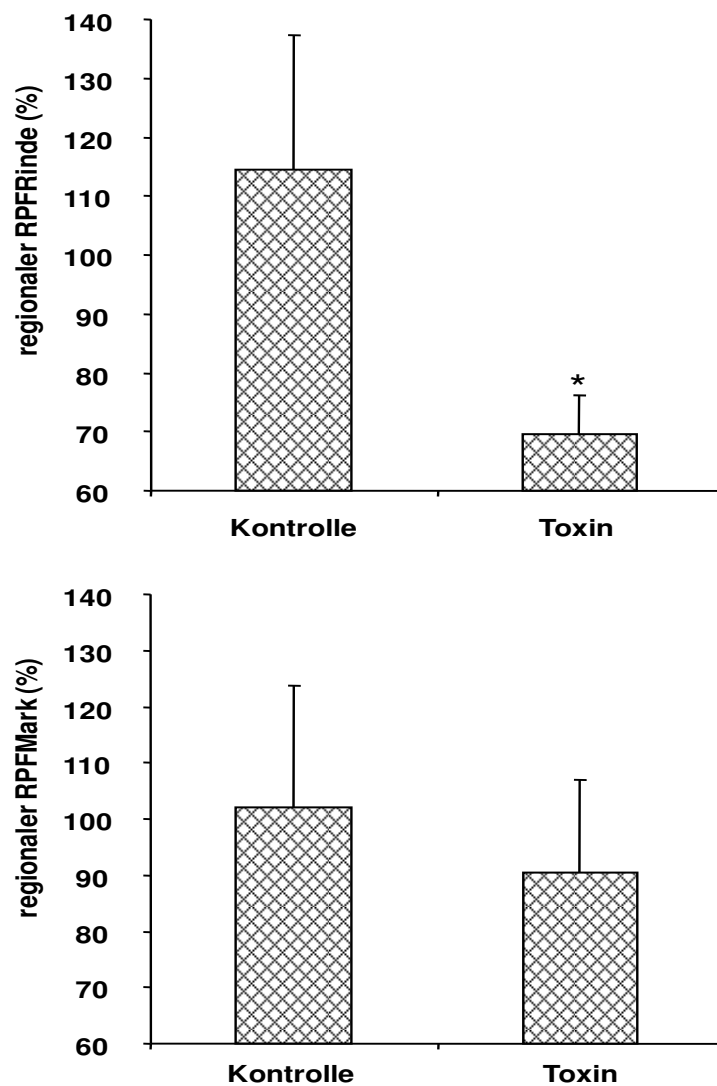


Abbildung 17: Veränderungen des regionalen renalen Perfusionsflusses durch Perfusion mit α -Toxin. Nach Perfusion des Toxins wurde mit Hilfe farblicher Mikrosphären die regionale Perfusion in Mark und Rinde bestimmt. Signifikante Ergebnisse wurden in der Grafik mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe).

7. Diskussion

7.1. Septisches Nierenversagen: Entwicklung der Fragestellung

Das septische Nierenversagen stellt eine prognoselimitierende Komplikation bei der Intensivtherapie septischer Patienten dar (6). Das Entstehen eines septischen Nierenversagens zieht häufig ein Multiorganversagen nach sich. Die steigende Inzidenz der Sepsis macht das septische Nierenversagen zu einer aktuellen und relevanten Problematik, deren genaue Pathogenese nicht sicher geklärt ist (1). Im Allgemeinen wird der durch die generalisierte, periphere Vasodilatation verursachte Abfall des Blutdrucks für das Entstehen der Nierenfunktionsstörung in der Sepsis verantwortlich gemacht. Nach dieser Hypothese handelt es sich beim septischen Nierenversagen um ein prärenales Nierenversagen. Zusätzliche Faktoren wie die Gabe nephrotoxischer Pharmaka (z.B. Aminoglykoside) können die Niere in der Sepsis zusätzlich schädigen. Das septische Nierenversagen ist wie alle anderen Formen des Nierenversagens durch einen Rückgang der GFR und der UFR, durch einen Anstieg des Serumkreatinins und durch Störungen des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts gekennzeichnet (10). Die Tatsache, dass aber auch septische Patienten ohne Blutdruckabfall ein Nierenversagen entwickeln können, macht deutlich, dass weitere Pathomechanismen zur Entstehung dieses Krankheitsbildes beitragen können (7-9). Die Sepsis geht von einem infektiösen Fokus aus. Neben Bakterien, auf deren Beteiligung in dieser Arbeit das Hauptaugenmerk lag, kommen auch Viren und Pilze als Auslöser in Frage. In der bakteriellen Sepsis werden meist aus einem entzündlichen Herd entweder die Mikroorganismen oder auch nur ihre Pathogenitätsfaktoren hämatogen im Organismus gestreut. Bei den Pathogenitätsfaktoren kann es sich abhängig von der Art des Erregers um freigesetzte Exotoxine oder um freiwerdende Endotoxine Gram-negativer bzw. „Endotoxinäquivalente“ Gram-positiver Keime handeln. Da eine Vielzahl klinisch relevanter Sepsiserreger porenbildende Exotoxine bildet (52), denen bei der Pathogenese der Sepsis und ihrer Organkomplikationen große Bedeutung zukommen könnte, sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob das isolierte und gereinigte α -Toxin von *Staphylococcus aureus* in der Lage ist,

wesentliche Veränderungen des septischen Nierenversagens im Modell der isoliert perfundierten Rattenniere auszulösen.

Staphylococcus aureus gehört in der Klinik zu den häufigsten Erregern von systemischen Infektionen (52). Dies bedingt sich besonders durch seine Fähigkeit, z.B. Katheter oder Herzklappen zu besiedeln und sich dort zu vermehren. Die meisten klinisch nachgewiesenen Stämme von *Staphylococcus aureus* produzieren α -Toxin, welches zu der Gruppe der porenbildenden Exotoxine zählt (53-62). Durch pharmakologische Interventionen sollte untersucht werden, ob es sich dabei um zytotoxische oder durch Entzündungsmediatoren vermittelte Prozesse handelte, die sich durch spezifische Interventionen hemmen oder mindern lassen. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob es unter der Einwirkung des Toxins zu einer Umverteilung des regionalen Perfusionsflusses in der Niere kommt. Da α -Toxin von *Staphylococcus aureus* als ein Prototyp porenbildender Exotoxine angesehen werden kann, könnten diese Erkenntnisse einen generellen Einblick in die Pathogenese des Nierenversagens in der bakteriellen Sepsis geben (64).

