

Experimentelle Untersuchungen zur Pathogenese
der septischen Kardiomyopathie:

**Einfluss der Lipoteichonsäure von
Staphylococcus aureus auf das
isoliert perfundierte Rattenherz**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

MICHAEL WOLFGANG HOPF

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 2004

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 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Experimentelle Untersuchungen zur Pathogenese
der septischen Kardiomyopathie:

**Einfluss der
Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus*
auf das isoliert perfundierte Rattenherz**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Michael Wolfgang Hopf
aus Stuttgart – Bad Cannstatt

Gießen 2004

Aus dem Zentrum für Innere Medizin,
Medizinische Klinik und Poliklinik II
Leiter: Prof. Dr. W. Seeger,
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: PD Dr. Ulf Sibelius

Gutachter: Prof. Dr. Dietmar Schranz

Tag der Disputation: 14.10.2004

Meinen Eltern
Gisela und Dr. Hans Hopf
gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Vorwort.....	4
2. Einleitung.....	5
2.1 Sepsis und septischer Schock.....	5
2.2 Das kardiovaskuläre System in der Sepsis und im septischen Schock.....	7
2.3 Akute septische Kardiomyopathie.....	9
2.3.1 Klinisches Erscheinungsbild.....	9
2.3.2 Pathogenese der akuten septischen Kardiomyopathie.....	10
2.3.3 TNF- α als Pathogenitätsfaktor der septischen Kardiomyopathie.....	10
2.3.4 Störungen der myokardialen Zirkulation.....	13
2.4 Vasoaktive Substanzen in der Sepsis.....	16
2.4.1 Plättchen-aktivierender-Faktor (PAF).....	16
2.4.2 Endothelin.....	17
2.4.3 Eicosanoide.....	17
2.4.3.1 Lipoxygenase-Produkte.....	18
2.4.3.2 Cyclooxygenase-Produkte.....	18
2.4.4 Stickstoffmonoxid (NO).....	20
2.5 Bakterielle Pathogenitätsfaktoren in der Sepsis.....	21
2.5.1 Bakterielle Exotoxine.....	21
2.5.2 Bakteriellendes Endotoxin.....	22
2.5.3 Lipoteichonsäure (LTA) von <i>Staphylococcus aureus</i>	23
2.6 Fragestellung.....	27
3. Material und Methoden.....	28
3.1 Materialien.....	28
3.1.1 Lösungen und Pharmaka für die Herzperfusion.....	28
3.1.2 Geräte und Materialien für die Herzperfusion.....	28

3.1.3 Versuchstiere	29
3.1.4 Lipoteichonsäure von <i>Staphylococcus aureus</i>	29
3.1.5 ELISA-Test-Kits zum Nachweis von Thromboxan A ₂ , Prostacyclin und TNF- α ..	30
3.1.6 Materialien und Geräte zur Messung von NO.....	30
3.1.7 Real-time-PCR	30
3.2 Methoden.....	31
3.2.1 Modell der isolierten Herzperfusion.....	31
3.2.2 Präparation und Perfusion des Rattenherzens	31
3.2.3 Versuchsaufbau	32
3.2.4 Messung physiologischer Parameter	34
3.2.5 Experimentelles Protokoll	34
3.2.6 Nachweis von Thromboxan A ₂ und Prostacyclin.....	35
3.2.7 Nachweis von TNF- α	36
3.2.8 NO-Messung.....	36
3.2.9 Überprüfung auf Kontamination durch Endotoxin.....	37
3.2.10 Quantifizierung von mRNA mit Real-time-PCR.....	38
3.2.11 Statistische Auswertung der Daten.....	39
4. Ergebnisse.....	40
4.1 Übersicht	40
4.2 Einfluß der LTA auf physiologische Parameter des Herzens	40
4.3 Freisetzung von TNF- α	42
4.4 Beeinflussung der TNF- α -Wirkung.....	44
4.5 Blockade des CD14-Rezeptors.....	44
4.5.1 Auswirkung auf die Produktion von TNF- α	44
4.5.2 Auswirkung auf physiologische Parameter	47
4.6 Untersuchung der Perfusatproben auf NO	48
4.7 Vasoaktive Substanzen und koronare Perfusion	48
4.8 Überprüfung der LTA auf Kontamination mit Endotoxin	51

5. Diskussion	52
5.1 Septische Kardiomyopathie.....	52
5.2 LTA bewirkt am Herzen eine Minderung der Kontraktilität	53
5.3 Freisetzung von TNF- α bei Perfusion des Herzens mit LTA.....	54
5.4 Mikrozirkulationsstörungen als Auslöser der septischen Kardiomyopathie.....	56
5.5 Klinische Bedeutung	58
6. Zusammenfassung	60
7. Summary.....	62
8. Auflistung der verwendeten Abkürzungen	64
9. Literaturverzeichnis	66
10. Danksagung	86
11. Lebenslauf	87

1. Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von August 2000 bis September 2002 am Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik und Poliklinik II (Leiter: Prof. Dr. Werner Seeger) der Justus-Liebig-Universität Gießen im Laborbereich von Herrn Prof. Dr. Dr. Friedrich Grimminger in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Ulf Sibelius unter Betreuung durch Herrn Dr. Ulrich Grandel. Die Arbeit befasst sich mit der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie, welche eine gravierende Komplikation septischer Krankheitsbilder darstellt. In diesem Zusammenhang wurde die pathogene Wirkung von Lipoteichonsäure, ein Zellwandbestandteil des grampositiven Bakteriums *Staphylococcus aureus* auf das Herz untersucht. Am isolierten und zellfrei perfundierten Rattenherz sollte durch pharmakologische Interventionen nähere Erkenntnisse zur Entstehung der septischen Kardiomyopathie durch grampositive Pathogenitätsfaktoren gewonnen werden.

2. Einleitung

2.1 Sepsis und septischer Schock

Die Reaktion des Körpers auf eine generalisierte Infektion mit dem Nachweis von Mikroorganismen oder dem hochgradigen Verdacht auf das Vorhandensein von Mikroorganismen wird als Sepsis bezeichnet. Das Krankheitsbild der Sepsis entsteht, indem eine eigentlich sinnvolle Abwehrreaktion des Körpers außer Kontrolle der physiologischen Regulation gerät, und damit in überschüssiger, generalisierter Form nicht mehr nur die auslösenden Pathogene bekämpft, sondern auch eine Schädigung körpereigener Zellen und sogar Organe verursacht.¹

Die wachsende Bedeutung der Sepsis in der Medizin begründet sich auf deren Fortschritt. Durch neue, bessere Behandlungsmethoden wächst die Zahl chronisch kranker, geschwächter oder immunsupprimierter Patienten. Gerade diese Patienten haben jedoch das höchste Risiko, an einer Infektion zu erkranken.² Durch häufige, ungezielte Antibiotikagabe bilden sich resistente Keime. Die Vermehrung resistenter Erreger und auch der vermehrte Einsatz invasiver Verfahren, wie intravasale Katheter, Intubation oder Blasen Katheter, haben zu einer Steigerung nosokomialer Infektionen geführt, und gefährden auch Patienten ohne primäre Infektionserkrankung. Damit wird verständlich, warum die Inzidenz der Sepsis in den vergangenen Jahrzehnten deutlich angestiegen ist.³ Sepsis steht mittlerweile an dritter Stelle der durch Infektionen verursachten Todesfälle und der septische Schock ist die Haupttodesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen.⁴ Die Letalität des septischen Schocks mit Multiorganversagen schwankt von 30 bis 80 %, abhängig von der Schädigung der Organsysteme.⁵

Klinische Symptome der Sepsis sind Tachykardie, Tachypnoe, Fieber oder Hypothermie, Leukozytose oder sogar Leukopenie. Diese Symptomatik kann auch durch nicht-infektiöse Ursachen, wie Polytrauma, Pankreatitis oder Verbrennungen hervorgerufen werden. Man spricht in jenen Fällen allerdings nicht von Sepsis, sondern von SIRS (systemic inflammatory response syndrome). Ist der Blutdruck deutlich vermindert und führt so zu einer Minderperfusion der Organe, wird dieser Zustand als septischer Schock bezeichnet. Sind im Verlauf der Erkrankung schwere Schäden an Organsystemen wie etwa Lunge, Herz oder Niere entstanden, wird dieses Stadium MODS (multiple organ dysfunction syndrome) genannt.⁶ Pathophysiologisch findet man als Ursache einer Sepsis meist eine lokale Infektion. Bakterien oder

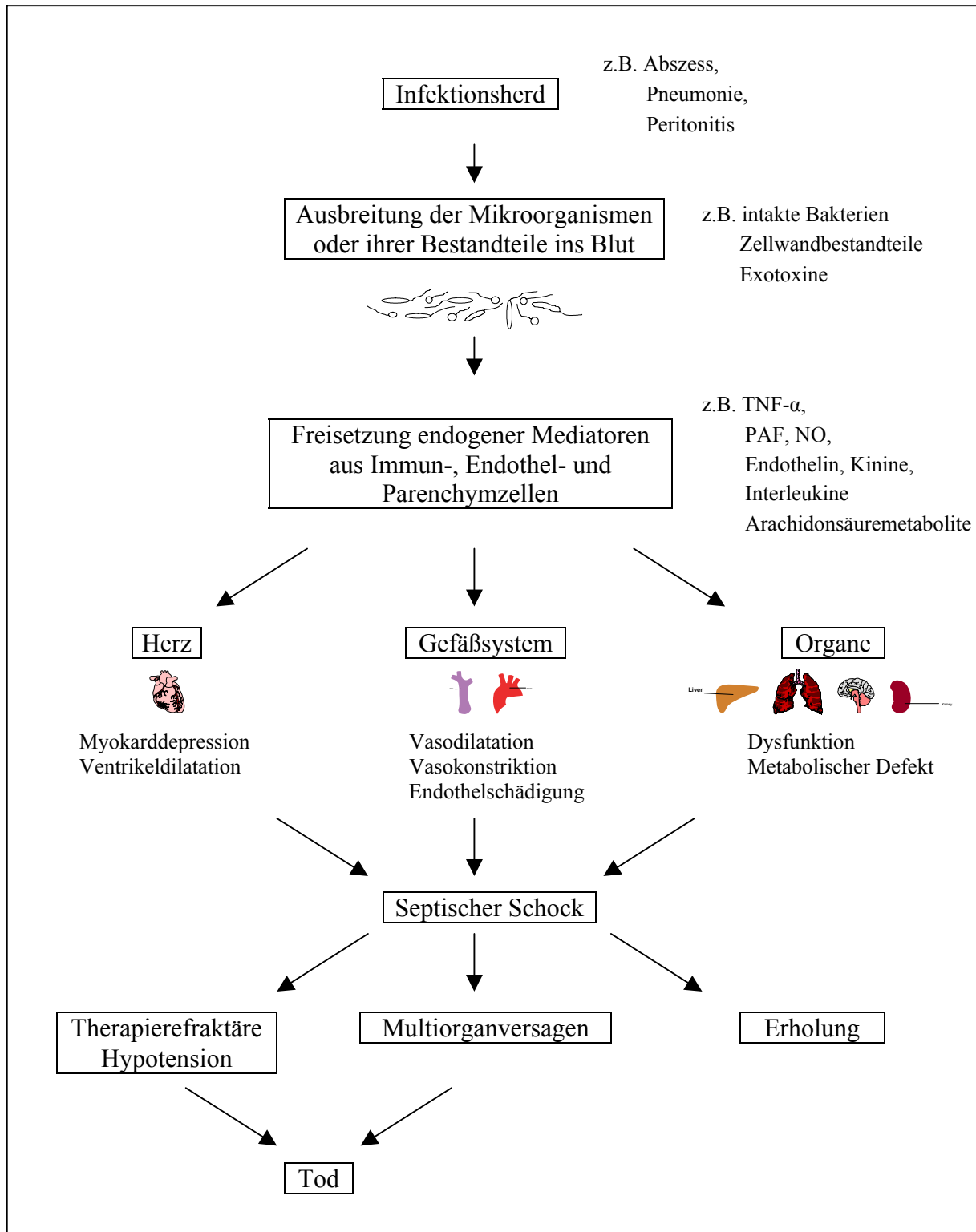


Abb.1 Pathogenese von Sepsis und septischem Schock

Von einem Infektionsherd ausgehend gelangen Erreger oder ihre Toxine in den Blutkreislauf. Unter Freisetzung endogener Mediatoren kommt es zu Beeinträchtigungen verschiedener Organsysteme, welche zum septischen Schock und letztendlich zum Tod führen können.

Modifiziert nach ⁷

Pilze können von diesem lokalen Geschehen aus direkt in den Blutkreislauf gelangen. Die Mikroorganismen können aber auch auf den Ort der Infektion begrenzt bleiben und von dort aus Toxine an das Blut abgeben. Solche Substanzen können Bakterienbestandteile wie Lipopolysaccharide oder Lipoteichonsäuren sowie sezernierte Exotoxine wie α -Toxin sein. Diese Stoffe können nun zu einer überschüssigen Aktivierung des Immunsystems führen. Sowohl humorale Komponenten wie Gerinnungs-, Komplementsystem und Antikörper, als auch zelluläre Effektoren des Immunsystems werden aktiviert. Diese zellulären Effektoren sind unter anderem Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und Endothelzellen, welche wiederum eine Vielzahl von Zytokinen mit unterschiedlichen Wirkungen ausschütten. Diese Zytokine haben eine starke physiologische Wirkung auf verschiedene Organsysteme und können durch Störungen der Makro- und Mikrozirkulation schwere Organschäden bewirken, die tödlichen Ausgang haben können.⁷

2.2 Das kardiovaskuläre System in der Sepsis und im septischen Schock

Der Schädigung des Herzens im septischen Krankheitsverlauf wurde oftmals nur eine geringe Bedeutung zugemessen, da die Pumpfunktionswerte des erkrankten Herzens im Vergleich zum gesunden ähnlich oder sogar leicht erhöht waren. Der Blutdruck ist während der Sepsis nicht selten stark erniedrigt, was auf eine Gefäßschädigung mit folgender Vasodilatation von Arterien und Venen zurückzuführen ist, so dass der systemische Gefäßwiderstand auf bis zu 30 % der Norm abfallen kann. Durch einen Verlust an Plasmaflüssigkeit kommt es zusätzlich zu einer Hypovolämie.

Um eine weiterhin ausreichende Durchblutung der Gewebe sicherzustellen, ist eine Erhöhung des Blutdrucks erforderlich. Da die Gefäßregulation in der Sepsis gestört ist, kann die Blutdruckerhöhung nur durch eine Steigerung des Herzzeitvolumens (HZV) erreicht werden. Das HZV muss um so höher ansteigen, je tiefer der Gefäßwiderstand abfällt. In einem bestimmten Bereich ist das zunächst möglich. Das HZV und andere Herzfunktionsparameter liegen dabei höher als bei Patienten mit normalem systemischen Gefäßwiderstand. Um jedoch bei einem stark erniedrigten systemischen Gefäßwiderstand, wie er in der Sepsis möglich ist, eine ausreichende periphere Durchblutung zu ermöglichen, müsste dazu das HZV auf das drei- bis vierfache gesteigert werden. Dies ist beim Gesunden mit einer vergleichbaren Erniedrigung des Gefäßwiderstandes durchaus möglich, in der Sepsis kann dies jedoch nicht immer erreicht werden.

Die Pumpfunktionsparameter des septischen Herzens sind auf den ersten Blick denen gesunder Patienten ähnlich, daher wurde eine mögliche Pumpfunktionsstörung im Verlauf des septischen Schocks früher für unwahrscheinlich gehalten. Berücksichtigt man jedoch, dass bei einem stark erniedrigten systemischen Gefäßwiderstand die Herzfunktionswerte deutlich erhöht sein müssten, so wird deutlich, dass das von der Sepsis beeinträchtigte Herz die erforderliche Funktion nicht mehr erbringen kann.^{7,8} Diese Herz-Funktionsstörung im Rahmen der Sepsis wird im deutschen Sprachgebrauch auch als 'akute septische Kardiomyopathie' bezeichnet.⁹

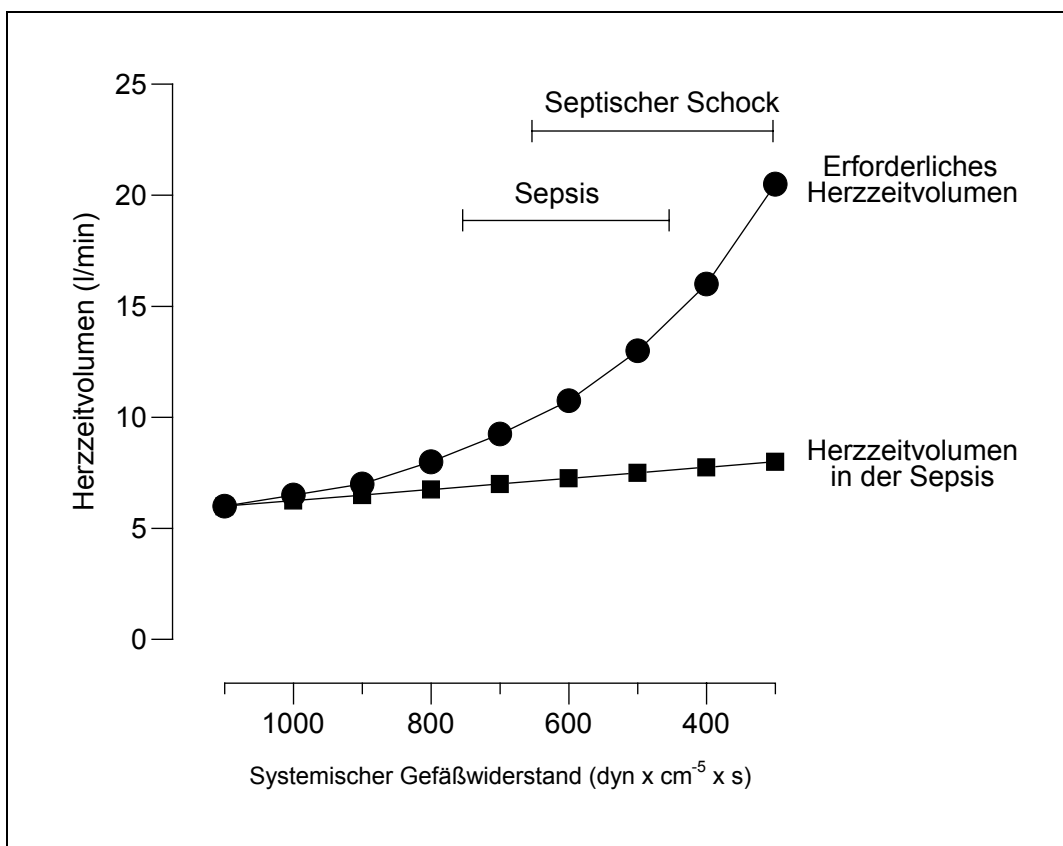


Abb. 2 Funktionsstörung des Herzens in der Sepsis

In der Sepsis kommt es zu einem zunehmenden Abfall des Gefäßwiderstandes. Um dabei einen adäquaten arteriellen Mitteldruck aufrecht erhalten zu können, wäre eine deutliche Steigerung des Herzzeitvolumen erforderlich (-●-), welche von einem gesunden Herz auch erbracht werden kann. Das Herz von Patienten mit septischer Erkrankung (-■-) kann dies jedoch häufig ohne supportive Therapie nicht erbringen. Modifiziert nach ⁸

2.3 Akute septische Kardiomyopathie

2.3.1 Klinisches Erscheinungsbild

Die akute septische Kardiomyopathie und ein daraus resultierendes Pumpversagen sind für etwa 10 % aller Todesfälle in der Sepsis verantwortlich.¹⁰ Klinisch zeigt sich eine im Verhältnis zum verminderten systemischen Gefäßwiderstand nur inadäquate Erhöhung der Pumpfunktion, welche durch erniedrigte links- und rechtsventrikuläre Auswurffractionen (ejection fraction, EF) charakterisiert wird. Die Ventrikel haben eine erhöhte Compliance und sind häufig dilatiert.¹¹ Es zeigen sich sowohl Störungen bei der Kontraktion als auch bei der Relaxation, diese können sowohl global als auch nur regional zu finden sein.¹² Die Koronargefäße sind weit gestellt und spiegeln damit die bei Sepsis vorherrschenden Verhältnisse des gesamten Gefäßbettes wider.^{13,14} Die Durchblutung des Herzens erscheint also zumindest auf Ebene der Makrozirkulation normal. Ein hypoxischer Schaden durch Minderperfusion bei schwerem Schock kann allerdings die Herzfunktion zusätzlich verschlechtern.⁸ Eine septische Herzschädigung scheint nicht vermehrt zu Arrhythmien zu führen, eher ist die Variabilität der Herzfrequenz eingeschränkt.¹⁵ Histologisch lassen sich nur selten pathomorphologische Korrelate der klinisch festgestellten akuten septischen Kardiomyopathie feststellen, meist sind die Veränderungen auf makroskopischer, histologischer und ultrastruktureller Ebene unspezifisch.¹⁶

Eine akute septische Kardiomyopathie beginnt meist in den ersten Tagen nach Beginn der Sepsis. Wird die Erkrankung überlebt, so heilt sie innerhalb von sieben bis zwölf Tagen folgenlos ab, hierin unterscheidet sie sich von anderen Formen der Herzinsuffizienz.^{17,18} Die Therapie der akuten septischen Kardiomyopathie ähnelt jener bei der Sepsis und besteht in erster Linie aus der Behandlung der Grunderkrankung. Die erforderliche Behandlung besteht aus der Sanierung eines vorhandenen Infektionsherdes und der antibiotischen Bekämpfung der Erreger. Darüber hinaus muss versucht werden, den bedrohlichen Blutdruckabfall durch eine ausreichende Gabe von Volumen und positiv inotroper und vasoaktiver Substanzen aufrecht zu erhalten.

Neben dieser überwiegend symptomatischen Behandlung werden auch vermehrt kausale Therapieansätze erprobt, welche früh in das Entzündungsgeschehen einzugreifen versuchen. Die Ergebnisse unter Verwendung von beispielsweise TNF- α -Antikörpern¹⁹ oder Ibuprofen²⁰ sind jedoch nicht überzeugend, was vermutlich daran liegt, dass die komplexen pathophysiologischen Vorgänge noch nicht ausreichend aufgeklärt sind.²¹

2.3.2 Pathogenese der akuten septischen Kardiomyopathie

Die pathophysiologischen Mechanismen bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz im septischen Schock sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedene Ansätze werden zur Erklärung herangezogen. Eine Störung der myokardialen Durchblutung auf Ebene der Mikrozirkulation wird ebenso vermutet, wie das Vorhandensein von negativ inotrop wirkenden Substanzen, im Englischen als 'myocardial depressant substances' (MDS) bezeichnet. Andere Mechanismen wie die Schädigung des Herzens durch aktivierte Monozyten²² oder durch Sauerstoffradikale^{23,24} oder Peroxynitrit²⁵ könnten ebenfalls zur Entstehung der septischen Kardiomyopathie beitragen. Es ist wahrscheinlich, dass nicht nur ein Mechanismus allein, sondern mehrere gemeinsam für die Schwächung des Herzens in der Sepsis verantwortlich sind. Im folgenden soll auf die 'myocardial depressant substances' sowie auf die Störungen der myokardialen Perfusion näher eingegangen werden.

