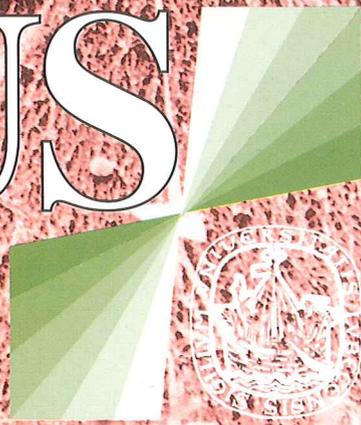


# FOCUS MUL



ZEITSCHRIFT FÜR WISSENSCHAFT, FORSCHUNG UND LEHRE  
AN DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT ZU LÜBECK





SCHERING



Diagnostika

## Wie als Partner man

Wer sich in der bildgebenden Diagnostik für Schering entscheidet, hat einen Partner gefunden, der zusammen mit ihm an einer kontinuierlichen Verbesserung der Diagnosestellung arbeitet. Mit anspruchsvollem Service und zahlreichen Fortbildungsveranstaltungen, z. B. für MRT, Ultraschall und Spiral-CT. Gut, einen so kompetenten Partner an seiner Seite zu wissen.

**Schering  
Diagnostika**

**Wissenschaft plus Partnerschaft.**

---

# FOCUS MUL

Zeitschrift für Wissenschaft, Forschung und Lehre an der Medizinischen Universität zu Lübeck

15. Jahrgang – Heft 2 – April 1998

---

## Inhalt

---

### Editorial

Klinische Forschung: Standortbestimmung und Perspektiven

H. Raspe

72

---

### Originalarbeiten

Aufnahme und Speicherung von Mediatoren in Blutplättchen – Eine mögliche Ursache nichthämolytischer Transfusionsreaktionen

M. H. F. Klinger, H. Klüter

76

Wird die Invasion bösartiger humaner Mammakarzinomzelllinien durch Kollagen I induziert?

Ch. Schubert, W. Kühnel

82

Knochenmatrixveränderungen bei Osteoporose – Bedeutung von TGF- $\beta$

B. Bätge

90

---

### Übersichten

Thrombolyse oder PTCA im akuten Herzinfarkt?

G. Richardt, F. Hartmann, R. Tölg, E. Giannitsis, H.-A. Katus

98

---

### Die Summa-cum-laude-Dissertation

Untersuchungen zur Wirkungsweise von Zinkionen im menschlichen Immunsystem

N. Wellinghausen

102

---

### Aktuelles

Leptin

A. Peters

109

---

### Der besondere Fall – Eine Kasuistik

Geophagie

A. Woywodt, E. F. Stange, W. Woywodt, A. Kiss

113

---

### Aus der Hochschule

Die Zukunft der Universitätsmedizin

H.-U. Erichsen

118

---

### Das Porträt

Prof. Dr. med. Hugo A. Katus

124

---

*Die elektronenmikroskopische Aufnahme auf der Titelseite ist dem Beitrag „Wird die Invasion bösartiger humaner Mammakarzinomzelllinien durch Kollagen I induziert?“ in diesem Focus MUL (S. 82 ff) entnommen.*

## Klinische Forschung: Standortbestimmung und Perspektiven

In etwa zehnjährigem Abstand wird in der Bundesrepublik Klage geführt über den Zustand der „klinischen Forschung“ 1979 erschien eine Denkschrift der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) „Zur Lage und Verbesserung der klinischen Forschung in der Bundesrepublik Deutschland“. 1989 veröffentlichte der Wissenschaftsrat „Empfehlungen zur klinischen Forschung an den Hochschulen“. Im letzten Jahr ging es um den Zustand der klinischen Forschung u. a. auf den Kongressen der Internisten (Wiesbaden) und Chirurgen (München). Zuletzt beschäftigte sich ein Rundtischgespräch der DFG mit diesem Thema. Die DFG erwägt die Ausarbeitung einer neuen Denkschrift.

Diese Diskussionen wurden und werden vor allem von denen geführt, die selbst klinische Forschung betreiben.

Dabei fällt auf, daß der Begriff in den letzten 20 Jahren einen Bedeutungswandel erfahren hat: Gerok (DFG-Denkschrift) ging es 1979 um „die Aufklärung eines biologischen Phänomens im Bereich der Krankheit“. „Epidemiologische Untersuchungen und vergleichende Therapiestudien“ wurden ausdrücklich ausgeschlossen. Der Wissenschaftsrat wollte 1989 dagegen neben der „Erforschung von Ursachen, Entstehung und Verlauf von Krankheiten“ auch „die wissenschaftliche Beschäftigung mit ihrer Erkennung und Behandlung“ eingeschlossen wissen, „die aus der ärztlichen Arbeit im Umgang mit kranken Menschen hervorgehen“. Heute hat sich das Gewicht noch stärker in Richtung dessen verschoben, was „evaluative clinical sciences“ genannt worden ist, also auf die Evaluation der Zweckmäßigkeit klinischen Handelns.

Die folgenden Paragraphen versuchen, einen groben Überblick über das Feld und einige aktuelle Brennpunkte und Aufgaben zu geben. Dabei werden auch Gesichtspunkte derjenigen zu berücksichtigen sein, die klinische Forschung und Forscher beurteilen, sei es aus methodischer, sei es aus ethisch-rechtlicher Sicht.

1. – Von klinischer Forschung i.e.S. sollte man nur dort sprechen, wo klinische Probleme im Kontext klinischer Situationen zur Diskussion stehen. Klinische Situationen sind dadurch charakterisiert, daß Ärzte/Ärztinnen (auch Pflegepersonen etc.) für Kranke in direktem Kontakt und unmittelbar Verantwortung übernehmen. Zum Wohle der Patienten unterstellen sie ihr klinisches Handeln definierbaren Zielen: u.a. in Präventi-

on, Screening und Diagnostik, Prognostik, Therapie, Rehabilitation, Verlaufsbeobachtung.

Zur Unterscheidung der klinischen von der Grundlagen-, der analytisch-epidemiologischen und der Gesundheitssystem-Forschung sind drei Elemente wichtig:

– Klinischer Forscher und sein „Objekt“, eine kranke oder gefährdete Person, arbeiten zusammen – „both being warm and alive“ (Shulman 1996).

– Ihr Handeln orientiert sich an einem Generalziel, dem Wohl dieser Subjekte. Damit sollten sich die Aussagen klinischer Forschung auf Personen beziehen lassen – nicht nur auf beliebig kleine subpersonale Einheiten (Organe, Gewebe, Zellen, Gene). Dies schließt Untersuchungen auf solchen Ebenen keineswegs aus. Deren „klinische Relevanz“ hängt aber davon ab, welche Bedeutung sie für den Vital- und Gesundheitszustand einer ganzen Person haben.

– Das genannte Gesamtziel wird in wiederum zielorientierten Einzelschritten, in einer Handlungskette verfolgt (u. a. Diagnostik, Prognostik, Therapie, Verlaufsbeobachtung). Es wäre unsinnig, klinische Forschung allein mit therapeutischer Forschung und hier wieder mit der Methode der randomisierten klinischen Studie identifizieren zu wollen. Weitere klassische Themen sind Screening und Diagnostik, Nosographie und Diagnose, Verlaufsbeobachtung und Prognostik, Prävention, Schulung und Rehabilitation. Zu berücksichtigen sind aber auch Probleme der Arzt-Patient-Beziehung, des Krankheitsverhaltens (z. B. Compliance) und die Zufriedenheit und Einstellungen aller Beteiligten. Neue Randthemen geben Qualitätssicherung und Kostenanalysen.

2. – Diese Abgrenzungen konzentrieren klinische Forschung aktuell auf das, was in einem Nature-Kommentar „clinical evaluative sciences“ (Hiatt and Goldman 1994) genannt worden ist. In ihnen geht es um die Untersuchung der *Zweckmäßigkeit* klinischen Handelns. Zweckmäßigkeit ist mehr als Wirksamkeit. Maßgeblich sind Zielorientierung und Grad der Zielerreichung. „Evaluative research“ (BMJ 1995) gibt der klinischen Medizin ein eigenes wissenschaftliches Fundament – neben dem, das die „explanatorische“ (= kausalanalytisch orientierte) naturwissenschaftlich-biologische Forschung bereitstellt.

3. – Ein wesentlicher Bereich dieser klinischen Forschung ist das, was im Angloamerikanischen „outcomes research“ (Epstein 1990) genannt worden ist. „Outcomes“ sind Ergebnisse alltäglichen klinischen Handelns, gemessen am Patienten, vorzugsweise auf der Ebene der Person. Sie schließen auch den weiten Bereich der Indikatoren gesundheitsbezogener Lebensqualität ein. Zu berücksichtigen sind weiter sozialmedizinische „Outcomes“ wie finanzielle Aufwendungen/Kosten, Arbeits-, Berufs- und Erwerbsunfähigkeit. Für ihre Unterscheidung ist besonders die International Classification of Impairments, Disabilities and Handicaps (ICIDH) der WHO (1980) geeignet. Sie befindet sich im Augenblick in einer Revision (ICIDH2).

4. – Es folgt, daß klinische Evaluation in der Regel multidisziplinär durchgeführt werden muß. Neben Klinikern, klinischen Epidemiologen und Biometrikern wie Informatikern sind auch Psychologen und andere Verhaltenswissenschaftler, Sozialmediziner und Ökonomen einzubeziehen.

5. – Neben die Untersuchung der Effektivität klinischen Handelns in streng kontrollierten artifiziellen Designs („efficacy“-Forschung, Paradigma: randomisierter klinischer Versuch im Bereich der Therapieforschung) ist die Untersuchung der „effectiveness“, auch „community effectiveness“ zu stellen (= „outcomes-research“ im engeren Sinne). Sie erlaubt eine Abschätzung der Zweckmäßigkeit klinischen Handelns unter Alltagsbedingungen. Im Bereich der Therapieforschung spricht man von Anwendungsbeobachtungen oder Phase IV-Studien. Dies erfordert eine Weiterentwicklung beobachtender Studiendesigns (Black 1996), auch im Bereich der Therapieforschung. In diesem Zusammenhang ist auf die Bedeutung von krankheits- und/oder behandlungsspezifischen klinischen Registern (z. B. des Krebsregisters unseres Landes) hinzuweisen. Sie bedürfen einer gezielten Förderung, auch durch eine überregionale Klärung datenschutzrechtlicher und ethischer Fragen.

6. – Ein Hauptproblem klinischer Forschung in Deutschland ist die unzureichende Entwicklung der klinischen Epidemiologie, d. h. ihrer methodologischen Grundlage. Auch wenn bereits 1932 die erste Auflage der „Methodenlehre der therapeutisch-klinischen Forschung“ aus der Feder Paul Martinis (eines Klinikers!) erschien – in der Nachkriegszeit ist dieses Thema bei uns versandet. Dies steht in deutlichem Gegensatz zu Entwicklungen in England, den USA und Kanada. Hier ist „clinical epidemiology“ von einer Reihe prominenter Wissenschaftler (u. a. A. Feinstein, D. Sackett, R. und S. Fletcher, M. Kramer) entwickelt worden. Oft waren bzw. sind sie Kliniker. Zahlreiche Universitäten des europäischen und nordamerikanischen Auslands bieten heute „clinical effectiveness courses/programmes“ als Teil klinisch-epidemiologischer Ausbildungen an. Eines der jüngsten Derivate der klinischen Epidemiologie ist die „evidence based medicine“ (Sackett et al 1997; Grennhalg 1997). Sie wird in den genannten Ländern – auch aus gesundheitspolitischen Gründen – massiv gefördert. So hat die Zentralregierung in den USA gerade 12 „evidence based practice centres“ gegründet. Bei uns steht diese Entwicklung am Anfang, es gibt erste Publikationen und Kurse, z. B. in Lübeck für Medizinstudenten und junge Ärzte. Im März d. J. ist in Berlin ein deutsches „Netzwerk Evidenz-basierte Medizin“ gegründet worden.

7. – Klinische Epidemiologie hat zahlreiche Berührungspunkte mit Biometrie und Medizinischer Statistik. Beide Disziplinen arbeiten eng zusammen. Sie geht aber über deren Konzepte und Methoden hinaus und setzt andere Schwerpunkte, vor allem in der Identifikation mit und der intimen Kenntnis von klinischem Handeln. Klinische Epidemiologie wird von klinischen Fragen und Zielen getrieben, nimmt ihren Ausgang von den oben angedeuteten Handlungsschritten (Diagnostik, Diagnosestellung, Prognostik, Therapie, Schulung, Rehabilitation, Verlaufsbeobachtung). Folgerich-



## Schütt & Grunde Sanitätshaus GmbH

BERUFSKLEIDUNG FÜR MEDIZINER · SAUERSTOFFGERÄTE  
REHABILITATIONSMITTEL · KOMPRESSIONSSTRÜMPFE  
ROLLSTÜHLE · GESUNDHEITSSANDALEN · KRANKENBETTEN  
KRANKENPFLEGEBEDARF · LEIBBINDEN · BRUCHBÄNDER  
FUSSEINLAGEN · INHALIERGERÄTE · SAUERSTOFFGERÄTE

SEIT ÜBER 20 JAHREN VERTRAGSPARTNER DER ORTHOPÄDISCHEN  
KLINIK DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Auch am Klinikum  
Ratzeburger Allee 111-125  
im Wirth-Center

Lübeck: Königstraße/Ecke Wahnstr.  
Fackenburger Allee 30 a  
Ratzeburger Allee 111-125  
Grapengießerstraße 21

Bad Schwartau: Lübecker Straße 12

in jedem Fall.....Tel.: 04 51/89 07-0

tig trägt das Lehrbuch von M. Kramer (eines Pädiaters; 1988) den Titel „Clinical Epidemiology and Biostatistics. A Primer for Clinical Investigators and Decision-Makers“, und die umfangreiche Monographie von A. Feinstein enthält unter dem Titel „Clinical Epidemiology: The Architecture of Clinical Research“ sehr wenige statistische Abschnitte. Zentrales Thema der klinischen Epidemiologie ist die mehrstufige Übersetzung eines klinischen Problems in ein adäquates Untersuchungsdesign, weit vor der Auswahl und Anwendung geeigneter statistischer Verfahren. Entsprechend hat Spitzer (1986) sie als „the study of determinants and effects of clinical decisions“ definiert.

8. – Für eine zeitgemäße Taxonomie klinischer Forschungsvorhaben sind schließlich rechtliche und ethische Unterscheidungen relevant. In diesem Kontext wird u. a. von Forschungsuntersuchungen am Menschen, von Heilbehandlung, Heilversuch, klinischem Versuch, Wissensversuch im engeren oder weiteren Sinne etc. gesprochen. Im Vordergrund steht dabei die Frage, wer der (potentielle) Nutznießer der Forschungsergebnisse ist, die in die Studie einbezogenen Patienten, spätere Patienten mit gleichen Problemen, unspezifizierte Kranke oder Gesunde, der Forscher und seine Neugierde oder der weltweite Wissensfundus selbst, der sich durch die neuen Erkenntnisse erweitert, vertieft oder korrigiert. Analog wäre zu bedenken, wer das Risiko des möglichen Schadens einer klinischen Untersuchung trägt.

Zusammenfassend schlage ich folgende Unterscheidungen und Termini vor:

*Außerhalb* des Bereiches *klinischer* Forschung liegen Vorhaben, die sich darauf konzentrieren, biologische Prozesse zu analysieren und zu verstehen, deren Ergebnisse allein subpersonale (Moleküle, Gewebe, Organe) oder suprapersonale Einheiten (Gruppen, Bevölkerungen, Institutionen) charakterisieren, die keinen Bezug zu einem der vielfältigen (Teil-)Ziele klinischen Handelns aufweisen und an denen kein Kliniker beteiligt ist.

Im Übergangsbereich von Grundlagen- zu klinischer Forschung läßt sich ein Feld „klinische Grundlagenforschung“ (Rietschel 1997) abgrenzen, das wohl auch Gerok und die DFG-Denkschrift von 1979 im Auge hatten (s.o.).

Ebenfalls *außerhalb* des Bereiches *klinischer Forschung* liegen die Standard-Heilbehandlung und der einzelne Heilversuch, d. h. die Anwendung eingeführter oder neuartiger medizinischer, v. a. therapeutischer Verfahren in Einzelfällen und ohne den Anspruch, methodisch abgesichertes generalisierbares Wissen zu schaffen.

Der Bereich der klinischen Forschung im eigentlichen Sinn ist nicht einheitlich: Man kann Unterscheidungen treffen nach dem klinischen Thema (u. a. Diagnostik, Prognostik, Therapie, neuerdings auch Qualitätssicherung und Ökonomisierung), den untersuchten Interventionen (u. a. Medikamente, Operationen, Psychotherapie, Schulungen, kombinierte Programme), dem Umfang und Generalisierungsanspruch der Untersuchung (N=1-Studien, mono/multizentrischer klinischer Versuch, Megatrial, Metaanalyse), dem Setting (Klinik im Sinne von Krankenhaus vs. Praxis/Ambulanz, Gemeinde) und/oder dem Typ von berücksichtigten „outcomes“ (u. a. klinische Parameter, Lebensqualitätsindikatoren, Kosten).

Manche Studien geben Antworten auf mehr als eine Fragestellung. So sind randomisierte klinische Versuche auch geeignet, kausalanalytische Fragen zu klären. Oft wird in der Auswertung deutlich, um was es den Forschern ging. Eine „intention-to-treat“-Auswertung betont eine pragmatische Fragestellung – eine Auswertung, die sich nur auf diejenigen konzentriert, die tatsächlich das Verum erhalten haben, ein explanatorisches, kausalanalytisches Interesse.

Auch im Übergang von der klinischen zur Versorgungs/Systemforschung und zur analytischen Epidemiologie gibt es Fragestellungen und Untersuchungen, die noch klinische Bezüge aufweisen. Hierzu gehören z. B. die interventiven Feldstudien (z. B. zum Wert von Früherkennungsmaßnahmen) oder Surveys nach den Versorgungs-Erwartungen und -Präferenzen in der offenen Bevölkerung.

Das Zentrum der klinischen Forschung im engeren Sinne sollte jedoch heute in der Evaluation klinischen Handelns gesehen werden. Dieses Feld ist in der BRD vernachlässigt und bedarf einer gezielten Entwicklung und Förderung. Diese sollte die methodologische Basis klinischer Forschung, die klinische Epidemiologie und Medizinische Statistik einschließen. Sonst werden wir uns auf eine neue Welle von Klagen etwa im Jahr 2007 einstellen müssen (zehnjährige „Wiederkehr des Verdrängten“).

Klinische Forschung und klinische Epidemiologie können die notwendige Bewegung zu „mehr Ergebnisorientierung und Rationalität“ (Sachverständigenrat 1995) der klinischen Medizin im Sinne von „evidence based medicine and health care“ (Gray 1997) unterstützen.

H. Raspe

*Prof. Dr. med. et phil. Heiner Raspe ist Direktor des Instituts für Sozialmedizin der Medizinischen Universität zu Lübeck.*

# Dräger



Nur durch die Optimierung  
der Betriebsabläufe und  
Kostentransparenz kommen  
Krankenhäuser ans Ziel:

## Ziele erreichen.

eine spürbare und werthaltige Effizienzsteigerung. Dräger ist dabei der Partner. Nicht nur durch Systemlösungen in der Medizintechnik, sondern auch durch umfassende Dienstleistungen für das Krankenhaus – vom Consulting über Personalentwicklung, Informationsverarbeitung, Service und technisches Gerätemanagement bis zur Finanzierung. Wie Ziele erreicht werden, zeigt Dräger Ihnen auf der Interhospital in Halle 4, Stand B 08. Dräger Medizintechnik GmbH, Lübeck, <http://www.draeger.com>.

**Dräger. Technik für das Leben.**

Aus dem Institut für Anatomie (Direktor: Prof. Dr. W. Kühnel) und dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin (Direktor: Prof. Dr. H. Kirchner) der Medizinischen Universität zu Lübeck

## Aufnahme und Speicherung von Mediatoren in Blutplättchen – Eine mögliche Ursache nichthämolytischer Transfusionsreaktionen

M. H. F. Klinger und H. Klüter

### Einleitung

In der transfusionsmedizinischen Praxis hat sich der gezielte Einsatz von einzelnen Blutkomponenten seit vielen Jahren durchgesetzt, und so ist die Thrombozytentransfusion für die klinische Versorgung von thrombozytopenischen Patienten von großer Bedeutung. Durch prophylaktische Gabe von Thrombozyten kann die Inzidenz von schwerwiegenden Hämorrhagien bei Leukämiepatienten drastisch gesenkt werden. Darüber hinaus ermöglicht die Thrombozytentransfusion in der operativen Medizin auch größere Eingriffe bei Patienten mit stark erniedrigten Thrombozytenzahlen.