7.2. α -Toxin von *Staphylococcus aureus* induziert eine renale Dysfunktion isoliert perfundierter Rattennieren

Die renale Perfusion unterschiedlicher Toxinkonzentrationen führte zu einem konzentrationsabhängigen Rückgang von RPF, UFR und GFR. Gleichzeitig kam es zu einer Störung der tubulären Funktion, gekennzeichnet durch eine verringerte TNa und eine erhöhte FeNa. Diese Befunde bestätigen frühere Untersuchungen, die die pathophysiologische Relevanz bakterieller Pathogenitätsfaktoren in der Entstehung der Sepsis gut belegen (51, 50). Es gibt auf zellulärer Ebene (52), auf Ebene isolierter Organe (86, 87, 88, 89) und im Ganztierversuch (90) Evidenzen, die die Bedeutung von α -Toxin von *Staphylococcus aureus* hervorheben. So induziert α -Toxin an isolierten Lungen und Herzen die Bildung vasoaktiver Mediatoren, löst an isolierten Lungen und Herzen schwere Organdysfunktionen aus und führt im Ganztiermodell innerhalb kurzer Zeit zu einem dem septischen Schock entsprechenden Krankheitsbild (86, 87, 88, 89). Im Lungenmodell konnte durch die pulmonalarterielle Perfusion mit α -Toxin eine der septischen Schocklunge entsprechende pulmonalarterielle Hypertonie mit der Bildung von Ödemen ausgelöst

werden. Darüberhinaus kam es zu deutlichen Mikrozirkulationsstörungen ebenso wie es hier an der Niere gezeigt werden konnte (86,87). Mikrozirkulationsstörungen sind auch bei der beeinträchtigten Organfunktion am Langendorff-Herz unter der α -Toxin-Perfusion gezeigt. Die isolierten Herzen zeigten eine stark verminderte Kontraktilität mit einem gleichzeitig massiv ansteigenden koronaren Perfusionsdruck (88). Die Ergebnisse dieser Studien zeigen die Stimulation des Arachidonsäurestoffwechsels mit einer verstärkten Freisetzung von vasoaktiven Eicosanoiden und die daraus resultierenden Mikrozirkulationsstörungen als das pathogenetische Konzept des α -Toxins. Die in dem Versuchsaufbau beobachteten Veränderungen der renalen Perfusion, der glomerulären Filtrationsrate, der Urinproduktion und der tubulären Funktion durch die renovaskuläre Perfusion von α -Toxin, waren eindeutig auf die Wirkung des isolierten Toxins zurückzuführen. Es traten die schon an den weiteren isolierten Organen gezeigten Störungen in der Mikrozirkulation auf, die mit einer vermehrten Bildung von Thromboxan in Zusammenhang standen. Die stärkste Evidenz besteht darin, dass sämtliche Veränderungen lediglich in den Nieren auftraten, die mit α -Toxin perfundiert wurden. Die Werte der Kontrollgruppe zeigten, dass das isolierte Organ über die Dauer des Versuchs in allen Parametern als stabil bezeichnet werden konnte. Die pathophysiologischen Veränderungen traten zeitlich an die Toxingabe gekoppelt auf. Zudem konnte die Ausprägung der physiologischen Veränderungen eindeutig mit der eingesetzten Toxinkonzentration in Zusammenhang gebracht werden. So korrelierte das Ausmaß der Beeinträchtigungen mit der Konzentrationsveränderung bei der α -Toxin-Perfusion und zeigte die biologische Aktivität des Toxins an dem Organ.

7.3. *Staphylococcus aureus* α -Toxin ruft eine renale Vasokonstriktion durch Aktivierung der intrarenalen Thromboxansynthese hervor

Einer der bemerkenswertesten Befunde der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass sich die durch α -Toxin hervorgerufene renale Vasokonstriktion nicht auf einen direkten Toxineffekt, sondern auf eine toxinvermittelte Aktivierung der Thromboxansynthese zurückführen ließ. So führte die Perfusion von α -Toxin im Vergleich zur Kontrollgruppe zur Ausschwemmung von TxB_2 , dem stabilen Hydrolyseprodukt von TxA_2 , aus den Rattennieren. In Anbetracht der Tatsache, dass

TxA₂ ein potenter Vasokonstriktor der renalen Gefäße darstellt, liegt die Vermutung nahe, dass TxA₂ zur renalen Vasokonstriktion beigetragen hat. Dies konnte auch für andere isolierte Organe unter der Perfusion mit α -Toxin gezeigt werden (86, 87,88). Die Hypothese konnte durch die beschriebenen pharmakologischen Interventionsversuche bestätigt werden.

Durch unspezifische Hemmung der Cyclooxygenase Isoenzyme COX-1, COX-2 und COX-3 mit Indomethazin konnte sowohl die Bildung von TxA₂ als auch der Abfall des RPF größtenteils verhindert werden. Indomethazin hemmt die Bildung von Prostacyclin, Prostaglandinen und Thromboxan aus der Arachidonsäure. Auch am isolierten Herzen konnte durch Sibelius et al. die durch α -Toxin induzierte Mikrozirkulationsstörung auf die Thromboxanaktivierung zurückgeführt werden(40,92). Ähnliche Ergebnisse konnten durch Einsatz des dualen Tx-Synthase Hemmers und Tx-Rezeptor Antagonisten Picotamid erzielt werden. Auch hier konnte die toxinabhängige TxA₂-Bildung und die assoziierte Vasokonstriktion verhindert werden. Den entscheidenden Hinweis brachte allerdings der Einsatz des spezifischen Tx-Rezeptor Antagonisten Daltroban. In dieser Versuchsreihe blieb die toxinaktivierte TxA₂-Bildung zwar sichtbar unbeeinflusst, die Vasokonstriktion konnte jedoch völlig verhindert werden. Auch wenn weitere Prostanoiden wie z.B. PGF_{2 α} in diesen Versuchsanordnungen ebenfalls gebildet werden könnten, scheint die beobachteten Veränderungen auf TxA₂ zurückzuführen zu sein. Diese Gültigkeit der α -Toxin-vermittelten Tx-Freisetzung als Grundlage der renalen Minderperfusion wird durch experimentelle Arbeiten der vergangenen Jahre gestützt. Sowohl an isoliert perfundierten Kaninchenlungen (91), als auch an isoliert perfundierten Rattenherzen (40,95) löste das isolierte α -Toxin schwerwiegende Perfusionsstörungen über die Aktivierung der Tx-Bildung aus. Aus den vorliegenden Untersuchungen ließ sich der zelluläre Ursprung des Thromboxans in der Rattenniere nicht ermitteln. Es konnte aber gezeigt werden, dass die renalen Mesangiumzellen zur Tx-Bildung befähigt sind (93). Es ist in hohen Maßen wahrscheinlich, dass auch hier die Porenbildung in den Tx-produzierenden Zielzellen das molekulare Substrat der Zellaktivierung darstellte. In isolierten Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass der Einstrom von Calcium über Toxinporen eng an die Bildung vasoaktiver Mediatoren, u.a. Prostanoiden, gekoppelt war (39). Angesichts der zeitlichen Kinetik musste das TxA₂ von der konstitutiv exprimierten COX-1 und nicht der induzierbaren COX-2 gebildet worden sein. Somit sprechen diese Befunde für eine Sequenz aus toxinaktivierter

Thromboxanfreisetzung mit nachfolgender renaler Vasokonstriktion als pathophysiologisches Korrelat der beobachteten Veränderungen. Diese pharmakologischen Interventionen konnten die pathophysiologische Relevanz des vasoaktiven Eicosanoids Thromboxan stark untermauern.