2.3.3 TNF- α als Pathogenitätsfaktor der septischen Kardiomyopathie

Die Vermutung, dass im Blut von Patienten mit hämorrhagischem Schock Substanzen vorhanden sind, welche die Pumpfunktion des Herzens beeinträchtigen, wurde erstmals 1947 von Wiggers formuliert.²⁶ Im Jahre 1966 wurde durch Brand und Lefer die Existenz einer solchen Substanz aus dem Blut von Katzen im hämorrhagischen Schock nachgewiesen.²⁷ In mehreren Studien wurde aufgezeigt, dass durch die Gabe von Serum septischer Patienten an Ganztiermodellen oder an isolierten Kardiomyozyten eine myokardiale Schwächung ausgelöst werden konnte.^{28,29,30} Obwohl im septischen Schock eine Vielzahl von Zytokinen im Blut nachzuweisen sind, welche zu einer Beeinträchtigung des Herzens führen können, konnten Parrillo et al. TNF- α und IL-1 β als Hauptauslöser der septischen Kardiomyopathie identifizieren.³¹

Das proinflammatorische Zytokin TNF- α ist in zahlreichen Entzündungsvorgängen beteiligt und spielt auch bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen wie beispielsweise Herzinfarkt,³² chronischer Herzinsuffizienz,^{33,34} Myokarditis³⁵ oder eben septischer Herzinsuffizienz³¹ eine wichtige Rolle.³⁶ Auf einen zirkulierenden pathogenen Reiz, wie beispielsweise durch Endotoxin, lassen sich erhöhte Serumspiegel von TNF- α und auch IL-1 β in Mensch und Tier nachweisen.^{37,38} Dabei konnte nachgewiesen werden, dass TNF- α nicht nur systemisch, sondern auch vom Myokard selbst gebildet werden kann.^{39,40}

Ein Nachweis der kardiodepressiven Potenz von TNF- α zeigt sich auch darin, dass bei Applikation von TNF- α sowohl im Tiermodell^{41,42} als auch beim Menschen⁴³ ein der septischen Kardiomyopathie ähnliches Krankheitsbild ausgelöst werden kann. Die durch TNF- α verursachte Kardiodepression wird dabei über TNF- α -Rezeptoren vermittelt, welche unter anderem auch im Herzen nachgewiesen werden konnten. Zeitlich gesehen zeigt die durch TNF- α vermittelte kardiodepressive Wirkung am Herzen einen biphasischen Verlauf. So ist bei einer nach wenigen Minuten einsetzenden Kontraktilitätsabnahme sowie einer Störung der Pumpfunktion, welche sich nach mehreren Stunden manifestiert, von zwei unterschiedlichen pathogenetischen Mechanismen auszugehen.⁴⁴

Dabei scheint die durch TNF- α verursachte frühe Kontraktilitätsstörung, durch Sphingosin vermittelt zu sein, welches bereits nach wenigen Minuten in großen Mengen in TNF- α -stimulierten Kardiomyozyten produziert wird und über weitere Reaktionen zu einer Verringerung der Calciumfreisetzung in der Zelle führt. Eine Störung des intrazellulären Calciumhaushaltes führt letztendlich zu einer Störung der myokardialen Kontraktilität, da der Calcium-Haushalt im Kardiomyozyten für den physiologischen Kontraktions-Relaxations-Zyklus eine entscheidende Rolle spielt.⁴⁵ Dabei bewirkt TNF- α über eine Aktivitätssteigerung der Sphingomyelinase eine gesteigerte Umwandlung von Sphingomyelin zu Ceramid, welches wiederum zu Sphingosin verstoffwechselt wird und direkt die intrazelluläre Calciumfreisetzung hemmt. Eine solche durch Sphingosin vermittelte frühe Kardiodepression durch TNF- α konnte sowohl am Kardiomyozyten⁴⁶ als auch am isoliert perfundierten Rattenherzen⁴⁷ nachgewiesen werden. Durch eine Hemmung der Umwandlung von Ceramid zu Sphingosin mit einem spezifischen Inhibitor der Ceramidase konnten die durch TNF- α ausgelösten negativ inotropen Effekte auf das Herz fast komplett aufgehoben werden.^{46,48}

Neben der Sphingosin-vermittelten frühen Störung der Calciumhomöostase führt TNF- α durch eine vermehrte Produktion von NO zu einer Störung der myokardialen Kontraktilität. TNF- α kann am Herzen sowohl die konstitutionelle^{49,50} als auch die induzierbare^{51,52} NO-Synthase (cNOS und iNOS) stimulieren. Das entstehende NO führt neben einer Einwirkung auf die koronaren Gefäße am Kardiomyozyten zu einer Stimulation der Guanylatcyclyase. Die Erhöhung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) führt dabei durch eine Desensibilisierung der Myofilamente gegenüber Calcium ebenso wie Sphingosin zu einer Störung der intrazellulären Calciumhomöostase. Die durch NO vermittelten intrazellulären Störungen des Calcium-Haushaltes scheinen dabei erst nach einer längeren Einwirkung von TNF- α auf das Herz zu Störungen der Kontraktilität zu führen, da für die Expression der iNOS mit der darauf folgenden Produktion von NO mehrere Stunden benötigt werden.⁴⁶ Da jedoch auch bereits

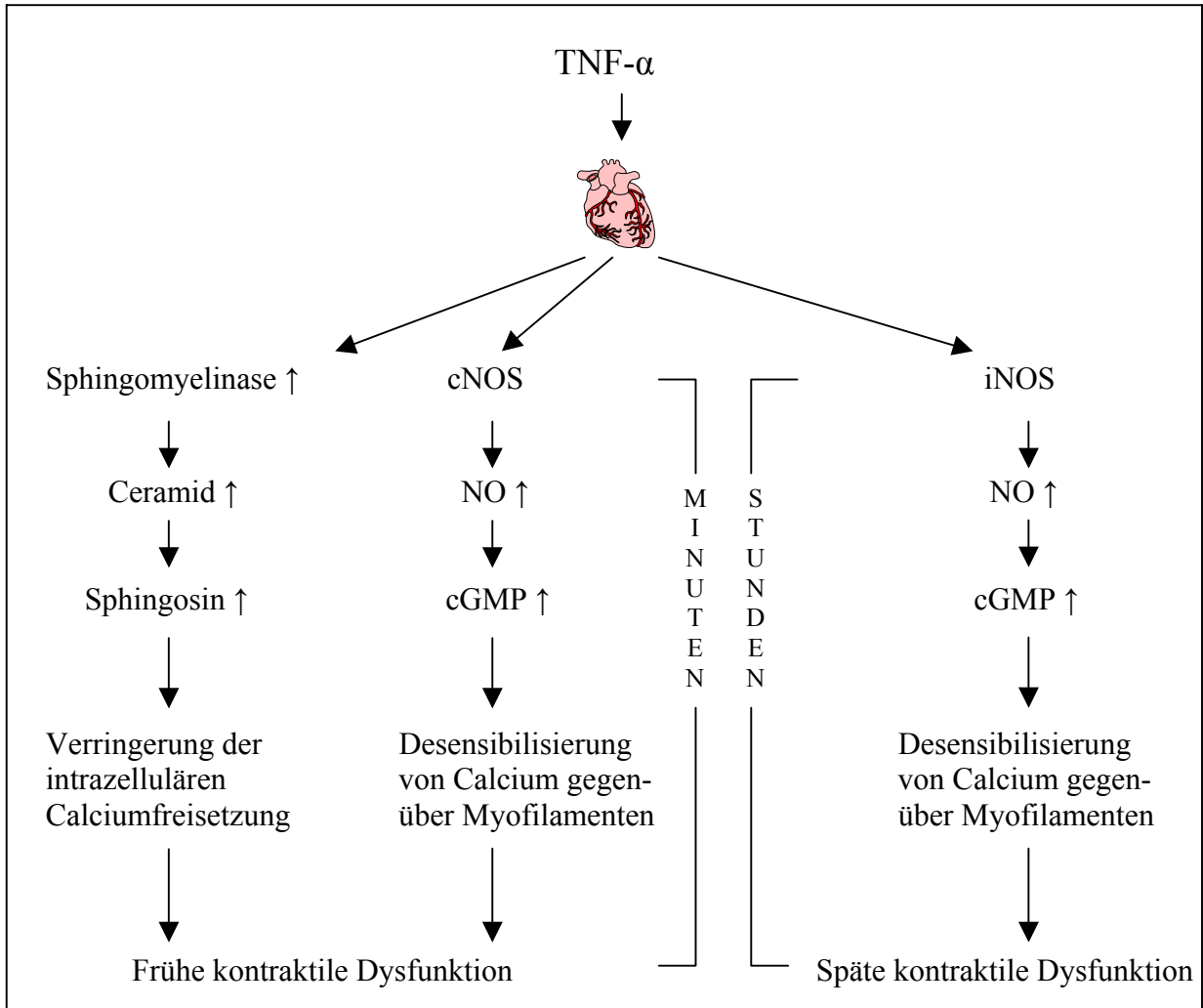


Abb. 3 Mechanismen der negativ inotropen Wirkung von TNF- α auf das Herz

TNF- α bewirkt am Herzen über eine Beeinflussung der Calciumhomöostase eine Störung der Kontraktilität. Eine nach Minuten beginnende Beeinträchtigung des Herzens wird durch verstärkte Aktivität der Sphingomyelinase oder der konstitutionellen NO-Synthase ausgelöst. Eine gesteigerte Produktion von NO durch die induzierbare NO-Synthase ist für eine mit Latenzzeit von Stunden ausgelöste Kontraktilitätsstörung durch TNF- α verantwortlich. Die durch NO vermittelte kardiodepressive Wirkung kann durch verschiedene Mechanismen wie beispielsweise durch verstärkte Bildung von cGMP oder Peroxynitrit hervorgerufen werden. In der Abbildung ist die negativ inotrope Wirkung von NO exemplarisch durch eine gesteigerte Produktion von cGMP dargestellt.

nach wenigen Minuten eine durch gesteigerte NO-Produktion verursachte Kontraktilitätsstörung beobachtet werden kann, scheint auch eine frühe, cNOS-induzierte Kardiodepression bei der Entstehung der akuten septischen Kardiomyopathie eine Rolle zu spielen.^{49,50}

Sowohl durch NO-abhängige als auch NO-unabhängige Beeinflussung der Kardiomyozyten wird die Kontraktilitätsstörung des Herzens durch TNF- α in der Sepsis ausgelöst. Durch die Applikation von TNF- α und IL-1 β in Ganztiermodellen,^{53,54} am isolierten Herzen⁴⁷ oder in Kardiomyozyten^{50,55} konnte eine kontraktile Störung, wie sie im septischen Schock zu beobachten ist, provoziert werden. Dabei wirken beide Zytokine auch allein, bei gemeinsamer Verabreichung verstärkt sich der negativ inotrope Effekt im Sinne eines Synergismus.^{56,57} Durch die Gabe eines monoklonalen Antikörpers gegen TNF- α oder IL-1 β kann die Herzschwäche vermindert oder gar aufgehoben werden.^{31,58}

In klinischen Studien mit monoklonalen Antikörpern konnten diese positiven Effekte jedoch nicht zufriedenstellend erreicht werden, was vermutlich daran liegt, dass TNF- α und IL-1 β bei weitem nicht die einzigen Faktoren sind, welche in der Sepsis das Herz beeinträchtigen.

2.3.4 Störungen der myokardialen Zirkulation

Neben Substanzen, welche in der Sepsis direkt die Funktion des Herzens beeinflussen, scheint auch eine veränderte Durchblutung des Herzens zu einer Beeinträchtigung der Pumpleistung zu führen.

Beim gesunden Menschen ist das Verhältnis von Sauerstoffbedarf und -angebot im Gleichgewicht. Bei vermehrtem Bedarf kann durch Gefäßerweiterung der Blutfluss gesteigert, oder direkt vom Gewebe die Sauerstoffausschöpfung des Blutes erhöht werden. Beim septischen Patienten sind diese Mechanismen beeinträchtigt.^{59,60} Auch wenn die Makrozirkulation noch normal ist, können bereits Störungen auf der Ebene der Mikrozirkulation, also in Arteriolen, Kapillaren und Venolen, vorhanden sein und zu einer Schädigung des Gewebes führen.

Die Ursache dieser Mikrozirkulationsstörungen liegt in einer in der Sepsis vermehrten systemischen und auch lokalen Ausschüttung vasoaktiver Mediatoren, einer Aktivierung von Blutzellen, wie Leukozyten oder Thrombozyten und einer Veränderung des Gefäßendothels. Das Gefäßendothel ist in der Sepsis angeschwollen und verringert den Gefäßdurchmesser. Durch ein Ungleichgewicht von Vasokonstriktion (durch Thromboxan A₂, Leukotriene, Endotheline, u.a.) und Vasodilatation (durch Prostacyclin, NO, u.a.) entsteht eine Störung der vaskulären Autoregulation, so dass beispielsweise nicht adäquat auf einen regionalen Sauer-

stoffmangel reagiert werden kann.^{61,62} Dies führt zu einer Störung der Sauerstoffversorgung des Gewebes. Diese ist jedoch nicht im gesamten Gewebe vorhanden. Neben minderdurchbluteten, vasokonstriktorisches Arealen finden sich auch Gebiete, in denen durch eine Vasodilatation ein erhöhter Blutfluss vorhanden ist. Dies führt zu Inhomogenitäten der Perfusion und des Sauerstoffangebotes.

Neben einer Verminderung des Gefäßwiderstandes kommt es in der Sepsis in vielen Organen zu einer Shuntperfusion. Das Blut fließt dabei direkt von der Arteriole in die Venole, ohne dabei die Kapillarstrombahn zu passieren und das Gewebe zu oxygenieren. So kann auch bei erhöhtem regionalen Blutfluss eine Störung der Sauerstoffversorgung auf Ebene der Mikrozirkulation vorliegen. Solche Gefäß-Kurzschlüsse sind beispielsweise in der Sepsis am Skelettmuskel und der Lunge beschrieben worden.⁶³ Dabei wird auch durch Erhöhung des Sauerstoffangebotes keine gesteigerte Sauerstoffverwertung in der Peripherie beobachtet.⁶⁴ Dies deutet darauf hin, dass dem lokalen Sauerstoffmangel neben einem zellulären Defekt in der Sauerstoffverwertung eine Fehlverteilung der regionalen Durchblutung zugrunde liegen kann.⁶⁵

Am Herzen wurde zunächst vermutet, dass eine globale Störung der Durchblutung die Ursache der septischen Kardiomyopathie ist.^{66,67,68} Diese Vermutung wurde durch die Messung des koronaren Blutflusses bei Patienten im akuten septischen Schock widerlegt. Anhand der Thermodilutionsmethode konnten am Sinus coronarius normale oder sogar erhöhte Flussraten gemessen werden, auch bei Patienten mit bereits beeinträchtigter Pumpfunktion.^{13,14} Eine globale Verminderung der Herzdurchblutung konnte somit als Ursache der septischen Herzinsuffizienz ausgeschlossen werden. Diese Beobachtung konnte von Lee et al. an endotoxinämischen Schweinen nachvollzogen werden. So wurde eine Pumpfunktionsstörung des Herzens nicht durch einen verminderten koronaren Blutfluss verursacht, das Myokard war sogar eher überperfundiert.⁶⁹ In Untersuchungen an Patienten im septischen Schock wurde die Sauerstoffextraktion des Herzens gemessen. Es zeigte sich, dass der koronare Blutfluss zwar erhöht, der Gefäßwiderstand und die Sauerstoffausschöpfung des Gewebes jedoch erniedrigt waren. Eine globale Minderperfusion des Herzens konnte somit ausgeschlossen werden, es fanden sich damit aber solche Durchblutungsverhältnisse, die für Störungen der Mikrozirkulation typisch sind.^{13,14}

Beeinträchtigungen verschiedener Organe in der Sepsis wurden auf Mikrozirkulationsstörungen zurückgeführt. So wurde unter anderem in der Lunge,^{70,71,72} dem Darm,^{73,74,75} oder in der Leber^{76,77} eine Störung der Durchblutung mit begleitender Funktionsstörung in der Sepsis nachgewiesen.

In tierexperimentellen Untersuchungen des Herzens zeigen sich ähnliche Verhältnisse. Groeneveld et al. untersuchten an Hunden im Endotoxin-Schock mittels radioaktiv markierter Mikrosphären die Durchblutung des Herzens. Neben einer Störung der Pumpfunktion wurde ein unveränderter myokardialer Blutfluss bei heterogener Verteilung in den Gefäßen beobachtet, es zeigte sich ein Nebeneinander von überperfundierten und minderperfundierten Bereichen. Diese Fehlverteilung des Blutflusses wurde durch eine Störung der Gefäßregulation erklärt und führte in den minderversorgten Arealen zu einer fokalen Ischämie, die als Ursache der beobachteten Pumpschwäche vermutet wurde.⁷⁸

Bei der Perfusion isolierter Rattenherzen beobachteten Avontuur et al. eine Erhöhung des koronaren Blutflusses und des myokardialen Sauerstoffverbrauchs. Wurde der koronare Blutfluss durch Hemmung der NO-Bildung oder durch die Applikation von Vasokonstriktoren reduziert, so führte dies nur an mit Endotoxin perfundierten Herzen, nicht jedoch an Kontrollherzen zu fokalen Myokardischämien. Die Kontrollherzen konnten ausreichend die artifizielle Vasokonstriktion kompensieren, die mit Endotoxin behandelten nicht, da bei ihnen vermutlich eine gestörte Vasomotion vorlag.⁷⁹ Dass eine Beeinträchtigung der myokardialen Perfusion zu einer Funktionsstörung des Herzens in der Sepsis führen kann, zeigten auch Grandel et al. Am isolierten Rattenherz wurde beobachtet, dass eine durch NO-vermittelte Vasodilatation einer durch *Staphylococcus aureus* α -Toxin hervorgerufenen Vasokonstriktion mit begleitender Kontraktilitätsstörung des Herzens entgegenwirken kann.⁸⁰ Darüber hinaus scheint auch die Sauerstoffverwertung in der Sepsis gestört zu sein. Fox et al. zeigten, dass septische Schafherzen nur unzureichend auf ein vermindertes Sauerstoffangebot reagieren können. Im Gegensatz zu gesunden Schafen konnten die septischen auf eine künstlich erzeugte Anämie nicht mit einer notwendigen Erhöhung der Sauerstoffextraktion aus dem Blut reagieren.⁸¹ Bloos et al. konnten - ebenfalls an Schafen - ähnliche Beobachtungen machen. Die gesunden Schafe konnten bei künstlich erzeugter Hypoxie ihre koronare Durchblutung um das dreifache steigern und somit das myokardiale Sauerstoffangebot erhöhen. Die septischen Schafe jedoch zeigten keine Erhöhung des Blutflusses und der Sauerstoffextraktion und konnten somit nicht adäquat auf die Hypoxie reagieren.⁸²

Histologische Befunde bei einer eingetretenen Organstörung in der Sepsis scheinen die experimentell erzeugten Beobachtungen zu bestätigen. Das durch Sepsis geschädigte Myokard zeigte ein interstitielles und auch intrazelluläres Ödem. Darüber hinaus fand sich eine Zerstörung der Mitochondrien sowie läppchenweise Zellnekrosen. Fibrinthromben, die sonst in der Sepsis häufig gefunden werden, konnten nicht entdeckt werden.⁸³ Das vorhandene histologi-

sche Bild könnte durch eine Mikrozirkulationsstörung des Herzens und daraus resultierender fokaler Ischämie einzelner Bereiche erklärt werden.

Die genannten Studien zeigen einen offensichtlichen Zusammenhang zwischen einer Funktionsbeeinträchtigung und einer Störung der Mikrozirkulation des Herzens. Da zahlreiche Mediatoren die Blutzirkulation in der Sepsis beeinflussen können, wird auf diese im folgenden näher eingegangen.

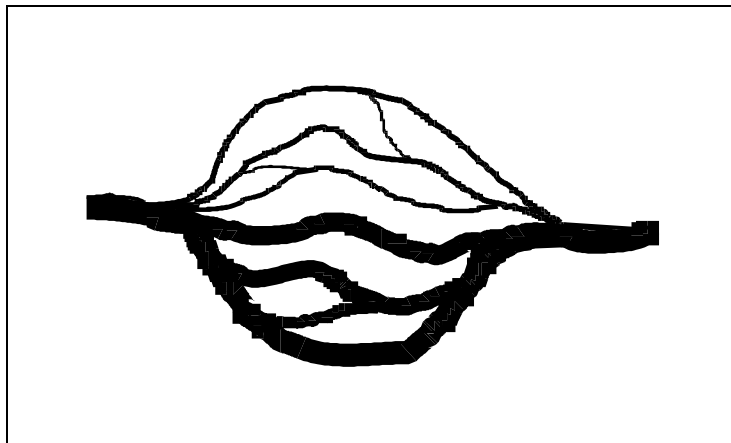


Abb. 4 Schematische Darstellung von Mikrozirkulationsstörungen in der Sepsis

Mikrozirkulationsstörungen können in der Sepsis zu einer Störung von Organfunktionen führen. Dabei kann es trotz normaler globaler Perfusion durch ein Nebeneinander von über- und unterperfundierten Arealen zu Organfunktionsstörungen kommen.

2.4 Vasoaktive Substanzen in der Sepsis

2.4.1 Plättchen-aktivierender-Faktor (PAF)

Der Plättchen-aktivierende-Faktor (PAF) ist ein Phospholipid, welches als inter- und intrazelluläres Signalmolekül an spezifische PAF-Rezeptoren bindet. PAF ist ein wichtiger Mediator in der Sepsis und führt unter anderem zu Thrombozytenaggregation, Degranulation von Granulozyten oder Bildung von Sauerstoffradikalen. Im septischen Schock wird PAF neben anderen Metaboliten als Verursacher von Organkomplikationen vermutet.^{84,85,86}

Da das Herz PAF produzieren kann, und auch PAF-Rezeptoren besitzt, kann PAF auch das kardiovaskuläre System beeinflussen. So bewirkt eine Applikation von PAF auf das isolierte

Rattenherz in hoher Dosierung eine Koronargefäßverengung,^{87,88} in niedrigen Dosierungen überwiegen eher koronardilatative Effekte.⁸⁹ In einigen Studien hatte PAF am isolierten Rattenherzen eine negativ inotrope Wirkung.⁸⁴ Die Pumpfunktionsstörung des Herzens in der Sepsis wird dabei durch PAF direkt auf die Kardiomyozyten oder durch eine Beeinflussung der Koronardurchblutung verursacht. Durch Gabe von spezifischen Antikörpern gegen PAF lässt sich die Herzfunktion bei Endotoxinämie verbessern.^{90,91} Die vasoaktiven Effekte von PAF scheinen durch Produkte der Lipoxygenase, partiell auch der Cyclooxygenase und Endothelin-1, bewirkt zu werden.^{92,93}

2.4.2 Endothelin

Das vorwiegend von Endothelzellen gebildete Peptid Endothelin-1 (ET-1) hat auf die glatte Gefäßmuskulatur eine äußerst starke vasokonstriktorische Wirkung. In seiner Wirkung auf das Herz wurden sowohl positive als auch negativ inotrope Effekte beschrieben.^{94,95,96,97} Wird ET-1 zum isolierten Herzen zugegeben, so zeigt sich eine koronare Vasokonstriktion, die sich durch eine inhomogene Verteilung auszeichnet.⁹⁸ Durch eine derartige Störung der koronaren Mikrozirkulation trägt Endothelin möglicherweise zu einer Kontraktilitätsstörung am septischen Herzen bei. Eventuell fördert auch Thromboxan A₂ die gefäßverengende Wirkung von ET-1. Gleichfalls führt ET-1, vermutlich als vasodilatative Gegenregulation, in den Koronargefäßen zur Ausschüttung von Prostacyclin.^{99,100} Der ET-1-Spiegel ist in der Sepsis häufig erhöht und ein Missverhältnis der beiden vasoaktiven Metaboliten ET-1 und NO scheint zu einer Beeinträchtigung des kardiovaskulären Systems beizutragen.¹⁰¹ Wurden Endothelinrezeptoren im septischen Schock durch Antagonisten blockiert, so konnte eine Besserung der Herzfunktion beobachtet werden.¹⁰²

2.4.3 Eicosanoide

Als Eicosanoide werden die oxygenierten Derivate der ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure (AA) bezeichnet. Arachidonsäure wird enzymatisch aus Phospholipiden der Zellmembran freigesetzt. Nach dem Enzym, welches den ersten Schritt der Oxygenierung ausführt, unterscheidet man Produkte der Lipoxygenase oder der Cyclooxygenase.

2.4.3.1 Lipoxygenase-Produkte

Durch die Einwirkung von verschiedenen Unterformen der Lipoxygenase entstehen die Leukotriene (LT) LTA_4 und LTB_4 sowie die Cysteinyl-Leukotriene LTC_4 , LTD_4 und LTE_4 . Die Leukotriene spielen bei entzündlichen Reaktionen und in der Sepsis eine wichtige Rolle. Sie bewirken unter anderem Chemotaxis, Vasokonstriktion, Bronchokonstriktion oder eine Erhöhung der endothelialen Permeabilität.^{103,104} Leukotriene werden unter anderem im Herzen von Leukozyten oder in Zellen der Gefäßmuskulatur¹⁰⁵ gebildet und führen in der koronaren Strombahn zu einer Vasokonstriktion.¹⁰⁶ Vermutlich bewirken die Leukotriene durch diese Beeinflussung der koronaren Durchblutung am Herzen eine Beeinträchtigung der Kontraktibilität.^{107,108,109} Eine durch Leukotriene verursachte Funktionsstörung des Herzens wurde auch im septischen Schock beobachtet.¹¹⁰

2.4.3.2 Cyclooxygenase-Produkte

Wird die Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase oxygeniert, so entstehen Prostanoiden. Dies sind unter anderem Prostaglandin I_2 (PGI_2 , Prostacyclin) und Thromboxan A_2 (TxA_2). Prostacyclin wird hauptsächlich von Endothelzellen freigesetzt und bewirkt an den Gefäßen eine Verminderung der endothelialen Permeabilität sowie eine Vasodilatation. Thromboxan A_2 ist eher gegensätzlich wirksam und führt zu einer Förderung der Thrombozytenaggregation, Bronchokonstriktion sowie an Gefäßen, auch an denen des Herzens, zu einer Erhöhung der endothelialen Permeabilität und zu Vasokonstriktion.^{111,112}

Die Cyclooxygenase existiert in zwei Isoformen: Zum einen gibt es die konstitutionelle Cyclooxygenase (COX-1), welche in den meisten Geweben in konstanter Anzahl vorhanden ist und auf physiologische Reize reagiert. Daneben existiert noch die erst vor kurzem entdeckte induzierbare Cyclooxygenase (COX-2). Sie wird durch verschiedene Reize wie Ischämie, Entzündung oder bei Sepsis induziert und in einer sehr hohen Anzahl produziert.¹¹³ Die COX-2 wurde bereits in verschiedenen Geweben nachgewiesen, auch im Herzen.^{114,115} In der Sepsis können Prostanoiden vermehrt im Plasma nachgewiesen werden. Dabei korreliert die Höhe des TxA_2 -Spiegels mit Schwere und Mortalität der Erkrankung, während Prostacyclin eine eher protektive Funktion zugesprochen wird.¹¹⁶

Eine durch Endotoxämie ausgelöste Funktionsstörung des Herzens konnte bei Schafen durch Thromboxan-Synthese-Hemmung gemindert werden.¹¹⁷ Am isolierten septischen Rat-

tenherzen werden sowohl TxA_2 als auch Prostacyclin ausgeschüttet, wobei die gefäßverengenden Wirkungen des TxA_2 die vasodilatativen Effekte des Prostacyclin auf die Koronargefäße übertreffen. So kann TxA_2 , vermutlich über vasokonstriktive Effekte auf die Koronargefäße, am isolierten septischen Rattenherz eine Abnahme der Kontraktilität bewirken.¹¹⁸ Daneben scheint TxA_2 auch eine Wirkung auf die Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ haben. So bewirkt eine bakterielle Stimulation des Herzens durch Induktion der COX-2 eine verstärkte Synthese von TxA_2 , welches vermutlich durch parakrine Förderung der $\text{TNF-}\alpha$ -Freisetzung zu einer myokardialen Kontraktilitätsstörung führt.¹¹⁹

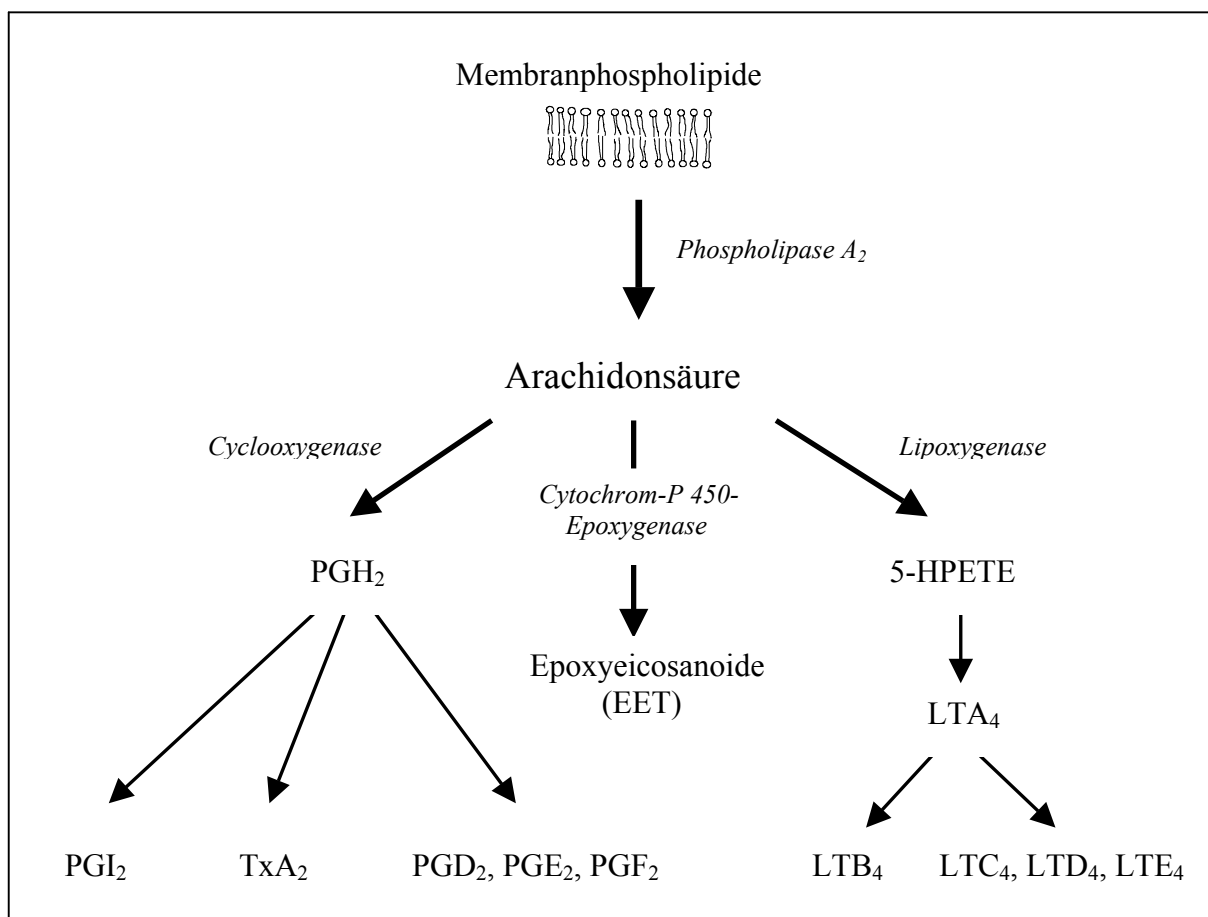


Abb.5 Synthese der Eicosanoide aus Arachidonsäure

Arachidonsäure wird enzymatisch aus Lipiden biologischer Membranen freigesetzt. Ist am ersten Oxidationsschritt die Cyclooxygenase beteiligt, so entstehen Thromboxane und Prostaglandine. Bei Oxidation durch die Lipoxygenase entstehen die verschiedenen Leukotriene. Epoxyeicosanoide entstehen, wenn die Arachidonsäure durch die Cytochrom-P450-Epoxygenase verstoffwechselt wird. Modifiziert nach¹²⁰

2.4.4 Stickstoffmonoxid (NO)

Dem starken Vasodilatator Stickstoffmonoxid (NO) kommt bei der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie besondere Bedeutung zu, da es nicht nur die Koronargefäße und somit die Durchblutung des Herzens beeinflusst, sondern weil es auch an der durch Zytokine verursachten Kontraktilitätsstörung des Herzens direkt beteiligt ist.