Auf der anderen Seite können aber auch unerwartete und unerwünschte Begleiterscheinungen akut während oder nach der Transfusion von Thrombozytenkonzentraten (TK) auftreten. Diese Transfusionsreaktionen verlaufen in der Regel mild, jedoch sind auch schwere Komplikationen wie z. B. anaphylaktische Schockzustände beschrieben worden. Hämolytische Episoden nach Thrombozytengabe sind im Gegensatz zur Erythrozytentransfusion selten. Häufiger treten febrile und allergische Symptome auf. Man bezeichnet diese Komplikationen deshalb auch als nichthämolytische Transfusionsreaktionen (NHTR).

NHTR nach Gabe von Thrombozytenpräparaten haben in den letzten Jahren eine zunehmende Aufmerksamkeit erfahren und können durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden. Da TK stets auch geringe Mengen von Leukozyten enthalten, können HLA- oder Granulozyten-spezifische Antikörper des Empfängers gegen die weißen Blutzellen im Blutpräparat gerichtet sein und zu einer rapiden Lyse der transfundierten Leukozyten mit der folgenden Freisetzung von leukozytären Pyrogenen führen. Aber auch während der Lagerung von TK ist bereits eine Anreicherung von Zytokinen und Chemokinen im Lagerungsmedium zu beobachten (1-7). Diese Entzündungsmediatoren entstammen zum großen Teil den unerwünschten Leukozytenbeimengungen im TK, sie sind aber auch nach

hocheffektiver Leukozytendepletion, z. B. durch Filtration während der Thrombozytenspende, anzutreffen. Folglich muß eine weitere Quelle für die als Verursacher von NHTR vermuteten Zytokine und Chemokine existieren, und hier kommen insbesondere die Thrombozyten in Betracht.

Thrombozyten bzw. Blutplättchen enthalten eine große Anzahl biologisch aktiver Substanzen wie z. B. den Plättchenfaktor 4,  $\beta$ -Thromboglobulin, Serotonin und Histamin (8). Diese Mediatoren werden zum Teil in Megakaryozyten bzw. Plättchen synthetisiert, oder sie können von zirkulierenden Plättchen aus dem Blutplasma aufgenommen werden, wie es bereits für das in den „dense bodies“ vorkommende Serotonin sowie für das in den  $\alpha$ -Granula vorkommende Fibrinogen bekannt ist. Die Ziele unserer Untersuchungen bestanden nun darin, in den Plättchen immunologisch kompetente Substanzen nachzuweisen, ultrastrukturell zu lokalisieren sowie die Freisetzung dieser Substanzen in gelagerten TK zu verfolgen. Zudem wollten wir wissen, ob und welche dieser Substanzen von Plättchen aktiv aus dem Blutplasma aufgenommen werden können. Dazu haben wir Konjugate aus kolloidalem Gold und verschiedenen Peptiden hergestellt und den Plättchen in vitro zur Aufnahme angeboten. Um derartige Endozytoseprozesse besser untersuchen zu können, haben wir dabei versucht, durch Stimulierung der Plättchen mit Thrombin und ADP eine Verstärkung der Internalisierung zu erzielen. Hinweise in dieser Richtung ergaben sich zum einen aus Beobachtungen von Morgenstern, der eine Zunahme von Clathrin-bedeckten Membranen und Vesikeln nach Stimulierung mit ADP beschrieb (9). Das Protein Clathrin findet sich prinzipiell an allen Zellmembranen, an denen Vesikel abgeschnürt werden, also auch bei der Entstehung von Endozytosebläschen. Des weiteren fanden Wencel-Drake et al. in ihren Experimenten eine Abnahme von oberflächengebundenem Fibrinogen nach Stimulierung der Plättchen und diskutierten eine Rezeptor-vermittelte Endozytose (10). Ob dieser Weg der Stoffaufnahme nun auch bei

immunologisch kompetenten Substanzen benutzt wird, sollten unsere Experimente klären.

### Endozytose und Rezeptorverschiebungen in Blutplättchen

Das Endozytosevermögen der Blutplättchen wurde bereits für ein breites Spektrum von Substanzen *in vitro* gezeigt: Als künstliche Marker dienten bisher Thorium-Partikel (11), Meerrettichperoxidase (12), Albumin-Gold-Konjugate (13), Fibrinogen-Gold-Konjugate (13-15) und Gold-konjugierte Anti-Glykoprotein IIb/IIIa-Antikörper (16, 17). Die Aufnahme von physiologischen Plasmaproteinen konnte durch intravenöse Injektionen von Fibrinogen, Albumin und IgG gezeigt werden, und das Fehlen von mRNA für diese drei Proteine in Plättchen und Megakaryozyten unterstreicht die Bedeutung der Endozytose für die Ausstattung der  $\alpha$ -Granula (18-22). Ein typisches morphologisches Äquivalent der Rezeptor-vermittelten Endozytose sind Clathrin-bedeckte Membranen und Vesikel. Die Bindung des Proteins Clathrin an eine Membran führt zur Ausbildung einer Konvexität und ist damit Voraussetzung zur Bildung von Endozytose- und Transportvesikeln. Eine auffällige Zunahme dieser Clathrin-gekoppelten Strukturen findet sich nach milder Aktivierung der Plättchen und weist damit auf gesteigerte intrazelluläre Transportprozesse hin (9).

Unsere Arbeitsgruppe konnte durch immunzytochemische Nachweisreaktionen am Ultradünnschnitt Clathrin an verschiedenen Membranen innerhalb der Plättchen nachweisen: An der äußeren Plasmamembran, an Membranen des offenen kanalikulären Systems (OCS) und zum Teil auch an Membranen der  $\alpha$ -Granula. Der gleichzeitige Einsatz von Antikörpern gegen drei wichtige adhäsive Proteine aus dem Blutplasma (von Willebrand-Faktor, Fibrinogen, Fibronektin) erbrachte Kolokalisationen mit Clathrin sowohl an der äußeren Plättchenmembran als auch an Membranen des OCS,

wodurch uns die Endozytose dieser Proteine naheliegender erscheint (23). Nach Stimulierung der Plättchen mit ADP oder Thrombin konnte jedoch keine Zunahme dieser Kolokalisationen beobachtet werden; die Steigerung der Endozytose blieb also aus.

In einer zweiten Reihe von Experimenten stellten wir Konjugate aus kolloidalen Goldpartikeln mit verschiedenen Proteinen her. Dadurch konnten wir die Interaktionen von Plättchen mit Fibrinogen (FG-Au), Immunglobulinen (IgG-Au und IgE-Au) und einem Chemokin (RANTES-Au) analysieren. Aufgrund der hohen Rezeptoranzahl für FG (Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ; ca. 50 000 pro Plättchen) begannen wir unsere Untersuchungen mit dem FG-Au-Konjugat und testeten an diesem Beispiel den Einfluß einer Stimulierung durch ADP bzw. Thrombin auf die Interaktion zwischen FG-Au und Plättchen. Wie schon aufgrund der Rezeptoranzahl nicht anders zu erwarten, war die Bindung von FG-Au an Plättchen nach milder ADP-Stimulation stark ausgeprägt. In unstimulierten Plättchen dagegen war nur eine minimale Bindung von FG-Au zu sehen, allerdings konnten wir auch nur in diesen Plättchen eine Endozytose von FG-Au beobachten (Abb. 1-3). Die zur Erzielung der Bindungskompetenz des RGD-Rezeptors  $\alpha_{IIb}\beta_3$  nötige Stimulierung führte dagegen zu einer extrem starken Akkumulation von Goldpartikeln im OCS (Abb. 4-6); innerhalb der  $\alpha$ -Granula konnten jedoch keine Goldmarker gefunden werden. Die Vermutung von Wencel-Drake et al., oberflächengebundenes FG würde von aktivierten Plättchen durch Endozytose internalisiert (10), konnten wir damit nicht bestätigen. Es gelang uns auch nicht, die Endozytose von Gold-Konjugaten durch Inkubation mit ADP oder Thrombin zu stimulieren. Vergleichbare Ergebnisse konnten wir auch mit den anderen drei Goldkonjugaten erzielen; sowohl IgG-Au als auch IgE-Au und RANTES-Au wurden in aktivierten Plättchen innerhalb des OCS angereichert und nur von unstimulierten Plättchen endo-

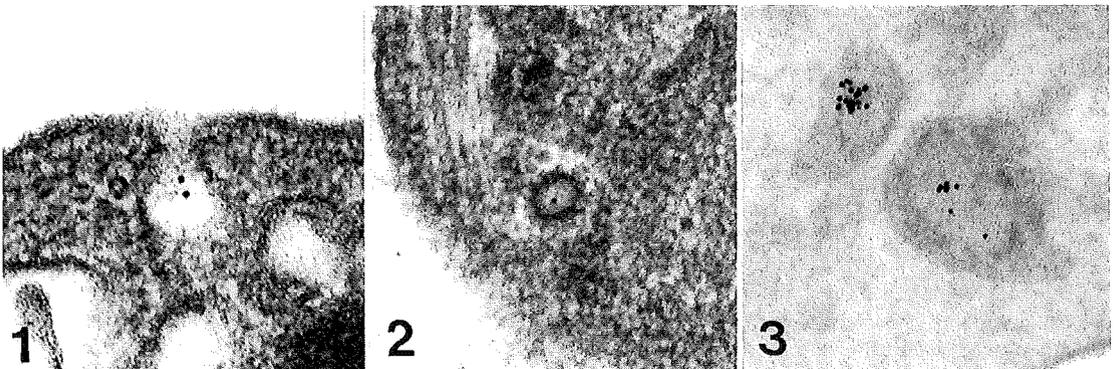


Abb. 1-3: Endozytose von Fibrinogen-Gold-Konjugaten durch unstimulierte Plättchen: Goldpartikel in einer Invagination der äußeren Membran (Abb. 1; x 160 000), in einem Clathrinumsäumten Bläschen (coated vesicle; Abb. 2; x 126 000) und innerhalb von Speichergranula (Abb. 3; x 150 000)

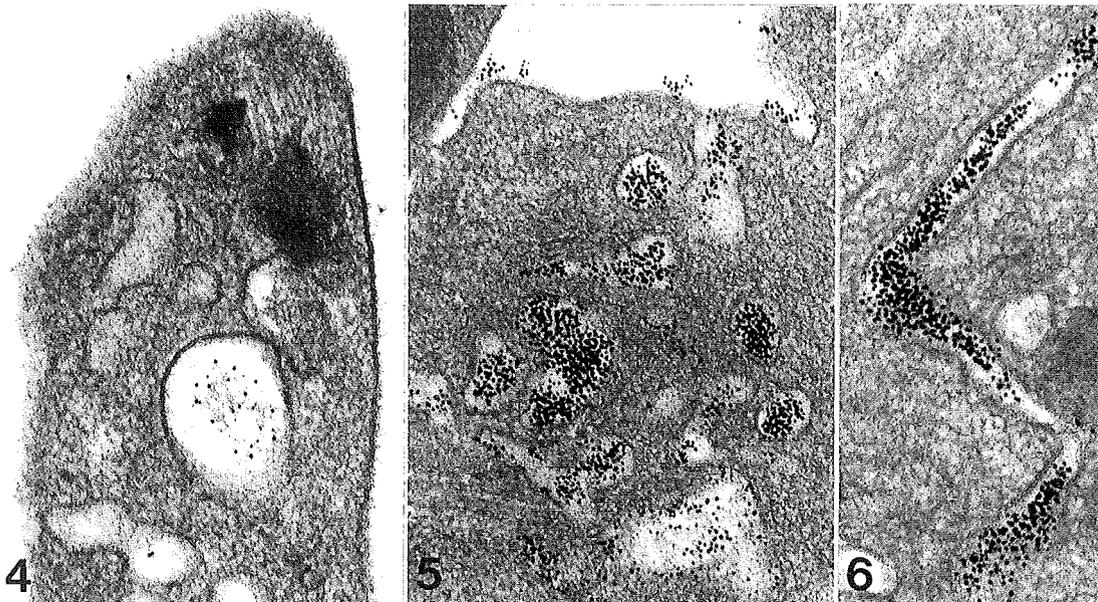


Abb. 4-6: Interaktion von Fibrinogen-Gold-Konjugaten mit ADP-stimulierten Plättchen: Bindung an der Plasmamembran sowie Akkumulation im offenen kanalikulären System (Abb. 4 und 5;  $\times 100\ 000$ ) sowie im Interzellularspalt zwischen benachbarten Plättchen in einem Aggregat (Abb. 6;  $\times 126\ 000$ )

zytiert. Speziell bei Inkubationen mit IgE-Au und RANTES-Au konnten wir dann Goldpartikel innerhalb der  $\alpha$ -Granula nachweisen.

Die Rezeptorverschiebungen, die in stimulierten Plättchen zu einer Anhäufung der Goldmarkierungen im OCS führen, sind zumindest für das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  bekannt und spielen eine wichtige Rolle bei Plättchenadhäsion und -aggregation (24-26). Der Plättchenrezeptor für IgE, Fc $\epsilon$  RII, bildet mit dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  einen Komplex (27) und wird vermutlich dessen Verschiebungen folgen. Ob die Translokation des Fc $\gamma$ -Rezeptors ebenfalls auf eine Verbindung zum  $\alpha_{IIb}\beta_3$  zurückzuführen ist, muß noch geklärt werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß hinsichtlich der Internalisierung von Substanzen zwischen zwei Mechanismen klar unterschieden werden muß: Zum einen findet in unstimulierten Plättchen eine Rezeptor-vermittelte Endozytose mit folgender Einlagerung der aufgenommenen Substanzen in Speichergranula statt (Abb. 1-3). Andererseits kommt es in stimulierten Plättchen zur Verschiebung von Rezeptoren von der Oberfläche in das OCS hinein mit folgender Anreicherung von rezeptorgebundenen Liganden in diesem Hohlraumssystem (Abb. 4-6). Die von Morgenstern beobachtete Zunahme von Clathrin-bedeckten Membranen in ADP-stimulierten Plättchen (9) spiegelt demnach keine gesteigerte Endozytose wider, sondern ist eher Anzeichen von Sekretionsprozessen. Und die Befunde von Wencel-Drake et al. (10) lassen sich nun

durch die aktivierungsbedingten Verschiebungen des Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  erklären, nicht aber durch eine wirkliche Endozytose.

### Speicherung von Mediatoren in den $\alpha$ -Granula

Neben ihrer wesentlichen Rolle in der Hämostase sind Blutplättchen auch an Entzündungs- und Abwehrprozessen beteiligt und verfügen über ein entsprechendes Reservoir an Entzündungsmediatoren, Wachstumsfaktoren und mikrobioziden Substanzen (8, 28). Die ersten in diesem Zusammenhang näher untersuchten Mediatoren wurden als kationische Proteine bezeichnet und verfügen über antibakterielle Eigenschaften, sie können Fieber und eine erhöhte Gefäßpermeabilität induzieren, und sie sind antikoagulatorisch wirksam (29).

In den letzten Jahren nun wurde eine ganze Reihe von Zytokinen bzw. Chemokinen in den Plättchen gefunden, die proinflammatorische und chemotaktische Eigenschaften aufweisen (30). Die Chemokine lassen sich in eine CXC- oder  $\alpha$ -Subklasse sowie eine CC- oder  $\beta$ -Subklasse unterteilen, wobei die  $\alpha$ -Subklasse bevorzugt auf Granulozyten chemotaktisch und aktivierend wirkt.  $\beta$ -Chemokine dagegen beeinflussen überwiegend Monozyten und T-Lymphozyten. Daneben wurde kürzlich eine neue  $\gamma$ -Subklasse definiert. Das erste bekannte  $\alpha$ -Chemokin ist Interleukin-8 (IL-8) (31), welches von Monozyten, einigen T-Zell-Subpopulationen und Endothelzellen freigesetzt wird. IL-8 ist in gelagerten TK nachweisbar, wird aber als

Zeichen einer deutlichen Leukozytenbeimengung angesehen, da es in Plättchen nicht aufzufinden ist. Aus den Plättchen stammen dagegen etliche andere  $\alpha$ -Chemokine wie Plättchenfaktor-4 (PF4),  $\beta$ -Thromboglobulin ( $\beta$ -TG), connective tissue-activating protein 3 (CTAP-3) und das neutrophil-activating peptide 2 (NAP-2). Diese  $\alpha$ -Chemokine wirken chemotaktisch auf Neutrophile, Monozyten und Fibroblasten (32) sowie Eosinophile (33), und sie induzieren die Histamin-Freisetzung aus Basophilen (34). PF4 verstärkt auch die Expression von IgG- und IgE-Rezeptoren auf Eosinophilen (33), und es erhöht die Reaktivität von Neutrophilen (35). Im Tiermodell wurde zudem eine Beteiligung von PF4 an allergischen Prozessen durch eine Steigerung der Reagibilität der Atemwege beschrieben (36).

Innerhalb der Gruppe der  $\beta$ -Chemokine wurden bisher RANTES sowie MIP-1 $\alpha$  in Plättchen gefunden, und wir konnten beide Chemokine in den  $\alpha$ -Granula lokalisieren (37, 38). Beide Substanzen werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

Neben den Chemokinen findet sich in den  $\alpha$ -Granula noch eine weitere Klasse von Proteinen mit immunologischer Bedeutung: Immunglobuline der Klassen IgG, IgM und IgA wurden schon vor etlichen Jahren in Plättchen entdeckt (28), und speziell das  $\alpha$ -granuläre Vorkommen von IgG wies auf die Bedeutung der Endozytose für die Ausstattung der  $\alpha$ -Granula hin (18, 22). Kürzlich entdeckten wir zudem die Existenz von IgE innerhalb der  $\alpha$ -Granula, wobei der IgE-Gehalt in Plättchen deutlich im Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen steht (39, 40) und wohl auch die Expression des entsprechenden Rezeptors Fc $\epsilon$  RII auf der Plättchenmembran widerspiegelt. Dieser Rezeptor findet sich auf Plättchen von Allergikern wesentlich stärker vertreten als auf Plättchen von gesunden Kontrollpersonen (41).

### Zytokine, Chemokine und Transfusionsreaktionen

Die wichtige Rolle von aus Leukozyten stammenden Zytokinen und Chemokinen bei der Entstehung von nichthämolytischen Transfusionsreaktionen (NHTR) konnte in den letzten Jahren klar gezeigt werden (3, 5) und führte zu erfolgreichen Bemühungen, die Anzahl der im TK verbleibenden Leukozyten zu minimieren. So wurde berichtet, daß sowohl eine Leukozytenfiltration unmittelbar nach der Thrombozytapherese als auch die Herstellung von TK durch Poolen von buffy coats zu weitgehend zytokinfreien Thrombozytenpräparaten führen können (6, 42-44). Doch trotz Verwendung von leukozytenarmen bzw. -depletierten TK sind weiterhin NHTR zu beobachten (1, 45, 46) und verweisen damit auf zusätzliche Entstehungsmechanismen derartiger Reaktionen.

In diesem Zusammenhang ist der Gehalt der Plättchen an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Chemokinen von besonderem Interesse. Die möglichen Effekte der  $\alpha$ -Chemokine PF4 und  $\beta$ -TG wurden bereits geschildert, und beide Substanzen werden zudem seit längerem als Marker für die abgelaufene Freisetzungsreaktion und zur Quantifizierung der Plättchenaktivierung im Konzentrat benutzt.

Die Anwesenheit der  $\beta$ -Chemokine RANTES und MIP-1 $\alpha$  in Plättchen ist dagegen erst seit kurzem bekannt (37, 38), und RANTES akkumuliert in gelagerten TK ähnlich wie PF4 und  $\beta$ -TG (7). RANTES wirkt chemotaktisch auf Monozyten, T-Lymphozyten und Basophile und kann die Freisetzung von Histamin induzieren (47). Basophile von Allergikern reagieren zudem auffällig stärker auf RANTES als Basophile von Gesunden (48), und alle diese Effekte weisen auf eine bedeutende Rolle von RANTES bei allergischen Reaktionen hin. Damit ist insgesamt eine ursächliche Beteiligung der Chemokine bei der Entstehung von NHTR anzunehmen, denn PF4 und MIP-1 $\alpha$  können ebenfalls eine Histamin-Freisetzung aus Basophilen induzieren (49, 50). Andererseits wird jedoch auch der Einfluß einer eventuellen allergischen Reaktionslage beim Empfänger des TK auf die Ausbildung einer Transfusionsreaktion deutlich.

Abschließend kann festgestellt werden, daß Blutplättchen ein nicht unerhebliches Potential an Entzündungsmediatoren speichern, die sowohl nach Stimulierung der Plättchen als auch nach deren Zerfall freigesetzt werden können. Da beide Prozesse während der Herstellung und Lagerung von Thrombozytenkonzentraten nicht zu vermeiden sind, kann es im gelagerten Konzentrat zu einer Akkumulation von entzündungsaktiven Mediatoren kommen, die dann eventuell an der Entstehung von nichthämolytischen Transfusionsreaktionen beteiligt sind. Unter diesen Mediatoren finden sich nicht nur Substanzen, die von Megakaryozyten bzw. Plättchen selber synthetisiert worden sind, sondern ein Teil dieser Mediatoren wird offensichtlich erst von zirkulierenden Plättchen aus dem Blutplasma aufgenommen.