7.4. *Staphylococcus aureus* α -Toxin führt zu schweren glomerulären und tubulären Funktionsausfällen isoliert perfundierter Rattennieren.

Der klinisch relevanteste Befund der vorliegenden Untersuchungen besteht sicher darin, dass der α -Toxin-induzierte Rückgang der renalen Perfusion von einem Rückgang der glomerulären Filtrationsrate, einem Rückgang der Urinproduktion und zu schwerwiegenden Störungen der tubulären Funktion begleitet war.

Möglicherweise führte α -Toxin durch direkte Einwirkungen auf Mesangiumzellen oder indirekt über die Wirkung von TxA_2 zur Kontraktion von Mesangiumzellen und somit zum Rückgang der GFR. Allerdings sprechen die Zeit- und Dosisabhängigkeit der Toxinwirkung, sowie die Tatsache, dass die Inhibition der Tx-Bioaktivität nicht nur den Abfall des RPF sondern auch den Rückgang der GFR verhindern kann, dafür, dass der Rückgang dieser Parameter keine unabhängigen Ereignisse waren. So könnte der Abfall der GFR und der UFR Anzeichen einer abfallenden glomerulären Perfusion sein. Auch die Auswirkung von α -Toxin auf die Verteilung der regionalen Perfusion unterstützt diese These. Unter der Perfusion mit α -Toxin kam es zu einer Umverteilung der renalen Perfusion aus kortikalen in medulläre Abschnitte, was ebenfalls eine verminderte glomeruläre Perfusion nach sich ziehen könnte.

Ein Sonderfall stellten die tubulären Funktionsstörungen unter der Toxinperfusion dar. Hier kam es zu einem Abfall von TNa und FeNa . Diese Veränderungen erwiesen sich allerdings durch Inhibition der Tx-Bioaktivität als unbeeinflusst. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass α -Toxin als porenbildendes Toxin zur Zytolyse einer Vielzahl von Zellen und somit auch möglicherweise von Tubulusepithelzellen befähigt ist. Eine Störung solch hochdifferenzierter Zellen könnte auch ohne manifesten Zelluntergang zum vollständigen Funktionsverlust der Tubuluszellen führen.

7.5. *Staphylococcus aureus* α -Toxin führt zur Umverteilung der regionalen Perfusion isolierter Nieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe farbiger Mikrosphären belegt werden, dass es neben dem Rückgang der renalen Perfusion zu einer Umverteilung der regionalen Perfusion innerhalb der Niere unter Einwirkung von α -Toxin gekommen war. Hierbei kam es zu einer Umverteilung von kortikalen in medulläre Nierenanteile. Störungen der regionalen Perfusion sind eine häufige pathophysiologisch relevante Veränderung septischer Organkomplikationen. Diese Störungen in der Mikrozirkulation führen gemeinsam mit einer Gerinnungsaktivierung zur Hypoxie in betroffenen Geweben. Sie sind in einer Reihe von Organen wie Lunge (91), Herz (94), Muskel (95) oder Darm (96,97) nachgewiesen. In diesen Organen ziehen sie schwerwiegende Funktionsstörungen nach sich. So kommt es im Parenchym isoliert perfundierter Lungen zu schwerwiegenden Ventilations-Perfusionsstörungen (91) und zum Abfall der Kontraktilität im Herzen (94). Inwieweit die hier beobachteten Veränderungen funktionelle Relevanz haben, kann durch diese Untersuchungen nicht abschließend geklärt werden, es ist jedoch vorstellbar, dass es dadurch zumindest zu einer Akzentuierung des Nierenversagens kam.

Die Messung der regionalen Perfusion erfolgte in dieser Arbeit durch Applikation farbiger Mikrosphären über die *Arteria renalis* während der Perfusion, wodurch es zu einer Embolisation der renalen Kapillaren kam. Diese Embolisation führte nicht zu einer Beeinträchtigung der Organfunktion, was an der unbeeinträchtigten Perfusionsrate festgemacht werden kann. Vielmehr ermöglichte das Quantifizieren der Menge der farbigen Mikrosphären, die sich in den verschiedenen Arealen festsetzten, zu analysieren, in welchem Verhältnis die regionalen Perfusionsflüsse in den funktionellen Abschnitten der Niere lag. Auf diesem Wege konnten die oben beschriebenen Erkenntnisse über die regionale Perfusion und ihre Veränderung unter den Manipulationen mit α -Toxin gewonnen werden.

7.6. Klinische Relevanz der Ergebnisse

Trotz medizinischer Fortschritte nimmt die Inzidenz der Sepsis zu. Gerade der Einsatz neuer Immunsuppressiva und Chemotherapeutika sowie der Einsatz invasiver diagnostischer und therapeutischer Prozeduren haben das Risiko, an einer

Sepsis zu erkranken, erhöht. Die invasive medizinische Betreuung multimorbider Patienten, die ohne die heutigen Therapeutika vielleicht ohne Chance auf ein weiteres Überleben wären, stellt zudem einen Risikofaktor für septische Erkrankungen dar (1,3).

Häufig wird der Verlauf der Sepsis durch Organkomplikationen verschlimmert. Vor allem das septische Nierenversagen geht mit einer besonders schlechten Prognose einher (2, 10,98). Lange Zeit wurde das septische Nierenversagen allein auf den Blutdruckabfall in der Sepsis im Sinne eines prärenalen Nierenversagens zurückgeführt. Die daraus resultierende Minderdurchblutung des Nierenparenchyms senkt die Funktionalität des Organs bis hin zum vollständigen Funktionsausfall. Charakterisiert wird das septische Nierenversagen durch einen Abfall der glomerulären Filtrationsrate, was mit einer Einschränkung der renalen Entgiftungsfunktion einhergeht. Da das septische Nierenversagen auch bei normotensiven septischen Patienten eintritt oder auch nach Normalisierung des Blutdrucks lange Zeit persistieren kann, müssen alternative Pathomechanismen an seinem Zustandekommen beteiligt sein.