NO wird durch die NO-Synthase (NOS) aus L-Arginin gebildet. Es existieren zwei Isoformen der NO-Synthase, die konstitutionelle NO-Synthase (cNOS, NOS III) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS II). Die cNOS befindet sich hauptsächlich in Endothelzellen und sorgt Calcium-abhängig für eine relativ konstante NO-Produktion. NO bewirkt im Gefäßmuskel intrazellulär einen Anstieg von cGMP, was zu einer Relaxation der Muskelzelle und in der Folge zur Vasodilatation führt.¹²¹ Die auch im Kardiomyozyten vorkommende iNOS wird durch proinflammatorische Stimuli wie Zytokine oder LPS verstärkt synthetisiert und führt zu einer massiven Bildung von NO: Durch die in der Sepsis häufig beobachtete starke NO-Produktion kommt es zu einer Störung der Gefäßregulation bis hin zum septischen Schock.

In zahlreichen Studien wurde von NO im Rahmen der Sepsis neben einer Beeinflussung der koronaren Durchblutung auch ein negativ inotroper Effekt von NO auf das Herz beschrieben.^{52,122} Die Funktionsstörung des Herzens in der Sepsis, welche durch die Zytokine TNF- α und IL-1 mitverursacht ist, wird dabei entweder über die Einwirkung der Sphingomyelinase oder aber direkt durch eine verstärkte Hochregulation der iNOS mit folgender verstärkter Ausschüttung von NO vermittelt.^{50,51}

NO scheint auf das Herz jedoch nicht nur negative Effekte zu haben. Avontuur et al. beobachteten, dass eine Hemmung der NOS in endotoxinämischen Ratten zu fokalen Minderperfusionen und Kontraktilitätsstörungen des Herzens führte.⁷⁹ Grandel et al. zeigten, dass eine durch *Staphylococcus aureus* α -Toxin verursachte Vasokonstriktion und Funktionsstörung des Herzens durch NO antagonisiert wird.⁸⁰

Obwohl durch Hemmung der NO-Synthese auch Verbesserungen der Herzfunktion beobachtet werden konnten, wird deutlich, dass NO nicht nur für eine Beeinträchtigung der Herzfunktion in der Sepsis verantwortlich gemacht werden kann.

2.5 Bakterielle Pathogenitätsfaktoren in der Sepsis

Eine Sepsis kann als Folge einer Infektion von zahlreichen Mikroorganismen entstehen. Zwar werden die meisten Fälle durch gramnegative oder grampositive Bakterien verursacht, doch sind auch andere Erreger wie Anaerobier, Pilze, Einzeller, Viren oder Mykobakterien in der Lage, dieses Krankheitsbild auszulösen. Dabei scheinen die Mikroorganismen nicht zu erregerspezifischen Krankheitsbildern zu führen, es zeigt sich vielmehr, dass der Organismus auf unterschiedliche Erreger mit gleichartigen Krankheitssymptomen reagiert.^{123,124}

Um ein septisches Krankheitsbild auszulösen, müssen die Bakterien jedoch nicht intakt sein, sondern auch durch von Bakterien sezernierte Toxine oder gar durch Bestandteile der Bakterienwand kann eine Sepsis mit folgender Organfunktionsstörung ausgelöst werden. Je nach Aufbau der Bakterienzellwand kann in grampositive und gramnegative Bakterien unterschieden werden. Dabei wird neuerdings vermutet, dass grampositive und gramnegative Erreger zu unterschiedlichen Krankheitsausprägungen führen, was vermutlich durch voneinander verschiedene Pathogenitätsfaktoren verursacht wird, welche jedoch noch nicht ausreichend ergründet wurden.¹²⁵

2.5.1 Bakterielle Exotoxine

Zahlreiche Bakterien, grampositive und gramnegative, sind in der Lage, für den Menschen pathogene Toxine zu bilden und abzugeben. Beispiele dafür sind das Listeriolysin von *Listeria monocytogenes*, das Hämolysin von *Escherichia coli*, das Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa* oder das α -Toxin von *Staphylococcus aureus*. Auf Zellen des Immunsystems üben sie einen intensiven Reiz aus und bewirken an ihnen eine starke Aktivierung mit einer Ausschüttung von proinflammatorischen Stimuli. Ihre Wirkung auf unterschiedliche Organsysteme entfalten sie, indem sie direkt in die Zellen eindringen und dort zu einer Störung des Zellstoffwechsels führen, oder indem sie von außerhalb auf die Zellmembran einwirken und diese schädigen.¹²⁶ Die sezernierten Exotoxine sind also auch in Abwesenheit von intakten Bakterien in der Lage, zu einer Sepsis oder gar einem septischen Schock mit begleitender Organstörung zu führen.

Für die einzelnen genannten Exotoxine Listeriolysin, Hämolysin, Exotoxin A und α -Toxin sind darüber hinaus auf Kardiomyozyten oder am isolierten Herzen ausgeprägte kardiodepres-

sive Effekte beschrieben worden.^{109,118,127,128} Die genauen pathogenetischen Vorgänge sind noch Gegenstand der aktuellen Forschung, und obwohl bereits verschiedene Erklärungsansätze vorliegen, ist die Pathogenese der septischen Kontraktilitätsstörung durch bakterielle Exotoxine bis heute noch nicht abschließend aufgeklärt.

2.5.2 Bakterielles Endotoxin

Neben intakten Bakterien oder bakteriellen Exotoxinen können auch einzelne Bestandteile der Bakterienzellwand septische Krankheitsbilder auslösen. In grampositiven Bakterien besteht die Wand unter anderem aus Peptidoglykanen (PepG) und Lipoteichonsäuren (LTA), bei gramnegativen Bakterien aus Lipopolysacchariden (LPS), welche auch als Endotoxin bezeichnet werden.

Paradoxerweise kommt es in der Sepsis mitunter bei Einleitung der Antibiotikatherapie zu einer zusätzlichen Gefährdung des Patienten durch pathogene Zellwandbestandteile, die von zerfallenden Bakterien freigesetzt werden und schwere immunologische Reaktionen hervorrufen können.¹²⁹ Aber auch durch die physiologischen zellulären und humoralen Abwehrmechanismen kann bei Zerstörung der pathogenen Mikroorganismen eine starke Freisetzung von Endotoxin oder anderer Zellwandbestandteile wie LTA auftreten.¹³⁰

Das Endotoxin gramnegativer Bakterien ist ein thermolabiles, in der Zellwand verankertes Antigen, welches der bekannteste und am besten untersuchte Auslöser von septischen Reaktionen im Gesamtorganismus, an isolierten Organen oder an Zellen ist. Patienten mit gramnegativer Sepsis zeigen häufig eine Erhöhung des Plasma-Endotoxinspiegels. Die im Blut gemessenen Endotoxinspiegel korrelieren dabei allerdings nicht mit der Schwere des Krankheitsbildes. Es müssen also neben dem Endotoxin noch andere Pathogenitätsfaktoren vorhanden sein, welche den Krankheitsverlauf zusätzlich negativ beeinflussen.¹³¹

Durch die Applikation von Endotoxin an Hunde oder gesunde Menschen konnten die in der Sepsis zu beobachtenden kardiovaskulären Veränderungen wie Hypotension oder myokardiale Kontraktilitätsstörung provoziert werden.^{132,133} Auch an Kardiomyozyten und an isolierten Herzen sind die durch Endotoxin ausgelösten Störungen der Kontraktilität gut belegt, was vermuten lässt, dass Endotoxin ein wichtiges Pathogen im Rahmen der septischen Kardiomyopathie ist.^{119,134} Seine Wirkungen an Zellen vermittelt LPS unter anderem, indem es an den spezifischen Oberflächenrezeptor CD14 auf den Zelloberflächen bindet. Auf diese Weise werden die immunkompetenten Zellen wie Monozyten, Makrophagen oder Granulozyten

aktiviert und reagieren mit einer Ausschüttung zahlreicher Zytokine. Diese CD14-Rezeptoren sind auch auf der Oberfläche von Kardiomyozyten vorhanden und scheinen die negativ inotrope Wirkung von LPS auf das Herz zu vermitteln, vermutlich durch eine verstärkte Produktion von TNF- α .¹³⁵ Allerdings wird von einigen Autoren auch eine CD14-Rezeptor-unabhängige Vermittlung der negativ inotropen Wirkung von Endotoxin auf das Herz vermutet.¹³⁶

Wichtige Rezeptoren bei der Vermittlung von Infektionen sind auch die Toll-like Rezeptoren (TLR).¹³⁷ Besonders TLR2 und TLR4 scheinen dabei für Effekte von LPS oder anderen pathogenen Bestandteilen von Bakterien auf den Organismus verantwortlich zu sein.^{138,139} Für Endotoxin ist auch eine TLR-4-vermittelte negativ inotrope Wirkung auf das Herz beschrieben.¹⁴⁰

2.5.3 Lipoteichonsäure (LTA) von *Staphylococcus aureus*

Im Vergleich zu gramnegativen Bakterien sind die Virulenzfaktoren grampositiver Bakterien weit weniger erforscht. Dies steht im Missverhältnis zur klinischen Relevanz der grampositiven Organismen. So zeigt sich bei der erregerspezifischen Untersuchung von septischen Patienten die zunehmende Bedeutung grampositiver Infektionen.^{141,142} Die wachsende Anzahl nosokomialer Infektionen und die durch übermäßigen Einsatz von Antibiotika hervorgerufenen Resistenzen (Methicillin- und Vancomycin-Resistenz) machen vor allem das grampositive Stäbchenbakterium *Staphylococcus aureus*, neben *E. coli* ohnehin der häufigste Auslöser von Infektionen beim Menschen, zu einem besonders pathogenen Erreger. Die Virulenz von *Staphylococcus aureus* wird unter anderem durch zahlreiche Toxine wie Exfoliatine, Enterotoxine, α -Toxin, Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren bedingt. Auf LTA soll im weiteren besonders eingegangen werden.

Analog zum Endotoxin bei gramnegativen Bakterien befinden sich in der Zellwand von *Staphylococcus aureus* neben Peptidoglykan (PepG) auch Lipoteichonsäure (LTA). LTA ist wie LPS ein amphiphiles, negativ geladenes Glykolipid. Für die biologische Wirksamkeit von LTA scheint ein Lipidanker entscheidend zu sein, der in ähnlicher Form als Lipid A in LPS hauptverantwortlich für deren Pathogenität ist.¹⁴³ Die Bedeutung der Zellwandbestandteile bei grampositiver Sepsis zeigt sich darin, dass im Blut von Erkrankten Antikörper gegen PepG und LTA nachzuweisen sind. Die beiden Zellwandbestandteile werden also während der Infektion freigesetzt und lösen im Organismus eine Immunreaktion aus.¹⁴⁴

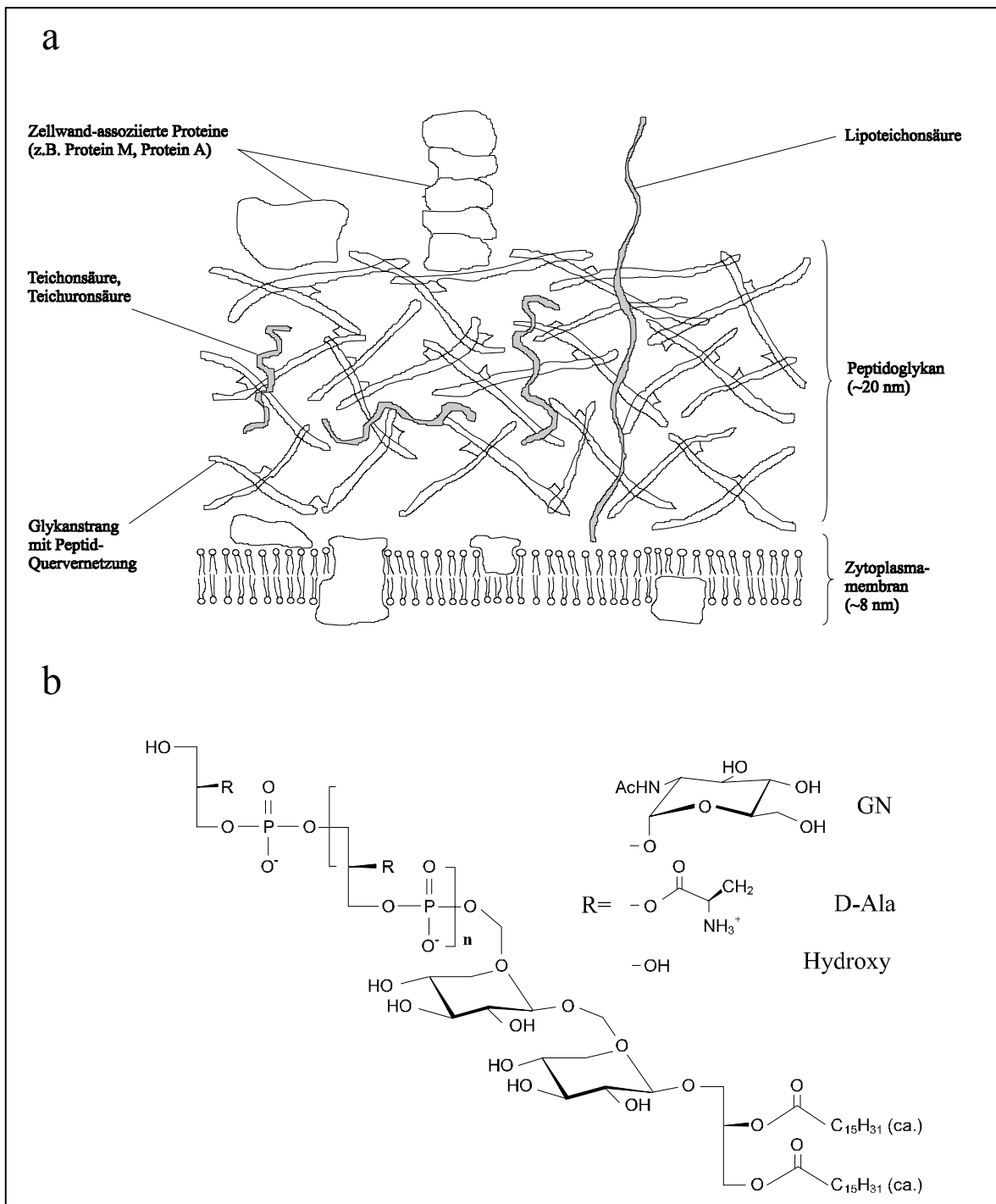


Abb.6 Der Zellwandbestandteil Lipoteichonsäure grampositiver Bakterien

a Schematische Darstellung der Zellwand grampositiver Bakterien mit den Bestandteilen Lipoteichonsäuren, Teichon- und Teichuronsäuren sowie Peptidoglykanen. Die einzelnen Bestandteile sind durch Peptidquervernetzung verbunden. Modifiziert nach ¹⁴⁵

b Chemische Struktur der Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus*. Reste: D-N-acetylglucosamin (GN), D-Alanin (D-Ala) oder Hydroxylgruppe (OH). Modifiziert nach ¹⁴⁶

In verschiedenen Studien wurden die Wirkung von LTA auf einzelne Zellen oder komplette Organismen untersucht. Für LTA und auch PepG konnten dabei an immunkompetenten Zellen unterschiedliche Ergebnisse beschrieben werden. So stimuliert LTA die Zytokinsynthese von Monozyten und Makrophagen. Die biologische Wirksamkeit der LTA ist dabei nicht bei allen Bakterienspezies gleich hoch. So wurde der LTA von *Staphylococcus aureus* eine deutlich stärkere pathogene Wirkung als der von *Bacillus subtilis* nachgesagt, obwohl deren Struktur fast identisch ist.¹⁴⁷ An anästhesierten Ratten konnten durch Gabe von LTA die in der Sepsis beobachteten Veränderungen wie Hypotension und Verringerung des peripheren Widerstandes reproduziert werden, vermutlich ausgelöst durch vermehrte Induktion der iNOS-mRNA.¹⁴⁷ An der glatten Muskulatur menschlicher Arterien bewirkt die Applikation von LTA, ebenfalls durch eine Induktion der iNOS mit gesteigerter Produktion von NO, eine Kontraktilitätsabnahme.¹⁴⁸

Die Effekte von PepG und LTA alleine waren jedoch im Vergleich zu denen von Endotoxin insgesamt schwächer ausgeprägt. Werden PepG und LTA gemeinsam verabreicht, bewirken diese im Sinne eines Synergismus eine deutlich stärkere Reaktion. So können durch eine gemeinsame Verabreichung der beiden Substanzen vielfach höhere Zytokinspiegel gemessen werden, und im gesamten Organismus kann sich eine Sepsis bis hin zu begleitender Schädigung der Organe entwickeln, wie es auch bei Gabe von Endotoxin beobachtet werden kann.^{147,149,150}

Auf einem ähnlichen Weg wie Endotoxin scheint auch LTA auf Zellen einzuwirken. So ist in verschiedenen Studien die Aktivierung von immunkompetenten Zellen mit darauffolgender Produktion von Zytokinen durch den Oberflächenrezeptor CD14 beschrieben.^{151,152,153} Durch Blockade des CD14-Rezeptors können die durch LTA verursachten Wirkungen abgeschwächt oder ganz antagonisiert werden.¹⁵⁴ Allerdings werden auch CD14-unabhängige Wege zur Zellaktivierung durch LTA diskutiert.^{155,156}

Die im Zusammenhang mit der Untersuchung von LTA auf ihre pathogenetische Potenz relativ uneinheitlichen Ergebnisse können dabei verschiedene Ursachen haben. Die in einigen Studien beobachtete schwache oder nicht vorhandene Wirksamkeit^{157,158} liegt möglicherweise an einer ungeeigneten Isolationsmethode der LTA. Wird zur Aufreinigung eine Standardtechnik angewendet, wie sie beispielsweise bei der Gewinnung von Endotoxin üblich ist, so kann die dadurch gewonnene LTA durch eine Veränderung der Struktur ihre pathogenetische Wirksamkeit ganz oder zu einem großen Teil verlieren. Wird die LTA jedoch adäquat aufgereinigt, so scheint sie eine ähnlich hohe pathogene Potenz wie Endotoxin zu besitzen.¹⁴⁶ Neben der der LTA fälschlich zugesprochenen geringen Wirksamkeit ist es aber auch möglich,

dass der LTA Wirkungen zugesprochen werden, für die sie überhaupt nicht oder nur zu einem geringen Teil verantwortlich ist. So ist die in verschiedenen Studien beschriebene Wirksamkeit der LTA, welche mit kommerziell erwerblichen LTA-Präparationen gewonnen wurden, auf eine Verunreinigung der LTA mit Lipopolysacchariden, Proteinen oder Nukleinsäuren und deren eigene biologische Wirksamkeit zurückzuführen.^{142,147,159,160}

2.6 Fragestellung

Die Entstehung einer Kontraktilitätsstörung am Herzen konnte in zahlreichen Studien durch verschiedene Exotoxine oder den Wandbestandteil LPS gramnegativer Bakterien reproduziert werden. Im Vergleich zu gramnegativen Erregern sind die Pathomechanismen grampositiver Erreger weit weniger erforscht. Dies steht jedoch im Missverhältnis zur klinischen Relevanz. So ist auch über die Wirkungen des Zellwandbestandteils LTA grampositiver Bakterien vergleichsweise wenig bekannt. Daher sollten durch zellfreie Perfusion von isolierten Rattenherzen mit LTA Erkenntnisse über die Wirkung grampositiver Pathogenitätsfaktoren auf das Herz gewonnen werden. Die Fragestellungen waren im Einzelnen:

1. Bewirkt die Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* am Herz eine Änderung der Kontraktilität und/oder der myokardialen Perfusion?
2. Sind sekundär freigesetzte Zytokine und/oder vasoaktive Mediatoren an der Entstehung der durch LTA vermittelten Kardiodepression und gestörten Vasomotion beteiligt?
3. Ist eine Störung der Gefäßregulation an der von LTA hervorgerufenen Schwächung des Herzens beteiligt?
4. Kann die negativ inotrope Wirkung der LTA auf das Herz durch pharmakologische Interventionen beeinflusst werden?

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Lösungen und Pharmaka für die Herzperfusion

- Aqua ad iniectabilia, Baxter S.A., Lessines, Belgien
- Carbogen (95% O₂, 5% CO₂), Messer Griesheim GmbH, Frankfurt, Deutschland
- Coulter Clone[®] MY4 CD-14-Ak , Coulter, Miami, USA
- Daltroban, Boehringer, Mannheim, Deutschland
- Elektrolytlösung I/3, Zusammensetzung: Calciumchlorid-Dihydrat 2,4 mmol, Magnesiumchlorid-Hexahydrat 1,3 mmol, Kaliumchlorid 4,3 mmol, Kaliumhydrogenphosphat 1,1 mmol, Natriumchlorid 125 mmol, Glucose 13,32 mmol; Serag-Wiessner KG, Naila, Deutschland
- Heparin-Natrium (Liquemin[®] N25000), Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
- Indometacin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Isofluran (Forene[®]), Abbot GmbH, Wiesbaden, Deutschland
- Isotone Kochsalzlösung zum Spülen und Befeuchten, Baxter S.A., Lessines, Belgien
- Monoclonal Anti-rat TNF-alpha-antibody (Purified Mouse Monoclonal IgG1), R&D Systems, Minneapolis, USA
- Natriumhydrogenkarbonat 8,4% pfrimmer, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
- NS-398, Calbiochem[®]-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA, USA
- Pentobarbital-Natrium (Narcoren[®]), Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland

3.1.2 Geräte und Materialien für die Herzperfusion

- Aortenkanüle aus Edelstahl, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
- Brückenverstärker, Schwarzer DME 48 S, Picker, München, Deutschland
- Differenzierer, Schwarzer DER 48, Picker, München, Deutschland

- Druckaufnehmer COMBITRANS, B.Braun, Melsungen, Deutschland
- Intrafix[®] Air P Perfusatfilter (15µm), B.Braun, Melsungen, Deutschland
- Latexballon Größe 5, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
- Mehrkanalschreiber, Schwarzer CU 12-N, Picker, München, Deutschland
- Organkammer aus doppelwandigem Glas (70 ml), Hohlglas, Lich, Deutschland
- Oxygenator/Perfusatreservoir aus doppelwandigem Glas (250 ml), Hohlglas, Lich, Deutschland
- Pumpenschläuche Tygon[®] (Innendurchmesser 3,18 mm), Ismatec, Glattbrugg, Schweiz
- Schlauchpumpe, MS-4 Reglo 8-100, Ismatec, Glattbrugg, Schweiz
- Silikonschläuche (Innendurchmesser 3 mm), Kalensee, Gießen, Deutschland
- Stimulator P Typ 201, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
- Wärmebad Typ 1092, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
- Wärmepumpe Thermomix BU, B.Braun, Melsungen, Deutschland

3.1.3 Versuchstiere

Es wurden männliche Wistar Ratten (Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von etwa 200-300 g verwendet.

3.1.4 Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus*

Die Lipoteichonsäure (LTA) von *Staphylococcus aureus* wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. Thomas Hartung, Institut für Biochemische Pharmakologie der Universität Konstanz zur Verfügung gestellt. Durch eine neue Isolationsmethode war es möglich, eine zu über 99 % reine, biologisch aktive LTA aufzureinigen. Anhand von Magnet-Resonanz- und Massenspektroskopie konnte die Struktur der LTA analysiert werden. Im Vergleich zu LTA, welche durch herkömmliche Standardtechniken aufgereinigt wurde, konnte eine deutliche Steigerung der biologischen Wirksamkeit aufgezeigt werden.¹⁴⁶ Die LTA wurde in lyophilisierter Form geliefert, in Aqua dest. gelöst und in Aliquots zu 100µg/10µl bei -20°C gelagert. Unter Verwendung des Limulus Amebocyte Lysate Test konnte eine Kontamination der Aliquots mit LPS allenfalls in Spuren nachgewiesen werden.

3.1.5 ELISA-Test-Kits zum Nachweis von Thromboxan A₂, Prostacyclin und TNF- α

- Thromboxan B₂ EIA kit, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA
- 6-keto Prostaglandin F_{1 α} EIA kit, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA
- Rat TNF- α Immunoassay kit, BioSource International Inc., Camarillo, California, USA

3.1.6 Materialien und Geräte zur Messung von NO

- Chemilumineszenzdetektor UPK 3100, UPM, Langgöns, Deutschland
- Infusionsrollerpumpe ISMATEC IP 12 SA 8031, Ismatec, Glattbrugg, Schweiz
- Jacketkühler 400 mm, Kalensee, Gießen, Deutschland
- Membran-Vakuumpumpe S/N 103473, UPM, Langgöns, Deutschland
- Natriumnitrat pro analysi, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Reaktionskammer, Kalensee, Gießen, Deutschland
- Salzsäure 37 % pro analysi, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Sauerstoff 4.5, Messer-Griesheim, Siegen, Deutschland
- Stickstoff 5.0, Messer-Griesheim, Siegen, Deutschland
- Stickstoffmonoxid 109 ppb, Messer-Griesheim, Siegen, Deutschland
- Thermopumpe Thermomix[®] ME, B.Braun, Melsungen, Deutschland
- Tygon[®]-Pumpenschläuche, Ismatec, Glattbrugg, Schweiz
- Vanadium(III)-Chlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Zweihalskolben 100 ml, Kalensee, Gießen, Deutschland

3.1.7 Real-time-PCR

- ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
- dNTP, Eurobio, Raunheim, Deutschland
- Dynabeads mRNA direct kit, Dynal, Oslo, Norwegen
- H₂O dest., DEPC-behandelt

- MgCl₂, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland
- MULV Reverse Transkriptase, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland
- 10^xPCR-Puffer II, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland
- RNase-Inhibitor, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland
- Stichproben-Hexamere, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland
- TaqMan PCR Reagent Kit, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Modell der isolierten Herzperfusion

Die durchgeführte retrograde Perfusion des Rattenherzens beruht auf dem erstmals 1895 von Langendorff beschriebenen Prinzip der isolierten Herzperfusion.¹⁶¹ Hierbei werden freipräparierte und isolierte Säugetierherzen retrograd durch den Aortenstumpf perfundiert. An der intakten Aortenklappe vorbei fließt das Perfusat durch die Koronarostien in die Koronargefäße. Dies führt zu einem perfundierten Myokard mit rhythmischen Kontraktionen des Herzens bei annähernd leeren Herzkammern. Die Isolation des Herzens bedeutet eine Abtrennung von zentralnervösen, humoralen und metabolischen Einflüssen des Gesamtorganismus auf das Herz, so dass man unabhängig von körpereigenen Reizen eine spezifische Reaktion auf definierte Stimuli beobachten kann.