Methodische Weiterentwicklungen bei der Aufarbeitung von Blutpräparaten können helfen, durch eine Reduzierung der Plättchenaktivierung die Freisetzung von Entzündungsmediatoren zu verringern und damit eine mögliche Ursache für die Entstehung von nichthämolytischen Transfusionsreaktionen weitgehend auszuschließen.

### Literatur

1. Brand A: Passenger leukocytes, cytokines, and transfusion reactions. *N Engl J Med* 1994;331:670-671
2. Ferrara J: The febrile platelet transfusion reaction - A cytokine shower. *Transfusion* 1995;35:89-90

3. Heddle NM, Klama L, Singer J, Richards C, Fedak P, Walker I, Kelton JG: The role of the plasma from platelet concentrates in transfusion reactions. *N Engl J Med* 1994;331:625-628
4. Stack G, Snyder EL: Cytokine generation in stored platelet concentrates. *Transfusion* 1994;34:20-25
5. Muylle L, Joos M, Wouters E, De Bock R, Peetermans ME: Increased tumor necrosis factor alpha (TNF alpha), interleukin 1, and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: relationship between TNF alpha and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. *Transfusion* 1993;33:195-199
6. Klüter H, Müller-Steinhardt M, Danzer S, Wilhelm D, Kirchner H: Cytokines in platelet concentrates prepared from pooled buffy coats. *Vox Sang* 1995;69:38-43
7. Bubel S, Wilhelm D, Entelmann M, Kirchner H, Klüter H: Chemokines in stored platelet concentrates. *Transfusion* 1996;36:445-449
8. Klinger MHF: Platelets and inflammation (review). *Anat Embryol* 1997;196:1-11
9. Morgenstern E: Coated membranes in blood platelets. *Eur J Cell Biol* 1982;26:315-318
10. Wencel-Drake JD, Boudignon-Proudhon C, Dieter MG, Criss AB, Parise LV: Internalization of bound fibrinogen modulates platelet aggregation. *Blood* 1996;87:602-612
11. White JG: The transfer of thorium particles from plasma to platelets and platelet granules. *Am J Pathol* 1968;53:567-575
12. Handagama PJ, George JN, Shuman MA, McEver RP, Bainton DF: Incorporation of a circulating protein into megakaryocyte and platelet granules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:861-865
13. Behnke O: Coated pits and vesicles transfer plasma components to platelet granules. *Thromb Haemost* 1989;62:718-722
14. Behnke O: Degrading and non-degrading pathways in fluid-phase (non-adsorptive) endocytosis in human blood platelets. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1992;24:169-178
15. Belitsner N, Anischuk M, Veklich Y, Pozdnjakova T, Gorkun O: Fibrinogen internalization by ADP-stimulated blood platelets. Ultrastructural studies with fibrinogen-colloidal gold probes. *Thromb Res* 1993;69:413-424
16. Morgenstern E, Ruf A, Patscheke H: Transport of anti-glycoprotein IIb/IIIa-antibodies into the alpha-granules of unstimulated human blood platelets. *Thromb Haemost* 1992;67:121-125
17. Kokawa T, Nomura S, Yasunaga K: Endocytosis of monoclonal anti-glycoprotein IIb/IIIa antibody in unstimulated platelets. *Thromb Haemost* 1993;69:90
18. Handagama P, Rappolecè DA, Werb Z, Levin J, Bainton DF: Platelet  $\alpha$ -granule fibrinogen, albumin and immunoglobulin G are not synthesized by rat and mouse megakaryocytes. *J Clin Invest* 1990;86:1364-1368
19. Lange W, Luig A, Dolken G, Mertelsmann R, Kanz L: Fibrinogen gamma-chain mRNA is not detected in human megakaryocytes. *Blood* 1991 ;78:20-25
20. Louache F, Debili N, Cramer E, Breton-Gorius J, Vainchenker W: Fibrinogen is not synthesized by human megakaryocytes. *Blood* 1991 ;77:311-316
21. Harrison P, Wilbourn B, Debili N, Vainchenker W, Breton-Gorius J, Lawrie AS, Masse J- M, Savidge GF, Cramer EM: Uptake of plasma fibrinogen into the alpha granules of human megakaryocytes and platelets. *J Clin Invest* 1989;84:1320-1324
22. Handagama PJ, Shuman MA, Bainton DF: Incorporation of intravenously injected albumin, immunoglobulin G, and fibrinogen in guinea pig megakaryocyte granules. *J Clin Invest* 1989;84:73-82
23. Klinger MHF, Klüter H: Immunocytochemical colocalization of adhesive proteins with clathrin in human blood platelets - Further evidence for coated vesicle-mediated transport of von Willebrand factor, fibrinogen and fibronectin. *Cell Tissue Res* 1995;279:453-457
24. Behnke O: Surface membrane clearing of receptor-ligand complexes in human blood platelets. *J Cell Sci* 1987;87:465-472
25. White JG, Escolar G: Mobility of GPIIb-IIIa receptors within membranes of surface- and suspension-activated platelets does not depend on assembly and contraction of cytoplasmic actin. *Eur J Cell Biol* 1990;52:341-348
26. Olorundare OE, Simmons SR, Albrecht RM: Evidence for two mechanisms of ligand-receptor movement on surface-activated platelets. *Eur J Cell Biol* 1993;60:131-145
27. Ameisen JC, Joseph M, Caén JP, Kusnier J-P, Capron M, Bolzard B, Wautier J-L, Levy-Toledano S, Vorng H, Capron A: A role for glycoprotein IIb-IIIa complex in the binding of IgE to human platelets and platelet IgE-dependent cytotoxic functions. *Br J Haematol* 1986;64:21-32
28. Harrison P, Cramer EM: Platelet  $\alpha$ -granules. *Blood Reviews* 1993;7:52-62
29. Nachman RL, Weksler BB: The platelet as an inflammatory cell. In: Weissman G, ed. *The cell biology of inflammation*. Amsterdam: Elsevier, 1980; pp.145-162
30. Baggiolini M, Dahinden CA: CC chemokines in allergic inflammation (review). *Immunology Today* 1994; 15:127-133
31. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL: Neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989;84:1045-1049
32. Deuel TF, Senior RM, Chang D, Griffin GL, Heinrichson RL, Kaiser ET: Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 ;78:4584-4587
33. Chihara J, Fukuda K, Yasuba H: Platelet factor 4 enhances eosinophil IgG and IgE Fc receptors and has eosinophil chemotactic activity. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:A421
34. Brindley LL, Sweet JM, Goetzl EJ: Stimulation of histamine release from human basophils by human platelet factor 4. *J Clin Invest* 1983;72:1218-1223
35. Aziz KA, Cawley JC, Zuzel M: Platelets prime PMN via released PF4: mechanism of priming and synergy with GM-CSF. *Br J Haematol* 1995;91 :846-853
36. Coyle AJ, Ackerman SJ, Irvin CG: Cationic proteins induce airway hyperresponsiveness dependent on charge interactions. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:896-900
37. Kameyoshi Y, Dörschner A, Mallet AI, Christophers E, Schröder J-M: Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med* 1992;176:587-592
38. Klinger MHF, Wilhelm D, Bubel S, Sticherling M, Schröder J-M: Immunocytochemical localization of the chemokines RANTES and MIP-1 $\alpha$  within human platelets and their release during storage. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:541-546

39. Klinger MHF, Klouche M, Wilhelm D: Blood platelets are stores for RANTES and IgE in allergy. *Ann Anat* 1996;178(Suppl):66
40. Klouche M, Klinger MHF, Wilhelm D, Kühnel W, Kirchner H: Endocytosis, storage and release of IgE by human platelets – differences in type I allergy and non-atopics. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:235-241
41. Capron A, Ameisen JC, Joseph M, Auriault C, Tonnel AB, Caen J: New functions for platelets and their pathological implications. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985;77: 107-114
42. Aye MT, Palmer DS, Giulivi A, Hashemi S: Effect of filtration of platelet concentrates on the accumulation of cytokines and platelet release factors during storage. *Transfusion* 1995;35:117-124
43. Flegel W, Wiesneth M, Stampe D, Koerner K: Low cytokine contamination in buffy coat-derived platelet concentrates without filtration. *Transfusion* 1995;35:917-920
44. Wadhwa M, Seghatchian J, Lubenko A, Contreras M, Dilger P, Bird C, Thorpe R: Cytokine levels in platelet concentrates: quantitation by bioassays and immunoassays. *Brit J Haematol* 1996;93:225-234
45. Wilhelm D, Klouche M, Fiebelkorn A, Görg S, Klüter H, Kirchner H: Nonhemolytic transfusion reactions after platelet substitution. *Lancet* 1993;342:364
46. Dzieczkowski JS, Barrett BB, Nester D, Campbell M, Cook J, Sugrue M, Andersen JW, Andersen KC: Characterization of reactions after exclusive transfusion of white cell-reduced cellular blood components. *Transfusion* 1995;35:20-25
47. Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Rot A, von Tschanner V, Baggioini M, Dahinden CA: RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. *Eur J Immunol* 1993;23:761-767
48. Kuna P, Reddigari SR, Schall TJ, Rucinski D, Viksman MY, Kaplan AP: RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophils. *J Immunol* 1992;149:636-642
49. Zucker MB, Katz IR: Platelet factor 4: production, structure, and physiologic and immunologic action. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991 ;198:693-702
50. Alam R, Stafford S, Forsythe P, Harrison R, Faubion D, Lett Brown MA, Grant JA: RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol* 1993;150:3442-3448

## FOCUS MUL

Zeitschrift für Wissenschaft, Forschung und Lehre an der Medizinischen Universität zu Lübeck

**Herausgeber:** Das Rektorat der Medizinischen Universität zu Lübeck

**Schriftleitung:** H.-P. Bruch, H. L. Fehm, D. Kömpf

**Wissenschaftlicher Beirat:** H. Arnold, R. Birngruber, K. Diedrich, H. Dilling, H. v. Domarus, P. Dominiak, W. Dosch, D. v. Engelhardt, A. Fenner, A. Ch. Feller, B. Fischer, H.-D. Flad, W. Gross, H. Halsband, M. Herczeg, D. Hogrefe, W. Jelkmann, D. Jocham, H. A. Katus, R. Kessel, H. Kirchner, U. Knölker, E. Konecny, K. Kruse, W. Kühnel, H. Laqua, V. Linnemann, E. Machle, P. Müller, D. O. Nutzinger, M. Oehmichen, Th. Peters, S. Pöpl, H.-H. Raspe, K. R. Reischuk, E. Richter, E.-Th. Rietschel, G. Schäfer, M. Schlaak, F. Schmielau, P. Schmucker, E. Schwinger, H. H. Sievers, W. Solbach, O. Strubelt, W. Traut, A.X.Trautwein, H. Weerda, H. D. Weiss, H. H. Wolff (alle Medizinische Universität zu Lübeck)

**Redaktion:** Ch. Weiss, R. Labahn, Telefon (04 51) 5 00 30 04

**Anschrift:** Medizinische Universität zu Lübeck, Ratzeburger Allee 160, D-23562 Lübeck

**Auflage:** 5000 Exemplare

**Verlag:** Hansisches Verlagskontor Heinz Scheffler, Mengstraße 16, D-23552 Lübeck, Telefon (04 51) 70 31-0

**Anzeigen:** Hansisches Verlagskontor H. Scheffler, Christiane Kernel

**Druck:** Verlag Schmidt-Römhild KG, Mengstraße 16, 23552 Lübeck, Telefon (04 51) 70 31-0

**Erscheinen:** FOCUS MUL erscheint vierteljährlich

**Redaktionsschluß:** 6 Wochen vorher

**Bezugspreis:** Einzelheft DM 18,-, Jahresabonnement DM 70,- zuzügl. Versandkosten. In den Mitgliedsbeiträgen der Gesellschaft der Freunde und Förderer der Medizinischen Universität zu Lübeck enthalten

ISSN 0940-9998

# Wird die Invasion bösartiger humaner Mammakarzinomzelllinien durch Kollagen I induziert?

Ch. Schubert, W. Kühnel

## Zusammenfassung

Rekonstituierte Basalmembran (Matrigel) löst bei der humanen Mammakarzinomzelllinie MX-1 die Bildung dreidimensionaler, weitgehend differenzierter Kolonien aus. In Reaktion auf Kollagen I dagegen wachsen MX-1 nur als dedifferenzierte Einzelzellen, ähnlich invasiven Tumorzellen. Eine andere humane Mammakarzinomzelllinie, T47D, differenziert sich auch in Kontakt zu Kollagen I (1). Im Unterschied zu MX-1-Zellen sind T47D-Zellen östrogenabhängig und spiegeln daher das Verhalten von Tumoren relativ gutartigen Charakters wider. Es ergab sich die Frage, inwiefern Zusammenhänge zwischen den genannten extrazellulären Matrices (ECM) und der Tumordinvasivität bestehen und ob möglicherweise der Malignitätsgrad verschiedener Mammakarzinomzelllinien in ihren Reaktionen auf Matrigel oder Kollagen I reflektiert wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die östrogenabhängige Zelllinie ZR-75-1, deren tamoxifenresistente Tochterlinie ZR-75-9a1 (2) und die östrogenunabhängigen MX-1-Zellen „in“ und „auf“ rekonstituierter Basallamina oder Kollagen I-Gelen ausgesät. Aufgrund der Ergebnisse von raster- und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen läßt sich feststellen, daß sich die Malignität der verwendeten Mammakarzinomzelllinien nur in ihrem Verhalten „auf“ oder „in“ Kollagen I widerspiegelt. Dies könnte für die „in vivo“-Situation insofern interessant sein, als Mammatumorzellen, die während der Proliferation aus ihrer Basalmembran ausbrechen, ebenfalls in Kontakt zum Kollagen I geraten. Kollagen I könnte daraufhin bei Zellen höherer Malignität Invasion und Vereinzlung auslösen bzw. zulassen, während bei gutartigen Tumorzellen ein geschlossener Zellverband erhalten bliebe.

## Summary

Reconstituted basement membrane matrigel induces the formation of differentiated colonies in the human mammary carcinoma cell line MX-1. When grown in contact to collagen I (CI), on the other hand, MX-1 cells grow as dedifferentiated, single cells strongly resembling invasive tumor cells. This contrasts with results from T47D cells, which differentiate in response to CI (1). However, as an estrogen dependent cell line

T47D cells are considered to present a more benign stage of breast cancer than estrogen independent MX-1 cells. Thus, it seemed expedient to investigate to what extent matrigel or collagen I may influence invasiveness and if malignancy of tumor cells might be reflected in their reactions to these extracellular matrices (ECM). MX-1 cells were, therefore, compared to estrogen dependent ZR-75-1 cells and to the antiestrogen resistant subline ZR-75-9a1 (2). These cells seeded „on“ and „in“ matrigel or CI were processed for scanning and transmission electron microscopy. Results of these examinations clearly indicate that MX1 cells display a more malignant behaviour than ZR-75 cells when plated on CI but not on matrigel. It is tempting to assume that this mimics the in vivo situation in so far as microcolonies of proliferating tumor cells which break through their basement membrane get in contact to the CI of the connective tissues. As opposed to more benign cells CI would then promote or at least not prevent spreading and invasion in malignant cells.

## Einleitung

Nicht nur Epithelien, sondern auch Tumorzellen zeigen in vitro deutliche Merkmale einer gewebetypischen Entwicklung, wenn sie in Kontakt zu extrazellulärer Matrix (ECM) kultiviert werden (3-6). Bei der humanen Mammakarzinomzelllinie MX-1 konnte der höchste Grad von Differenzierung - die Ausbildung azinus-ähnlicher Kolonien - durch die rekonstituierte Basallamina Matrigel ausgelöst werden (7). Auf Kollagen I-Gel fanden sich dagegen nur dedifferenzierte Einzelzellen, das Bild ähnelt dem invasiver Tumoren (8). Diese Reaktion steht im Gegensatz zu Befunden von Keely et al. (1), die auch bei Kontakt mit Kollagen I einen Anstieg der Differenzierung fanden. Sie verwendeten jedoch die humane Mammakarzinomzelllinie T47D, die, anders als MX-1-Zellen (9), östrogenabhängig ist und damit als weniger maligne angesehen werden kann. Es stellte sich nun die Frage, inwiefern sich die Malignität von Mammakarzinomzellen in ihrer Reaktion auf rekonstituierte Basallamina oder Kollagen I-Gele widerspiegelt. In vivo finden sich diese Substanzen in großer Menge in unmittelbarer Nachbarschaft von Brustkrebszellen und könnten somit die Invasion der Zellen in die Umgebung beeinflussen.

Wichtige Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Östrogenrezeptorgehalt und Invasionsvermögen entstammen den Arbeiten von Thompson et al. (10), die feststellten, daß östrogenrezeptornegative Brustkrebszelllinien in Matrigelassays eine stärkere Invasivität zeigten als östrogenrezeptorpositive Zellen. Außerdem konnten für verschiedene ECM-Bestandteile sowohl fördernde als auch hemmende Einflüsse auf die Motilität humaner Mammakarzinomzelllinien nachgewiesen werden (11). Dafür wurden die starren Plastikoberflächen von Zellkulturschalen mit ECM-Molekülen beschichtet (11). Andere Arbeitsgruppen (12-14) beschreiben jedoch, daß sowohl die Konsistenz des Substrates, auf dem die Zellen wachsen (Gel im Gegensatz zu Plastik), als auch die „Verfügbarkeit“ einer dreidimensionalen Umgebung (Wachstum „in“ einem Gel) für das Differenzierungsverhalten der Zellen ausschlaggebend sein können. Besonders die Differenzierung humaner Mammapithelzellen scheint von einer dreidimensionalen Umgebung abzuhängen, da es nur innerhalb von Matrigel oder Kollagen I-Gelen zur Ausprägung der typischen azinusähnlichen Strukturen kommt (15 und persönliche Mitteilung).

Um der physiologischen Umgebung möglichst nahezu kommen, haben wir in der vorliegenden Arbeit nur Gele verwendet. Für die Experimente „in“ bzw. „auf“ Matrigel oder Kollagen I-Gelen wurden drei humane Mammakarzinomzelllinien ausgewählt. Die östrogenabhängigen ZR-75-1-Zellen stellen den gutartigsten Zelltyp der Untersuchung dar (2). In der klinischen Praxis wie experimentell kann das Wachstum solcher Zellen durch die Gabe des Östrogenantagonisten Tamoxifen effektiv gehemmt werden (2). Leider entwickelt sich nach 1-2 Jahren Tamoxifenbehandlung eine Resistenz gegenüber dieser Substanz, und die weitere Behandlung der Tumore bleibt häufig erfolglos (16). Aufgrund der großen Bedeutung dieses Phänomens für die Therapie einer Brustkrebskrankung wurde die tamoxifenresistente, östrogenrezeptornegative ZR-75-1-Sublinie ZR-75-9a1 in die Experimente einbezogen (2). MX-1-Zellen wachsen im Gegensatz zu den ZR-75-Zellen als Xenotransplantate in Nacktmäusen (17) und können daher als die bösartigsten Zellen dieser Studie angesehen werden.

## Material und Methode

### Zelllinien und Medien

Die humane Mammakarzinomzelllinie ZR-75-1 und die tamoxifenresistente Tochterlinie ZR-75-9a1 wurden unserem Labor freundlicherweise von Herrn Dr. van den Berg (Belfast) zu Verfügung gestellt (2). ZR-75-1 Zellen wurden routinemäßig in RPMI 1640 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) mit 5 % fötalem Kälberserum (FKS), 2mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. ZR-75-9a1-Zellen erhielten außerdem 8 µM Tamoxifenzitat, das in Ethanol gelöst war (1 µl Ethanol/ml Medium). Vorversuche hatten gezeigt, daß Ethanol in dieser Dosierung keinen Effekt auf die Zellen ausübte. MX-1-Zellen stammen vom Cell Line Service (CLS, Heidelberg, Deutschland) und wurden ebenfalls in RPMI 1640 mit 2mM L-Glutamin, 100 IU Penicillin/ml und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert, benötigen jedoch 10 % FKS.

### Experimenteller Aufbau

Für die Experimente wurden die Zellen in 24-well-Platten ausgesät, in denen sich entweder Matrigel oder Kollagen I-Gel befanden. Matrigel (Beckton/Dickinson, Heidelberg, Deutschland) wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml verwendet – eine Konzentration, die bei humanen Mammapithelzellen Differenzierung induziert (4). Kollagen I (Vitrogen 100 bestehend aus 95- 98 % Kollagen I und 2-5 % Kollagen III, Collagen, München, Deutschland) wurde in einer Konzentration von 1,5 mg/ml verwendet, die Konzentration, bei der Keely et al. (1) bei der humanen Mammakarzinomzelllinie T47D Differenzierung auslösen konnten. „Auf“ den Gelen wurden 2,5-5 x 10<sup>4</sup> Zellen ausgesät. „In“ den Gelen wurden nach Trypsinierung und Zentrifugation 2,5 x 10<sup>5</sup> Zellen in 300 µl des flüssigen Gels resuspendiert. Dieses Gemisch wurde auf eine vorgelegte Gelschicht gegeben, um einen Kontakt der Zellen mit dem Plastik der Kulturschale zu verhindern. Anschließend wurden die Gele für 1 h bei 37° zum Gelieren gebracht und dann 1 ml Medium/well zugegeben. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt. Vor der Fixierung wurden alle Proben nativ mit einem inversen Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) fotografiert.