Porenbildende Exotoxine stellen bedeutende bakterielle Virulenzfaktoren dar, die an einer Entstehung septischer Organkomplikationen beteiligt sein könnten (10).

Vor diesem Hintergrund konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass es in Abwesenheit des eigentlichen Sepsiserregers zu charakteristischen Veränderungen des akuten Nierenversagens kommen kann. Schon das Einschwemmen eines bakteriellen Pathogenitätsfaktors aus einem entzündlichen extrarenalen Fokus in die Niere könnte genügen, damit es zu einer renalen Minderperfusion auf der Ebene der Nierendurchblutung kommt. Zudem zeigt sich, dass es sich bei diesen Veränderungen um keine direkt toxischen, sondern mediatorvermittelte Veränderungen handelt, die somit pharmakologisch angebar sind. So führte die Inhibition der Thromboxan-Bioaktivität im verwendeten Modell zu einer deutlichen Verbesserung renaler Funktionsparameter.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass das isolierte porenbildende Exotoxin α -Toxin des klinisch relevanten Sepsiserregers *Staphylococcus aureus* in der Lage ist, in Abwesenheit des bakteriellen Gesamtorganismus wesentliche Veränderungen des akuten Nierenversagens in der Sepsis an einem Modell der isoliert perfundierten Rattenniere hervorzurufen. Interessanterweise wird der

beobachtete Rückgang der renalen Perfusion, der glomerulären Filtration und der Urinproduktion nicht durch einen direkten toxischen Effekt von α -Toxin hervorgerufen, sondern ist Konsequenz einer toxinabhängigen Thromboxanfreisetzung. Diese Ergebnisse veranschaulichen die große pathophysiologische Relevanz von Bakterientoxinen in der Genese septischer Organveränderungen.

Die kausale Therapie des septischen Nierenversagens ist nicht von der allgemeinen Therapie der Sepsis zu trennen. Allerdings verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die Ergänzung der etablierten Therapiestrategien der Sepsis, nämlich die Fokussanierung, die konsequente antibiotische Therapie sowie die supportiven Therapiemaßnahmen, um „Anti-Toxin-Strategien“ sinnvoll sein könnten. Solche „Anti-Toxin-Strategien“ sind auf verschiedenen Ebenen denkbar, d.h. auf der Ebene der Toxine, der Toxin-Zell-Interaktion und auf der der toxinaktivierten Mediatoren. Auf der Ebene der Bakterientoxine waren Versuche Antikörper einzusetzen bisher erfolglos. Allerdings gibt es bisher keine Anstrengungen Exotoxine gezielt zu neutralisieren. Hier wäre der Einsatz polyvalenter Immunglobuline gegen eine Vielzahl von Exotoxinen und eine Vakzinierung gefährdeter Patientengruppen gegen wichtige Bakterientoxine denkbar.

Auch die Inhibition toxinaktivierter Mediatoren wäre durchaus eine denkbare Therapiestrategie. Allerdings sind hier die Versuche der Neutralisierung eines einzelnen Mediators in der Sepsis bisher erfolglos geblieben, was angesichts der großen Redundanz der proinflammatorischen und vasoaktiven Mediatorsysteme nicht verwunderlich ist. Auch wenn die hier gewonnen Erkenntnisse nahelegen, dass die Inhibition der Thromboxan-Bioaktivität erfolgversprechend sein könnte, muss dabei bedacht werden, dass eine Vielzahl von Bakterientoxinen einer Spezies bei einer septischen Erkrankung wirksam wird, und diese Toxine immer noch zusätzlich auf zelluläre Blutelemente in der Niere einwirken. So ist davon auszugehen, dass die Bildung von Thromboxan lediglich ein Aspekt der Pathophysiologie des septischen Nierenversagens darstellt. Ein gangbarer Weg der innovativen Therapiestrategien könnte hier allerdings die sogenannte Immunonutrition darstellen. Dabei könnte durch Supplementierung des septischen Patienten im Rahmen der Ernährungstherapie Eicosapentaensäure (EPA) statt Arachidonsäure (AA) zugeführt werden. EPA wird von Cyclo- und Lipoxxygenasen zu chemisch veränderten Leukotrienen, Prostaglandinen und Thromboxanen verstoffwechselt, die häufig eine

geringere proinflammatorische Potenz aufweisen. Gerade in klinischen Studien konnten viel versprechende Effekte durch diese Vorgehensweise belegt werden. Solange allerdings keine spezifischen Therapiemöglichkeiten des septischen Nierenversagens verfügbar sind, gelten neben der symptomatischen Therapie des Nierenversagens die allgemeinen Richtlinien der Sepsistherapie.

8. Zusammenfassung

Das akute Nierenversagen stellt eine häufige und klinisch bedeutende Komplikation der Sepsis und des septischen Schocks dar. Kennzeichnend für seinen Verlauf sind die typischen klinischen Merkmale des akuten Nierenversagens. Es handelt sich dabei vor allem um einen Rückgang der glomerulären Filtrationsrate und der Urinproduktion.

Da es unter dem septischen Schock zu einem generellen Blutdruckabfall kommt, ging man lange von einem prärenalen Nierenversagen bedingt durch eine renale Minderperfusion aus. Heute geht man davon aus, dass zusätzlich intrarenale oder auch systemische Faktoren an der Genese des septischen Nierenversagens beteiligt sein könnten, da das Nierenversagen auch nach einer Rekompensation des Blutdrucks bei septischen Patienten persistiert. Außerdem tritt es häufig sowohl bei normotensiven septischen Patienten als auch in normotensiven Tiermodellen der Sepsis auf.

Veränderungen der renalen Perfusion können wesentlich zur Entstehung des akuten Nierenversagens in der Sepsis beitragen. Experimentelle Untersuchungen legen nahe, dass die Nierenstrombahn nicht an der generalisierten Vasodilatation während der hyperzirkulatorischen Phase der Sepsis teilnimmt. Stattdessen kann es zu einer selektiven renalen Vasokonstriktion kommen. Da diese Zunahme des renalen Gefäßwiderstandes vor allem die afferenten Arteriolen betrifft, kommt es zu einer Abnahme des glomerulären Filtrationsdrucks und schon allein dadurch zu einem Rückgang der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Gleichzeitig wird dadurch zusätzlich die Perfusion und Funktion der Tubulusepithelien deutlich gestört. Zudem kann es zu Störungen der regionalen Perfusion innerhalb der Nieren kommen. Diese können sich in einer Umverteilung der Perfusion aus kortikalen in medulläre Gewebeabschnitte äußern.