3.2.2 Präparation und Perfusion des Rattenherzens

Die männlichen Wistar Ratten mit einem Gewicht von 200-300 g wurden zunächst mit 1000 µl des Inhalationsnarkotikums Isofluran (Forene[®]) und durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital-Natrium (Narcoren[®]) in der Dosierung 60 mg/kg Körpergewicht betäubt. Zur Vermeidung einer intrakoronaren Thrombenbildung wurde mit 2000 I.E. Heparin (Liquemin[®]) antikoaguliert. Nach der Testung auf Reflex- und Schmerzlosigkeit wurde die Ratte auf dem Operationstisch fixiert. Zunächst wurde die Peritonealhöhle eröffnet, um von dort eine bilaterale Thorakotomie durchzuführen. Die mobilisierte vordere Brustwand wurde nach oben gezogen und das Perikard eröffnet. Das Herz wurde, unter Belassung eines ausreichend langen Aortenstumpfes zur späteren Befestigung an der Perfusionskanüle, zügig von

den Gefäßen abgetrennt. In einer eisgekühlten kardioplegen Perfusatlösung erfolgte die weitere Präparation, bei der Gefäßreste und Bindegewebe entfernt, sowie der linke Vorhof für den später einzulegenden Latexballon eröffnet wurden. Anschließend wurde das präparierte Herz am Aortenstumpf an der Aortenkanüle mit Faden befestigt und mit 36-37° C warmen Perfusat durchspült, woraufhin es sofort zu schlagen begann.

3.2.3 Versuchsaufbau

Das Herz wurde in einem geschlossenen, rezirkulierenden System mit einem Volumen von 50 ml Perfusat perfundiert. Dies hat gegenüber einem offenem System den Vorteil, dass eine vergleichsweise geringere Menge an Agenzien und Pharmaka benötigt wird und sich außerdem im Perfusat Metabolite anreichern, welche im offenen System unter die Nachweisgrenze fallen könnten. Als Perfusat wurde ein modifizierter *Krebs-Henseleit*-Puffer verwendet in der Zusammensetzung (in mM): NaCl (125), KCl (4,4), KH₂PO₄ (1,1), MgCl₂·6H₂O (1,3), CaCl₂·2H₂O (2,4), Glucose (13,32), NaHCO₃ (25). Durch eine Begasung mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) wurde ein pO₂ von 520 +/- 50 mmHg und pCO₂ von 33 +/- 2 mmHg sowie ein pH von 7,37 +/- 0,03 erreicht. Durch eine Thermopumpe, welche erwärmte Flüssigkeit durch den doppelwandigen Reservoirbehälter und die Organkammer spülte, konnte die Perfusattemperatur auf 37° C reguliert werden. Es wurde eine flusskonstante, retrograde Perfusion durchgeführt mit einem Fluss von 10 ml/min/g Herzgewicht.

Über die Aortenkanüle gelangte das Perfusat oberhalb der passiv geschlossenen Aortenklappe in die Koronararterien, um von dort weiter in die Koronarvenen und die gekappten Lungenvenen in die mit Parafilm verschlossene und temperierte Organkammer abzufließen. Unterhalb der Organkammer befand sich ein Drei-Wege-Hahn, aus dem bei Bedarf Perfusatproben entnommen werden konnten. Bei geschlossenem Drei-Wege-Hahn wurde das Perfusat mittels Rollerpumpe durch einen Filter mit einer Porengröße von 15 µm zurück in das Perfusatreservoir befördert. Dort wurde es erneut mit Carbogen begast und Richtung Herz gepumpt.

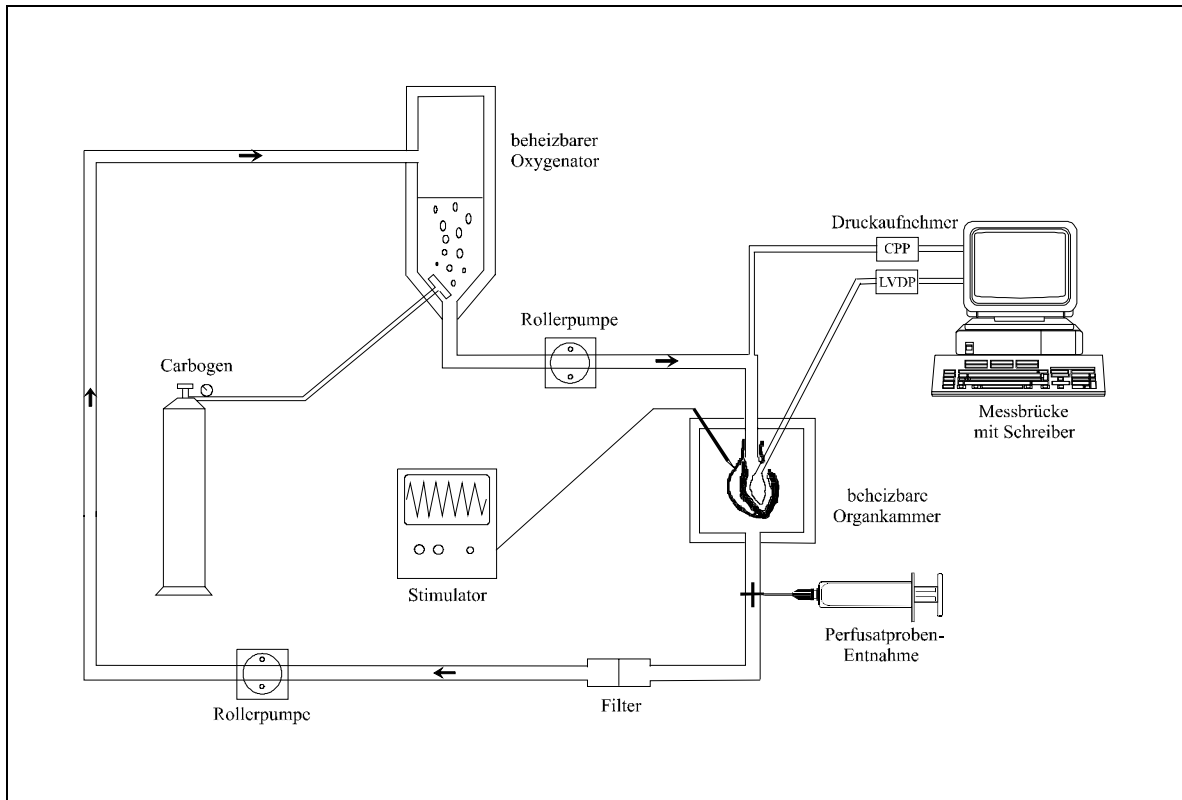


Abb. 7 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Aus dem Oxygenator fließt das erwärmte und mit Carbogen aufgesättigte Perfusat in das an der Aorta aufgehängte Rattenherz. Eine Rollerpumpe sorgt für eine flusskonstante Perfusion des Herzens. Das vom Herzen abtropfende Perfusat durchfließt einen Filter und wird über eine Rollerpumpe zurück in den Oxygenator gepumpt. Die Entnahme der Perfusatproben erfolgt unterhalb des Herzens über einen Dreiwegehahn. Durch einen im linken Ventrikel liegenden Latexballon wird die Kontraktilität des Herzens bestimmt. Der Perfusionsdruck kann oberhalb der Aortenkanüle über Druckaufnehmer ermittelt werden. Um frequenzabhängige Kontraktilitätsänderungen auszuschliessen wird die Herzfrequenz durch einen Stimulator konstant gehalten.

3.2.4 Messung physiologischer Parameter

Der Widerstand innerhalb der koronaren Strombahn wurde durch die Messung des koronaren Perfusionsdruckes (CPP) bei flusskonstanter Perfusion erfasst. Der CPP wurde durch ein oberhalb der Aortenkanüle abzweigendes Druckmeßsystem bestimmt, welches mit einem Druckaufnehmer verbunden war. Um die Kontraktilität des Herzens beurteilen zu können, wurde ein mit einem Druckaufnehmer verbundener und mit Flüssigkeit gefüllter Latexballon über die gekappten Lungenvenen in den linken Ventrikel eingelegt und auf einen enddiastolischen Druck von etwa 10 mmHg eingestellt. Dadurch konnten die isovolumetrischen Kontraktionen des Herzens dargestellt und der linksventrikuläre Druck (LVDP, left ventricular developed pressure) bestimmt werden. Zusätzlich wurde das Messsignal des linksventrikulären Druckes differenziert und die maximale linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) als weiterer Kontraktilitätsparameter gemessen. Die Messsignale der Druckaufnehmer wurden mit Messbrücken verstärkt und alle 5 Minuten von einem Mehrkanalschreiber aufgezeichnet. Um eine frequenzabhängige Schwankung der Kontraktilität auszuschließen, wurde das Herz durch ein Stimulationsgerät mit einer Frequenz von 320-360 Schlägen pro Minute gepaced.

3.2.5 Experimentelles Protokoll

Zunächst wurde das an der Aortenkanüle befestigte Herz mit 150 ml Perfusat durchspült, um Blut oder freie Zellen aus dem Herz und dem System zu entfernen. Dieses Perfusat wurde verworfen. Im Anschluss wurde das Herz für die restliche Zeit mit 50 ml rezirkulierend perfundiert. Um keine frequenzabhängigen Schwankungen der gemessenen physiologischen Parameter zu erhalten, wurde auf dem Vorhof eine Elektrode, welche an das Stimulationsgerät angeschlossen war, platziert. Die oben beschriebenen Messwerte wurden von Beginn an registriert. Sie waren zu Beginn eines Versuches gelegentlich noch schwankend, nach 15 Minuten jedoch waren die Werte meistens stabil. („steady-state“)

Versuche, bei denen die Messwerte zu diesem Zeitpunkt noch instabil waren, wurden abgebrochen und nicht in die Versuchsauswertung aufgenommen. Nach weiteren 10 Minuten wurde zum Zeitpunkt t_0 Lipoteichonsäure in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Ab diesem Zeitpunkt liefen die Versuche dann genau 180 Minuten, alle 5 Minuten wurden die

physiologischen Parameter CPP, LVDP und dp/dt_{max} registriert. Pharmaka wurden 10 Minuten vor der Lipoteichonsäure-Gabe hinzugefügt, um eine ausreichende Einwirkzeit zu garantieren. Perfusatsproben zur späteren analytischen Untersuchung wurden zweimal vor der LTA-Gabe entnommen, sowie nach 30, 60, 90, 120, 150 und 180 Minuten.

Folgende Versuche wurden in mindestens vierfacher Ausführung durchgeführt:

- Kontrolle
- LTA 2 $\mu\text{g/ml}$
- LTA 2 $\mu\text{g/ml}$ + CD-14-Ak, Konzentration 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (CD-14-Antikörper)
- LTA 2 $\mu\text{g/ml}$ + TNF- α -Ak, Konzentration 10 $\mu\text{g/ml}$ (TNF- α -Antikörper)
- LTA 2 $\mu\text{g/ml}$ + Indometacin 250 μM (Cyclooxygenase-Inhibitor)
- LTA 2 $\mu\text{g/ml}$ + NS-398 50 μM (selektiver Cyclooxygenase-2-Inhibitor)
- LTA 2 $\mu\text{g/ml}$ + Daltroban 10 μM (Thromboxan- A_2 -Rezeptorantagonist)

3.2.6 Nachweis von Thromboxan A_2 und Prostacyclin

Da die vasoaktiven Arachidonsäuremetabolite Thromboxan A_2 und Prostacyclin nur eine sehr kurze Halbwertszeit haben, mussten deren stabile, nicht-enzymatischen Hydrolyseprodukte Thromboxan B_2 (TxB_2) und 6-keto Prostaglandin $F_{1\alpha}$ (6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$) mit kommerziellen ELISA-Test-Kits bestimmt werden.

Diese ELISA-Systeme arbeiten nach folgendem Prinzip: Der nachzuweisende Analyt ($\text{TxB}_2/6\text{-keto PGF}_{1\alpha}$) der zu untersuchenden Probe konkurriert mit einer konstanten Menge Tracer (mit $\text{TxB}_2/6\text{-keto PGF}_{1\alpha}$ gekoppelte Acetylcholin-Esterase) um eine limitierte Anzahl von Bindungsstellen von $\text{TxB}_2/6\text{-keto PGF}_{1\alpha}$ -spezifischem Kaninchen-Antiserum. Da die Konzentration von Tracer konstant ist, die Konzentration von $\text{TxB}_2/6\text{-keto PGF}_{1\alpha}$ aus den zu untersuchenden Proben aber variiert, ist die Menge von gebundenem Tracer umgekehrt proportional zur $\text{TxB}_2/6\text{-keto PGF}_{1\alpha}$ -Konzentration in der Probe. Die aus dem Analyt oder dem Tracer, sowie den Antikörpern bestehenden Immunkomplexe wurden durch monoklonale Anti-Kaninchen-Antikörper, welche auf der Mikrotiterplatte fixiert sind, gebunden. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wurde die Platte mehrmals gewaschen, um nicht gebundene Reagenzien zu entfernen. Nun wurde ein chromogenes Substrat (Acetylthiocholin und 5,5'-dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure)) zugegeben, und durch das Enzym Acetylcholinesterase des gebundenen Tracers in 5-thio-2-Nitrobenzoesäure umgewandelt. Die Intensität der entstehenden gelben Farbe, welche photometrisch bei 412 nm bestimmt wurde, war proportional zur

Menge des gebundenen Tracers. Dieser wiederum war umgekehrt proportional zur Menge des Analyts in der Probe. Bis zur Untersuchung der Perfusatproben wurden diese bei -20°C gelagert.

3.2.7 Nachweis von TNF- α

Der quantitative Nachweis von TNF- α wurde mit kommerziellen Test-Kits durchgeführt, bei denen spezifische Antikörper gegen Ratten- TNF- α auf Mikrotiter-Platten fixiert sind. Die zu untersuchenden Perfusatproben wurden in die einzelnen Kammern auf der Mikrotiter-Platte pipettiert, gefolgt von der Zugabe eines biotinylierten, zweiten Antikörpers. Während der nun folgenden ersten Inkubation bindet das TNF- α -Antigen mit einer Seite an den fixierten Antikörper, während es mit einer anderen Seite an den biotinylierten, zweiten Antikörper bindet. Nach der Entfernung von überschüssigem freiem biotinylierten Antikörper wurde das Enzym Streptavidin-Peroxidase hinzugegeben, welches an den mit TNF- α fixierten biotinylierten Antikörper bindet. Nach einer zweiten Inkubation wurde die Platte mehrmals gewaschen, um ungebundenes Enzym zu entfernen. Nun wurde eine Substratlösung (Tetramethylbenzidin) hinzugefügt, welche von dem gebundenen Enzym in eine farbige Lösung umgewandelt wurde. Die Intensität dieses Farbprodukts wurde bei 450 nm photometrisch bestimmt und war der Konzentration von TNF- α aus der Probe direkt proportional. Da TNF- α thermolabil ist, wurden die Perfusatproben direkt nach der Abnahme in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend bei -80°C gelagert.

3.2.8 NO-Messung

Die Messung des in den Perfusatproben angereicherten NO wurde mit einem Chemilumineszenzdetektor durchgeführt. Die Meßmethode beruht auf dem Prinzip, dass bei der Reaktion von NO mit Ozon Licht freigesetzt wird. Dieses freigesetzte Licht wird durch einen Photomultiplier gefiltert, verstärkt und in ein elektrisches Stromsignal umgewandelt. Aus der Stärke des Stromsignals kann nun auf den NO-Gehalt geschlossen werden. Durch Kalibrierung mit definierten Gasen wird dann die NO-Konzentration in der Probe berechnet. NO wird in sauerstoffhaltiger Umgebung innerhalb kürzester Zeit zu den stabilen Oxidationsprodukten Nitrat, Nitrit und Peroxynitrit, zusammen als NO_x bezeichnet, umgewandelt.

Daher mussten in der Perfusatprobe zunächst die Oxidationsprodukte zu gasförmigem NO reduziert werden. Hierzu wurde die zu messende Perfusatlösung durch eine Schlauchpumpe in ein mit Vanadiumchlorid (0,1 M) und Salzsäure (2 M) gefülltes, beheiztes Reaktionsgefäß transportiert. Bei einer Temperatur von 90°C wurde das in der Perfusatlösung vorhandene Nitrat, Nitrit und Peroxynitrit vollständig zu NO reduziert. Zusammen mit dem als Trägergas eingesetzten Stickstoff, der das Reaktionsgefäß mit konstantem Fluss durchströmte, wurde das entstandene NO nun zum Chemilumineszenzdetektor transportiert und gemessen. Jede Probe wurde doppelt gemessen und die gemessenen Werte anschließend gemittelt.

3.2.9 Überprüfung auf Kontamination durch Endotoxin

Zur Untersuchung der Pharmaka und der LTA auf eine mögliche Verunreinigung durch Endotoxin, welche die Ergebnisse beeinflussen könnte, wurde der kommerziell erhältliche Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Test durchgeführt:

- Limulus Amebocyte Lysate Test Qcl-1000, BIO Whittaker, Walkersville, Maryland, USA

Die Amöbozyten aus der Hämolymphe des Pfeilschwanzkrebse (Limulus polyphemus) koagulieren, wenn sie mit Endotoxin in Kontakt kommen. Der Koagulationsprozess der Amöbozyten folgt einer ähnlichen Kaskade wie die Koagulation von Säugetier-Blut. Im LAL ist ein Proenzym aus Amöbozyten enthalten. Das LAL wurde zu der auf Endotoxin zu untersuchenden Probe zugegeben. Das in der Probe enthaltene Endotoxin katalysierte nun die Umwandlung des Proenzym in ein aktives Enzym. Die Menge an entstehendem Enzym war proportional zum Gehalt an Endotoxin in der Probe. Um die entstandene Menge an Enzym zu quantifizieren, wurde ein farbloses Substrat (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-p-Nitroanilin) hinzugefügt, von welchem das Enzym das farbige p-Nitroanilin abspaltete. Das entstandene p-Nitroanilin wurde photometrisch bei 405-410 nm bestimmt und korrelierte mit dem in der Probe vorhandenem Endotoxin. Durch Messung gegen Standards konnte der Gehalt an Endotoxin quantifiziert werden.

3.2.10 Quantifizierung von mRNA mit Real-time-PCR

Mit Hilfe der real-time-PCR war es möglich, die mRNA von TNF- α oder der COX-2 im Ventrikelmyokard quantitativ zu bestimmen. Dies wird möglich durch eine Kalibrierung der mRNA von TNF- α oder COX-2 mit der mRNA des ubiquitär vorkommenden PBGD-Gens. Dafür wurden vom Myokard des linken Ventrikels Gefrierschnitte von 10 μm Stärke angefertigt und in 300 μl Lyse-Puffer des *Dynabeads mRNA direct kit* aufgelöst. Nun wurden zur Kopplung der mRNA 100 μg supermagnetischer Glaspartikel, an die oligo-dT-Fragmente kovalent gebunden waren, hinzugegeben. Nach mehreren Waschvorgängen konnte die isolierte mRNA in 20 μl DEPC-behandeltem H_2O gelöst werden. Für die Synthese der cDNA wurden die Proben für zehn Minuten auf 70°C erhitzt und anschließend für fünf Minuten auf Eis gekühlt. Zu 10 μl von diesen Proben wurden 4 μl MgCl_2 (25mM), 2 μl 10^xPCR-Puffer II, 1 μl randomisierte Hexamere (50 μM), 0,5 μl RNase-Inhibitor (10 U), 1 μl MULV reverse Transkriptase (10mM) und 1 μl dNTP (10mM) hinzugefügt, so dass sich ein Gesamtvolumen von 19,5 μl ergab. Diese Proben wurden für zehn Minuten bei 20°C und für eine Stunde bei 43°C inkubiert. Anschließend wurde die ausgelöste Reaktion durch fünfminütiges Erhitzen auf 99°C gestoppt. Mit den dadurch gewonnenen Proben konnte schließlich die quantitative PCR mit dem *Sequence Detection System 7700* durchgeführt werden. Dazu wurden unter Verwendung des *TaqMan PCR Reagent Kits* 2 μl der gewonnenen cDNA mit dem Oligonukleotidprimer (300 nM) und den Hybridisierungssonden (200 nM) zu einem Volumen von 50 μl vermischt. Nun wurde für zehn Minuten auf 95°C erhitzt, anschließend folgten 40 Zyklen von 15 Sekunden bei 95°C und 60 Sekunden bei 61°C. Die gewonnenen mRNA-Kopien konnten nun quantifiziert werden. Für die interne Kalibrierung dient die mRNA eines ubiquitär vorkommenden Standard-Gens, der Porphobilinogen-Deaminase (PBGD). Zur relativen quantitativen Bestimmung wurde die Ziel-Gen-mRNA (TNF- α oder COX-2) mit einer internen Standard-Gen-mRNA (PBGD) nach folgender Formel berechnet:

$$T_0/R_0=K \cdot (1+E)^{(CT,R-CT;T)}$$

T_0 bezeichnet die initiale Anzahl an Ziel-Gen-mRNA-Kopien, R_0 : Initiale Anzahl an Standard-Gen-mRNA-Kopien, E: Effizienz der Amplifikation, CT,R : Schwellenzyklus des Standardgens, CT,T : Schwellenzyklus des Zielgens, K: Konstante.¹⁶²

Primer	Sequenz	Exon
PBGD-Amplicon-Größe: 135 bp		
PBGD-forward	5'CAAGGTTTTTCAGCATCGCTACCA3'	e4
PBGD-reverse	5'ATGTCCGGTAACGGCGGC3'	e1
PBGD-hybridization-probe	5'CCAGCTGACTCTTCCGGGTGCCAC3'	e4-e3
TNF- α -Amplicon-Größe: 173 bp		
TNF- α -forward	5'GGTGATCGGTCCCAACAAGGA3'	e1
TNF- α -reverse	5'CACGCTGGCTCAGCCACTC3'	e4
TNF- α -hybridization-probe	5'TGGCCCAGACCCTCACACTCAGATCA3'	e2-e3
COX-2-Amplicon-Größe: 149 bp		
COX-2-forward	5'CCATCCTGGAAAAGTCGAAGTTTAT3'	e6
COX-2-reverse	5'TTTGCCCAGCACTTCACTCATC3'	e5
COX-2-hybridization-probe	5'ATGATTTAAGTCCACTCCATGGCCCAGTCC3'	e6-e5

Tab.1 Sequenzen, Amplicon-Größen und Exon-Lokalisationen der Primer und Sonden

Durch Auswahl geeigneter Intron-erfassender Primer und Sonden waren die erhaltene cDNA viel kürzer als die genomische DNA. Für die verwendeten Sequenzen konnte nachgewiesen werden, dass keine Pseudogene existieren.

3.2.11 Statistische Auswertung der Daten

Die Änderungen der Kontraktilität (LVDP und dP/dt_{max}) sind als prozentuale Abweichungen vom Ausgangswert angegeben. Die Erhöhung des Perfusionsdrucks sowie die Akkumulation von Metaboliten wie TxB_2 oder TNF- α werden als Differenz (Δ) von den Ausgangswerten nach Beendigung der Äquilibrationsphase dargestellt. Sämtliche wiedergegebene Daten sind die Mittelwerte mit den Standardfehlern des Mittelwerts (SEM) aus mindestens vier Experimenten. Die gewonnenen 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 $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen sind in den einzelnen Diagrammen graphisch wiedergegeben.

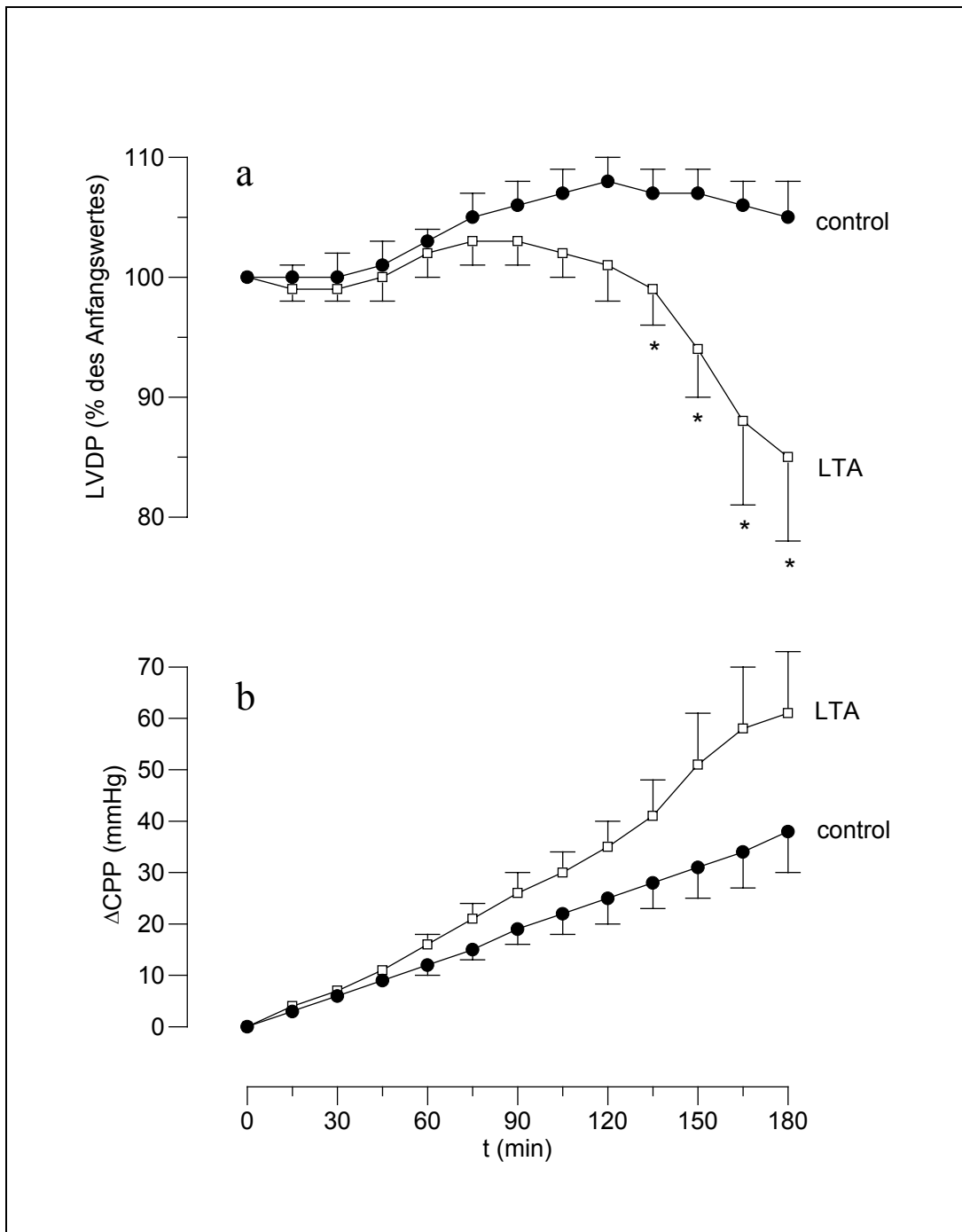
4. Ergebnisse

4.1 Übersicht

Um die Wirkung der Lipoteichonsäure auf das isoliert perfundierte Rattenherz zu untersuchen, wurden die Herzen für drei Stunden mit LTA perfundiert. Dabei wurde der Einfluss der Lipoteichonsäure auf die physiologischen Parameter des Herzens wie Kontraktilität (LVDP und dP/dt_{max}) sowie die koronare Durchblutung (CPP) beobachtet. Aus den gewonnenen Perfusatproben konnten verschiedene Mediatoren mit potentiell das Herz beeinflussender Wirkung quantitativ analysiert werden. Um weitere Erkenntnisse in der Pathophysiologie der akuten septischen Kardiomyopathie zu gewinnen, wurden die Herzen mit LTA sowie verschiedenen Pharmaka und Antikörpern perfundiert und deren Auswirkung auf die Herzfähigkeit beobachtet.