<p>----- <b>Bestrahlung</b> -----</p> <p>Maßanfertigungen+Echthaar+Augenbrauen+Einzelhaarverknüpfungen+bis zu 60.000 Einzelknoten ca. 4000 Zweitfrisuren+Partner aller Krankenkassen+unverbindl. Beratung am Krankenbett.</p>	<p>----- <b>Chemotherapie</b> -----</p> <p>Wir sind seit über dreißig Jahren Spezialisten für medizinischen Haarersatz. <b>Ihre Patienten haben einen Anspruch auf ein natürliches Aussehen.</b> Empfehlen Sie uns zum Nutzen Ihrer Patienten weiter! Christianstr. 6, 24534 Neumünster, Tel.: 0 43 21/4 82 00</p>	<p>----- <b>Alopecia</b> -----</p>
<p><b>haar ersatz</b></p> 		

## Elektronenmikroskopie

Für transmissions(TEM)- und raster(REM)-elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden die Kulturen in 0,06 M Na-Cacodylatpuffer mit 2 % (w/v) Glutaraldehyd, 0,6 % Paraformaldehyd und 0,03 %  $\text{CaCl}_2$  fixiert (18). Für die REM-Untersuchungen wurden die Proben nach 24 h zunächst in Cacodylatpuffer gewaschen und dann in einer aufsteigenden Azetonreihe dehydriert. Danach wurde in flüssigem  $\text{CO}_2$  bis zum kritischen Punkt getrocknet und anschließend für 5 min mit Goldpalladium „besputtert“. Für die TEM-Untersuchungen wurden die Proben ebenfalls nach 24 h gewaschen und für 2 h mit 1%  $\text{OsO}_4$  (w/v) und 0,5% Kaliumferrozyanid behandelt, gründlich in 0,2% Natriumazetatpuffer gewaschen und dann für 30 min mit 1% Uranylazetat in 0,2% Natriumazetatpuffer behandelt. Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und über einen Zwischenschritt mit Propylenoxyd in Araldit überführt. Durch einen Beschleuniger wurde die Polymerisierung des Araldid eingeleitet und bei 65° für 48 h vollständig ausgehärtet. Die Proben wurden schließlich ultradünn geschnitten, mit Uranylazetat und Bleizitrat kontrastiert und in einem Elektronenmikroskop (Philipps, Kassel, Deutschland) untersucht.

## Ergebnisse

### Matrigel

„Auf“ und „in“ Matrigel kam es bei allen Zellarten zu Koloniebildung (Abb. 1-3), die mit einem Anstieg der Differenzierung einherging. Hinsichtlich der Differenzierungsmerkmale fanden sich jedoch deutliche Unter-

schiede zwischen den Zelllinien. MX-1-Kolonien (Abb. 1) zeigten eine basale Reihe polarisierter Zellen, Interdigitationen, gangähnliche Strukturen und eine unvollständige Basallamina (Abb. 1 a). Bei ZR-75-1- und -9a1 -Zellen (Abb. 2,3) dagegen war weder eine Basallamina noch eine Polarisation der basalen Zellen zu finden. Stattdessen fanden sich zum Teil auch auf der basalen Seite der Kolonien Mikrovilli. Ein weiterer wichtiger Unterschied bestand darin, daß nur MX-1-Zellen die Fähigkeit besaßen, in das Gel einzuwandern (Abb. 4). Anstelle von Zelloberflächen war über diesen Kolonien nur Fasermaterial des Geles sichtbar. ZR-75-Kolonien (Abb. 5, 6) verhielten sich nicht invasiv, und es waren Zellgrenzen, Zelloberflächen und Mikrovilli sichtbar.

### Kollagen I

Das Wachstumsverhalten der Zellen „auf“ Kollagen unterschied sich geringgradig von dem „in“ Kollagen I. „Auf“ dem Gel waren die Zellen insgesamt etwas flacher. ZR-75-1 und -9a1-Zellen traten immer noch in Gruppen von Zellen mit zahlreichen interzellulären Kontakten auf, wuchsen in zwei bis drei Ebenen und wiesen gangähnliche Strukturen und Interdigitationen auf. Bei MX-1-Zellen fanden sich hingegen fast ausschließlich Einzelzellen ohne interzelluläre Kontakte und ohne die zuvor erwähnten Differenzierungsmerkmale. „In“ den Gelen wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen noch deutlicher. MX-1-Zellen schienen wiederum als dedifferenzierte Einzelzellen in ihre Umgebung einzudringen (Abb. 7), während ZR-75-1 und ZR-75-9a1-Zellen dreidimensionale Kolonien bildeten, deren Differenzierungsgrad dem in Matrigel entsprach (Abb. 8,9).

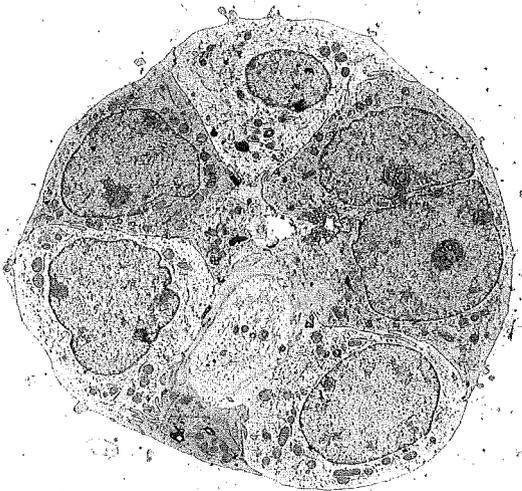


Abbildung 1: Kolonie von MX-1-Zellen in Matrigel. TEM x 7590

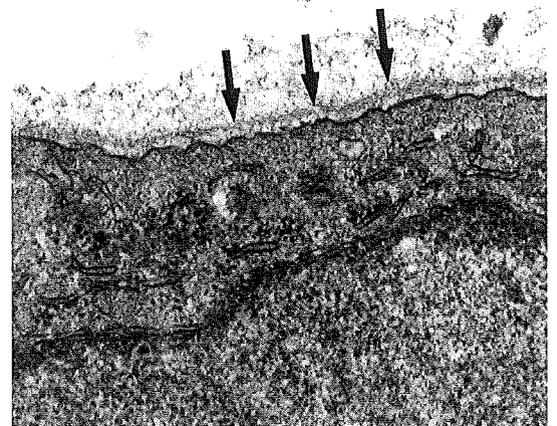


Abbildung 1a: Basalmembran (Pfeile) bei MX-1-Zellen in Matrigel. TEM x 44850

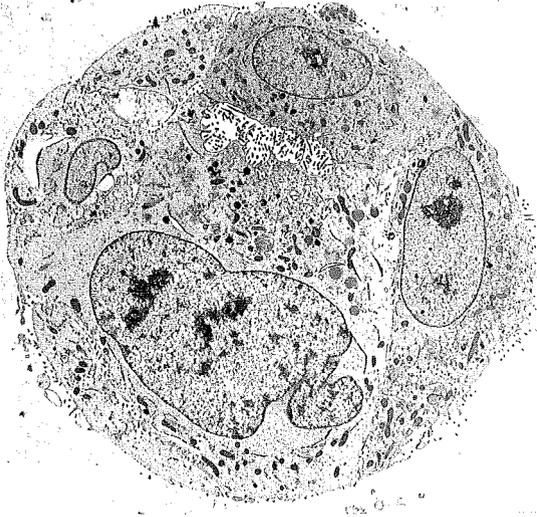


Abbildung 2: Kolonie von ZR-75-1-Zellen in Matrigel. TEM x 5750

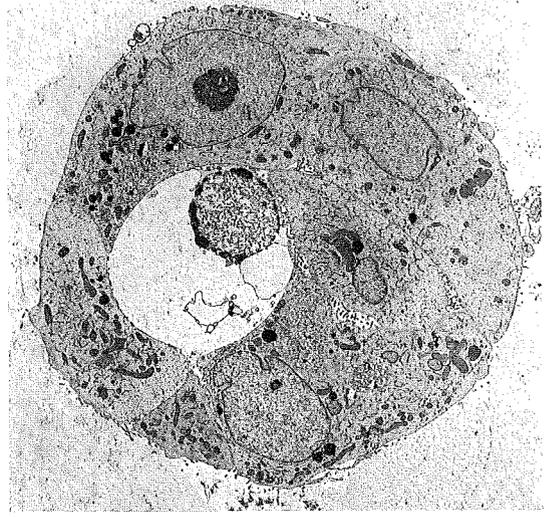


Abbildung 3: Kolonie von ZR-75-9a1-Zellen in Matrigel. TEM x 5750

## Diskussion

In verschiedenen Versuchsansätzen wurde der Frage nachgegangen, inwieweit das Invasionsverhalten von humanen Mammakarzinomzelllinien unterschiedlicher Malignität (Östrogenrezeptorgehalt, Wachstum in Nacktmäusen) durch rekonstituierte Basallamina oder Kollagen I beeinflusst wird. Um die physiologische Umgebung der Zellen bestmöglich nachzuahmen, wurden die Zellen nicht nur „auf“, sondern auch „in“ Gelen ausgesät (12-14). Hinsichtlich des Verhaltens der Zellen „auf“ oder „in“ Matrigel waren die Ergebnisse zunächst überraschend. Transmissionselektronenmikroskopisch zeigten die relativ gutartigen ZR-75-Zelllinien dreidimensionale Kolonien mit der Bildung von drüsentypischen, gangartigen Strukturen und Interdigitationen. Dies sind eindeutige Hinweise auf eine durch Matrigel induzierte Differenzierung, wie sie auch aus Untersuchungen mit anderen Karzinomzelllinien bekannt ist und bei herkömmlicher Kultivierung auf Plastik meist nicht auftritt (5, 6). Bei MX-1-Zellen fanden sich zusätzliche Differenzierungsmerkmale, nämlich basale polarisierte Zellen, die eine unvollständige Basallamina ausgebildet hatten. MX-1-Zellen scheinen sich bei Kontakt mit Matrigel also stärker zu differenzieren und damit gutartiger zu verhalten als die im klassischen Sinne weniger malignen ZR-75-Zellen. Daher läßt sich sagen, daß die Reaktionen der Zellen auf Matrigel keinen Rückschluß auf ihre Malignität zulassen. Rasterelektronenmikroskopisch hingegen zeigte sich, daß nur MX-1-Zellen die Fähigkeit hatten, in Matrigel einzuwandern. Beide ZR-75-Linien blieben auf der Oberfläche des Geles, waren also nicht invasiv

und damit gutartiger. Das Invasionsverhalten von Mammakarzinomzelllinien gegenüber Matrigel wird u. a. genutzt, um von der Invasivität in vitro auf die metastatische Aktivität in vivo zu schließen (10, 19). Außerdem konnten Thompson et al. (10) den bei maligneren Stadien von Mammakarzinomen auftretenden Verlust der Östrogenrezeptoren mit einer stärkeren Invasion des Matrigel korrelieren. Letzteres steht nicht vollständig im Einklang mit den Daten unserer Untersuchung, denn die östrogenrezeptornegative ZR-75-9a1 Tochterzelllinie (2) verhielt sich nicht invasiv. Es ist daher anzunehmen, daß der Verlust der Östrogenrezeptoren nicht notwendigerweise mit dem Erwerb der Fähigkeit,

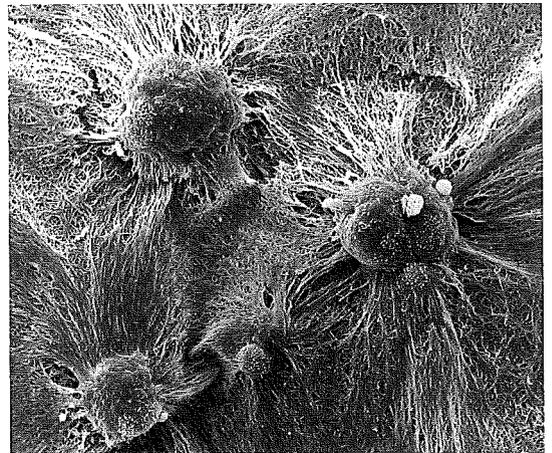


Abbildung 4: Gel-bedeckte Kolonien von MX-1-Zellen auf Matrigel. REM x 1134

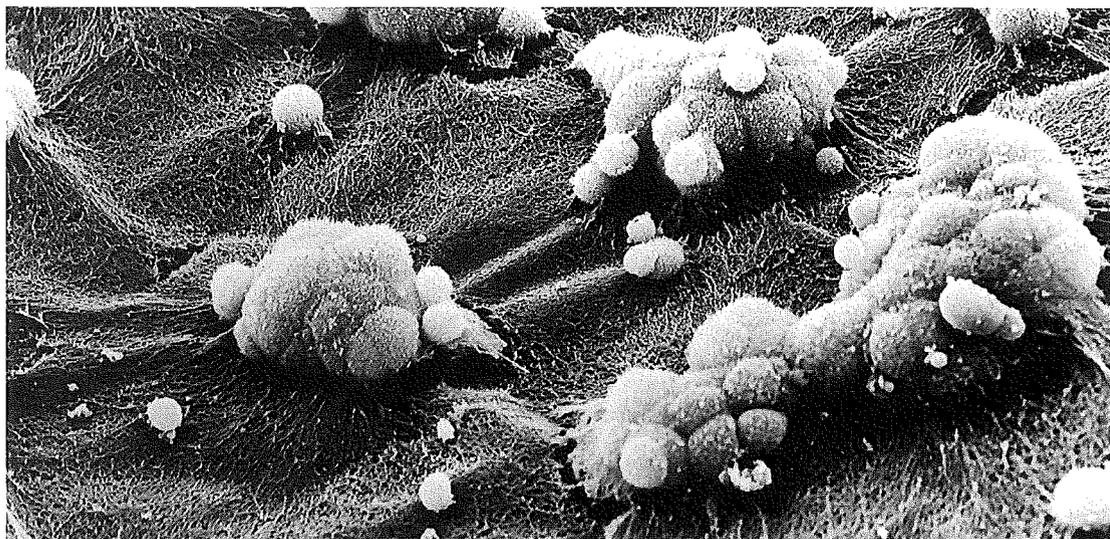


Abbildung 5: Kolonien von ZR-75-1-Zellen auf Matrigel. REM x 567

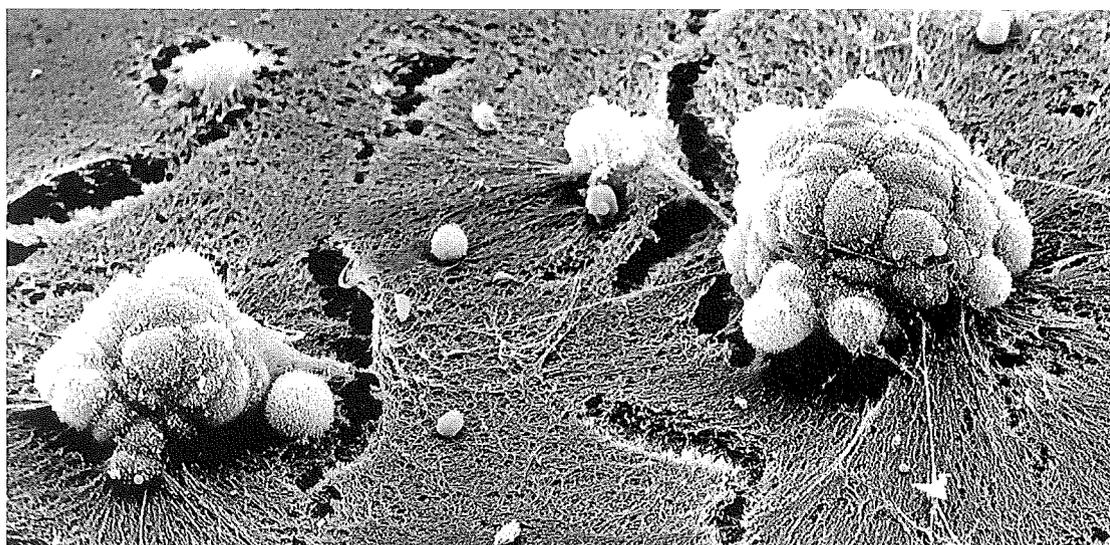


Abbildung 6: Kolonien von ZR-75-9a1-Zellen auf Matrigel. REM x 567

die Basalmembran durchdringen zu können, einhergeht.

In vivo durchbrechen so gut wie alle invasiven Stadien von Tumoren die Basalmembran und geraten anschließend in Kontakt zum Kollagen I des Brustdrüsengewebes (20). Deshalb findet auch Kollagen I in Invasionsassays Verwendung (21). Nach den Ergebnissen unserer Untersuchungen könnte dieser Kontakt bei den bösartigen Zellen die Dedifferenzierung und Vereinzelung der Zellen direkt induzieren oder zumindest (im Gegensatz zu Matrigel) zulassen, so wie dies am Beispiel der MX-1-Zellen erkennbar war. Des weiteren reagierten MX-1-Zellen „in“ und „auf“ Kollagen I vermehrt

mit Mitosen (BrdU-Inkorporation, unveröffentlichte Daten). Diese Befunde werden unterstützt durch Ergebnisse von Noel et al. (22), die bei der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 „auf“ Kollagen I-Gelen ebenfalls dedifferenzierte Monolayer und eine gesteigerte Proliferationsrate nachweisen konnten. Weitere Hinweise stammen aus Untersuchungen, die an der caninen Nierenepithelzelllinie MDCK durchgeführt wurden. Bei diesen Experimenten breiteten sich die Zellen „auf“ Kollagen I einzeln und fibroblastenähnlich aus, während es „auf“ Matrigel wie bei MX-1-Zellen zu Differenzierung kam (23). „In“ Kollagen I-Gelen kam es jedoch erneut zu einem Anstieg der

Differenzierung von MDCK-Zellen (23), was entweder für die relative Gutartigkeit der Zelllinie spricht oder in der Herkunft der Zellen – also in der abweichenden Regulation der Differenzierung (Mammaepithel-/Nierenepithelzellen) – begründet sein könnte.

Ursachen für die Ausbreitung in ECM könnten in der Fähigkeit der Zellen liegen, matrixverdauende Metalloproteinasen zu produzieren und auch zu aktivieren (24). Untersuchungen von Azzam et al. (25) erbrachten, daß speziell durch Kollagen I-Gel bei östrogenrezeptornegativen humanen Mammakarzinomzelllinien eine Aktivierung der Metalloproteinase MMP-2 induziert werden kann. Da sich MX-1-Zellen auf Kollagen I auch unter serumfreien, also weitgehend metalloproteinasefreien Bedingungen ausbreiten (unveröffentlichte Daten), scheinen noch weitere Mechanismen zu existieren, die eine Invasion ermöglichen. Welche Bedeutung eine mögliche Produktion von Metalloproteinasen für den Mechanismus der Invasion von MX-1-Zellen im Zusammenhang mit Kollagen I besitzt, wird derzeit untersucht.