Die systemische und intrarenale Aktivierung inflammatorischer und vasoaktiver Effektorsysteme könnte erheblich zu den beschriebenen Veränderungen der renalen Perfusion in der Sepsis beitragen. Neben erhöhten Spiegeln von Noradrenalin, Angiotensin II oder Vasopressin könnten vor allem intrarenale gebildete vasoaktive Mediatoren wie Leukotriene, die Cytochrom P450 Metabolite der Arachidonsäure, Prostaglandine und Thromboxan, Plättchen-aktivierender Faktor (PAF), Endothelin und Stickstoffmonoxid (NO) zur Abnahme der renalen Perfusion und der GFR, sowie

zur Umverteilung der intrarenalen Perfusion, auch ohne systemischen Blutdruckabfall, beitragen. Zusätzlich können Thromboxan, Cysteinyl-Leukotriene und Endothelin die GFR allein durch die Kontraktion von Mesangiumzellen erheblich vermindern. Zusammenfassend legen diese zumeist experimentell erhobenen Daten den Schluss nahe, dass das akute Nierenversagen in der Sepsis keineswegs ausschließlich durch prärenale hämodynamische Veränderungen hervorgerufen wird. Stattdessen könnten bakterielle Toxine intrarenale Effektorsysteme aktivieren, die schwerwiegende intrarenale Perfusionsstörungen nach sich ziehen. Somit könnten bakterielle Toxine eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese des septischen Nierenversagens beteiligt sein.

Die vorliegende Arbeit zeigt am Modell der isoliert perfundierten Rattenniere, dass es durch *Staphylococcus aureus* α -Toxin, der aus einem entzündlichen extrarenalen Fokus eingeschwemmt wird, über die Umverteilung des regionalen Perfusionsflusses zu einer starken Einschränkung der Nierenfunktion kommt, die konzentrationsabhängig auch in ein vollständiges Nierenversagen münden kann. Interessanterweise sind diese Veränderungen nicht durch den zytotoxischen Effekt des Bakterientoxins sondern die toxininduzierte und konzentrationsabhängige renale Thromboxanfreisetzung verursacht. Diese Einschränkungen der Nierenfunktion sind im Modell gekennzeichnet durch einen Abfall der Nierenfunktionsparameter RPF, UFR und GFR, sowie eine erhöhte TNa bei verringerter FeNa. Der Einsatz inhibitorisch wirkender Pharmaka ermöglicht eine detailliertere Darstellung dieser Signalvermittlung. Durch Einsatz eines COX Inhibitors, eines Thromboxansynthase Inhibitors und eines Tx-Rezeptor Antagonisten konnte gezeigt werden, dass die renale Vasokonstriktion im septischen Nierenversagen in engem Zusammenhang mit der Tx-Bildung stehen. Die Wirkung dieser Pharmaka auf die Niere und die sich dazu parallel entwickelnde renale Thromboxanbildung durch das Organ bestätigen diese Schlussfolgerungen über die kausalen Zusammenhänge zwischen der Thromboxansynthese und dem Nierenversagen. Die Untersuchungen mit den injizierten Mikrosphären zeigen zudem den engen Zusammenhang zwischen der Umverteilung des regionalen Blutflusses aus kortikalen in medulläre Gewebeabschnitte der Niere und der Ausbildung des Nierenversagens. Diese Befunde zeigen, dass bakterielle Exotoxine klinisch relevanter Sepsiserreger maßgeblich an der Entstehung des akuten Nierenversagens in der Sepsis beteiligt sein könnten.

9. Summary

Acute renal failure is a frequent and life-threatening complication of sepsis and septic shock. Typical features of acute renal failure are a decrease of urine production and glomerular filtration. (Very helpfully even in model of isolated perfused rat kidney and also very typical as a clinical sign for sepsis or septic shock is the renal perfusion flow rate (RPF), which tells us about vasomotoric situation in kidney.)

In patients with septic shock a sometimes dramatic decrease of blood pressure occurs which was thought to be the main cause of renal dysfunction. So renal failure in sepsis was attributed to hypoperfusion of the organ. However, as renal failure also occurs in normotensiv septic patients other factors must contribute to this disease.

Experimental data suggest that the renal vascular system does not participate in generalized vasodilatation of the organism. In fact it was found, that vasoconstriction may occur in the kidney. The increase of vascular resistance is mainly attributed to the afferent arteriols. Therefore glomerular filtration pressure decreases, which results in a decrease of glomerular filtration (GFR). Moreover, production of urine also decreases. In addition to this the regional blood flow of the kidney can also be redisturbed by this mechanism resulting in blood flow changes from cortical in medullar regions of the kidney. The intrarenal activation of inflammatory and vasoactive effectors by bacterial toxins may lead to these pathophysiological changes. The aim of this study was to elucidate the pathophysiological relevance of *Staphylococcus aureus* α -toxin in acute renal failure by using isolated perfused rat kidneys. The main finding of the present study was that *Staphylococcus aureus* α -toxin caused deterioration of isolated kidney function indicated by decrease in renal perfusion flow, glomerular filtration and urine production. Interestingly, these changes were not attributed to mere toxic effect of α -toxin, but were caused by the bioactivity of toxin-triggered release of Thromboxan A_2 within the kidney.

Moreover, α -toxin caused a distribution of renal perfusion flow from cortical to medullar tissue sections. These results indicate that bacterial exotoxins of clinically relevant bacteria may be of great relevance in the pathogenesis of septic renal failure. Renal failure may be due to a complex activation of proinflammatory and vasoactive mediators. Innovation of many therapeutic strategies may be based on a better understanding of complex mechanisms of renal failure in sepsis.

10. Literatur

- 1) Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care. Med.* 2001; 29: 1303-1310.
- 2) Schuster H-P, Müller-Werdan U. Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen. *Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen*. 3. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 2005 pp. 3-26.
- 3) Patel GP, Gurka DP and Balk RA. New Treatment strategies for severe Sepsis and septic shock. *Curr.Opin.Crit.Care* 2002; 9: 390-396.
- 4) Pfreundschuh M, Schölmerich J. Pathophysiologie und Pathobiochemie. URBAN FISCHER Verlag, München Jena 2000: S.99- 102.
- 5) Arribas B, Elena Rodríguez-Cabezas M, Comalada M, Bailón E, Camuesco D, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A, Gálvez J. Evaluation of the preventative effects exerted by *Lactobacillus fermentum* in an experimental model of septic shock induced in mice. *Br. J. Nutr.* 2008; 29: 1-8.
- 6) Schramm L, Seibold A, Schneider R, Zimmermann J, Netzer KO, Wanner C. Ischemic acute renal failure in the rat: effects of L-arginine and superoxide dismutase on renal function. *J. Nephrol.* 2008; 21: 229-235.
- 7) Brenner M, Schaer GL, Mallory DL, Suffrendini AF, Parillo JE. Detection of renal blood flow abnormalities in septic and critically ill patients using a new designed indwelling thermodilution renal vein catheter. *Chest* 1990; 98: 170-179.
- 8) Cumming AD, Kline R, Linton AL. Association between renal and sympathetic responses to nonhypotensive systemic sepsis. *Crit. Care Med.* 1988; 16: 1132-1137.
- 9) Walker JF, Cumming AD, Lindsay RM, Solez K, Linton A L. The renal response produced by nonhypotensive sepsis in a large animal model. *Am. J. Kidney Dis.* 1986; 8: 88-97.