4.2 Einfluss der LTA auf physiologische Parameter des Herzens

LTA wurde in der Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ dem Perfusat zugefügt und die Herzen über einen Zeitraum von drei Stunden beobachtet. Dabei wurden alle fünf Minuten die physiologischen Parameter LVDP und dP/dt_{max} als Maß der myokardialen Kontraktilität sowie CPP für die koronare Durchblutung gemessen und deren Änderungen von den Ausgangswerten berechnet. Der LVDP beschreibt den systolisch entwickelten linksventrikulären Druck, indem die Differenz zwischen endsystolischem und enddiastolischem Wert berechnet wird. In den Kontrollversuchen war die myokardiale Kontraktilität verhältnismäßig konstant. Der relative linksventrikuläre Druck als Maß der myokardialen Kontraktilität stieg zunächst leicht an und war nach 180 Minuten mit $105 \pm 3\%$ gering über dem Startniveau. Bei Zusatz von LTA in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ war nach drei Stunden eine Minderung der myokardialen Kontraktilität festzustellen. So war der LVDP nach 180 Minuten auf $85 \pm 7\%$ des Ausgangswertes gefallen. Dabei war eine zeitabhängige Schwächung des Herzens festzustellen. Befanden sich die Kontraktilitätswerte der Toxinversuche nach 105 Minuten noch auf ähnlichem Niveau wie die Kontrollversuche, so zeigte sich bei den Toxinversuchen im weiteren Verlauf eine deutliche Verschlechterung der Kontraktilität (*Diag. 1a*).



Diag.1 Einfluss der LTA auf die physiologischen Parameter des Herzens

Die Zugabe von LTA in der Konzentration $2 \mu\text{g/ml}$ (-□-) bewirkt eine zeitabhängige Schwächung des Kontraktilitätsparameter LVDP verglichen mit der Kontrollgruppe (-●-) (Diag.1a). Der koronare Perfusionsdruck ΔCPP erhöht sich bei Perfusion mit LTA leicht (Diag.1b). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus jeweils mindestens acht Versuchen. Mit * markierte Werte unterscheiden sich signifikant von den Kontrollwerten ($p < 0,05$).

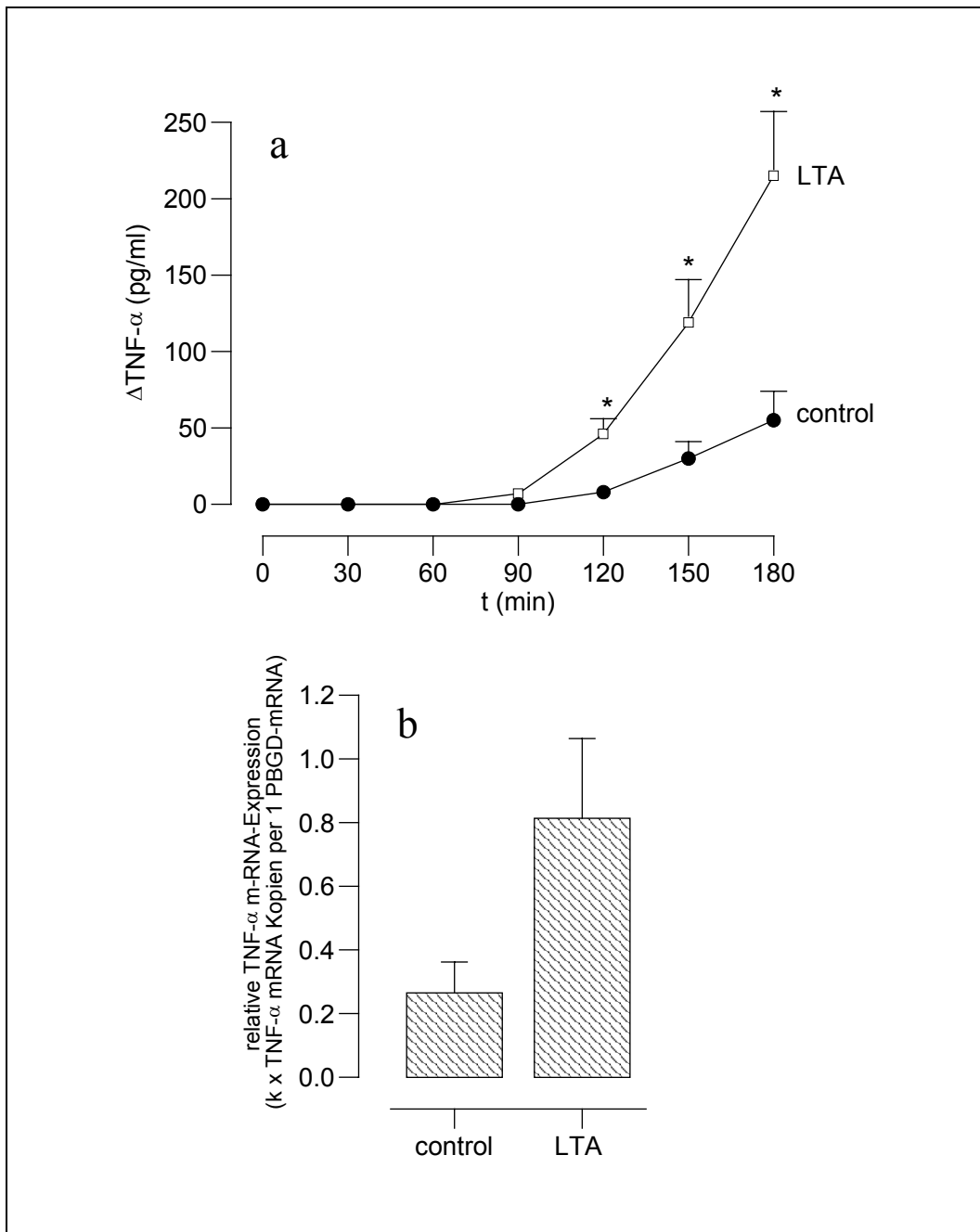
Bei dem Kontraktilitätsparameter dp/dt_{\max} waren ähnliche Beobachtungen zu machen. Die Kontrollversuche liefen relativ konstant und waren nach 180 Minuten exakt auf dem Ausgangswert von $100\pm 3\%$. Zugabe von LTA in einer Konzentration von $2\ \mu\text{g/ml}$ führte zu einem Abfall der maximalen linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit bis auf $84\pm 8\%$ nach 180 Minuten (*graphisch nicht dargestellt*).

Der CPP als Maß für den koronaren Gefäßwiderstand stieg bei den Kontrollversuchen relativ konstant auf $38\pm 8\ \text{mmHg}$ nach 180 Minuten an. Analog zu den Kontraktilitätsparametern war auch hier eine zeitabhängige Wirkung der LTA zu beobachten. Bei einer Zugabe von LTA war eine Zunahme des CPP zu beobachten, welche jedoch im Vergleich zu den Kontrollversuchen nicht sehr ausgeprägt war. Zugabe von LTA in der Konzentration von $2\ \mu\text{g/ml}$ führte zu einem Anstieg des ΔCPP auf $61\pm 12\ \text{mmHg}$ nach 180 Minuten (*Diag. 1b*).

4.3 Freisetzung von TNF- α

Vom rezirkulierenden Perfusat wurden in regelmäßigen Abständen Proben genommen und mittels ELISA auf TNF- α untersucht. Der Ausgangswert wurde von den folgenden abgezogen und die Differenz als Zunahme von TNF- α registriert. Bei den Kontrollversuchen war die Konzentration zunächst relativ konstant, erst ab der 120. Minute war ein leichter Anstieg zu beobachten. Nach 180 Minuten betrug die Zunahme der TNF- α -Konzentration $57\pm 24\ \text{pg/ml}$. Die durch Perfusion mit LTA gewonnenen Proben wurden mit einer LTA-Konzentration von $2\ \mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Auch hier war bis zur 90. Minute nur ein geringer Zuwachs an TNF- α zu verzeichnen, ab der 120. Minute jedoch war eine deutliche Erhöhung zu verzeichnen, welche sich bis zur 180. Minute auf Werte von $215\pm 42\ \text{pg TNF-}\alpha/\text{ml Perfusat}$ steigerte (*Diag. 2a*).

Mittels real-time-PCR wurde die TNF- α -mRNA-Expression im linken Ventrikel quantifiziert. Nach 180 Minuten war in den Kontrollherzen eine relative Konzentration von $0,2654\pm 0,0968$ TNF- α -mRNA nachzuweisen. In den Herzen, welche mit $2\ \mu\text{g/ml}$ LTA perfundiert wurden, fand sich dagegen mit einer relativen Konzentration von $0,8139\pm 0,2505$ eine etwa um das dreifache erhöhte Expression von TNF- α -mRNA im Ventrikelmyokard (*Diag. 2b*).



Diag.2 Myokardiale Freisetzung von TNF-α bei koronarer Perfusion von LTA

a. Die TNF-α-Akkumulation in den gewonnenen Perfusatproben wurde immunologisch durch ELISA analysiert. b. Die Expression von TNF-α-mRNA im Ventrikelmyokard nach dreistündiger Perfusion wurde mittels real-time-PCR quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens acht (Diag.2a) bzw. mindestens sechs (Diag.2b) Versuchen. Mit * markierte Werte unterscheiden sich signifikant von den Werten der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

4.4 Beeinflussung der TNF- α -Wirkung

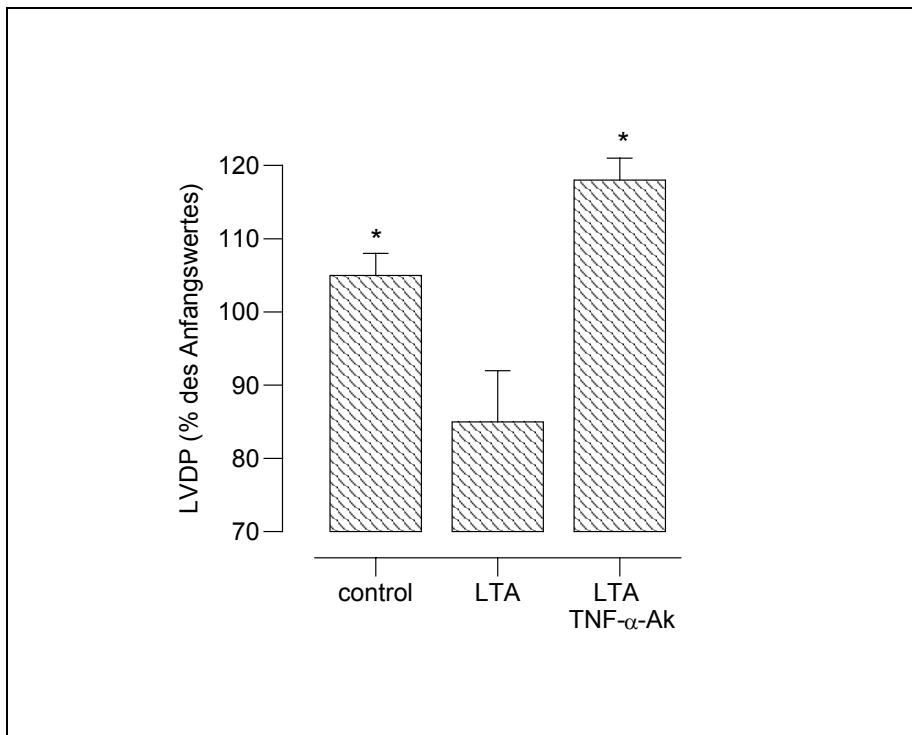
Um die potentielle kardiodepressive Wirkung des TNF- α zu untersuchen, wurde in das Perfusat mit einer LTA-Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ ein monoklonaler Antikörper gegen Ratten-TNF- α in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ hinzugefügt. Dabei zeigte sich, dass durch Verwendung des TNF- α -Antikörper der LTA-induzierte Abfall der Kontraktilität verhindert werden konnte. Der LVDP der Versuche mit TNF- α -Antikörper und LTA war von Beginn an höher als bei den Versuchen ohne, nach 180 Minuten war der LVDP bei 118 \pm 3 % des Ausgangswertes, verglichen mit 85 \pm 7 % bei den Versuchen, welche nur mit LTA perfundiert wurden (*Diag.3*).

Der Abfall der maximalen linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit $\text{dP/dt}_{\text{max}}$ konnte durch Zusatz von TNF- α -Antikörper ebenfalls verhindert werden. Nach drei Stunden betrug der $\text{dP/dt}_{\text{max}}$ bei gleichzeitiger Perfusion von TNF- α -Antikörper und LTA 122 \pm 5 % vom Ausgangswert, bei alleiniger Perfusion von LTA 84 \pm 8 %. Auch der koronare Perfusionsdruck wurde durch die Verwendung des TNF- α -Antikörpers beeinflusst. Betrug der Anstieg des CPP bei Perfusion mit LTA 61 \pm 12 mmHg nach drei Stunden, so führte die zusätzliche Verwendung des TNF- α -Antikörpers lediglich zu einem Zuwachs des CPP von 28 \pm 5 mmHg nach drei Stunden (*graphisch nicht dargestellt*).

4.5 Blockade des CD14-Rezeptors

4.5.1 Auswirkung auf die Produktion von TNF- α

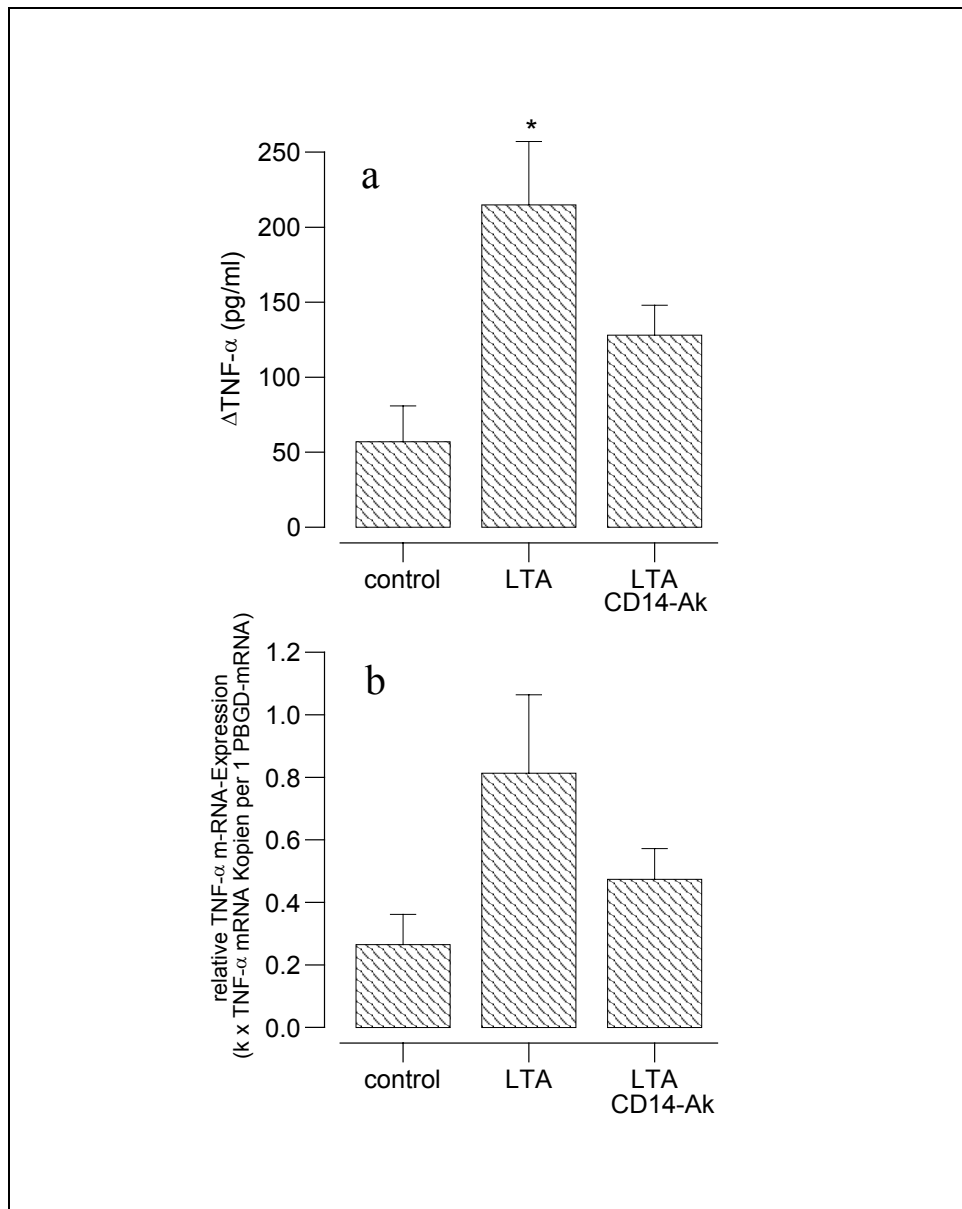
Um genauere pathophysiologische Erkenntnisse der Beeinflussung des Herzens durch LTA zu bekommen, wurde zum Perfusat ein monoklonaler Anti-Ratten-CD14-Antikörper in der Konzentration 2,5 $\mu\text{g/ml}$ hinzugegeben. Von den mit CD14-Antikörper und LTA perfundierten Herzen wurden in regelmäßigen Abständen Perfusatproben entnommen und mittels ELISA auf TNF- α untersucht und mit den LTA-Versuchen und den Kontroll-Versuchen verglichen. Verwendung des CD14-Antikörpers führte zu einer verminderten Ausschüttung von TNF- α durch LTA. Dabei lagen die sowohl mit CD14-Antikörper als auch LTA perfundierten Proben mit 128 \pm 20 pg/ml Perfusat nach drei Stunden etwa relativ genau zwischen den Perfusatproben der allein mit LTA perfundierten Herzen mit 215 \pm 42 pg/ml und den Kontroll-Versuchen mit 57 \pm 24 pg/ml Perfusat (*Diag.4a*).



Diag.3 Auswirkung eines Anti-TNF- α -Ak auf die Kontraktilität LTA perfundierter Herzen

Die Verwendung von Anti-Ratten-TNF- α -Antikörper bei koronarer Perfusion von LTA konnte den toxinabhängigen Rückgang des Kontraktilitätsparameter LVDP verhindern. Wiedergegeben sind die Veränderungen des LVDP nach 180 Minuten. Die Ergebnisse stammen aus mindestens vier Versuchen. Mit * markierte Werte unterscheiden sich signifikant von den LTA-Versuchen ($p < 0,05$).

Neben der Ausschüttung von TNF- α in das Perfusat wurde auch die TNF- α -mRNA im Ventrikelmyokard mittels real-time-PCR quantifiziert. Wie die Ausschüttung von TNF- α wurde auch die Expression der TNF- α -mRNA von der Verwendung des CD14-Antikörpers bei der Perfusion der Herzen mit LTA beeinflusst. Es zeigte sich bei den mit CD14-Antikörper und LTA perfundierten Herzen eine Abnahme der TNF- α -mRNA-Kopien im Myokard ($0,4737 \pm 0,0985$), verglichen mit den LTA perfundierten Herzen ($0,8139 \pm 0,2505$) und den Kontrollherzen ($0,2654 \pm 0,0968$) (Diag.4b).

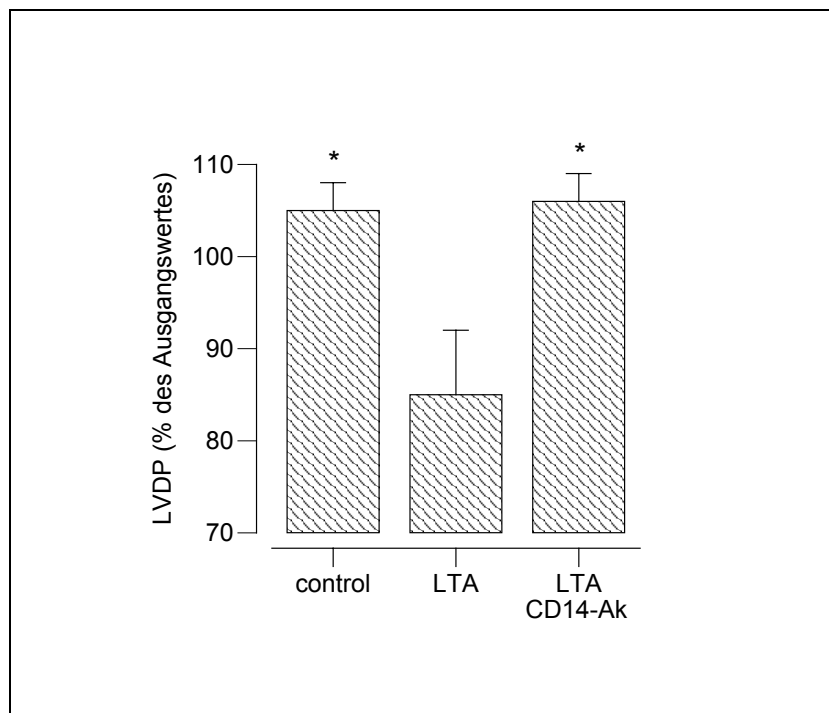


Diag.4 Auswirkung von Anti-CD14-Ak auf die kardiale Synthese von TNF-α durch LTA

Zugabe eines CD14-Antikörpers zur Herzperfusion mit LTA führt zu einer geringeren Ausschüttung von TNF-α ins Perfusat, verglichen mit der Perfusion nur mit LTA. Dargestellt sind auch die Werte der Kontrollen nach 180 Minuten (Diag.4a). Die Expression der TNF-α mRNA nach dreistündiger Perfusion wurde durch die Verwendung des CD14-Antikörpers bei der LTA-Perfusion im Vergleich zur reinen LTA-Perfusion vermindert (Diag.4b). Die Ergebnisse stammen aus mindestens acht (Diag.4a) bzw. mindestens sechs (Diag.4b) Versuchen. Mit * markierte Werte unterscheiden sich signifikant von den Kontrollen ($p < 0,05$).

4.5.2 Auswirkung auf physiologische Parameter

Durch die zeitgleiche Perfusion des CD14-Antikörpers zeigte sich eine Aufhebung der negativ inotropen Wirkung der LTA. Bei Perfusion mit LTA zeigten sich LVDP-Werte von 85 ± 7 % nach drei Stunden, unter Verwendung des CD14-Antikörpers stiegen die LVDP-Werte auf 106 ± 3 % bei Ende der Perfusion (*Diag.5*). Auch die koronare Perfusion wurde durch die Verwendung des CD14-Antikörpers beeinflusst. Bei Perfusion nur mit LTA stieg der koronare Perfusionsdruck auf 61mmHg, bei Zugabe von CD14-Antikörper zeigte sich dagegen nur ein sehr geringer Anstieg des CPP auf Werte von 8mmHg nach 180 Minuten (*graphisch nicht dargestellt*).



Diag.5 Auswirkungen der Blockade des CD14-Rezeptor auf physiologische Parameter

*Zugabe eines CD14-Antikörpers zur LTA-Perfusion führt zu einer Verbesserung des Kontraktilitätsparameter LVDP verglichen mit der Perfusion nur mit LTA. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte samt Standardabweichungen und stammen aus mindestens jeweils acht Versuchen. Mit * markierte Werte unterscheiden sich signifikant von den LTA-Versuchen ($p < 0,05$).*

4.6 Untersuchung der Perfusatproben auf NO

Mittels Chemilumineszenzdetektion wurde aus den entnommenen Perfusatproben der Gehalt an NO bestimmt. Es zeigte sich eine kontinuierliche Steigerung der NO-Ausschüttung im Zeitverlauf. Nach 180 Minuten betragen die Werte der unter LTA-Perfusion gewonnenen Proben $2,1 \pm 0,8 \mu\text{M}$. Die Werte der Kontrollen lagen mit $2,8 \pm 1,4 \mu\text{M}$ bei einem ähnlichen Niveau. Signifikante Unterschiede waren nicht festzustellen (*graphisch nicht dargestellt*).