Beide ZR-75-Linien – ähnlich normalen Mammaepithelzelllinien (15) – bildeten auch in Reaktion auf Kollagen I Kolonien, deren Differenzierung zumindest „in“ Kollagen I der durch Matrigel induzierten entsprach. In keiner der beiden Versuchsgruppen („in“ oder „auf“ den Gelen) kam es zu einer Vereinzelung der Zellen. Demnach spiegelt das Verhalten der Zellen bei Kontakt zu Kollagen I sehr viel besser die Malignität der eingesetzten Zelllinien wieder. Es liegt die Schlußfolgerung nahe, daß Kollagen I bei malignen Zellen ein invasives Verhalten (Dedifferenzierung und Invasion als Einzelzellen) unterstützt bzw. zuläßt, während Basalmembran/Matrigel auch bei manchen bösartigen Zellen ein relativ gutartiges Verhalten (Differenzierung) induzieren kann. Da Mammakarzinomzellen in vivo beim Übergang zum invasiven Typ die Eigenschaft erwerben, sich als einzelne Zellen in das angrenzende, Kollagen I-enthaltende Gewebe auszubreiten (8), wäre also denkbar: 1. daß Kollagen I ein Signal für die aggressive Invasion in die Umgebung gibt oder 2. daß der Verlust der Eigenschaft, sich in Kollagen I zu differenzieren, eine Invasion auslöst. Angaben aus der Literatur verweisen bezüglich Invasion und Metastasierung von Tumorzellen auf die Bedeutung von Molekülen, wie den e-Cadherin/Catenin-Komplex (20, 8), Vimentin (10) oder Metalloproteinasen (24, 25). Aufgrund unserer Befunde liegt es nahe, auch kausale Zusammenhänge zwischen Einflüssen von Basalmembran bzw. Kollagen I und diesen „Metastase-markern“ zu vermuten. Abgesehen von den Untersuchungen von Azzam et al. (25) zu Kollagen I-induzierten Metalloproteinaseaktivatoren ist dieses Problem jedoch bisher weitgehend ungeklärt und wird deshalb Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

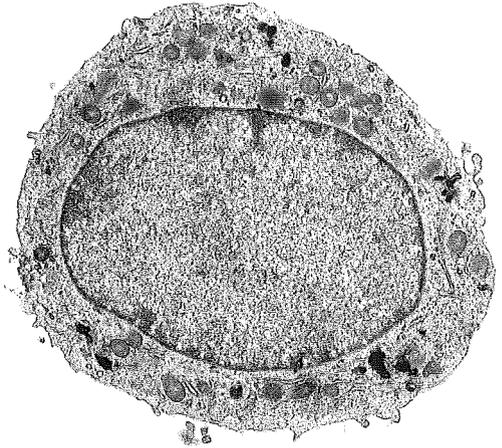


Abbildung 7: Einzelne MX-1-Zelle in Kollagen I-Gel. TEM x 20700

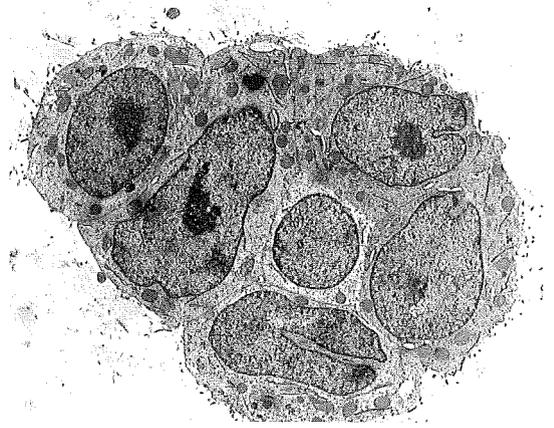


Abbildung 8: Kolonie von ZR-75-1-Zellen in Kollagen I-Gel. TEM x 4485

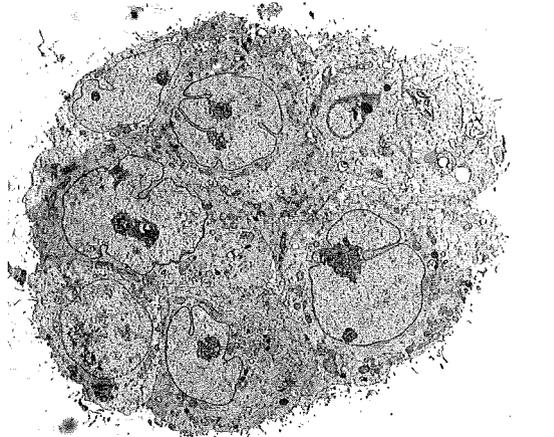


Abbildung 9: Kolonie ZR-75-9a1-Zellen in Kollagen I-Gel. TEM x 7590

## Literatur

1. Keely PJ, Fong AM, Zutter MM, Santoro SA: Alteration of collagen dependent adhesion, motility, and morphogenesis by the expression of antisense 2 integrin mRNA in mammary cells. *J Cell Sci* 1995; 108: 595-607.
2. van den Berg HW, Lynch M, Martin J, Nelson J, Dickson GR, Crookard AD: Characterisation of a tamoxifen-resistant variant of the ZR-75-1 human breast cancer cell line (ZR-75-9a1) and stability of the resistant phenotype. *Br J Cancer* 1989; 59: 522-526.
3. Blaschke RJ, Howlett AR, Deprez PY, Petersen OW, Bissell MJ: Cell differentiation by extracellular matrix components. *Methods Enzymol* 1994; 245: 535-556.
4. Petersen OW, Ronnov-Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ: Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Nat Acad Sci* 1992; 89: 9064-9068.
5. Del-Buono R, Pignatelli M, Bodmer WF, Wright NA: The role of arginine-glycine-aspartic acid directed binding to type I collagen and rat mesenchymal cells in colorectal tumor differentiation. *Differentiation* 1991; 46(2):97-103.
6. Kibbey MC, Royce LS, Dym M, Baum BJ, Kleinman HC: Glandular-like morphogenesis of the human submandibular tumor cell line A253 on basement membrane components. *Exp Cell Res* 1992; 198(2):343-351
7. Schubert C, Mendoza AS, Mentzel M, Kühnel W: Responses of the human breast tumor cell line MX-1 to reconstituted basement membrane (matrigel). A transmission and scanning electron microscopical study. *Ann Anat* 1996; Suppl 178:115.
8. Moll R, Mike M, Frixen UH, Birchmeier W: Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *Am J Path* 1993; 143: 1731 -1742.
9. Wiedemann GJ, Roszinski S, Biersack A, Mentzel M, Weiss C, Wagner T: Treatment efficacy, intratumoral  $PO_2$  and pH during thermochemotherapy in xenotransplanted human tumors growing in nude mice. *Contrib Oncol* 1992; 42: 556-565.
10. Thompson EW, Paik S, Brünnner N, Sommer CL, Clarke R, Shima TB, Torri J, Donahue S, Lippman ME, Martin GR, Dickson RB: Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Phys* 1992; 150: 534-544.
11. Coopman PJ, Bracke ME, Lissitzky JC, de Bruyne GK, van Roy FM, Foidart JM, Mareel MM: Influence of basement membrane molecules on directional migration of human breast cell lines in vitro. *J Cell Sci* 1991; 98: 395-401.
12. Li ML, Aggeler J, Farson DA, Hatier C, Hassell J, Bissell MJ: Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Nat Acad Sci* 1987; 84: 136-140.
13. Hohn HP und Denker HW: The role of cell shape for differentiation of chorioncarcinoma cells on extracellular matrix. *Exper Cell Res* 1994; 215: 40-50.
14. Senoo H, Imai K, Sato M, Kojima N, Miura M, Hata RI: Threedimensional structure of extracellular matrix reversibly regulates morphology, proliferation, and collagen metabolism of perisinusoidal stellate cells (vitamin A storing cells). *Cell Biol Int* 1996; 20: 501-512.
15. Howlett AR, Bailey N, Damsky C, Petersen OW, Bissell MJ: Cellular growth and survival are mediated by  $\beta 1$  integrins in normal human breast epithelium but not in breast carcinoma. *J cell Sci* 1995; 108: 1945-1957.
16. Jiang SY und Jordan VC: A molecular strategy to control tamoxifen resistant breast cancer. *Cancer Surveys* 1992; 14: 55-70.
17. Mendoza AS, Mentzel M, Krüger M, Krammer HJ, Wiedemann G, Wagner T, Weiss C, Kühnel W: The morphology of xenotransplanted human breast carcinoma MX-1 growing in nude mice. A light and transmission electron microscopical study. *Ann Anat* 1995; 177: 3-10.
18. Graziadei PP, Levine RR, Monti-Graziadei GA: Plasticity of connections of the olfactory sensory neuron: regeneration into the forebrain following bulbectomy in the neonatal mouse. *Neurosci* 1979; 4: 713-727.
19. Bae SN, Arand G, Azzam H, Pavasant P, Torri J, Frandsen TL, Thompson EW: Molecular and cellular analysis of basement membrane invasion by human breast cancer cells in matrigel-based in vitro assays. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 24:241-255.
20. Flug M, Köpf-Maier P: The basement membrane and its involvement in carcinoma cell invasion. *Acta Anat* 1995; 152: 69-84.
21. Vermeulen SJ, Bruyneel EA, Bracke ME, de Bruyne GK, Vennekens KM, Vleminckx KL, Bexx GJ, van Roy FM, Mareel MM: Transition from the noninvasive to the invasive phenotype and loss of  $\alpha$ -catenin in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1995; 55: 4722-4728.
22. Noel A, Calle A, Emonard H, Nusgens B, Foidart JM, Lapiere CM: Antagonistic effects of laminin and fibronectin in cell-to-cell and cell-to-matrix interactions in MCF-7 cultures. *In Vitro Cell Dev Biol* 1988; 24: 373-380.
23. Zuk A, Matlin KS, Hay ED: Type 1 collagen induces Madin-Darby canine kidney cells to become fusiforme in shape and loose apical-basal polarity. *J Cell Biol* 1989; 108: 903-919.
24. Goldberg GL, Eisen AZ: Extracellular matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. In *Advances in Cellular and Molecular Biology of Breast Cancer: Regulatory Mechanisms in Breast Cancer* (Lippman ME, Dickson RB eds.) Boston: Kluwer Acad Public 1990: 421-440.
25. Azzam HS, Arand G, Lippman ME, Thompson EW: Association of MMP2 activation Potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production. *J Nat Cancer Inst* 1993; 85: 1758-1764.

# KONGRESS

## ORGANISATION

Ihr leistungsstarker  
Partner mit über  
30jähriger Erfahrung.



Kompetent bei der  
Durchführung von

### **KONGRESSEN TAGUNGEN SEMINAREN SYMPOSIEN** (auch via Satellit)

im gesamten  
Bundesgebiet und dem  
benachbarten Ausland.



Lassen Sie sich von uns  
beraten!



Hansisches Verlagskontor  
Mengstraße 16  
23552 Lübeck  
Tel. 04 51 / 70 31-205  
Fax. 04 51 / 70 31-281

■ Anmietung  
geeigneter  
Räumlichkei-  
ten

■ Hotel-  
buchungen

■ Tagungsbüro

■ Industrie-  
ausstellung

■ Teilnehmer-  
verwaltung

■ Referenten-  
betreuung

■ Bereitstellen  
modernster  
Technik und  
Kommunika-  
tionssysteme

■ Drucksachen,  
Herstellung und  
Versand

■ Rahmen-  
programm

■ Finanzplanung/  
Abrechnung

■ PR unterstüt-  
zende  
Aktivitäten

# Knochenmatrixveränderungen bei Osteoporose – Bedeutung von TGF- $\beta$

B. Bätge

## 1. Einleitung

### *Definition*

Die aktuell gültige Definition bezeichnet die Osteoporose allgemein als eine Krankheit mit reduzierter Knochenmasse und zerstörter Mikroarchitektur, woraus jeweils ein gesteigertes Frakturrisiko resultiert. Diese Minimalkonsens-Definition trägt offensichtlich wenig zur Diagnosestellung am einzelnen Patienten im klinischen Alltag bei. Es hat daher nicht an Versuchen gefehlt, die Diagnose „Osteoporose“ an meßbare Parameter zu koppeln, insbesondere, seit mit den verschiedenen Methoden der Osteodensitometrie die Möglichkeit zur nicht-invasiven Bestimmung der Knochendichte eines Patienten besteht. Die bloße Präsenz einer erniedrigten Knochenmasse berücksichtigt jedoch in keiner Weise, daß die klinische Manifestation einer Osteoporose in aller Regel an das Auftreten von Frakturen gekoppelt ist, andererseits besteht die Erkrankung natürlich schon am Tag vor dem Eintreten einer Fraktur. Eine jüngere Osteoporose-Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) versucht daher einer Synthese dieser Aspekte (28). Demnach liegt eine Osteoporose bei einer Knochenmineraldichte von mehr als 2,5 Standardabweichungen (SD) unterhalb des Durchschnittswertes des jungen Erwachsenen vor (sog. T-Wert), von einer „Osteopenie“ spricht man dementsprechend bei einer Knochenmineraldichte von - 1 bis - 2,5 SD. Die Zusätze „präklinisch“ oder „manifest“ (engl. „established“) berücksichtigen dabei, ob noch keine oder bereits mindestens eine osteoporosebedingte Fraktur vorliegt.

### *Epidemiologie*

Legt man die genannte WHO-Definition zugrunde, so ergibt sich auf der Basis einer jüngeren US-amerikanischen Untersuchung, daß in den USA 16,8 Millionen (entsprechend 54 %) aller postmenopausalen weißen Frauen eine Osteopenie und 9,4 Millionen (30 %) eine Osteoporose haben (21). Etwa 4,8 Millionen Frauen leiden bereits unter einer manifesten Osteoporose. Allein in den USA sind jährlich mindestens 1,3 Millionen Frakturen auf eine Osteoporose zurückzuführen; die drei im Osteoporose-Kontext am häufigsten betroffenen Skelettregionen sind der Schenkelhals, die

Wirbelsäule und der distale Unterarm. Das Lebenszeitrisiko für einen dieser Frakturtypen beträgt für eine Frau über 50 Jahren etwa 40 % (22).

Die Schätzungen für die der Volkswirtschaft entstehenden Kosten aufgrund osteoporotischer Frakturen belaufen sich allein für die USA auf 20 Milliarden US-\$ jährlich, wobei die Schenkelhalsfrakturen den größten Anteil daran haben dürften.

### *Diagnostisch-therapeutisches Dilemma*

Trotz der dargestellten Bemühungen um eine eindeutige Definition der Osteoporose bleibt die Diagnosestellung am einzelnen Patienten häufig schwierig, insbesondere zu einem Zeitpunkt, wo therapeutische oder – noch besser – prophylaktische Interventionen noch sinnvoll sind. Doch auch die Diagnose einer manifesten Osteoporose ist häufig problematisch, da selbst die zweifelsfreie Erkennung von Wirbelkörperfrakturen schwierig ist (15). Im Prä-Frakturstadium steht die Osteodensitometrie zur individuellen Risikoabschätzung zur Verfügung, deren breiter Einsatz als Screeninguntersuchung erscheint jedoch derzeit volkswirtschaftlich nicht vertretbar, so daß im allgemeinen die anamnesegestützte Eingrenzung von Risikogruppen am Beginn der Patienten-Evaluierung steht. Die sich daraus evtl. ergebende Densitometrie als statische Momentaufnahme kann komplementiert werden durch die Bestimmung von Knochenstoffwechsel-Parametern im Serum und im Urin, die eine Aussage über die dynamische Größe des Knochenumsatzes erlauben und damit die Auswahl des Therapeutikums mitbeeinflussen könnten. Bis heute existiert jedoch keine einfache und bezahlbare Methode, um eine interventionspflichtige Osteoporose im präklinischen Stadium zweifelsfrei zu diagnostizieren und dann kurativ zu behandeln. Der Hauptgrund hierfür dürfte in dem noch mangelhaften Verständnis der Pathogenese der Osteoporose zu suchen sein. Vieles weist darauf hin, daß eine individuelle ossäre Prädisposition vorhanden ist. Die zentrale Bedeutung lokaler Faktoren in der Osteoporoseentstehung dürfte dabei einer der Schlüssel für künftige frühdiagnostische Methoden und kausal-therapeutische Ansätze sein (9, 20, 24). Unser besonderes Interesse galt hingegen der bislang wenig untersuchten organischen Knochenmatrix als Grundgerüst stabilen Kno-

chengewebe sowie als Speicher zahlreicher Moleküle mit unterschiedlichsten Funktionen. Die zentrale Frage war dabei, ob sich beim Kollagen, welches über 90 % der organischen Matrix stellt, osteoporose-typische Veränderungen finden lassen, die möglicherweise zum besseren Verständnis Pathogenese der Osteoporose beitragen könnten.

## 2. Material und Methoden

In einer postmortalen Untersuchung wurde vertebrales Knochengewebe (BWK 2 bis LWK 5) von insgesamt 55 Patienten (28 Frauen, 27 Männer; Alter 22-93 Jahre) untersucht. Es wurde versucht, alle erwachsene Altersgruppen sowie Patienten mit makroskopisch offensichtlich stark unterschiedlicher Knochendichte zu erfassen (Abb. 1). In allen Fällen wurde an LWK 2 eine computergestützte histomorphometrische Analyse zur Knochendichtebestimmung durchgeführt. Zentraler Parameter war dabei das trabekuläre Knochenvolumen (TBV), hiermit wurden die blind dazu erhobenen biochemischen Daten jedes Falles korreliert.

### Kollagenextraktion

Die gereinigte und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  pulverisierte Wirbelkörperspongiosa wurde zunächst durch Dialyse gegen 0.4M EDTA bei pH 7.4 für 5 Wochen entkalkt. Das Knochenkollagen wurde dann durch wiederholten, jeweils limitierten Pepsinverdau in Lösung gebracht (3). Zur Trennung und Anreicherung einzelner Kollagentypen erfolgten sequentielle neutrale und saure Salzfällungen durch Dialyse nacheinander gegen 1,0 M, 1,8 M und 2,5 M NaCl-Lösungen (0.05 M Tris, pH 7,4). Über eine HPLC-Anlage erfolgte dann die Trennung der beiden  $\alpha$ -Ketten des Kollagen I. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend lyophilisiert und deren Reinheit durch SDS-PAGE überprüft.

Zur Bestimmung des Hydroxylysin- und Hydroxyprolingehaltes wurde ein automatischer Aminosäurenana-

lyzer eingesetzt. Für die Bestimmung des Gehaltes von Galactosyl-Hydroxylysin (GH) bzw. Glucosyl-Galactosyl-Hydroxylysin (GGH) wurden die Hydrolysate vorher durch Kationenaustausch-Chromatographie angereichert und dann auf den genannten Aminosäureanalyser aufgetragen.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Kollagenfibrillen wurden sowohl direkt vom menschlichen Knochengewebe isolierte Kollagenfibrillen als auch solche, die in vitro aus isoliertem Kollagen I der Patienten gebildet worden waren, verwendet.

### Untersuchungen an humanen Osteoblasten in vitro

Die Anlage der Primärkultur von osteoblasten-ähnlichen Zellen erfolgte aus humaner Hüftkopf-Spongiosa nach der Explant-Methode. Bei elektiven Totalendoprothesen-Operationen an Patienten beiderlei Geschlechts, die in der Klinik für Orthopädie der Medizinischen Universität zu Lübeck durchgeführt wurden, wurde die Spongiosa aus dem Hüftkopf entfernt. Die Kultivierung des Explantats (ca. 6 Stückchen/cm<sup>2</sup>) erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Polycarbonat-Zellkulturflaschen mit Filterdeckel in supplementiertem DMEM bei 37° C in einem Begasungsbrutschrank in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>. Eine Zellbank wurde in flüssigem Stickstoff angelegt. Dazu wurden jeweils konfluente hOB einer 75 cm<sup>2</sup>-Schale trypsinisiert und das gewonnene Zellpellet in Einfriermedium (10 % (v/v) DMSO in FKS) resuspendiert. Die Charakterisierung des Zellsystems erfolgte u. a. durch den cytochemischen Nachweis der Alkalischen Phosphatase (ALP) und die Bestimmung der ALP-Enzymaktivität, den Nachweis der PTH-stimulierten cAMP-Aktivierung sowie den Nachweis der Osteocalcinsynthese und der in vitro Mineralisierung.

Für die quantitative und qualitative Analyse der in vitro Kollagensynthese wurden Inkubationen mit L-<sup>3</sup>[H]-Prolin durchgeführt. Berechnet wurde die quantitative Kollagensynthese als Hydroxyprolin- Counts [Bq] pro Zelle, der Sekretionsfaktor wurde als  $\frac{[{}^3\text{H}]\text{-Hydroxyprolin}_{\text{Medium}}}{([{}^3\text{H}]\text{-Hydroxyprolin}_{\text{Medium}} + [{}^3\text{H}]\text{-Hydroxyprolin}_{\text{Zellen}})}$  ausgedrückt. Zur qualitativen Kollagenanalyse wurden nach erfolgter Gelelektrophorese die Banden der aufgetrennten Kollagen-a-Ketten (a1I, a2I, a1III, a1V) ausgeschnitten. Die counts [Bq] pro a-Kette wurden als prozentualer Anteil der Gesamtaktivität aller a-Ketten einer Probe berechnet, um den relativen Anteil der Kollagentypen I, III und V zu bestimmen.

Für die Analyse der posttranslationalen Modifizierung von Lysinresten einzelner  $\alpha$ -Ketten unter der Einwirkung verschiedener Faktoren wurden Inkubationen mit L-[<sup>14</sup>C]-Lysin durchgeführt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte analog der qualitativen Kollagenanalyse

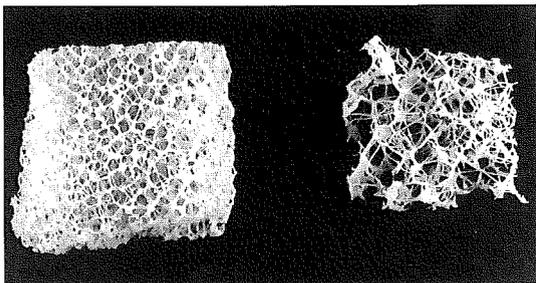


Abb. 1: Vertebrale Wirbelkörperspongiosa mit im Normbereich liegender (rechts) und stark erniedrigter Knochenmasse (links). Jeweils 0,5 cm dicke Spongiosawürfel, wie sie im Rahmen der biochemischen Aufarbeitung anfielen.

wie beschrieben bis zum Ausschneiden der Banden der  $\alpha$ -Ketten. Die Auftrennung und Quantifizierung der markierten Lysinreste erfolgte mittels Kationenaustauschchromatographie mit angeschlossener Festphasenzintillation und automatischer Berechnung. Zur Auswertung wurden die [ $^{14}\text{C}$ ]-Aktivitäten in den Signalen von GGH, GH, Hyl und Lys addiert und der relative Anteil jeder Komponente berechnet. Durch Multiplikation dieses Anteils mit der Gesamtzahl an Lysinresten einer  $\alpha$ -Kette wurde die jeweilige Anzahl der modifizierten Reste je  $\alpha$ -Kette berechnet.