- 10) Wan Li, Bellomo R, Di Giantomasso D, Ronco C. The pathogenesis of septic acute renal failure. *Curr. Opin. Crit. Care.* 2003; 9: 496-502.
- 11) Ravikant T, Lucas TE. Renal blood flow distribution in septic hyperdynamic pigs. *J. Surg. Res.* 1977; 22: 294-298.
- 12) Brenner M, Schaer GL, Mallory DL, Suffrendini AF, Parillo JE. Detection of renal blood flow abnormalities in septic and critically ill patients using a newly designed indwelling thermodilution renal vein catheter. *Chest.* 1990; 98: 170-179.
- 13) Van Lambalgen AA., Bouriquet N, Casselas D. Effects of endotoxin on tone and pressure responsiveness of preglomerular juxtamedullary vessels. *Eur. J. Physiol.* 1996; 432: 574-577.
- 14) Lugon JR, Boim A, Ramos OL, Ajzen H, Schor N. Renal function and glomerular hemodynamics in male endotoxemic rats. *Kidney Int.* 1989; 36: 570-575.
- 15) van Lambalgen AA, van Kraats AA, van den Bos GC, Stel HV, Straub J, Donker AJ, Thijs LG. Renal function and metabolism during endotoxemia in rats: role of hypoperfusion. *Circ. Shock* 1991; 35: 164-173.
- 16) Cronenwett JL, Lindenauer SM. Distribution of intrarenal blood flow during bacterial sepsis. *J. Surg. Res.* 1978; 24: 132-141.
- 17) Schaub RG, Ochoa R, Simmons CA, Lincoln KL. Renal microthrombosis following endotoxin infusion may be mediated by lipoxigenase products. *Circ. Shock* 1987; 21: 261-270.
- 18) Badr KF, Kelley VE, Rennke HG, Brenner BM. Roles for thromboxane A₂ and leukotrienes in endotoxin-induced acute renal failure. *Kidney Int.* 1986; 30: 474-480.
- 19) Klahr S. Role of arachidonic acid metabolites in acute renal failure and sepsis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1994; 9: 52-55.

- 20) Wang J, Dunn MJ. Platelet-activating factor mediates endotoxin-induced acute renal insufficiency in rats. *Am. J. Physiol.* 1987; 253: F1283-F1289.
- 21) Kohan DE. Role of endothelin and tumor necrosis factor in the renal response to sepsis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1994; 9: 73-77.
- 22) Shultz V, Collins MG, Yates MS. Amelioration of glycerol-induced acute renal failure in the rat with 8-phenyltheophylline: Timing of intervention. *Eur. J. Pharmacol.* 1988; 40: 733-735.
- 23) Vaughan MR, Quaggin SE. How do mesangial and endothelial cells form the glomerular tuft? *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008; 19: 24-33.
- 24) Laszik Z, Nadasdy T, Johnson LD, Lerner MR, Brackett D, Silva FG. Renal interleukin-1 expression during endotoxemia and Gram-negative septicemia in conscious rats. *Circ. Shock* 1994; 43: 115-121.
- 25) Linas SL, Whittenburg D, Parsons PE, Repine JE. Ischemia increases neutrophil retention and worsens acute renal failure: role of oxygen metabolites and ICAM 1. *Kidney Int.* 1995; 48: 1584-1591.
- 26) Linas SL, Whittenburg D, Repine JE. Role of neutrophil derived oxidants and elastase in lipopolysaccharide-mediated renal injury. *Kidney Int.* 1991; 39: 618-623.
- 27) Shultz PJ, Raj L. Endogenously synthesized nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 1718-1725.
- 28) Liu Z, Yu Y, Jiang Y, Li J. Growth hormone increases circulating neutrophil activation and provokes lung microvascular injury in septic peritonitis rats. *J Surg Res.* 2002; 105:195-199.
- 29) Snell RJ, Parrillo JE. Cardiovascular dysfunction in septic shock. *Chest* 1991; 99: 1000-1009.
- 30) Hiltebrand LB, Krejci V, Sigurdsson GH. Effects of dopamine, dobutamine, and dopexamine on microcirculatory blood flow in the gastrointestinal tract during sepsis and anesthesia. *Anesthesiology* 2004; 100: 1188-1197.

- 31) Chin A, Radhakrishnan J, Fornell L, John E. Effects of tezosentan, a dual endothelin receptor antagonist, on the cardiovascular and renal systems of neonatal piglets during endotoxin shock. *J. Pediatr. Surg.* 2002; 37: 482-487.
- 32) Sprague RS, Stephenson AH, Dahms TE, Lonigro AJ. Proposed role for leukotrienes in the pathophysiology of multiple systems organ failure. *Crit. Care Clin.* 1989; 5: 315-329.
- 33) Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N. Engl. J. Med.* 1990; 323: 645-655.
- 34) Lai YJ, Pullamsetti SS, Dony E, Weissmann N, Butrous G, Banat GA, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Role of the prostanoid EP4 receptor in Iloprost-mediated vasodilatation in pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008; 8: 188-196.
- 35) Petrak RA, Balk RA, Bone RC. Prostaglandins, cyclo-oxygenase inhibitors, and thromboxane synthase inhibitors in the pathogenesis of multiple system organ failure. *Crit. Care. Clin.* 1989; 5: 303-314.
- 36) Van Hinsbergh VW. Regulatory functions of the coronary endothelium. *Mol. Cell. Biochem.* 1992; 116: 163-169.
- 37) Kadowaki H, Yamamoto T, Kageyama-Yahara N, Kurokawa N, Kadowaki M. The pathophysiological roles of COX-1 and COX-2 in the intestinal smooth muscle contractility under the anaphylactic condition. *Biomed. Res.* 2008; 29:113-117.
- 38) Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 157-160.
- 39) Seeger W, Obernitz R, Thomas M, Walrmath D, Suttorn N, Holland IB, Grimminger F, Eberspächer B, Hugo F, Bhakdi S. Lung vascular injury after administration of viable hemolysin-forming *Escherichia coli* in isolated rabbit lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 143: 797-805.