4.7 Vasoaktive Substanzen und koronare Perfusion

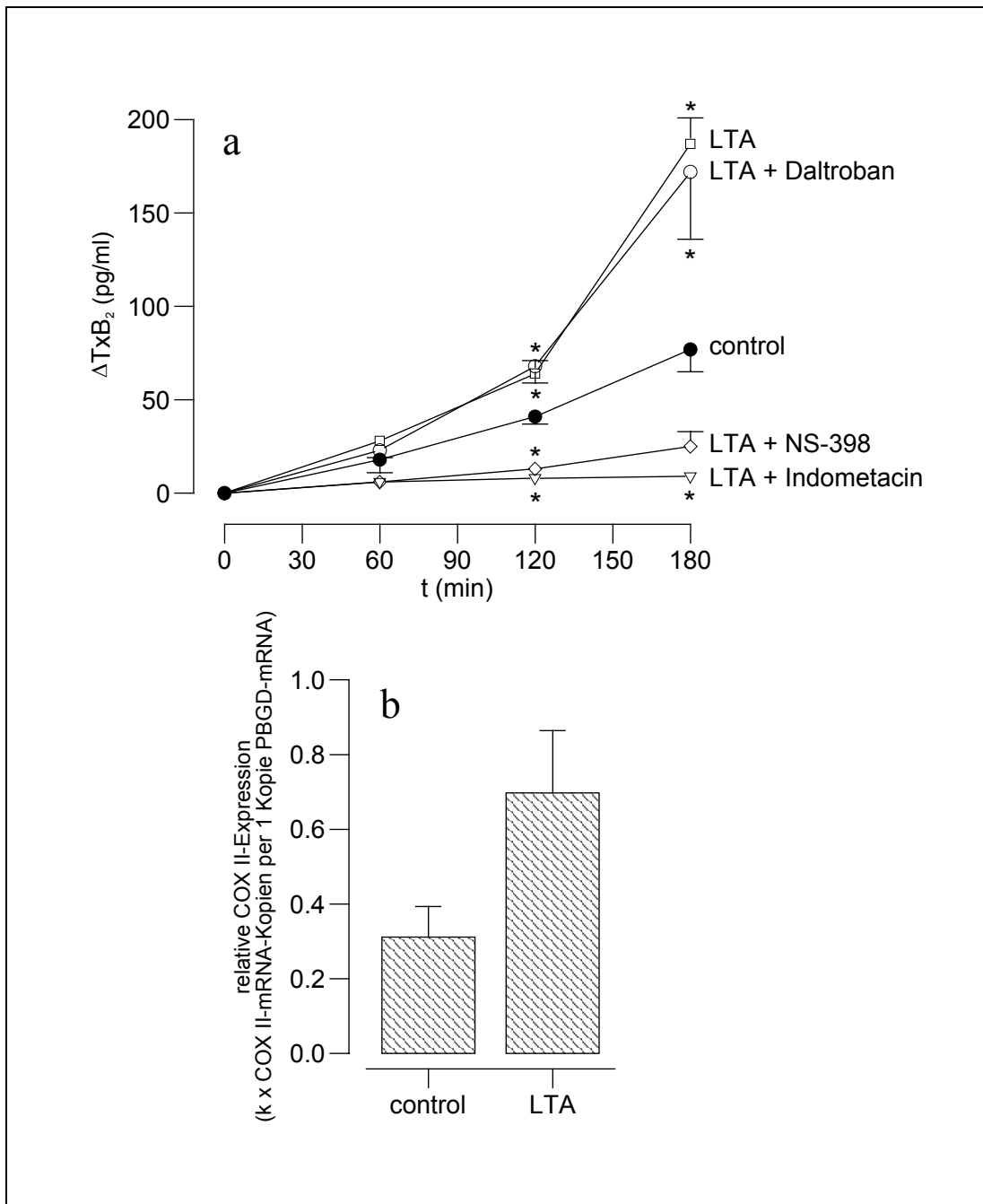
Um den durch LTA verursachten Anstieg des koronaren Perfusionsdruckes genauer zu untersuchen, wurde das Perfusat auf das vasokonstriktorische Cyclooxygenaseprodukt Thromboxan (Tx) A_2 untersucht. TxA_2 konnte durch den Nachweis dessen stabilen Metaboliten TxB_2 mit einem ELISA quantitativ im Perfusat bestimmt werden. Um genauere Einblicke in die Regulation der koronaren Perfusion zu erhalten, wurde durch pharmakologische Interventionen direkt in den Cyclooxygenase-Stoffwechsel eingegriffen. Bei den Kontrollversuchen war mit $77 \pm 12 \text{ pg/ml}$ nach drei Stunden ein leichter Anstieg der TxB_2 -Konzentration festzustellen. Die Perfusion mit LTA führte dagegen mit $187 \pm 14 \text{ pg/ml}$ zu einer deutlichen Ausschüttung von TxB_2 in das Perfusat. Unter Verwendung des Thromboxan A_2 -Rezeptorantagonisten Daltroban ($10 \mu\text{M}$) war die Ausschüttung von TxB_2 durch LTA mit $172 \pm 35 \text{ pg/ml}$ nahezu unverändert. Die Hemmung der Cyclooxygenase führte dagegen zu einer deutlichen Verminderung der TxB_2 -Konzentration im Perfusat. Durch die alleinige Hemmung der COX-2 mit dem selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 ($50 \mu\text{M}$) zeigte sich eine TxB_2 -Konzentration von $25 \pm 8 \text{ pg/ml}$. Bei unselektiver Hemmung der Cyclooxygenase, also der COX-1 und der COX-2, zeigte sich eine noch deutlichere Verminderung der TxB_2 -Konzentration. So konnte durch den unselektiven COX-Inhibitor Indometacin ($250 \mu\text{M}$) die Ausschüttung von TxB_2 ins Perfusat auf $9 \pm 3 \text{ pg/ml}$ vermindert werden (*Diag.6a*).

Ähnliche Ergebnisse ergab die Untersuchung der Perfusatproben auf das Cyclooxygenaseprodukt Prostacyclin, das anhand dessen stabilen Hydrolyseproduktes 6-keto Prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ (6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$) bestimmt wurde. Durch Perfusion der Herzen mit LTA konnte nach 180 Minuten eine 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Konzentration von $11741 \pm 3242 \text{ pg/ml}$ festgestellt werden, verglichen mit einem Wert von $7560 \pm 2415 \text{ pg/ml}$ bei den Kontrollversuchen. Durch

Hemmung der COX-2 mit NS-398 konnte die Ausschüttung von 6-keto PGF_{1α} auf 1959±391 pg/ml vermindert werden. Die zusätzliche Inhibierung der COX-1 durch Indometacin verminderte die 6-keto PGF_{1α}-Konzentration bis auf Werte von 421±113 pg/ml (*graphisch nicht dargestellt*).

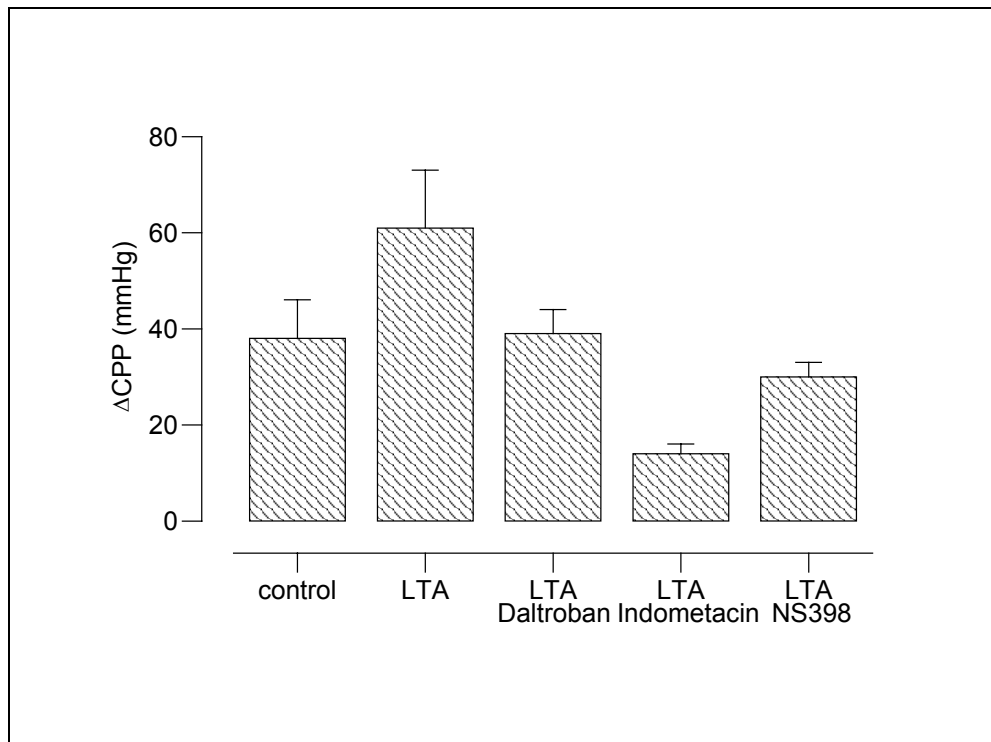
Neben der Ausschüttung der Cyclooxygenaseprodukte TxB₂ und 6-keto PGF_{1α} wurde auch die Expression der COX-2-mRNA im Ventrikelmyokard mittels real-time-PCR gemessen. Die Perfusion der Herzen mit LTA zeigte bei einer relativen Konzentration von 0,6976±0,1664 eine erhöhte Expression der COX-2-mRNA im Vergleich zu den Kontrollversuchen mit 0,3117±0,0820 (*Diag. 6b*).

Auch die Auswirkungen der Cyclooxygenaseprodukte auf den koronaren Perfusionsdruck, welcher ein Maß für den koronaren Gefäßwiderstand ist, wurden untersucht. Perfusion der Herzen mit LTA führte mit 61±12 mmHg nach drei Stunden zu einer stärkeren Zunahme des CPP als bei den Kontrollversuchen (38±8 mmHg). Verwendung des Thromboxan A₂-Rezeptorantagonisten Daltroban zur Perfusion mit LTA führte bei Werten von 39±5 mmHg nach dreistündiger Perfusion zu einer Abschwächung der LTA-vermittelten Vasomotion. Unselektive Hemmung der COX-1 und 2 durch Indometacin führte mit 14±2 mmHg auch zu einem geringeren Anstieg des Perfusionsdruckes als eine alleinige Hemmung der COX-2 dies mit 30±3 mmHg durch den selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 bewirkte (*Diag. 7*).



Diag.6 Auswirkungen der LTA auf Produkte und Induktion der Cyclooxygenase

a. Die Freisetzung des Cyclooxygenaseproduktes TxA₂ im Zeitverlauf wurde anhand des stabilen Hydrolyseproduktes TxB₂ mittels ELISA im Perfusat bestimmt. b. Nach dreistündiger Perfusion wurde im Ventrikelmyokard durch real-time-PCR die COX-2-mRNA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens fünf (Diag.6a) bzw. sechs (Diag.6b) Experimenten. Mit * markierte Werte unterscheiden sich signifikant von den Kontrollen ($p < 0,05$).



Diag.7 Veränderungen des koronaren Perfusionsdruckes bei Beeinflussung der Cyclooxygenase

Verwendung des Thromboxan A_2 -Rezeptorantagonisten Daltroban und unselektive Hemmung der COX-1 und 2 (Indometacin) bzw. selektive Hemmung der COX-2 (NS-398) führen zu einer Änderung des koronaren Perfusionsdruckes nach dreistündiger Perfusion mit LTA. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus jeweils mindestens fünf Versuchen.

4.8 Überprüfung der LTA auf Kontamination mit Endotoxin

Um die beobachteten Veränderungen ausschließlich der Wirkung der LTA zuschreiben zu können und nicht einer eventuellen Kontamination mit Endotoxin, wurden die verwendeten 100 μ g-LTA-Aliquots mit dem Limulus Amebocyte Lysate Test auf eine eventuelle Verunreinigung mit LPS untersucht. Es zeigte sich, dass bei einem LPS-Gehalt von 5 pg pro 10 μ l-Aliquot, was einer Verunreinigung von 0,5 pg LPS pro mg LTA entspricht, allenfalls eine äußerst geringgradige Endotoxin-Konzentration nachgewiesen werden konnte. Der LPS-Gehalt der Perfusatproben lag unter der Nachweisgrenze des Essays.

5. Diskussion

5.1 Septische Kardiomyopathie

Mit der steigenden Inzidenz der Sepsis, wie sie seit langer Zeit zu beobachten ist, wächst auch die Bedeutung einer Funktionsbeeinträchtigung des Herzens bei septischen Erkrankungen. Der als 'akute septische Kardiomyopathie' bezeichneten Pumpschwäche des Herzens in der Sepsis wurde lange Zeit wegen scheinbar normaler Funktionsparameter eine geringe Bedeutung zugemessen. Zwar ist in der Sepsis ein gesteigertes Herzzeitvolumen zu beobachten, dies ist jedoch in Relation zum stark erniedrigten systemischen Gefäßwiderstandes nur inadäquat erhöht. Die erforderliche Steigerung der Pumpfunktion, wie sie zur Aufrechterhaltung der Perfusion erforderlich wäre, kann das septisch geschädigte Herz jedoch häufig nicht erbringen. Damit trägt die septische Kardiomyopathie zur Letalität der Sepsis bei. Wird die Sepsis jedoch überlebt, so kann die septische Kardiomyopathie innerhalb kurzer Zeit folgenlos ausheilen.^{2,3,7,8,10,17,18}

An der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie scheinen unterschiedliche Mechanismen beteiligt zu sein. Zum einen kommt es in der Sepsis zur exzessiven Produktion von Zytokinen, von denen einige potentiell kardiodepressive Eigenschaften aufweisen und durch direkte Einwirkung auf das Herz dessen Pumpleistung vermindern.^{31,41,42,43} Daneben scheint auch eine Durchblutungsstörung des Herzens eine Funktionsverminderung zu verursachen. Dabei ist die globale Durchblutung des Herzens jedoch unverändert.^{13,14,69} Vielmehr führt eine unphysiologische Verteilung der Durchblutung mit einem Nebeneinander von über- und unterversorgten Arealen zu einer Schwächung des Herzens.^{78,79} Ähnliche Mikrozirkulationsstörungen mit der Entwicklung von funktionellen Shunts sind in der Sepsis als Auslöser von Störungen anderer Organsysteme bereits bekannt.⁷⁰⁻⁷⁷

Eine Sepsis kann prinzipiell als Folge einer Infektion der unterschiedlichsten Mikroorganismen wie Viren, Pilze oder Protozoen entstehen. Häufigste Erreger einer Sepsis sind jedoch Bakterien. Dabei müssen die Bakterien allerdings nicht intakt sein. Sowohl von Bakterien sezernierte Exotoxine als auch Bestandteile der Bakterienwand sind allein in der Lage, ein septisches Erkrankungsbild zu verursachen. Dabei ist besonders für Lipopolysaccharid, ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, anhand zahlreicher Untersuchungen eine deutliche kardiodepressive Wirkung nachgewiesen worden.^{132,133,134} Weit weniger gut erforscht

sind dagegen die pathophysiologischen Mechanismen grampositiver Bakterien auf die Entstehung der septischen Kardiomyopathie, obwohl gerade grampositive Bakterien in zunehmendem Maße für die Entstehung septischer Erkrankungen verantwortlich sind.¹⁴¹ Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, nähere Erkenntnisse über die Auswirkung des Zellwandbestandteils Lipoteichonsäure des grampositiven Stäbchenbakteriums *Staphylococcus aureus* auf das isoliert perfundierte Rattenherz zu erhalten.

5.2 LTA bewirkt am Herzen eine Minderung der Kontraktilität

Eine Schwächung des Herzens durch verschiedene bakterielle Pathogene bei septischen Erkrankungen konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden. So führte eine experimentell erzeugte Endotoxinämie in Ganztiermodellen oder beim gesunden Menschen zu den kardiovaskulären Veränderungen, wie sie auch in der Sepsis beobachtet werden können.^{53,69,133} Auch an zellfrei perfundierten Rattenherzen wurden für einzelne bakterielle Pathogenitätsfaktoren kardiodepressive Effekte reproduziert. So konnten bei einer Perfusion der Herzen mit den Exotoxinen *E.coli*-Hämolysin oder *Staphylococcus aureus*- α -Toxin sowie mit LPS, dem Endotoxin gramnegativer Bakterien, ausgeprägte Störungen der Kontraktilität beobachtet werden.^{47,80,109,119,164}

Obwohl dem Zellwandbestandteil LTA grampositiver Bakterien im Rahmen septischer Erkrankungen bereits in verschiedenen Studien pathogene Wirksamkeit nachgesagt wurde,^{143,147,149,150} ist über dessen Beteiligung an der septischen Kardiomyopathie noch wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit führte eine Perfusion des Herzens mit LTA im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeitabhängig zu Veränderungen der beobachteten physiologischen Parameter. So zeigte sich eine Schwächung der Kontraktilitätsparameter LVDP und dP/dt_{max} , welche nach etwa 90 minütiger Perfusion der Herzen mit LTA begann und sich im Verlauf noch verstärkte. Nach dreistündiger Perfusion der Herzen war eine durch LTA verursachte deutliche Schwächung der Kontraktilität zu beobachten. Auch der CPP als Maß der Durchblutung des Herzens wurde durch die Perfusion mit LTA beeinflusst. Unter Verwendung von LTA zeigte sich ein Anstieg des CPP verglichen mit der Kontrollgruppe, welcher jedoch nicht sehr ausgeprägt war. Diese Beobachtungen scheinen für eine kardiodepressive Wirkung des grampositiven Zellwandbestandteil LTA zu sprechen, wie dies für die in gramnegativen Bakterien vorhandene LPS bereits seit langem bekannt ist.^{119,132-134} Eine dosisabhängige Wirkung der

LTA wurde dabei nicht festgestellt. Höhere Konzentrationen von LTA erbrachten ähnliche Ergebnisse, niedrigere Konzentrationen blieben wirkungslos. LTA wurde daher in der Konzentration von 2 µg/ml Perfusat eingesetzt, was mit der Konzentration an Endotoxin in anderen Arbeiten mit isoliert perfundierten Herzen vergleichbar ist.¹¹⁹

Um die beobachteten physiologischen Veränderungen nur der LTA zuschreiben zu können, musste eine eventuelle Verunreinigung mit LPS, was besonders bei Verwendung kommerziell erwerblicher LTA-Präparationen zur fälschlich der LTA zugesprochenen Wirkung geführt hatte,^{143,147,159,160} ausgeschlossen werden. Daher wurden für die Versuche ausschließlich gereinigte und sterilisierte Glasgefäße und Schläuche verwendet. Eine Verunreinigung der lyophilisierten LTA durch Endotoxin konnte unter Verwendung des Limulus-Tests ausgeschlossen werden.

5.3 Freisetzung von TNF- α bei Perfusion des Herzens mit LTA

In der Sepsis kommt es zur massiven Ausschüttung zahlreicher Zytokine. So lässt sich unter anderem ein erhöhter Spiegel von TNF- α im Blut septischer oder endotoxinämischer Patienten nachweisen.^{2,163} Bei verschiedenen Erkrankungen des Herzens, wie chronischer Herzinsuffizienz, akuter Herzinfarkt oder Myokarditis spielt TNF- α eine wichtige Rolle.³⁶ Auch bei der Entstehung der in der Sepsis zu beobachtenden Funktionsstörung des Herzens scheint TNF- α unmittelbar beteiligt zu sein. Applikation von TNF- α führte im Ganztiermodell an Hunden^{42,53} und Ratten^{41,54} zu einer konzentrationsabhängigen Schwächung der Kontraktilität. Dabei applizierten Natanson et al. Hunden in der einen Gruppe LPS, in der anderen TNF- α . Eine fast identische Schwächung des Herzens, wie sie durch Applikation von TNF- α zu beobachten war, konnte dabei auch durch alleinige Gabe von LPS ausgelöst werden. Dies spricht für eine durch TNF- α vermittelte Wirkung von LPS auf das Herz.⁵³ Auch an isoliert perfundierten Rattenherzen konnte in verschiedenen Studien unter Verwendung von LPS eine vermehrte Produktion von TNF- α registriert werden, gefolgt von einer zunehmenden Einschränkung der Pumpfunktion.^{47,119,164}

Die Perfusion der isolierten Rattenherzen mit LTA führte zu einer deutlichen Ausschüttung von TNF- α ins Perfusat verglichen mit den Kontrollversuchen. Es konnte eine dosisabhängige Beeinflussung des Herzens durch TNF- α beobachtet werden. Vom zeitlichen Verlauf lässt sich die steigende Konzentration von TNF- α gut mit der beobachteten zunehmenden Schwächung der Kontraktilität vereinbaren. Dass die beobachtete Kontraktilitätsstörung durch

TNF- α verursacht wurde, zeigte sich auch durch Verwendung eines Antikörpers gegen TNF- α . Wurde das produzierte TNF- α neutralisiert, so war eine Minderung der Pumpfunktion der Herzen nicht mehr festzustellen. Der Produktion von TNF- α bei der Perfusion mit LTA ging dabei eine gesteigerte TNF- α -mRNA-Expression im Myokard des linken Ventrikels voraus. Der Produktionsort des TNF- α kann in der vorliegenden Untersuchung nicht eindeutig bestimmt werden. In bisherigen Studien konnten Endothel- und glatte Muskelzellen sowie auch Kardiomyozyten selbst als Orte der TNF- α -Produktion ausgemacht werden.^{39,40}

Das produzierte TNF- α kann am Herzen über verschiedene Mechanismen zu einer Minderung der Kontraktilität führen.⁴⁴ Durch eine Aktivitätssteigerung der Sphingomyelinase kommt es zur vermehrten Produktion von Sphingosin. Dieses bewirkt durch eine intrazelluläre Verringerung der Calciumfreisetzung eine frühe Störung der Kontraktilität, welche Calcium-abhängig ist.⁴⁵⁻⁴⁸ Dieser Pathomechanismus ist mit dem Zeitverlauf der LTA-abhängigen Kardiodepression, wie sie im vorliegenden Modell beobachtet wurde, durchaus vereinbar. Daneben kann auch durch eine Stimulation der konstitutionellen und der induzierbaren NO-Synthase durch TNF- α eine Störung der Calciumhomöostase bewirkt werden, was in der Folge zu einer frühen oder auch späten Störung der Kontraktilität des Herzens führt.⁴⁹⁻⁵²

Eine deutliche Ausschüttung von NO in das Perfusat wäre dabei zu erwarten gewesen. Bei der vorliegenden Arbeit war jedoch sowohl bei den Versuchen mit LTA als auch bei den Kontrollen eine kontinuierliche Ansammlung der Stoffwechselprodukte NO_x festzustellen. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war dabei sehr gering. Somit ist eine durch cNOS vermittelte Wirkung von LTA eher auszuschließen. Eine Aussage über eine TNF- α -vermittelte Kontraktilitätsstörung durch Induktion der iNOS kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht gemacht werden. Dies liegt daran, dass für eine signifikante Induktion der iNOS mehrere Stunden benötigt werden, die isoliert perfundierten Herzen jedoch nur in einem Zeitfenster von drei Stunden beobachtet wurden.⁵² Eine vermehrte Produktion von NO hätte daher eventuell bei einer Verlängerung der Perfusionszeit über drei Stunden hinaus beobachtet werden können. Dies ist jedoch wegen des Versuchsaufbaus und der limitierten Überlebenszeit der isolierten Herzen nicht möglich. Die kontinuierliche Steigerung von NO_x im Perfusat bei beiden Gruppen kommt vermutlich durch die basale Aktivität der konstitutionellen NOS zustande, die über die Produktion von NO für die Vasoregulation im koronaren Gefäßbett sorgt.

Es ist bekannt, dass zahlreiche Wirkungen von LPS auf Zielzellen durch den CD14-Oberflächenrezeptor vermittelt werden. Auch auf Kardiomyozyten konnte dieser Rezeptor nachgewiesen werden. Eine durch LPS verursachte verstärkte Bildung von TNF- α durch

Kardiomyozyten wurde zumindest partiell durch CD14-Rezeptoren vermittelt.^{135,165} Dass auch LTA über den CD14-Rezeptor wirkt, konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden. So wurden Wirkungen der LTA auf immunkompetente Zellen wie Monozyten oder T-Zellen, unter anderem mit verstärkter Produktion von TNF- α , über einen CD14-abhängigen Weg aufgezeigt.^{151-154,166}

In der vorliegenden Arbeit konnte bei der Blockade des CD14-Rezeptors eine Abschwächung der durch LTA hervorgerufenen Veränderungen am Herzen bewirkt werden. Die durch LTA verursachte TNF- α -Ausschüttung des Herzens konnte deutlich reduziert werden, die negativ inotrope Wirkung wurde komplett aufgehoben. Eine Reduktion der TNF- α -Freisetzung durch eine Blockade des CD14-Rezeptors deutet auf eine zumindest partielle Regulation der durch LTA hervorgerufenen TNF- α -Produktion über den CD14-Oberflächenrezeptor hin. Da die Kontraktilität des Herzens trotz geringerer aber immer noch vorhandenen TNF- α -Produktion in gleichem Niveau wie die Kontrollen sind, deutet darauf hin, dass auch andere negativ inotrope Effekte als TNF- α über den CD14-Rezeptor moduliert werden. Allerdings müssen die kardiodepressiven Einflüsse nicht nur durch CD-14-vermittelt sein, denn andererseits wurden für die durch LPS ausgelöste negativ inotrope Wirkung auf das Herz auch CD14-unabhängige Mechanismen vermutet.¹³⁶ Auch bei Untersuchungen von durch LTA verursachten Auswirkungen auf verschiedene Zellen wurden CD14-unabhängige Wege beschrieben.^{155,156}

5.4 Mikrozirkulationsstörungen als Auslöser der septischen Kardiomyopathie

Eine Minderung der Kontraktilität des Herzens in der Sepsis ist nicht immer allein auf die direkte Einwirkung negativ inotroper Substanzen zurückzuführen. Auch eine Störung der Myokarddurchblutung kann zu einer Einschränkung der Pumpfunktion führen. Dabei scheint das Herz in der Sepsis nicht global vermindert durchblutet zu sein, was durch normale oder sogar erhöhte Durchblutung der Koronargefäße gezeigt werden konnte.^{13,14,69} Eine Störung der Mikrozirkulation bei normalem globalem Blutfluss konnte als Ursache von Organfunktionsstörungen verschiedener Organe wie Lunge, Darm oder Leber in der Sepsis ausgemacht werden.⁷⁰⁻⁷⁷ Ähnliche Beobachtungen mit einem Nebeneinander von über- und unterperfundierten Arealen als Auslöser einer Organstörung ließen sich bei experimenteller Endotoxämie auch am Herz nachweisen. Sowohl am Ganztiermodell als auch am isoliert perfundierten Rattenherz konnte unter Verwendung von LPS, *Staphylococcus aureus*- α -Toxin oder *E. coli*-

Hämolyse eine durch Mikrozirkulationsstörungen verursachte Kardiodepression beobachtet werden.^{78-80,109,118}

Auch wenn die Minderung der Kontraktilität in der vorliegenden Arbeit nicht unmittelbar auf den Einfluss von Mikrozirkulationsstörungen zurückzuführen war, so könnten die beobachteten vasomotorischen Phänomene durchaus jenseits des Beobachtungszeitraums von drei Stunden zum Tragen kommen. Thromboxan A₂ und Prostaglandin I₂ werden nicht nur von der konstitutionellen COX-1 sondern auch von der induzierbaren COX-2 bei verschiedenen Erkrankungen produziert.¹¹³ Die COX-2 ist vor allem unter pathologischen Bedingungen auch am Herzen nachzuweisen und wird mit verschiedenen Erkrankungen des Herzens in Verbindung gebracht. So konnte beispielsweise im Myokard septischer Patienten eine verstärkte Expression der COX-2 gefunden werden.^{114,115} Das von der COX produzierte TxA₂ wirkt vasokonstriktiv, PGI₂ vasodilatativ. In der Sepsis können beide Prostanoiden vermehrt im Plasma nachgewiesen werden, wobei die Höhe des TxA₂-Spiegels mit Schwere und Mortalität der Erkrankung korreliert.¹¹⁶ Vermutlich können beide Prostanoiden über eine Störung der Mikrozirkulation zur schlechten Prognose des Krankheitsbildes beitragen.¹¹⁸

Die Perfusion der isolierten Herzen mit LTA führte zu einer deutlichen Ausschüttung von TxA₂ ins Perfusat. Dies war jedoch nur von einem geringen Anstieg des Perfusionsdruckes begleitet. Möglicherweise lag dies an einer vermehrten Produktion des vasodilatativ wirksamen PGI₂, welcher durch LTA ebenfalls vermehrt gebildet wird. Dass die Steigerung des koronaren Gefäßwiderstandes durch TxA₂ verursacht wird, zeigte sich bei Verwendung eines spezifischen Tx-Antikörpers und Inhibition der Cyclooxygenase. Wurde die Wirkung des durch LTA vermehrt produzierten TxA₂ durch Antagonisierung (Daltroban) oder verminderte Bildung (Indometacin, NS398) beeinflusst, so normalisierte sich der zuvor beobachtete Anstieg des Perfusionsdruckes. Die in der PCR beobachtete Hochregulation der COX-2-mRNA und die Versuche mit NS398 deuten darauf hin, dass die vermehrte Produktion der Prostanoiden durch eine gesteigerte Induktion der COX-2 im Myokard verursacht zu sein scheint. Eine verstärkte Aktivität der COX-2 durch Einwirkung von LTA konnte bisher bereits an menschlichen pulmonalen Epithelzellen beobachtet werden.¹⁶⁷

Die durch LTA bewirkte Änderung der koronaren Perfusion ist in der vorliegenden Arbeit eher weniger für die beobachtete Minderung der Kontraktilität verantwortlich. Dies bedeutet jedoch nicht, dass durch LTA ausgelöste Funktionsstörungen am Herzen nicht auch durch Störungen der Mikrozirkulation mitverursacht sein können. Die Induktion der COX-2 war nach drei Stunden Perfusion mit LTA bereits verstärkt, bei längerer Beobachtung wird sie vermutlich noch stärker zunehmen. Daher ist davon auszugehen, dass die Produktion der

Prostanoide und die durch sie verursachten Störungen der Durchblutung mit zunehmendem Zeitverlauf eher noch zunehmen werden. Bei der vorliegenden Untersuchungstechnik mit Langendorff-perfundierten Herzen ist eine für diese Fragestellung erforderliche Ausweitung des Beobachtungszeitraums jedoch nicht möglich, so dass die vermutete Beteiligung von Durchblutungsstörungen an der durch LTA ausgelösten Beeinträchtigung des Herzens nicht ausreichend erklärt werden kann.