#### Inkubation mit TGF- $\beta_1$

TGF- $\beta_1$  aus humanen Thrombocyten wurde in Konzentrationen von 0,1 bis 5 ng/ml zur Inkubation eingesetzt, wobei das Lösungsmittel als Nullwert genommen wurde. Zum Beleg TGF- $\beta$ -spezifischer Effekte wurden parallele Inkubationen mit anti-TGF- $\beta_1$  neutralisierenden Antikörpern durchgeführt. Analysiert wurde dann die in vitro Kollagensynthese (s. o.) sowie der Einfluß dieses Wachstumsfaktors auf die Lysylhydroxylase. Hierzu wurde für die Northern-Analysen eine cRNA-Sonde für die Lysylhydroxylase konstruiert. Zur semiquantitativen Analyse der Lysylhydroxylase-mRNA-Spiegel unter dem Einfluß von TGF- $\beta_1$  wurden Dot-Blot-Analysen mit  $\beta$ -Actin als Standard durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### Kollagenzusammensetzung

Die Auftrennung einzelner  $\alpha$ -Ketten mittels SDS-PAGE zeigte überwiegend (> 90 %) Kollagen I, Kollagen V ließ sich in allen untersuchten Proben nachweisen, der relative Anteil betrug etwa 8 % (Abb. 2, Spur C). Es zeigten sich keine relevanten interindividuellen Unterschiede hinsichtlich dieser Zusammensetzung, ebenso ergab sich keine eindeutige Korrelation zum Alter des Patienten oder zur morphometrisch bestimmten Knochenmasse (2). Kollagen III ließ sich nicht oder nur in Spuren im erwachsenen Knochengewebe nachweisen. Dieser Kollagentyp kommt physiologischer-

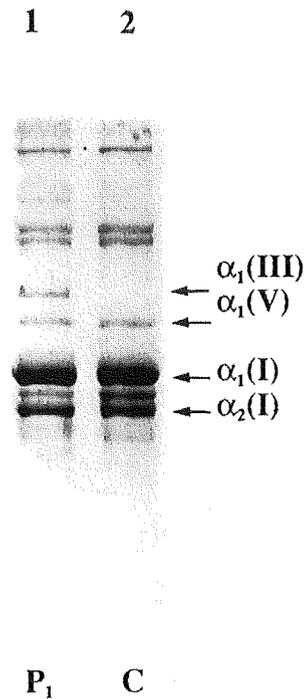


Abb. 2: Gelelektrophoretische Auftrennung (SDS-PAGE) des humanen Kollagens, welches durch limitierten Pepsinverdau aus der Wirbelkörperspongiosa der geschilderten Patientin mit extremer Osteoporose (P<sub>1</sub>) sowie aus Kontrollgewebe (C) extrahiert wurde. Die densitometrische Analyse ergab einen etwa 85 %-igen Anteil von Kollagen I und einen jeweils etwa 8 %-igen Anteil der Kollagen III und V.

weise nur in fetalem, nicht jedoch in postnatalem Knochengewebe vor (7).

Auffälligkeiten in der Kollagenzusammensetzung zeigten sich lediglich in einem Sonderfall einer 67jährigen Patientin, bei der seit etwa 15 Jahren eine manifeste Osteoporose mit Kompressionsfrakturen mehrerer Wirbelkörper bekannt waren (Abb. 3). Histomorphometrisch ergab sich ein extrem verringertes trabekuläres Knochenvolumen (TBV) von 3,1 %; dies entsprach dem niedrigsten aller im untersuchten Kollektiv bestimmten Werten. Die biochemische Aufarbeitung der vertebrealen Spongiosa zeigte in der SDS-PAGE ungewöhnlicherweise signifikante Mengen Kollagen III (Abb. 2, Spur P<sub>1</sub>). Bei der histologischen Untersuchung fanden sich in diesem Fall auffällige geflechtartige Strukturen an den ansonsten lamellär aufgebauten Trabekeln im Sinne von Mikrokallus-Gewebe, welches sich offensichtlich aufgrund der extrem niedrigen Knochenmasse nach Mikrofrakturen einzelner Trabekel gebildet hatte (5). Die daraufhin durchgeführte immunhistochemische Untersuchung dieser Areale belegte, daß sich das Kollagen III in diesen geflechtartig aufgebauten Regionen befand (ohne Abb.), wobei der relative Anteil densitometrisch auf etwa 8 % beziffert werden konnte. Dieser spezielle Fall demonstrierte somit, daß sich bei extrem niedriger Knochenmasse Mikrofrakturen mit reaktiver Mikrokallusbildung nachweisen lassen können. Hierbei kommt es zur Produktion von Kollagen III, welches normalerweise ausschließlich in fetalem Knochengewebe vorhanden ist.

Dieser spezielle Fall demonstrierte somit, daß sich bei extrem niedriger Knochenmasse Mikrofrakturen mit reaktiver Mikrokallusbildung nachweisen lassen können. Hierbei kommt es zur Produktion von Kollagen III, welches normalerweise ausschließlich in fetalem Knochengewebe vorhanden ist.

#### Posttranslationale Kollagenmodifikation

Aufgrund der zentralen Bedeutung der posttranslationalen Modifikation für die funktionsadaptierte Ausgestaltung der kollagenen Knochenmatrix (vgl. Diskussion) stellte die Suche nach Veränderungen des Lysylhydroxyierungsgrades und des Glykosylierungsgrades an Proben mit unterschiedlicher Knochenmasse eine Kardinalfragestellung dar. Der mittlere Lysylhydroxyierungsgrad (LHG) zeigte keine signifikanten Unter-

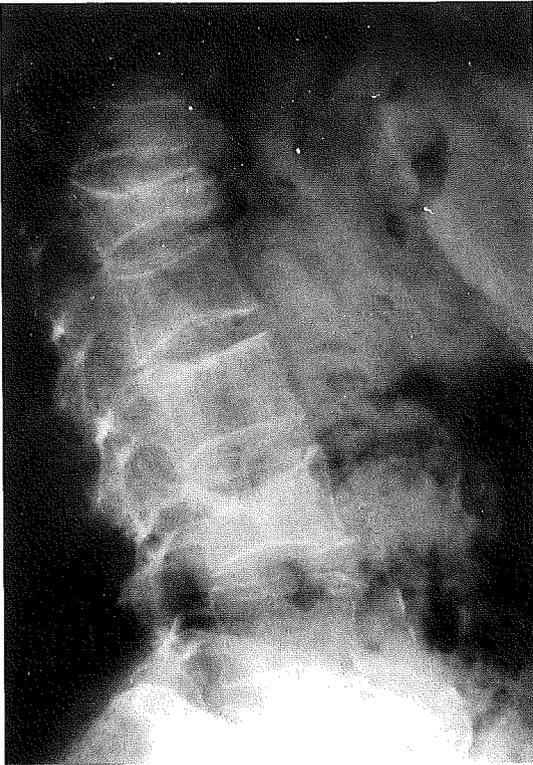


Abb. 3: Seitliche Röntgenaufnahme der LWS und unteren BWS der geschilderten Patientin mit extremer Osteoporose. Erkennbar sind mehrere osteoporotische Wirbelkörperfrakturen und -verformungen.

schiede zwischen beiden Geschlechtern. Es zeigte sich nur eine schwache positive Korrelation dieses Parameters zum Alter des Patienten, wobei nur für die  $\alpha 2(I)$ -Kette eben das Signifikanzniveau erreicht wurde ( $r=0,30$ ,  $p<0,05$ ). Deutlich war dagegen für beide  $\alpha$ -Ketten die signifikante negative Korrelation des LHG zum morphometrisch ermittelten trabekulären Knochenvolumen (TBV;  $r=-0,56$ ,  $p<0,001$  für  $\alpha 1(I)$  und  $r=-0,38$ ,  $p<0,05$  für  $\alpha 2(I)$ ; vgl. Abb. 4). Innerhalb des weiblichen Subkollektivs war der LHG in prämenopausalen niedriger als in postmenopausalen Frauen, am höchsten jedoch in Patientinnen mit manifester Osteoporose (ohne Abb.). Darüber hinaus zeigte sich eine signifikante negative Korrelation Kollagen-I-Glycosylierungsgrades mit dem trabekulären Knochenvolumen (TBV;  $r=-0,75$ ,  $p<0,005$ ; vgl. Abb. 5). Der Glycosylierungsgrad des Kollagens I zeigte eine enge Beziehung zum Lysylhydroxylierungsgrad ( $r=0,66$ ,  $p<0,01$  für  $\alpha 2(I)$ ).

Zur Beantwortung der Frage, ob die posttranslationalen Kollagenmodifikationen den Durchmesser der Kollagenfibrillen beeinflussen, wurden sowohl direkt vom humanen Knochengewebe isolierte, als auch in vitro

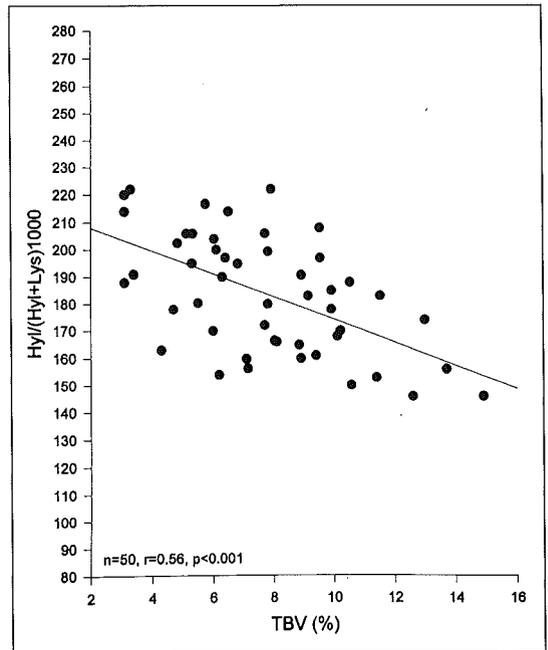


Abb. 4: Negative Korrelation zwischen dem Lysylhydroxylierungsgrad von  $\alpha 2(I)$  und dem trabekulären Knochenvolumen (TBV). Der Lysylhydroxylierungsgrad ist ausgedrückt als [Hydroxylysin / (Hydroxylysin + Lysin)] x 1000 (hier für  $n=50$ ,  $r=-0,56$ ,  $p<0,001$ ).

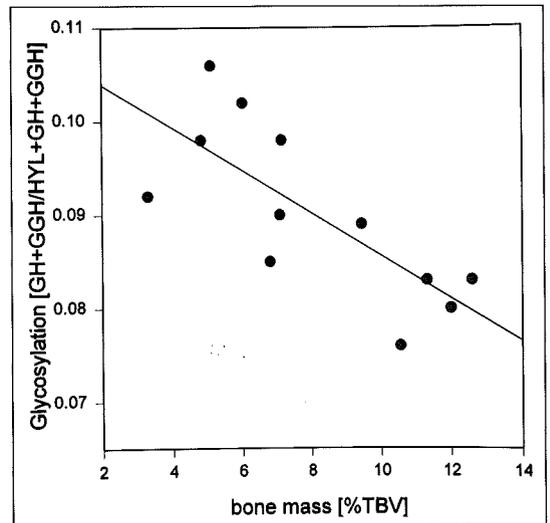


Abb. 5: Negative Korrelation zwischen dem Glycosylierungsgrad von humanem Kollagen I und dem trabekulären Knochenvolumen (TBV). Der Glycosylierungsgrad ist ausgedrückt als (GH+GGH) / (GH+GGH+Hyl). ( $n=12$ ,  $r=-0,75$ ,  $p<0,005$ ). (GH = Galactosyl- / GGH = Glucosyl- Galactosyl-Hydroxylysin).



Abb. 6: Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahme von in vitro geformten Fibrillen aus reinem Kollagen I, welches aus humaner Wirbelkörperspongiosa isoliert wurde. Erkennbar ist die charakteristische Querstreifung in 67nm-Periodizität (Abb: Prof. Dr. H. Notbohm, Institut für Med. Molekularbiologie).

neugeformte Fibrillen elektronenmikroskopisch untersucht (Abb.6). Es zeigte sich an insgesamt 10 Proben in beiden Assays keine erkennbare Beziehung zwischen dem Glycosylierungsgrad des Kollagens I und dem Fibrillendurchmesser (4).

#### Osteoblastäre Kollagensynthese – Wirkung von TGF- $\beta_1$ (vgl. Tab. 1)

Die Gesamtkollagensynthese wurde durch TGF- $\beta$  signifikant konzentrationsabhängig stimuliert und erreichte das 3,4-fache des Kontrollwertes bei 5 ng/ml TGF- $\beta$ . Darüber hinaus führten hohe TGF- $\beta$ -Konzentrationen zu einer deutlichen Abnahme des relativen Anteils von Kollagen III auf etwa ein Drittel des Ausgangswertes, woraus eine Steigerung des Kollagen

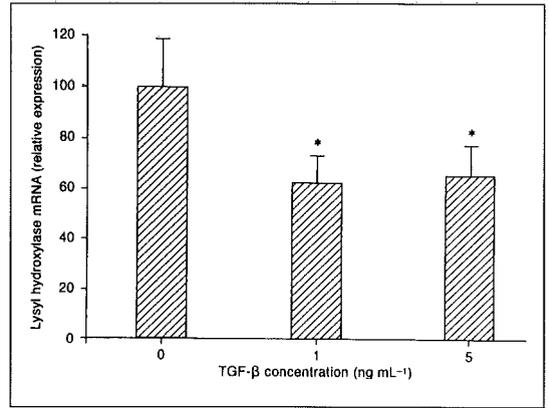


Abb. 7: Reduktion der Lysylhydroxylase- mRNA-Spiegel in humanen Osteo-blasten unter dem Einfluß von TGF- $\beta$  (\* =  $p < 0,005$ ). Graphische Auswertung der RNA Dot Blots mit der Lysylhydroxylase-Sonde,  $\beta$ -Actin diente als interner Standard.

I/III-Verhältnisses resultierte (25). Auf RNA-Ebene führte TGF- $\beta_1$  ebenfalls zu einer Steigerung der Transkripte für beide  $\alpha$ -Ketten des Kollagens I, wohingegen es zu einer deutlichen Abnahme des  $\alpha 1(III)$ -Transcriptes kam.

Darüberhinaus führte die Inkubation mit TGF- $\beta_1$ , zu einer Verringerung des Lysylhydroxylierungsgrades des neusynthetisierten Kollagens. Zur Klärung des hierbei zugrundeliegenden Mechanismus wurde der Einfluß dieses Wachstumsfaktors auf das relevante Enzym, die Lysylhydroxylase untersucht. Es zeigte sich nach der Inkubation von hOB mit TGF- $\beta_1$  eine Inhibierung der Lysylhydroxylase-mRNA-Transkripte um etwa ein Drittel (Abb. 7). Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die beobachtete Reduktion der Lysylhydroxylierung von Kollagen unter dem Einfluß von TGF- $\beta_1$ , auf eine prätranslationale Hemmung der Lysylhydroxylase zurückzuführen ist.

## 4. Diskussion

### Gewebsuntersuchungen

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine zunehmende Kollagenmodifikation bei abnehmender Knochenmasse und belegen somit erstmals, daß die kollagene Knochenmatrix bei Osteopenie qualitativ verändert ist. Darüber hinaus kann es in Osteoporose-Extremfällen offensichtlich zur Wiederaufnahme fetaler Kollagensynthesemuster (mit Kollagen III) kommen.

Von fetalem ossärem Gewebe ist ein Kollagen-III-Anteil von mindestens 5 % bekannt, wohingegen dieser Kollagentyp im adulten Knochengewebe praktisch nicht vorkommt (2, 7). Da in weichen Bindegeweben Kollagen III eine Rolle bei der Regulation des Kollagenfibrillendurchmessers zu spielen scheint, ist die fi-

WIRKUNG VON TGF- $\beta_1$ AUF HUMANE OSTEOBLASTEN
● Stimulation der Kollagensynthese
● Minimierung des relativen Kollagen-III-Anteils
● Reduzierung der Kollagenmodifikation (verringertes Lysylhydroxylierungsgrad)

Tab. 1

brilläre Textur beim fetalen Knochengewebe wahrscheinlich anders als beim erwachsenen Knochengewebe (1). Dies dürfte letztendlich zu dem lichtmikroskopischen Bild eines geflechtartigen, weniger lamellär strukturierten Knochengewebes beitragen. Hiermit vereinbar ist auch der geschilderte Fall einer schweren Osteoporose mit ausgeprägter Mikrokallusbildung, wo der biochemisch auf etwa 8 % bezifferte Kollagen-III-Anteil immunhistochemisch ausschließlich in dem geflechtartigen Mikrokallusgewebe nachgewiesen werden konnte. Diese Befunde sprechen für die Fähigkeit zur Umdifferenzierung der matrixproduzierenden Osteoblasten im Bereich der Mikrofraktur mit der Wiederaufnahme eines fetalen Kollagenproduktionsmusters. Die Tatsache, daß die vorliegenden Untersuchungen nur in einem von 55 Fällen diese charakteristische Kollagen-III-Produktion ergaben, steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß sich Mikrokallusformationen erst unterhalb einer kritischen Knochenmassenschwelle finden lassen (14).

Im Verlauf der Biosynthese des Kollagens finden für dieses Molekül charakteristische posttranslationale Modifikationen statt, die durch unterschiedliche, jeweils spezifische Enzyme katalysiert werden: die Aktivitäten zweier Prolyl-Hydroxylasen führen zur Bildung Hydroxyprolin (OH-Pro), die Lysylhydroxylase katalysiert die Hydroxylierung an Lysinresten des Kollagens. Das gebildete Hydroxylysin (Hyl) kann weiter zum Galactosyl-Hydroxylysin und ggf. zum Glucosyl-Galactosyl-Hydroxylysin umgewandelt werden. Alle genannten Modifikationsschritte können nur ablaufen, solange die Tripelhelixbildung noch nicht stattgefunden hat.

Im Gegensatz zum Hydroxyprolin liegt die Bedeutung der Hydroxylysin-Reste weniger in der Stabilisierung des Kollagenmoleküls, sondern vielmehr in dessen Wandelbarkeit in Hinblick auf eine optimale Anpassung an die funktionellen Erfordernisse im jeweiligen Gewebe. So dienen Hyl-Reste als Ausgangspunkte für die Bildung intra- und intermolekularer Quervernetzungen sowie als Anheftungstelle für Mono- und Diglycoside. Als Ausdruck differenter adaptiver Fähigkeiten finden sich deutliche Unterschiede im Lysylhydroxylierungsgrad (LHG) sowohl zwischen den einzelnen Kollagentypen als auch bei demselben Kollagentyp aus unterschiedlichen Geweben (17).

Die eigenen Untersuchungen zeigen eine signifikante Steigerung des LHG beider  $\alpha$ -Ketten des Kollagens I mit abnehmender Knochenmasse. Die Tatsache, daß die Korrelation des LHG mit dem Patientenalter schwach ist, spricht gegen eine allgemeine involutive Veränderung im Rahmen des Alterungsprozesses und für eine mit dem osteopenietypischen Knochenstrukturumbau verbundene biochemische Alteration der kollagenen Knochenmatrix; bislang war man davon

ausgegangen, daß osteoporotisches Knochengewebe im Vergleich zu Normalgewebe in seinem molekularen Aufbau unverändert ist. Da die eigenen Ergebnisse eine konstante Korrelation zwischen dem LHG und der Knochenmasse ohne erkennbaren Schwellenwert, keinen signifikanten Unterschied bezüglich des LHG zwischen den Geschlechtern und schließlich nur eine schwache Beziehung zwischen dem LHG und dem Lebensalter aufzeigen, erscheint aufgrund einer jüngeren systematischen Studie (14) ein enger Zusammenhang zwischen reparativen Umbauvorgängen bei niedriger Knochenmasse einerseits und vermehrter Hydroxylierung an den Lysinresten des Kollagens I andererseits unwahrscheinlich. Der beobachtete erhöhte LHG bei Osteopenie könnte dagegen auf lokalen Fehlregulationen beruhen, die die Osteoblasten dazu veranlassen, eine Matrix mit biochemischen Eigenschaften des fetalen bzw. reparativen Gewebes zu produzieren. Hinweise für eine Regulierbarkeit des LHG ergeben sich u. a. aus der kontinuierlichen LHG-Abnahme während der fetalen Entwicklung (18). Ebenso liegen aus Tierversuchen Erkenntnisse über unterschiedliche Modifizierungsgrade von Kollagenen verschiedenen anatomischen Ursprungs vor (26). Die in vitro Untersuchungen an humanen Osteoblasten sollten daher dazu dienen, herauszufinden, welche Rolle in diesem Zusammenhang lokale Aktivitätsunterschiede der Lysylhydroxylase selbst oder von beeinflussenden Faktoren spielen (siehe unten).