- 40) Sibelius U, Grandel U, Buerke M, Mueller D, Kiss L, Kraemer HJ, Braun-Dullaeus R, Haberbosch W, Seeger W, Grimminger F. Staphylococcal α -toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation. *Circulation* 2000; 101: 78-85.
- 41) Conger J, Robinette J, Villar A, Raj L, Shultz P. Increased nitric oxide synthase activity despite lack of response to endothelium-dependent vasodilators in postischemic acute renal failure. *J. Clin. Invest.* 1995; 96: 631-638.
- 42) Welch WJ, Wilcox CS. Potentiation of tubuloglomerular feed-back in rat by thromboxan mimetic. *J. Clin. Invest.* 1992; 89:1857-1865.
- 43) Cirino M, Morton H, Mac Donald C, Hadden J, Ford-Hutchinson AW. Thromboxane A₂ and prostaglandin endoperoxide analogue effects on porcine renal blood flow. *Am. J. Physiol.* 1990; 258: 109-114.
- 44) Zipser RD. Effects of selective inhibition of thromboxane synthesis on renal function in humans. *Am. J. Physiol.* 1985; 248: F753-F756.
- 45) Doursout MF, Oguchi T, Fischer UM, Liang Y, Chelly B, Hartley CJ, Chelly JE. Distribution of NOS Isoforms in a porcine endotoxin shock model. *Shock* 2008; 29: 692-702.
- 46) Yu L, Gengaro PE, Niederberger M, Burke T J, Schrier RW. Nitric oxide: a mediator in rat tubular hypoxia/reoxygenation injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 1691-1695.
- 47) Wiles JB, Cerra FB, Siegel JH, Border JR. The systemic sepsis response: Does the organism matter? *Crit. Care. Med.* 1980; 8: 55-60.
- 48) Pilz G, McGinn P, Boekstegers P, Kaab S, Weidenhofer S, Werdan K. Pseudomonas sepsis does not cause more severe cardiovascular dysfunction in patients than non Pseudomonas sepsis. *Circ. shock* 1994; 42: 174-182.

- 49) Marre R, Mertens T, Trautmann M, Klinische Infektiologie, Urban & Fischer Verlag. 2000
- 50) Bhakdi S. Microbial toxins. Wien Klin. Wochenschr. 1998; 110: 660-668.
- 51) Hildebrand F, Pape HC, Krettek C. The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction. Unfallchirurg. 2005; 108:793-794, 796-803.
- 52) Grimminger F, Rose F, Sibelius U, Meinhardt M, Pötzsch B, Spriestersbach R, Bhakdi S, Suttorp N, Seeger W. Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins *Escherichia coli* hemolysin and staphylococcal α -toxin. J. Immunol. 1997; 159: 1909-1916.
- 53) Arbuthnott JP, Freer JH, Bernheimer AW. Physical states of staphylococcal α -toxin. J. Bacteriol. 1967; 94: 1170-1177.
- 54) Arbuthnott JP, Freer JH, Billcliffe B. Lipid-induced polymerization of staphylococcal α -toxin. J. Gen. Microbiol. 1973; 75: 309-319.
- 55) Arvand M, Bhakdi S, Dahlbäck B, Preissner KT. *Staphylococcus aureus* α -toxin attack on human platelets promotes assembly of the prothrombinase complex. J. Biol. Chem. 1990; 265: 14377-14381.
- 56) Bader MF, Thierse D., Aunis D., Ahnert-Hilger G., Gratzl M. Characterization of hormone and protein release from α -toxin-permeabilized chromaffin cells in primary culture. J. Biol. Chem. 1986; 261: 5777-5783.
- 57) Bashford CL, Alder GM, Menestrina G, Micklem KJ, Murphy JJ, Pasternak CA. Membrane damage by hemolytic viruses, toxins, complement, and other cytotoxic agents. A common mechanism blocked by divalent cations. J. Biol. Chem. 1986; 261: 9300-9308.
- 58) Belmonte G, Cesatti L, Ferrari B, Nicolussi T, Ropele M., Menestrina G. Pore formation by *Staphylococcus aureus* α -toxin in lipid bilayers: temperature and concentration dependence. Eur. Biophys. J. 1987; 14: 349-358.

- 59) Bernheimer AW. Interactions between membranes and cytolytic bacterial toxins. *Biochim. Biophys. Acta* 1974; 344: 27-50.
- 60) Bernheimer AW, Kim KS, Remsen CC, Antanavage J, Watson SW. Factors affecting interaction of staphylococcal α -toxin with membranes. *Infect. Immun.* 1972; 6: 636-642.
- 61) Bernheimer AW, Schwartz LL. Isolation and composition of staphylococcal α - toxin. *J. Gen. Microbiol.* 1963; 30: 455-468.
- 62) Walev I, Palmer M, Valeva A, Weller U, Bhakdi S. Binding, oligomerization, and pore formation by streptolysin O in erythrocytes and fibroblast membranes: detection of nonlytic polymers. *Infect. Immun.* 1995; 63: 1188-1194.
- 63) Alving CR, Habig WH, Urban KA and Hardegree MC. Cholesterol-dependent teranolysin damage to liposomes. *Biochem. Biophys. Acta* 1979; 551: 224-228.
- 64) Alouf JE. Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S. erythrogenic toxins) *Pharmacol. Ther.* 1980; 11: 661-71.
- 65) Sibelius U, Grandel U, Buerke M, Kiss L, Klingenberger P, Heep M, Bournelis E, Seeger W, Grimminger F. Leukotriene-mediated coronary vasoconstriction and loss of myocardial contractility evoked by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in perfused rat hearts. *Crit. Care Med.* 2003 Mar; 31: 683-688.
- 66) Forth D, Henschler W, Rummel W. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* Urban & Fischer 1996.
- 67) Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998; 38: 97-129.
- 68) Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. Cox-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 13926-13931.

- 69) Baber SR, Deng W, Rodriguez J, Master RG, Bivalacqua TJ, Hyman AL, Kadowitz PJ. Vasoactive prostanoids are generated from arachidonic acid by COX-1 and COX-2 in the mouse. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2005; 289: 1476-1487.
- 70) Barnett J, Chow J, Ives D, Chiou M, Mackenzie R, Osen E, Nguyen B, Tsing S, Bach C, Freire J, et al. Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G7H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochem. Biophys. Acta* 1994; 1209: 230-239.
- 71) Feng L, Sun W, Xia Y, Tang WW, Chanmugam P, Soyoola E, Wilson CB, Hwang D. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; 307: 361-368.
- 72) Hela T, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 889: 7384-7388.
- 73) Johnson JL, Wimsatt J, Buckel SD, Dyer RD, Maddipati KR. Purification and characterization of prostaglandin H synthase-2 from sheep placental cotyledons. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995; 324: 26-34.
- 74) Kennedy BP, Chan CC, Culp SA, Cromlish WA. Cloning and expression of rat prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase)-2 cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; 197: 494-500.
- 75) Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase-2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 3223-3228.
- 76) O'Neill G., Ford-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett.* 1993; 330: 156-160.
- 77) Smith CJ., Zhang Y., Koboldt CM., Muhammad J., Zweifel BS., Shaffen A., Talley JJ. Masferrer JL. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 13313-13318.