5.5 Klinische Bedeutung

Nach wie vor ist die Sepsis eine gefürchtete Komplikation zahlreicher Erkrankungen. Obgleich sowohl in der medikamentösen Behandlung als auch der supportiven Intensivtherapie deutliche Fortschritte gemacht wurden, nimmt die Todesrate der Sepsis weiter zu.^{3,4,142} Besonders gefürchtet ist dabei das Auftreten von verschiedenen Organfunktionsstörungen im Verlauf der Erkrankung. Auch das Herz kann von einer solchen Störung betroffen sein. Dabei ist es dem Herzen unmöglich, das aufgrund generalisierter Vasodilatation geforderte hohe Blutvolumen in entsprechendem Maße auszuwerfen. Dieses Krankheitsbild wird dann als 'septische Kardiomyopathie' bezeichnet.

Zur Pathogenese der septischen Kardiomyopathie tragen vermutlich zwei verschiedene Mechanismen bei. Zum einen werden im Verlauf einer septischen Erkrankung vom Körper zahlreiche Zytokine gebildet, von denen einige eine direkte negativ inotrope Wirkung auf das Herz haben. Zum anderen tragen Störungen der Myokarddurchblutung auf der Ebene der Mikrozirkulation zur Schwächung des Herzens in der Sepsis bei.

Als wichtige Pathogene bekannt sind Exotoxine wie das *E. coli*-Hämolyisin oder *Staphylococcus aureus*- α -Toxin und vor allem Endotoxine von gramnegativen Bakterien. Vergleichsweise wenig bekannt ist dagegen über die möglichen Pathomechanismen grampositiver Zellwandbestandteile wie LTA, obwohl grampositive Erreger bei steigender Tendenz bereits zu 50% Verursacher septischer Erkrankungen sind.^{141,142}

In der vorliegenden Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass der Zellwandbestandteil LTA des grampositiven Bakteriums *Staphylococcus aureus* ein wichtiges Pathogen im Rahmen der septischen Kardiomyopathie ist. Dabei wird die negativ inotrope Wirkung der LTA vermutlich vor allem durch eine gesteigerte Synthese von TNF- α vermittelt, die wiederum partiell CD14-Rezeptor-abhängig ist. Darüber hinaus war eine von LTA verursachte leichte Veränderung der Myokarddurchblutung festzustellen. Obwohl sie im beobachteten Zeitfenster vermut-

lich eher weniger zur durch LTA verursachten Kardiodepression beitrug, so kann theoretisch dadurch auch eine später einsetzende Störung der Kontraktilität verursacht werden.

Man muss jedoch beachten, dass die Ergebnisse am isoliert perfundierten Herzen gewonnen wurden. Daher kann man nicht unbedingt voraussagen, wie die Ergebnisse auf den gesamten Organismus zu übertragen sind. Im vorliegenden Modell wurde unter Abwesenheit zirkulierender Zellen gearbeitet, welche die pathogene Wirkung der LTA durchaus aggravieren könnten. Aufgrund der Methode konnten die Herzen nur für wenige Stunden beobachtet werden, über etwaige Langzeitwirkungen kann man daher nur spekulieren. Auch über die im Blutplasma vorhandenen Konzentrationen an pathogenen Bakterienbestandteilen liegen keine eindeutigen Ergebnisse vor. Bisher durchgeführte Studien wurden aber mit ähnlichen Konzentrationen an LTA durchgeführt.¹⁴² In entsprechenden Versuchen mit LPS wurden zur vorliegenden Untersuchung vergleichbare Konzentrationen an LPS eingesetzt.¹¹⁹ Außerdem ist noch zu beachten, dass die vorliegenden Ergebnisse an Herzen der Ratte erhoben wurden. Inwieweit diese Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden können ist unklar. Doch können hierdurch wichtige Erkenntnisse zur Pathogenität von Bakterien erworben werden, welche wiederum auch auf den menschlicheren Organismus einwirken könnten.

Daher konnte in der vorliegenden Arbeit der LTA neben den bisher bekannten Auswirkungen auf verschiedene Organsysteme auch eine Beteiligung an der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie zugesprochen werden. Besonders interessant sind diese Erkenntnisse wegen einer deutlichen Zunahme von septischen Erkrankungen, welche durch grampositive Bakterien ausgelöst werden, darunter vor allem *Staphylococcus aureus* als besonders virulenter Keim. Durch Einsatz von Antibiotika oder immunologische Reize kann es zum Zerfall der Bakterien mit der Folge einer hohen Konzentration von Zellwandbestandteilen wie LTA im Blut kommen. Die direkte Konfrontation des Organismus mit einzelnen Zellwandbestandteilen macht es notwendig, nähere Erkenntnisse in der Pathophysiologie dieser Mechanismen zu gewinnen.

6. Zusammenfassung

Trotz vieler verbesserter Behandlungsmöglichkeiten ist die Todesrate bei Sepsis in den vergangenen Jahren deutlich angestiegen. Darum gewinnt dieses Krankheitsbild in der modernen Medizin zunehmend an Bedeutung. Eine besonders schlechte Prognose geht mit dem Auftreten von verschiedenen Organfunktionsstörungen einher. Von einer solchen Störung kann in der Sepsis auch das Herz betroffen sein. Dabei ist es dem Herz nur bedingt möglich, adäquat mit einer Erhöhung des Herzminutenvolumen der in der Sepsis vorliegenden Erniedrigung des Blutdrucks entgegenzuwirken. Klinische Befunde dieser wegen erhöhtem Herzminutenvolumen auch als hyperzirkulatorisch bezeichneten Herzinsuffizienz sind eine Dilatation beider Ventrikel mit einer Verminderung der Ejektionsfraktion sowie Wandbewegungsstörungen des Myokards.

Die septische Kardiomyopathie kann von zwei verschiedenen Pathomechanismen verursacht werden. Zum einen wirken zahlreiche kardiodepressive Zytokine wie TNF- α direkt auf das Herz ein und zum anderen tragen Mikrozirkulationsstörungen des Myokardgewebes zu einer Schwächung des Herzens bei. Auslöser einer Sepsis und in der Folge auch einer septischen Kardiomyopathie können die verschiedensten Mikroorganismen sein. Dabei müssen diese nicht unbedingt intakt sein. Septische Krankheitsbilder können auch durch von Bakterien sezernierte Exotoxine oder durch Zellwandbestandteile ausgelöst werden. Besonders der Zellwandbestandteil LPS gramnegativer Bakterien ist dabei sehr gut untersucht. Weit weniger bekannt sind dagegen die Pathomechanismen grampositiver Bakterien, ganz im Gegensatz zu ihrer immer weiter zunehmenden klinischen Bedeutung.

Für den Zellwandbestandteil LTA grampositiver Bakterien wurden bisher pathogene Wirkungen auf verschiedene Zellsysteme beschrieben. Ziel der vorliegenden Arbeit war, am isoliert perfundierten Rattenherz die mögliche Beeinflussung der Herzfunktion durch den Zellwandbestandteil LTA des grampositiven Bakteriums *Staphylococcus aureus* zu untersuchen. Darüber hinaus sollten Erkenntnisse über die Pathogenese der durch LTA ausgelösten Veränderungen gewonnen werden.

Die Perfusion des isolierten Rattenherzens führte zu einer zeitabhängigen Schwächung des Herzens. Die Minderung der Kontraktilität war dabei von einer leichten Steigerung des koronaren Perfusionsdruckes begleitet. Mit der Schwächung des Herzens war gleichzeitig eine verstärkte Freisetzung von TNF- α ins Perfusat festzustellen. Antagonisierung der TNF- α -

Wirkung durch Verwendung eines Antikörpers verhinderte die durch LTA hervorgerufene Kontraktilitätsstörung. Die Blockade des CD14-Rezeptors führte zu einer deutlichen Verminderung der TNF- α -Produktion und wendete die Herzfunktionsstörung durch LTA ebenfalls ab. Eine gesteigerte Freisetzung von NO bei Perfusion der Herzen mit LTA war nicht festzustellen. Zur Steigerung des Perfusionsdrucks durch LTA war eine vermehrte Synthese der vasoaktiven Cyclooxygenaseprodukte Thromboxan A₂ und Prostacyclin zu verzeichnen. Eine Hemmung der Cyclooxygenase verhinderte den unter LTA-Perfusion zu beobachtenden Anstieg des Perfusionsdruckes.

Die gewonnenen Ergebnisse legen nahe, dass die durch Perfusion mit LTA ausgelöste Kontraktilitätsstörung des isoliert perfundierten Rattenherzens durch eine partiell CD14-abhängige Freisetzung von TNF- α verursacht wird. Die durch vermehrte Produktion der Cyclooxygenaseprodukte Thromboxan A₂ und Prostacyclin verursachte Änderung der koronaren Zirkulation könnte zu der durch LTA verursachten Herzfunktionsstörung beitragen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass der Zellwandbestandteil LTA von *Staphylococcus aureus* ein wichtiger pathogener Bestandteil grampositiver Organismen bei der Verursachung septischer Krankheitsbilder ist.

7. Summary

Despite improved therapeutic management, mortality rate of sepsis clearly has increased in the last years. For that reason, the syndrome of sepsis gets more and more important in modern medicine. Prognosis of sepsis syndrome becomes poor when it is associated with organ dysfunction. Dysfunction of the heart is part of the multiple organ dysfunction syndrome in sepsis. The heart of septic patients is frequently unable to increase cardiac output adequately to compensate the systemic fall in blood pressure due to an extensive vasodilatation in sepsis. Clinical findings of septic cardiomyopathy are dilatation of both ventricles, reduced ejection fractions and global as well as regional contractile dysfunction of myocardium.

Septic cardiomyopathy can be caused by two different pathogenetic mechanisms. On one hand, myocardial depression results from the direct or indirect negative inotropic effects of various circulating cytokines like TNF- α . On the other hand, microcirculatory dysfunction and heterogeneous myocardial blood flow can contribute to cardiac dysfunction. Sepsis can be initiated by various microorganisms. It is not necessary, that these microorganisms are fully intact. Sepsis syndrome can also be induced by exotoxins which are actively secreted by bacteria or by parts of the bacterial cell wall. Especially Lipopolysaccharide from the cell wall of gram-negative bacteria has been well investigated. Despite of growing importance of gram-positive bacteria, little is known about their pathogenic mechanisms.

For lipoteichoic acid, a component of the cell wall of gram-positive bacteria, pathogenetic effects on various cell types have been described. The aim of the present study was to investigate cardiac alterations caused by the cell wall component lipoteichoic acid from the gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* on isolated perfused rat heart. In addition, pathogenetic mechanisms of alterations induced by lipoteichoic acid should be elucidated.

Perfusion of the isolated rat hearts lead to a time-dependant cardiac depression, paralleled by a moderate increase in coronary perfusion pressure. Impairment of contractility was accompanied by accumulation of TNF- α in the recirculating perfusate. TNF- α antibodies completely abolished the loss of contractility caused by lipoteichoic acid. Antagonism of CD14-receptor lead to distinct decline of TNF- α -production and prevented the myocardial depression induced by lipoteichoic acid. Perfusion of the hearts with lipoteichoic acid did not affect the release of NO. The increase of coronary perfusion pressure caused by LTA was accompanied

by liberation of the vasoactive eicosanoids thromboxane A₂ and prostacyclin. Inhibition of myocardial cyclooxygenase abolished the increase of coronary perfusion pressure by LTA. In conclusion, cell-free perfusion of isolated rat hearts with LTA results in cardiac dysfunction by a partially CD14-dependant release of TNF- α . Myocardial depression in LTA-perfused hearts may be further enhanced by the occurrence of regional perfusion abnormalities as indicated by the release of cyclooxygenase products thromboxane A₂ and prostacyclin. These findings further show that the cell wall component lipoteichoic acid of *Staphylococcus aureus* is an important pathogenic stimulus in induction of sepsis by gram-positive organism.

8. Auflistung der verwendeten Abkürzungen

AA	Arachidonsäure (arachidonic acid)
α -Toxin	<i>Staphylococcus aureus</i> -alpha-Toxin
bp	Basenpaare
CD	Oberflächenmolekül (cluster of differentiation)
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cNOS	konstitutionelle NO-Synthase (NOS III)
COX	Cyclooxygenase
CPP	koronarer Perfusionsdruck (coronary perfusion pressure)
dP/dt_{max}	maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EET	Epoxyeicosanoide (epoxyeicosatrienoic acid)
EF	Auswurfraction (ejection fraction)
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunosorbenstest (enzyme linked immunosorbent assay)
ET	Endothelin
HZV	Herzzeitvolumen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase (NOS II)
LAL	Limulus Amöbozyt Lysat
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
LTA	Lipoteichonsäure (lipoteichoic acid)
LVDP	Linksventrikulärer Druck (left ventricular developed pressure)
M	mol/l
MDS	myocardial depressant substances
MODS	multiple organ dysfunction syndrome
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NO	Stickstoffmonoxid

Abkürzungen

NO _x	Nitrat und Nitrit als Abbauprodukte von Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBGD	Porphobilinogen-Deaminase
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
PepG	Peptidoglykan
PGI ₂	Prostacyclin
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	Standardabweichung (standard error of the mean)
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
Tx	Thromboxan

9. Literaturverzeichnis

- ¹ Schuster, H.-P., U. Müller-Werdan. Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen. In: Schuster, H.-P., K. Werdan. Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen. 3.Aufl.. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (2000) pp.3-26.*
- ² Bone, R.C. The Pathogenesis of Sepsis. *Annals of Internal Medicine (1991) 115:457-469.*
- ³ Centers for Disease Control. Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicaemia – United States, 1979-1987. *Morb Mortal Wkly Rep (1990) 39:31-34.*
- ⁴ Bone, R.C., C.J. Grodzin, R.A. Balk. Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process. *Chest (1997) 112:235-43.*
- ⁵ Baue, A.E., R. Durham, E. Faist. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? *Shock (1998) 10:79-89.*
- ⁶ American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definition of sepsis and multiple organ failure, and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med (1992) 20:864-74.*
- ⁷ Parrillo, J.E. Pathogenetic Mechanisms of Septic Shock. *N Engl J Med (1993) 328:1471-1478.*
- ⁸ Müller-Werdan, U., R. Prondzinsky, R. Witthaut, N. Stache, K. Heinroth, C. Kuhn, H. Schmidt, I. Busch, K. Werdan. Das Herz bei Sepsis und MODS. *Wien Klin Wochenschr (1997) 1:3-24.*
- ⁹ Schuster, H.-P. Schlußfolgerungen. In: Werdan, K., H.-P. Schuster, G. Schlag, G. Spilker, R. Neumann. Sepsis: Toxinwirkung, Herzschädigung, Quantifizierung, supportive Therapie mit Immunglobulinen. *Intensivmed (1989) 26:152-153.*

- ¹⁰ Parrillo, J.E. The cardiovascular pathophysiology of sepsis. *Ann Rev Med (1989) 40:469-485.*
- ¹¹ Ellrodt, A.G., M.S. Riediger, A. Kimchi, D.S. Berman, J. Maddahi, G.H. Murata. Left ventricular performance in septic shock: Reversible segmental and global abnormalities. *Am Heart J (1985) 110:402-409.*
- ¹² Jafri, S.M., S. Lavine, B.E. Field, M.T. Bahorozian, R.W. Carlson. Left ventricular diastolic function in sepsis. *Crit Care Med (1991) 18:709-714.*
- ¹³ Cunnion, R.E., G.L. Schaer, M.M. Parker, C. Natanson, J.E. Parrillo. The coronary circulation in human septic shock. *Circulation (1986) 73:637-44.*
- ¹⁴ Dhainaut, J.F., M.F. Huyghebaert, J.F. Monsallier, G. Lefevre, J. Dall'Ava-Santucci, F. Brunet, D. Villemant, A. Carli, D. Raichvarg. Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose, and ketones in patients with septic shock. *Circulation (1987) 75:533-41.*
- ¹⁵ Prodzinsky, R., N. Stache, R. Witthaut, M. Winkler, P. Fraunberger, A.K. Walli, D. Seidel, K. Werdan. Multiorganversagen (MOV) mit und ohne Sepsis – Inzidenz supra- und ventrikulärer Arrhythmien. *Wien Klin Wochenschr (1997) 109:FV13.*
- ¹⁶ Müller-Höcker, J., W. Haerty. Pathomorphological aspects of the heart in septic patients. In: Schlag, G., H. Redl. Pathophysiology of shock, sepsis and organ failure. *Springer (1993) pp 853-858.*
- ¹⁷ Parker, M.M., J.H. Shelhamer, S.L. Bacharach. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med (1984) 100:483-490.*
- ¹⁸ Parrillo, J.E. Septic Shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction and therapy. *Ann Intern Med (1990) 113:227-242.*

- ¹⁹ Fisher C.J. Jr., J.M. Agosti, S.M. Opal, S.F. Lowry, R.A. Balk, J.C. Sadoff, E. Abraham, R.M. Schein, E. Benjamin. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* (1996) 334(26):1697-1702.
- ²⁰ Bernard, G.R., A.P. Wheeler, J.A. Russell, R. Schein, W.R. Summer, K.P. Steinberg, W.J. Fulkerson, P.E. Wright, B.W. Christman, W.D. Dupont, S.B. Higgins, B.B. Swindell. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. *N Engl J Med* (1997) 336:912-918.
- ²¹ Müller-Werdan, U., K. Werdan. Prophylaxe und Therapie der akuten septischen Kardiomyopathie. In: Schuster, H.-P., K. Werdan. Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen. 3.Aufl.. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York* (2000) pp.333-396.
- ²² Semb, A.G., K. Ytrehus, J. Vaage, R. Myklebust, O.D. Mjos. Functional impairment in isolated rat hearts induced by activated leukocytes: protective effect of oxygen free radical scavengers. *J Mol Cell Cardiol* (1989) 21:877-887.
- ²³ Schrier, G.M., M.L. Hess. Quantitative identification of superoxide anion as a negative inotropic species. *Am J Physiol* (1988) 255:H138-143.
- ²⁴ Brigham, K.L.. Oxygen radicals – an important mediator of sepsis and septic shock. *Klin Wochenschr* (1991) 69:1004-1008.
- ²⁵ Khadour F.H., D. Panas, P. Ferdinandy, C. Schulze, T. Csont, M.M. Lalu, S.M. Wildhirt, R. Schulz. Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2002) 283(3):H1108-1115.
- ²⁶ Wiggers, C.J. Myocardial depression in shock. A survey of cardiodynamic studies. *Am Heart J* (1947) 33:633-650.
- ²⁷ Brand, E.D., A.M. Lefer. Myocardial depressant factor in plasma from cats in irreversible post-oligemic shock. *Proc Soc Exp Biol Med* (1966) 122:200-203.

- ²⁸ Lovett, W.L., S.L. Wangenstein, T.M. Glenn, A.M. Lefer. Presence of a myocardial depressant factor in patients with circulatory shock. *Surgery (1971) 70:223-231.*
- ²⁹ Maksad A.K., C.J. Cha, R.C. Stuart, F.A. Brosco, G.H. Clowes Jr. Myocardial depression in septic shock: Physiologic and metabolic effects of a plasma factor on an isolated heart. *Circ Shock Suppl (1979) 1:35-42.*
- ³⁰ McConn, R. J.K. Greineder, F. Wasserman, G.H. Clowes Jr. Is there a humoral factor that depresses ventricular function in sepsis? *Circ Shock (1979) 1:9-22.*
- ³¹ Kumar, A., V. Thota, L. Dee, J. Olson, E. Uretz, J.E. Parrillo. Tumor necrosis factor α and Interleukin 1β are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med (1996) 183:949-958.*
- ³² Ridker, P.M., N. Rifai, M. Pfeffer, F. Sacks, S. Lepage, E. Braunwald. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation (2000) 101:2149-2153.*
- ³³ Levine, B., J. Kalman, L. Mayer, H.M. Fillit, M. Packer. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med (1990) 323:236-241.*
- ³⁴ Torre-Amione, G., S. Kapadia, J. Lee, R.D. Bies, R. Lebovitz, D.L. Mann. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation (1996) 92:1487-1493.*
- ³⁵ Matsumori A.. Cytokines in myocarditis and cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol (1996) 11:302-309.*
- ³⁶ Meldrum, D.R.. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol (1998) 274:R577-R595.*
- ³⁷ Hesse, D.G., K.J. Tracey, Y. Fong, K.R. Manogue, M.A. Palladino Jr., A. Cerami, G.T. Shires, S.F. Lowry. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg Gynecol Obstet (1988) 166:147-153.*

- ³⁸ Michie, H.R., K.R. Manogue, D.R. Spriggs, A. Revhaug, S. O'Dwyer, C.A. Dinarello, A. Cerami, S.M. Wolff, D.W. Wilmore. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* (1988) 318:1481-1486.
- ³⁹ Kapadia, S., J. Lee, G. Torre-Amino, H.H. Birdsall, T.S. Ma, D.L. Mann. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest* (1995) 96:1042-52.
- ⁴⁰ Meldrum, D.R., J.C. Cleveland, B.S. Cain, X. Meng, A.H. Harken. Increased myocardial tumor necrosis factor-alpha in a crystalloid-perfused model of cardiac ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* (1998) 65:439-43.
- ⁴¹ Schirmer, W.J., J.M. Schirmer, D.E. Fry. Recombinant human tumor necrosis factor produces hemodynamic changes characteristic of sepsis and endotoxemia. *Arch. Surg* (1989) 124:444-445
- ⁴² Eichenholz, P.W., P.Q. Eichacker, W.D. Hoffmann, S.M. Banks, J.E. Parrillo, R.L. Danner, C. Natanson. Tumor necrosis factor challenges in canines: patterns of cardiovascular dysfunction. *Am J Physiol* (1992) 263:H668-H675.
- ⁴³ Hegewisch, S.; J.H. Weh, D.K. Hossfeld: TNF-induced cardiomyopathy. *Lancet* (1990) 1:294-295
- ⁴⁴ Murray, D.R., G.L. Freeman. Tumor necrosis factor alpha induces a biphasic effect on myocardial contractility in conscious dogs. *Circ Res* (1995) 78:154-160.
- ⁴⁵ Müller-Werdan, U., C. Reithmann, K. Werdan. Cytokines and the heart: Molecular mechanisms of septic cardiomyopathy. R.G. Landes Company, Georgetown, USA / Chapman&Hall, New York USA, Springer, Berlin Heidelberg New York (1996)
- ⁴⁶ Oral, H., G.W. Dorn, 2nd, D.L. Mann. Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian cardiac myocyte. *J Biol Chem* (1997) 272:4836-42.

- ⁴⁷ Edmunds, N.J., H. Lal, B. Woodward. Effects of tumour necrosis factor-alpha on left ventricular function in the rat isolated perfused heart: possible mechanisms for a decline in cardiac function. *Br J Pharmacol* (1999) 126:189-96.
- ⁴⁸ Sugita, M., M. Williams, J.T. Dulaney, H.W. Moser. Ceramidase and ceramide synthesis in human kidney and cerebellum. *Biochem Biophys Acta* (1975) 398:125-131.
- ⁴⁹ Kumar, A., R. Brar, P. Wang, L. Dee, G. Skorupa, F. Khadour, R. Schulz, J.E. Parrillo. Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am J Physiol* (1999) 276:R265-76.
- ⁵⁰ Finkel, M.S., C.V. Oddis, T.D. Jacob, S.C. Watkins, B.G. Hattler, R.L. Simmons. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* (1992) 257:387-389.
- ⁵¹ Stein, B., P. Frank, W. Schmitz, H. Scholz, M. Thoenes. Endotoxin and cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. *J Mol Cell Cardiol* (1996) 28:1631-9.
- ⁵² Schulz, R., E. Nava, S. Moncada. Induction and potential biological relevance of a Ca (2+)-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol* (1992) 105:575-80.
- ⁵³ Natanson, C., P.W. Eichenholz, R.L. Danner, P.Q. Eichacker, W.D. Hoffman, G.C. Kuo, S.M. Banks, T.J. MacVittie, J.E. Parrillo. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J Exp Med* (1989) 169:823-32.
- ⁵⁴ Bozkurt, B., S.B. Kribbs, F.J. Clubb, L.H. Michael, V.V. Didenko, P.J. Hornsby, Y. Seta, H. Oral, F.G. Spinale, D.L. Mann. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* (1998) 97:1382-91.

- ⁵⁵ Yokoyama, T., L.Vaca, R.D. Rossen, W. Durante, P. Hazarika, D.L. Mann. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian heart. *J Clin Invest* (1993) 92:2303-2312.
- ⁵⁶ Okusawa, S., J.A. Gelfand, T. Ikejima, R.J. Connolly, C.A. Dinarello. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* (1988) 81:1162-72.
- ⁵⁷ Cain, B.S., D.R. Meldrum, C.A. Dinarello, X. Meng, K.S. Joo, A. Banerjee, A.H. Harken. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med* (1999) 27:1309-18.
- ⁵⁸ Herbertson, M.J., H.A. Werner, C.M. Goddard, J.A. Russel, A. Wheeler, R. Coxon, K.R. Walley. Anti-tumor necrosis factor-alpha prevents decreased ventricular contractility in endotoxemic pigs. *Am J Respir Crit Care Med* (1995) 152:480-8.
- ⁵⁹ Nelson, D.P., R.W. Samsel, L.D. Wood, P.T. Schumacker. Pathological supply dependence of systemic and intestinal O₂ uptake during endotoxemia. *J Appl Physiol* (1988) 64:2410-9.
- ⁶⁰ Walley, K.R. Heterogeneity of oxygen delivery impairs oxygen extraction by peripheral tissues: theory. *J Appl Physiol* (1996) 81:885-94.
- ⁶¹ Drazenovic, R., R.W. Samsel, M.E. Wylam, C.M. Doerschuk, P.T. Schumacker. Regulation of perfused capillary density in canine intestinal mucosa during endotoxemia. *J Appl Physiol* (1992) 72:259-65.
- ⁶² Lam, C., K. Tyml, C. Martin, W. Sibbald. Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis. *J Clin Invest* (1994) 94:2077-83.
- ⁶³ Cronenwett, J.L., S.M. Lindenauer. Direct measurement of arteriovenous anastomotic blood flow in the septic canine hindlimb. *Surgery* (1979) 85:275-82.