Der Befund eines gesteigerten LHG bei Osteopenie führt zu der Frage, auf welche Weise diese biochemische Matrixveränderung in einer funktionellen, z. B. biomechanischen Beeinträchtigung des Knochengewebes resultieren kann; jüngere Studien konnten an Knochengewebe von Mäusen bzw. Hühnern eine negative Korrelation der Bruchfestigkeit mit dem LHG zeigen (16, 30). Unklar ist zunächst noch, wo der Mediator zwischen Übermodifikation und Gewebeeigenschaften zu suchen ist. So weisen einige Daten auf eine Beeinflussung der Fibrillenbildung durch den Glycosylierungsgrad des Kollagenmoleküls hin: da die Anheftung beider Glycoside die Kollagenmoleküle hydrophiler werden läßt, wird die Aggregationsfähigkeit reduziert und dadurch die Fibrillenbildung beeinträchtigt (27). Neuere experimentelle Daten sprechen dafür, daß schon kleinste Veränderungen des Glycosylierungsgrades des Kollagens den Durchmesser neugeformter Fibrillen beeinflussen (27, 29). Die eigenen Experimente ergaben zwar eine signifikante positive Korrelation des Glycosylierungsgrades mit dem LHG und darüber hinaus auch mit dem morphometrisch ermittelten Knochenvolumen, eine Beeinflussung des Fibrillendurchmessers war aus den durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen an in vitro gebildeten bzw. an aus dem Gewebe isolierten Fibrillen jedoch

nicht ersichtlich (Abb. 6). Somit erscheint es insgesamt unwahrscheinlich, daß die beobachtete biomechanische Instabilität von Knochengewebe mit überhydroxyliertem und infolge davon auch überglycosyliertem Kollagen I auf einen veränderten Fibrillendurchmesser zurückzuführen ist.

#### Zellkulturuntersuchungen

Seit einigen Jahren ist bekannt, daß das Knochengewebe der Hauptspeicherort für TGF- $\beta$  im menschlichen Körper ist (8). Sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten sind in der Lage, TGF- $\beta$  zu synthetisieren, welches im Gewebe physiologischerweise in inaktiver (latenter) Form vorliegt; aufgrund der Freisetzung aktiven TGF- $\beta$ s durch resorbierende Osteoklasten und der daraus resultierenden Stimulation der Knochenbildung erfüllt TGF- $\beta$  wichtige Funktionen eines Kopplungsfaktors (engl. „coupling factor“) zwischen osteoklastärer und osteoblastärer Tätigkeit (6). Die Stimulation der Matrixsynthese ist die herausragende Wirkung von TGF- $\beta$  im Knochen, die Mineralisierung wird eher gehemmt.

Von besonderem Interesse war – aufbauend auf den o. g. Ergebnissen der Gewebsuntersuchungen – die Frage, ob TGF- $\beta$  in vitro einen Einfluß auf die posttranslationale Modifikation des von humanen Osteoblasten synthetisierten Kollagens I hat. Die Aminosäureanalyse des unter dem Einfluß von TGF- $\beta_1$  synthetisierten Kollagens ergab eine Hemmung der Lysylhydroxylierung. Der reduzierte LHG ist als Förderung einer reifen kollagenen Knochenmatrix und damit als eine „antiosteoporotische“ Wirkung durch TGF- $\beta$  zu werten. Die in den eigenen Experimenten beobachtete prätranslationale Hemmung der Lysylhydroxylase durch TGF- $\beta$  spricht dafür, daß dieser Wachstumsfaktor im Knochengewebe einen wichtigen Regulator der Lysylhydroxylierung darstellt.

Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse liegt die Vermutung nahe, daß eine verringerte lokale Aktivität von TGF- $\beta$  in Zuständen mit erhöhtem LHG – wie z. B. bei der Osteoporose – eine Rolle spielt. Passend zu dieser Hypothese wurden in verschiedenen, mit Knochenmassenverlust einhergehenden Situationen – wie z. B. nach Ovariectomie oder mit zunehmendem Alter – reduzierte TGF- $\beta$ -Gewebskonzentrationen beschrieben (11, 23). Auf der anderen Seite gibt es Hinweise auf eine antiosteopenische, protektive Wirkung von hohen lokalen TGF- $\beta$ -Konzentrationen, wie z. B. in osteopenieresistenten Schädelknochen (10, 12). Inwieweit eine verringerte Ansprechbarkeit des Knochengewebes auf TGF- $\beta$  in pathologischen Situationen eine Rolle spielt, ist noch völlig unklar. Erste vorläufige eigene Daten zeigen ein Ausbleiben des Effektes von TGF- $\beta_1$ , auf die Lysylhydroxylase-mRNA-Spiegel bei Osteoblasten von Patienten mit Osteogenesis imperfecta.

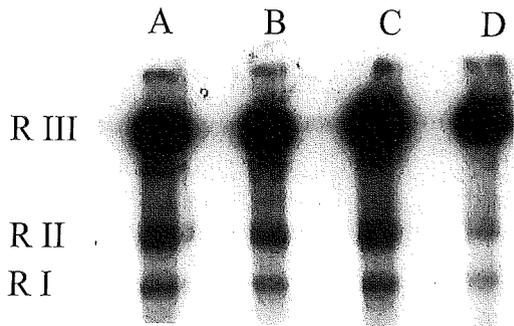


Abb. 8: TGF- $\beta$ -Rezeptoren Typ I, II und III (Betaglycan) auf humanen Osteoblasten. Gelelektrophoretische Trennung nach Crosslinking mit Disuccinimidylsuberat (A-D: verschiedene Osteoblastenpopulationen). (Abb. J. Gebken, Institut für Med. Molekularbiologie).

Gelänge es, unerwünschte Modifikationen des Kollagenkollagens in vivo zu beeinflussen, wären therapeutische Ansätze zur Verbesserung der Matrixqualität gegeben. Wie die eigenen, in vitro erhobenen Daten vermuten lassen, ist TGF- $\beta$  bezüglich der enzymatischen Kollagen-Modifikation ein vielversprechender Kandidat, wobei die gesteigerte Matrixquantität unter TGF- $\beta$  stets hinzuzurechnen ist. Erste tierexperimentelle Untersuchungen sprechen für einen günstigen Effekt von systemisch verabreichtem TGF- $\beta$  auf die Knochenneubildung (13, 19).

#### 5. Ausblick

Die Ergebnisse unterstreichen die mögliche Bedeutung TGF- $\beta$ -orientierter Therapieansätze bei osteopenischen Krankheitsbildern. Die direkte – insbesondere systemische – Verabreichung dieses Wachstumsfaktors beim Menschen ist derzeit allerdings noch Zukunftsmusik.

Die darüber hinaus gewonnenen Hinweise auf eine verminderte Ansprechbarkeit von Osteoblasten auf TGF- $\beta$  in bestimmten pathologischen Situationen lenken das Interesse zunächst auf die Rezeptoren für diesen Wachstumsfaktor. Wie in Abb. 8 ersichtlich, verfügen humane Osteoblasten über 3 Typen von TGF- $\beta$ -Rezeptoren; zur Signalübermittlung ist eine Komplexbildung der Rezeptoren Typ I und II mit dem Liganden notwendig. Der Rezeptor Typ III ist bei der Signalübertragung nicht beteiligt und hat wahrscheinlich ligandenpräsenzierende Funktion. Künftige Experimente sollen die Regulierbarkeit bzw. Störungen im Bereich der Rezeptoren I und II untersuchen und deren Rolle in pathologischen Situationen überprüfen.

#### Anmerkung

Diese Experimente wurden durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft im

## Literatur

1. Adachi E, Hayashi T. 1986. In vitro formation of hybrid fibrils of type V collagen and type I collagen. Limited growth of type I collagen into thick fibrils by type V collagen. *Connect-Tissue-Res* 14(4):257-66.
2. Bätge B, Diebold J, Stein H, Bodo M, Müller PK. 1992. Compositional analysis of the collagenous bone matrix. A study on adult normal and osteopenic bone tissue. *Eur-J-Clin-Invest* 22(12):805-12.
3. Bätge B, Notbohm H, Diebold J, Lehmann H, Bodo M, Deutzmann R, Müller PK. 1990. A critical crosslink region in human-bone-derived collagen type I. Specific cleavage site at residue Leu95. *Eur-J-Biochem* 192(1):153-9.
4. Bätge B, Winter C, Notbohm H, Acil Y, Brinckmann J, Müller PK. 1997. Glycosylation of human bone collagen I in relation to lysylhydroxylation and fibril diameter. *J - Biochem* 122: 109-115
5. Blackburn J, Hodgskinson R, Currey JD, Mason JE. 1992. Mechanical properties of microcallus in human cancellous bone. *J-Orthop-Res* 10:237-246.
6. Bonewald LF, Dallas SL. 1994. Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. *J-Cell-Biochem* 55(3):350-7.
7. Brenner RE, Vetter U, Nerlich A, Wörsdorfer O, Teller WM, Müller PK. 1989. Osteogenesis imperfecta: insufficient collagen synthesis in early childhood as evidenced by analysis of compact bone and fibroblast cultures. *Eur-J-Clin-Invest* 19(2): 159-66.
8. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL. 1994. Transforming growth factor- $\beta$  gene family members and bone. *Endocrine Reviews* 15: 27-39.
9. Dempster DW, Lindsay R. 1993. Pathogenesis of osteoporosis. *Lancet* 341(8848):797- 801.
10. Dequeker J, Mohan S, Finkelman RD, Aerssens J, Baylink DJ. 1993. Generalized osteoarthritis associated with increased insulin-like growth factor types I and II and transforming growth factor beta in cortical bone from the iliac crest. Possible mechanism of increased bone density and protection against osteoporosis. *Arthritis-Rheum* 36(12): 1702-8.
11. Finkelman RD, Bell NH, Strong DD, Demers LM, Baylink DJ. 1992. Ovariectomy selectively reduces the concentration of transforming growth factor beta in rat bone: implications for estrogen deficiency associated bone loss. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* 89(24): 12190-3.
12. Finkelman RD, Eason AL, Rakijian DR, Tutundzhyan Y, Hardesty RA. 1994. Elevated IGF-II and TGF-beta concentrations in human calvarial bone: potential mechanism for increased graft survival and resistance to osteoporosis. *Plast-Reconstr-Surg* 93(4):732-8.
13. Gazit D, Zilberman Y, Passi-Even L, Ebner R, Kahn AJ. 1995. In vivo administration of TGF-beta1 increases marrow progenitor number and selectively reverses the bone loss seen in old, „osteoporotic“ mice. *J-Bone-Miner-Res* 10: S145.
14. Hahn M, Vogel M, Amling M, Ritzel H, Delling G. 1995. Microcallus formations of the cancellous bone: a quantitative analysis of the human spine. *J-Bone-Miner-Res* 10(9): 1410-6.
15. Kleerekoper M, Nelson DA. 1992. Vertebral fracture or vertebral deformity [editorial]. *Calcif-Tissue-Int* 50(1):5-6.
16. Knott L, Whitehead CC, Fleming RH, Bailey AJ. 1995. Biochemical changes in the collagenous matrix of osteoporotic avian bone. *Biochem-J* 310: 1045-51.
17. Kühn K. 1987. The classical collagens: Types I, II and III. In: *Structure and function of collagen types* (Mayne R, Burgeson RE, Hrgs.) pp 1-42; Academic press, Orlando.
18. Lehmann HW, Bodo M, Frohn C, Nerlich A, Rimek D, Notbohm H, Müller PK. 1992. Lysylhydroxylation in collagens from hyperplastic callus and embryonic bones. *Biochem-J* 282:313-8.
19. Machwate M, Zerath E, Holy X, Hott M, Godel D, Lomri A, Marie PJ. 1995. Systemic administration of transforming growth factor- $\beta$ 2 prevents the impaired bone formation and osteopenia induced by unloading in rats. *J-Bone-Miner-Res* 10: S176.
20. Manolagas SC, Jilka RL. 1995. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N-Engl-J-Med* 332(5):305-11.
21. Melton LJ 3rd. 1995. How many women have osteoporosis now? *J-Bone-Miner-Res* 10(2): 175-7.
22. Melton LJ 3rd, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW, Riggs BL. 1992. Perspective. How many women have osteoporosis? *J-Bone-Miner-Res* 7(9): 1005-10.
23. Nicolas V, Prewett A, Bettica P, Mohan S, Finkelman RD, Baylink DJ, Farley JR. 1994. Age-related decreases in insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta in femoral cortical bone from both men and women: implications for bone loss with aging. *J-Clin-Endocrinol-Metab* 78(5): 1011-6.
24. Pacifici R. 1996. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J-Bone-Miner-Res* 11: 1043-1051.
25. Seitzer U, Bätge B, Acil Y, Müller PK. 1995. Transforming growth factor  $\beta_1$ , influences lysyl hydroxylation of collagen I and reduces steady-state levels of lysylhydroxylase mRNA in human osteoblast-like cells. *Eur-J-Clin-Invest* 25:959-966.
26. Suarez KN, Romanello M, Bettica P, Moro L. 1996. Collagen type I of rat cortical and trabecular bone differs in the extent of posttranslational modifications. *Calcif-Tissue-Int* 58:65-69.
27. Torre Blanco A, Adachi E, Romanic AM, Prockop DJ. 1992. Copolymerization of normal type I collagen with three mutated type I collagens containing substitutions of cysteine at different glycine positions in the alpha 1 (I) chain. *J-Biol-Chem* 267(7):4968-73.
28. World Health Organisation. 1994. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World-HealthOrgan- Tech-Rep-Ser* 843:1-129.
29. Yang CL, Rui H, Mosler S, Notbohm H, Sawaryn A, Müller PK. 1993. Collagen II from articular cartilage and annulus fibrosus. Structural and functional implication of tissue specific posttranslational modifications of collagen molecules. *Eur-J-Biochem* 213(3): 1297- 302.
30. Yang C, Niu C, Bodo M, Gabriel E, Notbohm H, Wolf E, Müller PK. 1993. Fulvic acid supplementation and selenium deficiency disturb the structural integrity of mouse skeletal tissue. An animal model to study the molecular defects of Kashin-Beck disease. *Biochem-J* 289:829-35.

Aus der Medizinischen Klinik II der Medizinische Universität zu Lübeck (Direktor Prof. H.A. Katus)

## Thrombolyse oder PTCA im akuten Herzinfarkt?

G. Richardt, F. Hartmann, R. Tölg, E. Giannitsis, H.-A. Katus

Der Herzinfarkt ist nach wie vor die häufigste Todesursache in den westlichen Industriestaaten. In der Regel liegt dem akuten Myokardinfarkt ein thrombotischer Verschluss einer Koronararterie zugrunde. Die möglichst frühe und vollständige Wiedereröffnung des Infarktgefäßes ist derzeit das generell akzeptierte Ziel der Infarkttherapie. Eine frühzeitige sogenannte Reperfusionstherapie kann akute Komplikationen des Myokardinfarktes verhindern und trägt zur Senkung der Hospitalletalität bei (1, 2). Auch langfristig kommt es zu einer Senkung der Letalität der Herzinfarktpatienten, wenn das verschlossene Koronargefäß frühzeitig und dauerhaft wiedereröffnet werden konnte (2, 3). Die Erkenntnisse über den positiven Einfluß einer Reperfusionstherapie basieren nahezu ausschließlich auf den Daten großer Studien mit thrombolytisch wirksamen Substanzen im Herzinfarkt (1, 2). Diese Studien ergaben aber auch, daß selbst die neueren Lyseeregime nur bei etwa der Hälfte der behandelten Patienten eine vollständige Reperfusion erzielen können (2). Darüber hinaus bestehen weitere Limitationen der Lysetherapie. Hier sind in erster Linie lebensbedrohliche Blutungskomplikationen zu nennen (1). Außerdem kommt es bei etwa 10-30 % der Patienten zu Reokklusionen der Infarktgefäße bereits wenige Tage nach Lysetherapie (4, 5). Die erwähnten Studien konnten des weiteren keinen Wirksamkeitsnachweis bei elektrokardiographisch kleinen Infarkten, Patienten über 70 Lebensjahren oder solchen im kardiogenen Schock erbringen. Wenn der Symptombeginn der Infarktpatienten mehr als 12 h zurückliegt, ist die Lysetherapie in der Regel einer konventionellen Therapie nicht mehr überlegen (1).

Wegen der zahlreichen Einschränkungen der Lysetherapie werden in Deutschland tatsächlich nur etwa 30 % der Patienten mit akutem Herzinfarkt lysiert. Die Probleme der Lysetherapie haben das Interesse auf alternative Reperusionsverfahren gerichtet. Die Ballondilatation ist eine solche Alternative, die in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewinnt. Bereits 1993 wurden mehrere kleine randomisierte Studien publiziert, in denen die direkte PTCA der Lysetherapie deutlich überlegen war (6, 7). In größeren randomisierten Studien und in zwei Registern ist die Überlegenheit der

PTCA allerdings weniger ausgeprägt (8, 9, 10). Infolge dieser widersprüchlichen Berichte ist eine teilweise polemische Auseinandersetzung entbrannt, in der sich Befürworter der Lysetherapie und der PTCA gegenüberstehen. In dieser Diskussion stehen logistische, infrastrukturelle und ökonomische Argumente häufig im Vordergrund, und es wird weniger über prinzipielle Unterschiede nachgedacht. Wir möchten daher an dieser Stelle die prinzipiellen Unterschiede beider Verfahren verdeutlichen und auf dieser Basis erläutern, warum wir die PTCA für das überlegene Verfahren halten.

### Diagnostische Basis

Die Entscheidung zur Lysetherapie beruht auf dem typischen Beschwerdebild des Patienten zusammen mit einem „diagnostischen EKG“. Demgegenüber erweitert sich die diagnostische Basis bei der PTCA um den angiographischen Befund. Wir wollen im folgenden erläutern, weshalb die Kenntnis des angiographischen Befundes eine differenziertere Therapieplanung erlaubt. Zum Beispiel können auch Patienten, bei denen trotz frischem Koronargefäßverschluss keine signifikanten EKG-Veränderungen bestehen, einer Reperfusionstherapie zugeführt werden. Ein unauffälliges EKG findet sich immerhin bei einem Drittel der Patienten mit frischem Verschluss des Ramus circumflexus der linken Koronararterie und bei etwa einem Fünftel der Patienten mit Verschlüssen der rechten Koronararterie und des Ramus descendens anterior der linken Herzkranzarterie (11). Außerdem müssen Patienten, bei denen es bereits spontan oder durch die Gabe von Aspirin und Heparin zu einer Wiedereröffnung des Gefäßes gekommen ist oder Patienten mit einem „Infarkt-EKG“ trotz unauffälliger Koronarien (z. B. bei Perikarditis), sich keiner potentiell gefährlichen fibrinolytischen Reperfusionstherapie unterziehen. Schließlich finden sich angiographisch bei etwa 5 % der Patienten schwere 3-Gefäßerkrankungen mit Hauptstammstenose die unmittelbar einer Bypassoperation zugeführt werden müssen (8).

### Mechanismus der Koronargefäßöffnung

Der fundamentale Unterschied zwischen der Lysetherapie und der PTCA ist sicher der Mechanismus der Ko-

ronargefäßöffnung. Mit der Lysetherapie können Thromben aufgelöst werden, die in der Regel auf dem Boden eines rupturierten Plaques entstanden sind (12). Das bedeutet aber, daß bei einer erfolgreichen Lyse die zugrundeliegende Koronarstenose bzw. das rupturierte Plaque verbleibt. Die Stenose kann flußlimitierend sein und die thrombogene Oberfläche des rupturierten Plaques ist wahrscheinlich verantwortlich für Reokklusionen, die in verschiedenen Studien bei 10 bis 30 % der lysierten Patienten auftraten (4, 5). Die Tatsache, daß das Thrombolytikum nur gegen Thromben wirksam ist, erklärt auch, warum primär nicht thrombotische Gefäßverschlüsse, wie z. B. okkludierende Dissektionen, nicht erfolgreich therapiert werden können. Experimentelle Untersuchungen wiesen außerdem darauf hin, daß der zusammen mit der Lyse entstehende lytische Gerinnungsstatus den Reperfusionsschaden des Myokards verstärken kann (13). In diesem Zusammenhang werden auch die häufig unter Lyse entstehenden hämorrhagischen Infarzierungen gedeutet (13). Schließlich ist die Wirkung des Thrombolytikums an einen ausreichenden Perfusionsfluß gebunden (14). So erklärt sich wahrscheinlich die fehlende Wirksamkeit der Thrombolysetherapie bei Patienten im Schock und bei Hinterwandinfarkten mit rechtsventrikulärer Beteiligung, bei denen ein deutlich verminderter koronarer Perfusionsdruck vorliegt (15, 16).