- 78) Hood JS, Nossaman BD, Ibrahim IN, McMahon TJ, Babycos CR, Kadowitz PJ. Daltroban blocks thromboxane responses in the pulmonary vascular bed of the cat. *J. Appl. Physiol.* 1992; 72: 2305-2310.
- 79) Ichikawa I, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Hostetter TH, Benner BM. Role of angiotensin II in the altered renal function of congestive heart failure. *Circ. Res.* 1984; 55: 669-675.
- 80) Castellani S, Paniccchia R, Di Serio C, La Cava G, Poggesi L, Fumagalli S, Gensini GF, Neri Serneri GG. Thromboxane inhibition improves renal perfusion and excretory function in severe congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 42:133-139.
- 81) Balsano F, Violi F, The ADEP Group. Effect of picotamide on the clinical progression of peripheral vascular disease: a double-blind placebo-controlled study. *Circulation* 1993; 87: 563-569.
- 82) Cocozza M, Picano T, Oliviero U, Russo N, Coto V, Milani M. Effects of picotamide, an antithromboxane agent, on carotid atherosclerotic evolution: a two-year, double-blind, placebo-controlled study in diabetic patients. *Stroke* 1995; 26: 597- 601.
- 83) Castellani S, Paladini B, Paniccchia R, et al. Increased renal formation of thromboxane A₂ and prostaglandin F_{2α} in heart failure. *Am. Heart. J.* 1997; 133: 94-100.
- 84) Hakkinen JP, Miller MW, Smith AH, Knight DR. Measurement of organ blood flow with coloured microspheres in the rat. *Cadiovasc. Res.* 1995; 29: 74-79.
- 85) Sharon L, Hale BS, Alker KJ, Kloner RA. Evaluation of nonradioactive, coloured microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. *Circulation* 1988; 78: 428-434.
- 86) Seeger W, Bauer M, Bhakdi S. Staphylococcal α-toxin elicits hypertension in isolated rabbit lungs. *J. Clin. Invest.* 1984; 74: 849-858.

- 87) Walmrath D, Scharmann M, König R, Pilch J, Grimminger F, Seeger W. Staphylococcal α -toxin induced ventilation-perfusion mismatch in isolated bloodfree-perfused rabbit lungs. J. Appl. Physiol. 1993; 74: 1972-1980.
- 88) Sibelius U, Grandel U, Buerke M, Mueller D, Kiss L, Kraemer HJ, Braun-Dullaeus R, Haberbosch W, Seeger W, Grimminger F. Staphylococcal α -toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts- role of thromboxane formation. Circulation 2000; 101: 78-85.
- 89) Cohen JJ, Black AJ, Wertheim SJ. Direct effects of endotoxin on the function of the isolated perfused rat kidney. Kidney Int. 1990; 37: 1219-1226.
- 90) Chin A, Radhakrishnan J, Fornell L, John E. Effects of tezosentan, a dual endothelin receptor antagonist, on the cardiovascular and renal system of neonatal piglets during endotoxin shock. J. Pediatr. Surg. 2002; 37: 482-487.
- 91) Walmrath D, Pilch J, Scharmann M, Grimminger F, Seeger W. Severe VA/Q mismatch in perfused lungs evoked by sequential challenge with endotoxin and *E. coli* hemolysin. J. Appl. Physiol. 1994; 76: 1020-1030.
- 92) Grandel U, Sibelius U, Schrickel J, Schmidt D, Buerke M, Fink L, Bournelis E, Heep M, Mayer K, Bohle RM, Seeger W, Grimminger F. 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* α -toxin. Crit. Care Med. 2001; 29: 1-7.
- 93) De Rubertis FR, Craven PA. Eicosanoids in the pathogenesis of the functional and structural alterations of the kidney in diabetes. Am. J. Kidney Dis. 1993; 22: 727-735.
- 94) Groenevald ABJ, van Lambalgen AA, van den Bos GC, Bronsveld W, Naut JJP, Thijs LG. Maldistribution of heterogeneous coronary blood flow during canine endotoxin shock. Cardiovasc. Res. 1991; 25: 80-88.

- 95) Cryer HG, Garrison RN, Harris PD, Greenwald BH, Alsip NL. Prostaglandins mediate skeletal muscle arteriole dilation in hyperdynamic bacteremia. *Am. J. Physiol.* 1990; 259: H728-H734.
- 96) Mayer K, Temmesfeld-Wollbrück B, Friedland A, Olschewski H, Reich M, Seeger W, Grimminger F. Severe microcirculatory abnormalities elicited by *E. coli* hemolysin in the rabbit ileum mucosa. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 1999; 160: 1171-1178.
- 97) Farquhar I, Martin CM, Lam C, Potter R, Ellis CG, Sibbald WJ. Decreased capillary density in vivo in bowel mucosa of rats with normotensive sepsis. *J. Surg. Res.* 1996; 61: 190-196.
- 98) Tetta C, Bellomo R and Ronco C. Artificial organ treatment for multiple organ failure, acute renal failure, and sepsis. Recent new trends. *Artificial Organs* 2003; 27: 202-213.

11. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei all denen bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Grimminger für die Bereitstellung der umfangreichen apparativen und materiellen Mittel.

Herrn PD Dr. med. Ulrich Grandel danke ich ganz besonders für die Überlassung des interessanten Themas und für seine kompetente wissenschaftliche und praktische Unterstützung, die bis zum Schluss für das Gelingen der Arbeit unabdingbar war.

Herrn Prof. Gerstberger danke ich für die Unterstützung während des Prozesses.

Frau Martina Heep hat mich während der gesamten Zeit und darüber hinaus praktisch und moralisch konsequent betreut, und dafür danke ich ihr sehr.

Am Schluss danke ich meiner gesamten Arbeitsgruppe für die kollegiale, freundschaftliche und unterstützende Zusammenarbeit, die die Promotionszeit für mich immer in schöner Erinnerung bleiben lässt.

Meiner Schwester danke ich, dass Sie sich immer um Lara, Puck und Barolo gekümmert hat.

12. Erklärung:

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften genommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus -Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Düren, den 15.07.2010

Melanie Eva Maria Simon

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5602-5



9 783835 956025

© 2jenn - Fotolia.com