- ⁶⁴ Ronco, J.J., J.C. Fenwick, B.R. Wiggs, P.T. Phang, J.A. Russel, G. Tweeddale. Oxygen consumption is independent of increases in oxygen delivery by dobutamine in septic patients who have normal or increased plasma lactate. *Am Rev Respir Dis* (1993) 147:25-31.
- ⁶⁵ Astiz, M.E., E.C. Rackow, J.L. Falk, B.S. Kaufmann, M.H. Weil. Oxygen delivery and consumption in patients with hyperdynamic septic shock. *Crit Care Med* (1987) 15:26-8.
- ⁶⁶ Elkins, R.C., J.R. McCurdy, P.P. Brown, L.J. Greenfield. Effects of coronary perfusion pressure on myocardial performance during endotoxin shock. *Surg Gynecol Obstet* (1973) 137:991-6.
- ⁶⁷ Hinshaw, L.B., L.T. Archer, J.J. Spitzer, M.R. Black, M.D. Peyton, L.J. Greenfield. Effects of coronary hypotension and endotoxin on myocardial performance. *Am J Physiol* (1974) 227:1051-1057.
- ⁶⁸ Peyton, M.D., L.B. Hinshaw, L.J. Greenfield, R.C. Elkins. The effects of coronary vasodilatation on cardiac performance during endotoxin shock. *Surg Gynecol Obstet* (1976) 143:533-8.
- ⁶⁹ Lee, K.J., S.W. Dziuban jr., H. van der Zee, R.D. Goldfarb. Cardiac function and coronary flow in chronic endotoxemic pigs. *Proc Soc Exp Biol Med* (1988) 189:245-52.
- ⁷⁰ Seeger, W., H. Walter, N. Suttorp, M. Muhly, S. Bhakdi. Thromboxane-mediated hypertension and vascular leakage evoked by low doses of Escherichia coli hemolysin in rabbit lungs. *J Clin Invest* (1989) 84:220-7.
- ⁷¹ Walmrath, D., M. Scharmann, R. König, J. Pilch, F. Grimminger, W. Seeger. Staphylococcal alpha-toxin induced ventilation-perfusion mismatch in isolated blood-free perfused rabbit lungs. *J Appl Physiol* (1993) 74:1972-80.

- ⁷² Walmrath, D., J. Pilch, M. Scharmann, F. Grimminger, W. Seeger. Severe VA/Q mismatch in perfused lungs evoked by sequential challenge with endotoxin and E. coli hemolysin. *J Appl Physiol* (1994) 76:1020-30.
- ⁷³ VanderMeer, T.J., H. Wang, M.P. Fink. Endotoxemia causes ileal mucosal acidosis in the absence of mucosal hypoxia in a normodynamic porcine model of septic shock. *Crit Care Med* (1995) 23:1217-26.
- ⁷⁴ Revelly, J.P., T. Ayuse, N. Brienza, H.E. Fessler, J.L. Robotham. Endotoxic shock alters distribution of blood flow within the intestinal wall. *Crit Care Med* (1996) 24:1345-51.
- ⁷⁵ Crouser, E.D., M.W. Julian, P.M. Dorinsky. Ileal VO₂-O₂ alterations induced by endotoxin correlate with severity of mitochondrial injury. *Am J Respir Crit Care Med* (1999) 160:1347-53.
- ⁷⁶ Wang, P., Z.F. Ba, S.M. Tait, M. Zhou, I.H. Chaudry. Alterations in circulating blood volume during polymicrobial sepsis. *Circ Shock* (1993) 40:92-8.
- ⁷⁷ Unger, L.S., H.M. Cryer, R.N. Garrison. Differential response of the microvasculature in the liver during bacteremia. *Circ Shock* (1989) 29:335-44.
- ⁷⁸ Groeneveld, A.B., A.A. van Lambalgenet G.C. van den Bos, W. Bronsveld, J.J. Nauta, L.G. Thijs. Maldistribution of heterogeneous coronary blood flow during canine endotoxin shock. *Cardiovasc Res* (1991) 25:80-8.
- ⁷⁹ Avontuur, J.A., H.A. Bruining, C. Ince. Inhibition of nitric oxide synthesis causes myocardial ischemia in endotoxemic rats. *Circ Res* (1995) 76:418-25.
- ⁸⁰ Grandel, U., U. Sibelius, J. Schrickel, D. Schmidt, M. Buerke, L. Fink, E. Bournelis, M. Heep, K. Mayer, R.M. Bohle, W. Seeger, F. Grimminger. Biosynthesis of constitutive nitric oxide synthase-derived nitric oxide attenuates coronary vasoconstriction and myocardial depression in a model of septic heart failure induced by Staphylococcus aureus alpha-toxin. *Crit Care Med* (2001) 29:1-7.

- ⁸¹ Fox, G.A., A. Bersten, C. Lam, A. Neal, F.S. Rutledge, K. Inman, W.J. Sibbald. Hematocrit modifies the circulatory control of systemic and myocardial oxygen utilisation in septic sheep. *Crit Care Med* (1994) 22:470-9.
- ⁸² Bloos, F.M., H.M. Morisaki, A.M. Neal, C.M. Martin, C.G. Ellis, W.J. Sibbald, M.L. Pitt. Sepsis depresses the metabolic oxygen reserve of the coronary circulation in mature sheep. *Am J Respir Crit Care Med* (1996) 153:1577-84.
- ⁸³ Hersch, M., A.A. Gnidec, A.D. Bersten, M. Troster, F.S. Rutledge, W.J. Sibbald. Histologic and ultrastructural changes in nonpulmonary organs during early hyperdynamic sepsis. *Surgery* (1990) 107:397-410.
- ⁸⁴ Montrucchio, G., G. Alloatti, G. Camussi. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* (2000) 80:1669-99.
- ⁸⁵ Camussi, G., C. Ronco, G. Montrucchio, G. Piccoli. Role of soluble mediators in sepsis and renal failure. *Kidney Int Suppl* (1998) 66:S38-42.
- ⁸⁶ Chang, S.W., C.O. Feddersen, P.M. Henson, N.F. Voelkel. Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest* (1987) 79:1498-509.
- ⁸⁷ Piper, P.J., A.G. Stewart. Antagonism of vasoconstriction induced by platelet-activating factor in guinea-pig perfused hearts by selective platelet-activating factor receptor antagonists. *Br J Pharmacol* (1987) 90:771-83.
- ⁸⁸ Stahl, G.L., A.M. Lefer. Mechanisms of platelet-activating factor-induced cardiac depression in the isolated perfused rat heart. *Circ Shock* (1987) 23:165-77.
- ⁸⁹ Hu, W.M., P.C. Choy, R.Y. Man. Characterization of the coronary vascular responses to platelet-activating factor in the isolated perfused heart. *Lipids* (1991) 26:700-4.

- ⁹⁰ Herbertson, M.J., H.A. Werner, K.R. Walley. Platelet-activating factor antagonism improves ventricular contractility in endotoxemia. *Crit Care Med* (1997) 25:221-6.
- ⁹¹ Abu-Zidan, F.M., S. Walther. Platelet activating factor antagonism improves cardiovascular function in non-hypotensive sepsis in pigs. *Eur J Surg* (1996) 162:499-504.
- ⁹² Giessler, C., K. Ponicke, C. Steinborn, O.E. Brodde. Effects of PAF on cardiac function and eicosanoid release in the isolated perfused rat heart: comparison between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Basic Res Cardiol* (1995) 90:337-47.
- ⁹³ Man, R.Y., A.A. Kinnaird. Similar coronary vascular effects in the rat perfused heart of platelet-activating factor structural analogues with agonist and antagonist properties. *Br J Pharmacol* (1995) 116:2359-64.
- ⁹⁴ Kramer, B.K., T.W. Smith, R.A. Kelly. Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes. Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent Na(+)-H⁺ exchanger. *Circ Res* (1991) 68:269-79.
- ⁹⁵ Takanashi, M., M. Endoh. Characterization of positive inotropic effect of endothelin on mammalian ventricular myocardium. *Am J Physiol* (1991) 261:H611-9.
- ⁹⁶ Izumi, M., S. Miyamoto, M. Hori, H. Ozaki, H. Karaki. Negative inotropic effect of endothelin-1 in the mouse right ventricle. *Eur J Pharmacol* (2000) 396:109-17.
- ⁹⁷ Sakurai, K., I. Norota, H. Tanaka, I. Kubota, H. Tomoike, M. Endo. Negative inotropic effects of angiotensin II, endothelin-1 and phenylephrine in indo-1 loaded adult mouse ventricular myocytes. *Life Sci* (2002) 70:1173-84.
- ⁹⁸ Homma, S., T. Miyauchi, Y. Sugishita, K. Goto, M. Sato, N. Ohshima. Vasoconstrictor effects of endothelin-1 on myocardium microcirculation studied by the Langendorff perfusion method: differential sensitivities among microvessels. *Microvasc Res* (1992) 43:205-17.

- ⁹⁹ Karwatowska-Prokopczuk, E., A. Wennmalm. Effects of endothelin on coronary flow, mechanical performance, oxygen uptake, and formation of purines and on outflow of prostacyclin in the isolated rabbit heart. *Circ Res* (1990) 66:46-54.
- ¹⁰⁰ Zaugg, C.E., P.S. Hornstein, P. Zhou, D. Simper, T.F. Luscher, P.R. Allegrini, P.T. Buser. Endothelin-1-induced release of thromboxane A2 increases the vasoconstrictor effect of endothelin-1 in postischemic reperfused rat hearts. *Circulation* (1996) 94:742-7.
- ¹⁰¹ Sharma, A.C., S.J. Motew, S. Farias, K.J. Alden, H.B. Bosmann, W.R. Law, J.L. Ferguson. Sepsis alters myocardial and plasma concentrations of endothelin and nitric oxide in rats. *J Mol Cell Cardiol* (1997) 29:1469-77.
- ¹⁰² Chin, A., J. Radhakrishnan, L. Fornell, E. John. Effects of tezosentan, a dual endothelin receptor antagonist, on the cardiovascular and renal systems of neonatal piglets during endotoxic shock. *J Pediatr Surg* (2002) 37:482-7.
- ¹⁰³ Sprague, R.S., A.H. Stephenson, T.E. Dahms, A.J. Lonigro. Proposed role for leukotrienes in the pathophysiology of multiple systems organ failure. *Crit Care Clin* (1989) 5:315-29.
- ¹⁰⁴ Lewis, R.A., K.F. Austen, R.J. Soberman. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med* (1990) 323:645-55.
- ¹⁰⁵ Tanaka, N., T. Kita, K. Kasai, T. Nagano. The immunocytochemical localization of tumour necrosis factor and leukotriene in the rat heart and lung during endotoxin shock. *Virchows Arch* (1994) 424:273-7.
- ¹⁰⁶ Roth, D.M., D.J. Lefer, C.E. Hock, A.M. Lefer. Effects of peptide leukotrienes on cardiac dynamics in rat, cat, and guinea pig hearts. *Am J Physiol* (1985) 249:H477-84.
- ¹⁰⁷ Garlick, P.B., G.D. Mashiter, V. Di Marzo, M.N. Maisey. The synthesis, release and action of leukotrienes in the isolated, unstimulated, buffer-perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* (1989) 21:1101-10.

- ¹⁰⁸ Lee, C.C., R.F. Appleyard, J.G. Byrne, L.H. Cohn. Leukotrienes D4 and E4 produced in myocardium impair coronary flow and ventricular function after two hours of global ischemia in rat heart. *Cardiovasc Res* (1993) 27:770-3.
- ¹⁰⁹ Sibelius, U., U. Grandel, M. Buerke, L. Kiss, P. Klingenberger, M. Heep, E. Bournelis, W. Seeger, F. Grimminger. 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) 31(3):683-688.
- ¹¹⁰ Schutzer, K.M., U. Haglund, A. Falk. Cardiopulmonary dysfunction in a feline septic shock model: possible role of leukotrienes. *Circ Shock* (1989) 29:13-25.
- ¹¹¹ Petrak, R.A., R.A. Balk, R.C. Bone. Prostaglandins, cyclo-oxygenase inhibitors, and thromboxane synthetase inhibitors in the pathogenesis of multiple systems organ failure. *Crit Care Clin* (1989) 5:303-14.
- ¹¹² van Hinsbergh, V.W. Regulatory functions of the coronary endothelium. *Mol Cell Biochem* (1992) 116:163-9.
- ¹¹³ Smith, W.L., R.M. Garavito, D.L. DeWitt. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* (1996) 271:33157-60.
- ¹¹⁴ Liu, S.F., R. Newton, T.W. Evans, P.J. Barnes. Differential regulation of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 gene expression by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat. *Clin Sci (Lond)* (1996) 90:301-6.
- ¹¹⁵ Wong, S.C., M. Fukuchi, P. Melnyk, I. Rodger, A. Giaid. Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor-kappa B in myocardium of patients with congestive heart failure. *Circulation* (1998) 98:100-3.

- ¹¹⁶ Bernard, G.R., H.D. Reines, P.V. Halushka, S.B. Higgins, C.A. Metz, B.B. Swindell, P.E. Wright, F.L. Watts, V.V. Vrbanc. Prostacyclin and thromboxane A2 formation is increased in human sepsis syndrome. Effects of cyclooxygenase inhibition. *Am Rev Respir Dis (1991) 144:1095-101.*
- ¹¹⁷ Fujioka, K., K. Sugi, T. Isago, J.T. Flynn, L.D. Traber, D.N. Herndon, D.L. Traber. Thromboxane synthase inhibition and cardiopulmonary function during endotoxemia in sheep. *J Appl Phys (1991) 71:1376-1381.*
- ¹¹⁸ Sibelius, U., U. Grandel, M. Buerke, D. Müller, L. Kiss, H.J. Krämer, R. Braun-Dullaeus, W. Haberbosch, W. Seeger, F. Grimminger. Staphylococcal alpha-toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation. *Circulation (2000) 101:78-85.*
- ¹¹⁹ Grandel, U., L. Fink, A. Blum, M. Heep, M. Buerke, H.J. Kraemer, K. Mayer, R.M. Bohle, W. Seeger, F. Grimminger, U. Sibelius. Endotoxin-induced myocardial tumor necrosis factor-alpha synthesis depresses contractility of isolated rat hearts: evidence for a role of sphingosine and cyclooxygenase-2-derived thromboxane production. *Circulation (2000) 102:2758-64.*
- ¹²⁰ Tolman, K.G. Eicosanoids and the liver. *Prostagl Other Lip Med (2000) 61:164-174.*
- ¹²¹ Parratt, J.R. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. *J Antimicrob Chemother (1998) 41 Suppl A:31-9.*
- ¹²² Brady, A.J., P.A. Poole-Wilson, S.E. Harding, J.B. Warren. Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am J Physiol (1992) 263:H1963-6.*
- ¹²³ Wiles, J.B., F.B. Cerra, J.H. Siegel, J.R. Border. The systemic septic response: does the organism matter? *Crit Care Med (1980) 8:55-60.*

- ¹²⁴ Pilz, G., P. McGinn, P. Boekstegers, S. Kaab, S. Weidenhofer, K. Werdan. Pseudomonas sepsis does not cause more severe cardiovascular dysfunction in patients than non-Pseudomonas sepsis. *Circ Shock* (1994) 42:174-82.
- ¹²⁵ Opal, S.M., J. Cohen. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med* (1999) 27:1608-16.
- ¹²⁶ Bhakdi, S., I. Walev, D. Jonas, M. Palmer, U. Weller, N. Suttorp, F. Grimminger, W. Seeger. Pathogenesis of Sepsis Syndrome: Possible relevance of pore-forming bacterial toxins. *Curr Top Microbiol Immunol* (1996) 216:101-118.
- ¹²⁷ Wiggins, N.J., B.B. Williams, I.H. Siddique. Effects of listerial hemolysin on perfused isolated rat heart. *Am J Vet Res* (1974) 35:1101-1104.
- ¹²⁸ Müller-Werdan, U., A. Pfeifer, G. Hubner, C. Seliger, C. Reithmann, H. Rupp, K. Werdan. Partial inhibition of protein synthesis by Pseudomonas exotoxin A deranges catecholamine sensitivity of cultured rat heart myocytes. *J Mol Cell Cardiol* (1997) 29:799-811.
- ¹²⁹ Heer, C., K. Stuertz, R.R. Reinert, M. Mader, R. Nau. Release of teichoic and lipoteichoic acids from 30 different strains of Streptococcus pneumoniae during exposure to ceftriaxone, meropenem, quinupristin/dalfopristin, rifampicin and trovafloxacin. *Infection* (2000) 28:13-20.
- ¹³⁰ Ginsburg, I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis* (2002) 2:171-9.
- ¹³¹ Danner, R.L., C. Natanson, R.J. Ellin, J.M. Hosseini, S. Banks, T.J. MacVittie, J.E. Parrillo. Pseudomonas aeruginosa compared with Escherichia coli produces less endotoxemia but more cardiovascular dysfunction and mortality in a canine model of septic shock. *Chest* (1990) 98:1480-7.

- ¹³² Natanson, C., M.P. Fink, H.K. Ballantine, T.J. MacVittie, J.J. Conclin, J.E. Parrillo. Gram negative bacteria produces both severe systolic and diastolic cardiac dysfunction in a canine model that stimulates human septic shock. *J Clin Invest* (1988) 78:259-270.
- ¹³³ Suffredini, A.F., R.E. Fromm, M.M. Parker, M. Brenner, J.A. Kovacs, R.A. Wesley, J.E. Parrillo. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med* (1989) 321:280-7.
- ¹³⁴ Rubin, L.J., R.S. Keller, J.L. Parker, H.R. Adams. Contractile dysfunction of ventricular myocytes isolated from endotoxemic guinea pigs. *Shock* (1994) 2:113-20.
- ¹³⁵ Comstock, K.L., K.A. Krown, M.T. Page, D. Martin, P. Ho, M. Pedraza, E.N. Castro, N. Nakajima, C.C. Glembotski, P.J. Quintana, R.A. Sabbadini. LPS-induced TNF-alpha release from and apoptosis in rat cardiomyocytes: obligatory role for CD14 in mediating the LPS response. *J Mol Cell Cardiol* (1998) 30:2761-75.
- ¹³⁶ Cowan, D.B., D.N. Poutias, P.J. Del Nido, F.X. McGowan Jr.. CD14-independent activation of cardiomyocyte signal transduction by bacterial endotoxin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2000) 279:H619-29.
- ¹³⁷ Knapp, S., J. Branger, T. van der Poll. Advances in Research of the Inflammatory Response: The Importance of Toll-Like Receptors. *Wien Med Wochenschr* (2002) 21:552-554.
- ¹³⁸ Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, S. Akira. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J Immunol* (1999) 162:3749-3752.
- ¹³⁹ Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Okawa, K. Takeda, S. Akira. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* (1999) 11:443-451.

- ¹⁴⁰ Nemoto, S., J.G. Vallejo, P. Knuefermann, A. Misra, G. Defreitas, B.A. Carabello, D.L. Mann. Escherichia coli LPS-induced LV dysfunction: role of toll-like receptor-4 in the adult heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2002) 282(6):H2316-2323.
- ¹⁴¹ Bone, R.C. Gram-positive organisms and sepsis. *Arch Intern Med* (1994) 154:26-34.
- ¹⁴² Wang, J.E., M.K. Dahle, M. McDonald, S.J. Foster, A.O. Aasen, C. Thiemermann. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock* (2003) 20(5):402-414.
- ¹⁴³ Morath, S., A. Stadelmaier, A. Geyer, R.R. Schmidt, T. Hartung. Synthetic lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus is a potent stimulus of cytokine release. *J Exp Med* (2002) 195:1635-40.
- ¹⁴⁴ De Kimpe, S.J., M. Kengatharan, C. Thiemermann, J.R. Vane. The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus act in synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) 92:10359-63.
- ¹⁴⁵ Brandis, H., H.J. Eggers, W. Köhler, G. Pulverer. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. *Fischer* (1994) 7. Auflage
- ¹⁴⁶ Morath, S., A. Geyer, T. Hartung. Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus. *J Exp Med* (2001) 193:393-7.
- ¹⁴⁷ Kengatharan, K.M., S. De Kimpe, C. Robson, S.J. Foster, C. Thiemermann. Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J Exp Med* (1998) 188:305-15.
- ¹⁴⁸ Tsuneyoshi, I., Y. Kanmura, N. Yoshimura. Lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus depresses contractile function of human arteries in vitro due to the induction of nitric oxide synthase. *Anesth Analg* (1996) 82:948-53.

- ¹⁴⁹ Cusumano, V., M.T. Fera, M. Carbone, F. Anzani Ciliberti, A. Bellantoni, V. Cusumano. Synergic activities of streptococcal pyrogenic exotoxin A and lipoteichoic acid in cytokine induction. *New Microbiol* (2000) 23:37-45.
- ¹⁵⁰ Middelveld, R.J., K. Alving. Synergistic septicemic action of the gram-positive bacterial cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid in the pig in vivo. *Shock* (2000) 13:297-306.
- ¹⁵¹ Cleveland, M.G., J.D. Gorham, T.L. Murphy, E. Tuomanen, K.M. Murphy. Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependant pathway. *Infect Immun* (1996) 64:1906-1912.
- ¹⁵² Hattori, Y., K. Kasai, K. Akimoto, C. Thiemermann. Induction of NO synthesis by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* in J774 macrophages: involvement of a CD14-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* (1997) 233:375-9.
- ¹⁵³ Wang, J.E., P.F. Jorgensen, M. Almlöf, C. Thiemermann, S.J. Foster, A.O. Aasen, R. Solberg. Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect Immun* (2000) 68:3965-70.
- ¹⁵⁴ Ellingsen, E., S. Morath, T. Flo, A. Schromm, T. Hartung, C. Thiemermann, T. Espevik, D. Golenbock, D. Foster, R. Solberg, A. Aasen, J. Wang. Induction of cytokine production in human T cells and monocytes by highly purified lipoteichoic acid: involvement of Toll-like receptors and CD14. *Med Sci Monit* (2002) 8:BR149-56.
- ¹⁵⁵ Kusunoki, T., E. Hailman, T.S. Juan, H.S. Lichtenstein, S.D. Wright. Molecules from *Staphylococcus aureus* that bind CD14 and stimulate innate immune responses. *J Exp Med* (1995) 182:1673-82.

- ¹⁵⁶ Arakaki, R., S. Sugawara, H. Nakashima, S. Kotani, H. Takada. A lipoteichoic acid fraction of *Enterococcus hirae* activates cultured human monocytic cells via a CD14-independent pathway to promote cytokine production, and the activity is inhibited by serum components. *FEMS Immunol Med Microbiol* (1998) 22:283-91.
- ¹⁵⁷ Bhakdi, S., T. Klonisch, P. Nuber, W. Fischer. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun* (1991) 59:4614-4620.
- ¹⁵⁸ Keller, R., W. Fischer, R. Keist, S. Bassetti. Macrophage response to bacteria: induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. *Infect Immun* (1992) 60:3664-3672.
- ¹⁵⁹ Gao, J.J., Q. Xue, E.G. Zuvanich, K.R. Haghi, D.C. Morrison. Commercial preparations of lipoteichoic acid contain endotoxin that contributes to activation of mouse macrophages in vitro. *Infect Immun* (2001) 69:751-757.
- ¹⁶⁰ Morath, S., A. Geyer, I. Spreitzer, C. Hermann, T. Hartung. Structural decomposition and heterogeneity of commercial lipoteichoic acid preparations. *Infect Immun* (2002) 70:938-944.
- ¹⁶¹ Langendorff, O.. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Archiv der gesamten Physiologie* (1895) 61:291-332.
- ¹⁶² Fink, L., Seeger, W., Ermert, L., Hänze, J., Stahl, U., Grimminger, F., Kummer, W., Bohle, R.M.. Real-time quantitative RT-PCR after laser assisted cell picking. *Nat Med* (1998) 4(11):1329-1333.
- ¹⁶³ Kumar, A., C. Haery, J.E. Parrillo. Myocardial dysfunction in septic shock. *Critical Care Clinics* (2000) 16(2):251-287.
- ¹⁶⁴ Stamm, C., D.B. Cowan, I. Friehs, S. Noria, P.J. del Nido, F.X. McGowan. Rapid endotoxin-induced alterations in myocardial calcium handling: obligatory role of cardiac TNF-alpha. *Anesthesiology* (2001) 95(6):1396-1405.

- ¹⁶⁵ Knuefermann, P., S. Nemoto, A. Misra, N. Nozaki, G. Defreitas, S.M. Goyert, B.A. Caraballo, D.L. Mann, J.G. Vallejo. CD-14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction *Circulation* (2002) *106(20):2608-2615*.
- ¹⁶⁶ Schroder, N.W., S. Morath, C. Alexander, L. Hamann, T. Hartung, U. Zahringer, U.B. Gobel, J.R. Weber, R.R. Schumann. Lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor-2, lipopolysaccharide-binding protein, CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* (2003) *278(18):15587-94*.
- ¹⁶⁷ Lin, C.H., I.H. Kuan, H.M. Lee, W.S. Lee, J.R. Sheu, Y.S. Ho, C.H. Wang, H.P. Kuo. Induction of cyclooxygenase-2 protein by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* in human pulmonary epithelial cells: involvement of a nuclear factor-kappa B-dependent pathway. *Br J Pharmacol* (2001) *134(3):543-552*.

10. Danksagung

Ich möchte mich bei all denen bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

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

Herrn PD Dr. Ulf Sibelius danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und seine kompetente wissenschaftliche Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ulrich Grandel, der mit seiner fortwährenden und ausdauernden Betreuung in wissenschaftlichen und auch praktischen Angelegenheiten sehr viel zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. Ludger Fink danke ich für die Durchführung der real-time-PCR.

Frau Martina Heep danke ich für ihre kompetente, praktische Hilfe im Labor.

Außerdem möchte ich meinen Eltern ganz herzlich danken, ohne deren Förderung - auch großzügiger finanzieller Natur - diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Und Dir, liebe Anja, danke ich für Deine dauerhafte Unterstützung in allen Lebenslagen!

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Michael Wolfgang Hopf
Geburtsdatum: 09.04.1975
Geburtsort: Stuttgart - Bad Cannstatt

Schulbildung

1981-1985 Grundschohle in Mundelsheim
1985-1994 Gymnasium in Besigheim mit Abitur

Zivildienst

1994-1995 Pflegehelfer in der Urologie am Katharinenhospital Stuttgart

Studium der Humanmedizin

1996-2003 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen

10.09.1998 Ärztliche Vorprüfung

23.03.2000 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

08/00-10/04 Dissertation bei PD Dr. Ulf Sibelius am Zentrum für Innere Medizin,
Medizinische Klinik und Poliklinik II, Universitätsklinikum Gießen

26.03.2003 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

10/02-09/03 Praktisches Jahr:
Innere Medizin, Evangelisches Krankenhaus Gießen
Chirurgie, Klinikum Wetzlar
Anästhesie, Kreisspital Männedorf (Schweiz)

03.11.2003 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Arzt im Praktikum

03/04-09/04 Arzt im Praktikum an den St. Vincentius-Kliniken Karlsruhe
03/04-07/04 Medizinische Klinik Abteilung 2 (Hämatologie/Onkologie)
08/04-09/04 Medizinische Klinik Abteilung 1 (Gastroenterologie/Endokrinologie)

Assistenzarzt

Seit 01.10.04 Assistenzarzt an den St. Vincentius-Kliniken Karlsruhe
Medizinische Klinik Abteilung 1 (Gastroenterologie/Endokrinologie)

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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 entnommen 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.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
Email: vvb-ips@t-online.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-482-9



9 783 896 874825