Bei der Ballondilatation wird das Gefäß meist mit der Passage des Drahtes durch den okkludierenden Thrombus eröffnet. Die Dilatation selbst führt dann in der Regel zu einer Beseitigung der zugrunde liegenden Koronarstenose, indem das Plaque in die Gefäßwand gepreßt wird. Naturgemäß können durch PTCA auch nicht-thrombotische Koronargefäßverschlüsse eröffnet werden. Problematisch sind schwer erreichbare Gefäßverschlüsse in stark gewundenen Gefäßverläufen und peripher im Gefäßbaum lokalisierte Okklusionen. Außerdem sind wie bei jeder konventionellen Angioplastie verkalkte und im Bereich von Gefäßabgängen lokalisierte Läsionen schwerer zu behandeln. Bei ausgedehnten Koronarthrombosen können periphere intra-

koronare Embolisationen den Reperfusionserfolg gefährden. Alle genannten Limitationen der PTCA im Infarkt erklären, weshalb der Erfolg dieses Verfahrens sehr stark von der individuellen Erfahrung des Operateurs abhängt (17). Allgemein ist akzeptiert, daß ein Operateur zunächst ausreichende Erfahrungen bei konventionellen Ballonangioplastien sammeln muß und mindestens 75 Angioplastien im Jahr durchführen sollte, bevor er mit befriedigender Erfolgsrate Infarktgefäße behandeln kann. So sind die starken Differenzen der Wiederöffnungsraten (70 bis 95 %) in verschiedenen Studien wahrscheinlich auf Unterschiede in der individuellen Erfahrung der Operateure bzw. Zentren zurückzuführen, die an den Untersuchungen beteiligt waren. Festzuhalten bleibt dennoch, daß selbst auf der Grundlage ungünstigerer Berichte die PTCA bezüglich der erzielten Erfolgsraten und Reokklusionsraten deutlich besser abgeschnitten hat als alle neueren Lyseregime.

Aus dem grundsätzlich verschiedenartigem Mechanismus der Koronargefäßwiedereröffnung läßt sich ein weiterer Unterschied ableiten: Während die Lyse bei Patienten mit kritischer Hämodynamik (kardiogener Schock, Hinterwandinfarkt mit rechtsventrikulärer Beteiligung) niedrige Wiedereröffnungsraten zeigt, ist die PTCA in dieser Situation derzeit wahrscheinlich das einzige Verfahren mit Aussicht auf eine sichere Wiedereröffnung des Herzkranzgefäßes. Aus einer eigenen Untersuchung (16) wissen wir, daß die Gruppe der Hinterwandinfarkte mit rechtsventrikulärer Beteiligung, die bisher (d. h. in der Ära der Lysetherapie) als besondere Risikogruppe galt (18), unter der Verwendung der PTCA als Reperusionsstrategie einen Verlauf zeigt, der dem von Patienten mit unkompliziertem Hinterwandinfarkt vergleichbar ist (unveröffentlichte Daten, Abb. 2). Gerade in der Frühphase der Infarkte führt die erfolgreiche mechanische Reperfusion der proximalen rechten Kranzarterie zu einer hämodynamischen und damit auch prognostischen Verbesserung (19). Hingegen scheint die häufig mit einer rechtsventrikulären Infarzierung vergesellschaftete systemische Hypoperfusion – die zudem durch bradykarde Herzrhythmusstörungen verstärkt wird – den Lyseerfolg zu beeinträchtigen (16, 20). Bei der klinischen Verlaufskontrolle unserer Patienten fand sich bei Hinterwandinfarkten mit Rechtsherzbeteiligung sogar eine niedrigere Rate kardialer Ereignisse (Reisemie, Reinfarkt, Bypassoperation) während des Krankenhausaufenthalts.

### Komplikationen

Auch unter Beachtung der Kontraindikationen für die Lysetherapie treten bei 1-2 % der Patienten schwere zerebrale Blutungen auf. Ebenso kann es bei der PTCA zu schweren Blutungen kommen, die dann allerdings

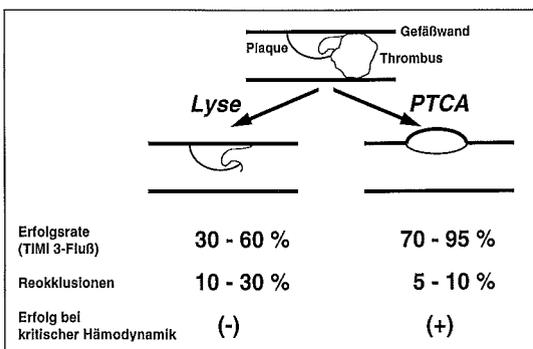


Abb. 1: Mechanismus der Koronargefäßöffnung

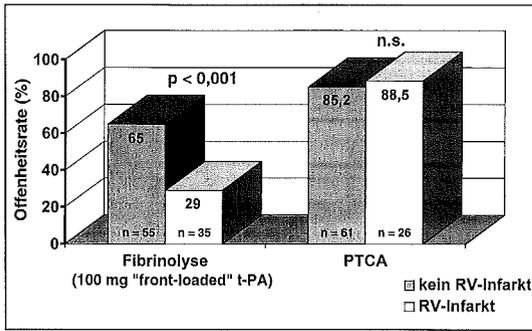


Abb. 2: Angiographische Erfolgsrate – TIMI 3 bei Hinterwandinfarkt

in der Regel im Bereich der Leistenpunktion bzw. retroperitoneal auftreten (8). Darüber hinaus kann durch die Kontrastmittelapplikation eine Allergie ausgelöst werden, eine Niereninsuffizienz entstehen und eine Schilddrüsenüberfunktion auftreten. Die letztgenannten Komplikationen sind bei elektiven Herzkatheteruntersuchung in der Regel durch ausreichende Vorbehandlungen und Vorsichtsmaßnahmen niedrig zu halten. In der besonderen Situation der unter Zeitdruck schnell durchzuführenden direkten PTCA im Infarkt kommt diesem Problem sicher ein besonderes Gewicht zu, ohne daß hierzu bisher exakte Zahlen vorliegen.

### Entwicklungspotential

Die Fibrinolysetherapie und die PTCA unterliegen einer ständigen Fortentwicklung, in der einerseits neue Fibrinolyse-schemata und neue fibrinolytische Substanzen eingeführt werden und auf der anderen Seite auch das PTCA-Material ständig verbessert wird. Außerdem können beide Verfahren mit adjuvanten Therapiemaßnahmen verknüpft werden. Betrachten wir zunächst das Entwicklungspotential der Fibrinolyse. Es wird selbst von Verfechtern der Fibrinolysetherapie eingeräumt, daß sich die Fibrinolyse in einem therapeutischen Dilemma befindet, da weitere Verbesserungen der fibrinolytischen Aktivität, die auf höhere Wiedereröffnungsraten zielen, mit erhöhten Blutungskomplikationen erkauft werden. Auch die zuletzt publizierte GUSTO-III-Studie ergab mit dem rekombinanten Gewebefibrinolyse-aktivator Reteplase trotz vielversprechender Voruntersuchungen keine besseren Ergebnisse als sie bisher mit akzellerierter Alteplase (rt-PA) erzielt werden konnten (21). Eine adjuvante Therapie mit einem Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten kann hier möglicherweise einen Ausweg bieten (22). Demgegenüber zeichnen sich bei der PTCA derzeit schon eine Reihe von adjuvanten Therapien ab, die sich bereits klinisch bewährt haben. So hat die Gabe von Reopro™ mittlerweile ihren festen Platz bei der Hochrisiko-PTCA, insbesondere dann, wenn intrakoronare

Thromben vorliegen (23). Außerdem kann durch zusätzliche Stentimplantation beim Infarkt die primäre Erfolgsrate wahrscheinlich erheblich erhöht werden (24) und die Reokklusionsrate weiter gesenkt werden (25). Schließlich bietet die PTCA die Möglichkeit zur lokalen Therapie, die entweder durch lokale Applikation von kardioprotektiven Pharmaka oder in Zukunft sicher auch durch Gentransfer erfolgen kann.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß es sich bei der Fibrinolyse und der PTCA im akuten Myokardinfarkt um alternative Verfahren handelt, die gemeinsam auf eine schnelle und vollständige Wiedereröffnung einer frisch verschlossenen Koronararterie zielen. Leider haben beide Verfahren relativ hohe Komplikationsraten und sind teuer. Die prinzipiellen Unterschiede zwischen der Fibrinolyse und der PTCA, die, wie geschildert, die diagnostische Basis, den Mechanismus der Koronargefäßeröffnung, die Art der Komplikation und die Möglichkeiten zu adjuvanten Therapien umfassen, lassen derzeit die PTCA als das überlegene Verfahren erscheinen. Es ist daher in unseren Augen die direkte PTCA im Infarkt der Lysetherapie vorzuziehen, sofern ausreichende Erfahrungen in einem Zentrum vorliegen und die logistischen Voraussetzungen für eine schnelle und sichere Durchführung geschaffen werden können.

### Literatur

1. Fibrinolytic Therapy Trialists' (FTT) Collaborative Group. Indications for fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction: collaborative overview of early mortality and major morbidity results from all randomised trials of more than 1000 patients. *Lancet* 1994; 343: 311-322.
2. The Gusto Angiographic Investigators. The effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, or both on coronary artery patency, ventricular function, and survival after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993; 329:1615-22.
3. Baigent C, Collins R. ISIS-2: 4-year mortality follow-up of 17187 patients after fibrinolytic and anti-platelet therapy in suspected acute myocardial infarction. *Circulation* 1993; 8: Suppl I:291 (abstract)
4. Meijer A, Verheugt WA, Werter CJPJ, Lie KI, van der Pol JMJ, van Eenige MJ. Aspirin versus coumadin in the prevention of reocclusion and recurrent ischemia and after successful thrombolysis, a prospective placebo-controlled angiographic study. *Circulation* 1993; 87: 1524-30.
5. Topol EJ, Califf RM, Vandormael M, Grines CL, George BS, Sanz ML and the Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction (TAMI-6) Study Group. A randomized trial of late reperfusion therapy for acute myocardial infarction. *Circulation* 1992; 85: 2090-9.
6. Grines CL, Browne KF, Marco J, Rothbaum D, Stone GW, O'Keefe J, Overlie P, Donohue B, Chelliah N, Timmis GC, Vliestra RE, Strzelecki M, Puchrowicz-Ochocki S, O'Neil WW. A comparison of immediate angioplasty with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993; 328: 673-9.

7. Zijlstra F, DeBoer MJ, Hoorntje JCA, Reiffers S, Reiber JHC, Suryapranata H. A comparison of immediate coronary angioplasty with intravenous streptokinase in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993; 328: 680-4.
8. GUSTO IIB Angioplasty Substudy Investigators. A clinical trial comparing primary coronary angioplasty with tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1997; 336: 1621-8.
9. Every NR, Parsons LS, Hlatky M, Martin JS, Weaver WD. A comparison of thrombolytic therapy with primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1996; 335: 1253-60.
10. Zahn R, Vogt A, Neuhaus KL, Schuster S, Senges J for the ALKK Study Group. Angioplasty in acute myocardial infarction in clinical practice: results in 4625 patients from the ALKK Angioplasty Registry. *J Am Coll Cardiol* 1997; 15A (abstract)
11. Huey BL, Beller GA, Kaiser DL, Gibson RS. A comprehensive analysis of myocardial infarction due to left circumflex artery occlusion: comparison with infarction due to right coronary artery and left anterior descending artery occlusion. *J Am Coll Cardiol* 1988; 12: 1156-66.
12. Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring-the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death and crescendo angina. *Br Heart J* 1985; 53: 363-73.
13. Ohnishi Y, Butterfield MC, Saffitz JE, Sobel BE, Corr PB, Goldstein JA. Deleterious effects of a systemic lytic state on reperfused myocardium. *Circulation* 1995; 92: 500-510.
14. Prewitt RM, Downes AMT, Gu S, Chan SM, Ducas J. Effects of hydralazine and increased cardiac output on recombinant tissue plasminogen activator-induced thrombolysis in canine pulmonary embolism. *Chest* 1991; 99: 708-14.
15. Bates ER, Topol EJ. Limitations of thrombolytic therapy for acute myocardial infarction complicated by congestive heart failure and cardiogenic shock. *J Am Coll Cardiol* 1992; 18: 1077-84.
16. Giannitsis E, Potratz J, Wiegand U, Stierle U, Djonlagic H, Sheikhzadeh A. Impact of early accelerated dose tissue plasminogen activator on in-hospital patency of the infarcted vessel in patients with acute right ventricular infarction. *Heart* 1997; 77: 512-16.
17. Grassman E, Johnson S, Krone R. Uredictors of success and major complications for primary percutaneous transluminal coronary angioplasty in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 201-208.
18. Zehender M, Kasper W, Kauder E, Schönthaler M, Geibel A, Olschewski M, Just H. Right ventricular infarction as an independent predictor of prognosis after acute inferior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993; 328: 981-8.
19. Kinn JW, Ajluni SC, Samyn JG, Bates ER, Grines CL, O Neill W. Rapid hemodynamic improvement after reperfusion during right ventricular infarction. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 1230-4.
20. Shah PK, Maddahi J, Berman DS, Pichler M, Swan HJC. Scintigraphically detected predominant right ventricular dysfunction in acute myocardial infarction: clinical and hemodynamic correlates and implications for therapy and prognosis. *J Am Coll Cardiol* 1985; 6: 1264-72.
21. GUSTO III Investigators. A comparison of reteplase with alteplase for acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1997; 337: 118-123.
22. IMPACT-AMI Investigators. Combined accelerated tissue-plasminogen activator and platelet glycoprotein II b/III a integrin receptor blockade with integrilin in acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; 95: 846-54.
23. The CAPTURE Investigators. Randomised placebo-controlled trial of abxiximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina: the Capture study. *Lancet* 1997; 349: 1429-35.
24. PASTA Investigators. Primary Palmaz-Schatz stent implantation for acute myocardial infarction: the final results of the Japanese PASTA trial. *Circulation* 1997; 96 (suppl I): 595 (abstract).
25. Tölg R, Richardt G, Adler S, Kurz T, Kurowski V, Hartmann F, Katus HA. Alleinige PTCA oder koronare Stentimplantation bei akuten koronaren Syndromen. *Zeitschr f Kardiol* 1997; 86 (suppl II): 49 (abstract).



Infusionslösungen, Volumenersatz, Spüllösungen  
 Künstliche Ernährung – parenteral und enteral  
 Dialysegeräte, Infusionspumpen, Desinfektionsmittel

**Zuverlässig – rund um die Uhr**

Fresenius AG, 61343 Bad Homburg v. d. H., Telefon: (0 61 71) 60 - 0

Aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin (Direktor Prof. Dr. med. H. Kirchner) der Medizinischen Universität zu Lübeck und der Klinik für Innere Medizin III (Sektion Infektiologie und Klinische Immunologie, Leiter Prof. Dr. med. Kern) der Universität Ulm

## Untersuchungen zur Wirkungsweise von Zinkionen im menschlichen Immunsystem\*

N. Wellinghausen

### Zusammenfassung

Zink ist ein essentielles Spurenelement für das Immunsystem, dessen Wirkungsweise noch weitgehend unbekannt ist. In dieser Arbeit gelang es, wichtige Mechanismen der Interaktion von Zink mit Monocyten und T-Zellen sowie mit Lipopolysaccharid (LPS), dem Endotoxin gram-negativer Bakterien, aufzuklären. Durch Vergleich mit strukturell ähnlichen Kationen konnte eine Zinkspezifität für die Cytokininduktion in Monocyten auf Transkriptionsebene und Proteinebene belegt werden. Insulin und Transferrin wurden als Serumproteine identifiziert, die spezifisch und rezeptorunabhängig die zinkinduzierte Monokinsekretion erhöhen. Intrazelluläre Zinkmessungen belegen, daß Zink nach Stimulation bereits innerhalb weniger Minuten in die Zellen aufgenommen wird. Durch Hemmung intrazellulärer Signaltransduktionsprozesse konnte eine Beteiligung von Protein-Tyrosin-Kinasen und cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen an der zinkinduzierten Cytokinsekretion nachgewiesen werden. Somit kann von einer direkten Wirkung des Zinks auf die Signaltransduktion ausgegangen werden. Durch Kultur der Zellen in einem 2-Kammer-Modell wurde erstmals die Notwendigkeit einer direkten Zell-Zell-Interaktion zwischen Monocyten und Lymphocyten für die zinkinduzierte Lymphokinsekretion (Interferon- $\gamma$ ) belegt. Überraschenderweise üben höhere Zinkdosen einen direkt hemmenden Effekt auf T-Zellen aus. Dieser ist bedingt durch Inhibition der Interleukin-1-Rezeptor-abhängigen Proteinkinase (IRAK) in den T-Zellen. Bezüglich der Interaktion von Zink mit LPS ist bekannt, daß Zinkzugabe zu LPS die LPS-induzierte Cytokinsekretion in PBMC zu erhöhen vermag. Es gelang jetzt, den Mechanismus dieses Synergismus zu charakterisieren. Zink interagiert direkt mit der Struktur des LPS und überführt es in eine biologisch aktivere Konformation. Die in dieser Arbeit aufgeklärten Wirkungsme-

chanismen einer Zinkstimulation *in vitro* tragen somit einerseits zum Verständnis der immunologischen Wirkungen von Zink bei und legen andererseits den Grundstein für eine sinnvolle und spezifische Zinkapplikation *in vivo*.

### Summary

Zinc is an essential trace element for the immune system. The mechanisms by which zinc ions interact with immune cells are, however, still poorly understood. In this study, mechanisms of the interaction of zinc with monocytes, T cells and lipopolysaccharide (LPS), the endotoxin of gram-negative bacteria, were elucidated. Comparison with structural related cations revealed a specificity of zinc in induction of cytokines in monocytes both on the transcriptional and translational level. Insulin and transferrin were identified as serum proteins which enhance zinc-induced monokine secretion in a specific and receptor-independent manner. Measurement of intracellular zinc concentrations showed increased zinc uptake after stimulation already within minutes. By inhibition of intracellular signal transducers, an involvement of protein tyrosine kinases as well as cAMP- and cGMP-dependent protein kinases in zinc-induced cytokine secretion was revealed. A direct influence of zinc on intracellular signal transducers is, therefore, most likely. By culturing the cells in a 2-chamber-culture-model, the necessity of a direct cellular interaction between monocytes and lymphocytes for zinc-induced lymphokine secretion (interferon- $\gamma$ ) was elucidated. Surprisingly, high zinc dosages exert a direct inhibitory effect on T cells, caused by intracellular inhibition of the interleukin-1-receptor associated protein kinase (IRAK) in the T cells. Concerning the interaction between zinc and LPS it is known that zinc addition enhances LPS-induced cytokine secretion in PBMC. Now, the mechanism of this synergism has been characterized. Zinc directly interacts with the structure of LPS and converts the LPS into a biologically more active conformation. Conclusively, the me-

\*Teile dieser Arbeit, insbesondere der Abbildungen, wurden entnommen aus (26, 27, 29).

chanisms of zinc stimulation *in vitro* clarified in this study contribute to our understanding of the immunological function of zinc and, furthermore, serve as a basis for rational and specific application of zinc *in vivo*.

### Einleitung

Zink ist ein notwendiges Spurenelement für unsere Immunabwehr. Es beeinflusst zum einen spezifisch Immunfunktionen, zum anderen werden aber auch viele allgemeine Zellfunktionen, die für das Immunsystem als hoch proliferatives Organ besonders bedeutsam sind, von zinkabhängigen Proteinen reguliert, wie beispielsweise Enzymen der DNA-Replikation, Transkriptionsfaktoren oder Signaltransduktoren. Im Plasma befindet sich bei einem physiologischen Zinkspiegel von 12-16  $\mu\text{M}$  nur 0,1 % des Gesamtkörperzinks, hauptsächlich gebunden an Serumproteine wie Albumin,  $\alpha_2$ -Makroglobulin und Transferrin (1,25,29). Dennoch spielt dieser Zinkpool eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase. So führen beispielsweise die im Rahmen der Akut-Phase-Reaktion vermehrt sezernierten pro-inflammatorischen Cytokine (hauptsächlich Interleukin (IL)-1 und IL-6) zu einer Verschiebung des Serumzinks in die Leber (20).

Ein Zinkmangel beeinträchtigt alle an der Immunabwehr beteiligten Zellen. So findet sich eine verminderte Aktivität der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten wie auch der Natürlichen Killerzellen (7, 8, 19). Von besonderer Bedeutung ist aber eine gestörte Reifung und Funktion der T-Zellen, denn Zink stellt einen essentiellen Kofaktor für das wichtige Thymus-Hormon Thymulin dar (15). Der Zusammenhang zwischen Immundefekten und einem Zinkmangel wird insbesondere deutlich an der autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung Acrodermatitis enteropathica. Hierbei handelt es sich um eine spezifische Störung der Zinkabsorption, die neben Wachstumsstörungen und Hauterscheinungen mit einer Thymusaplasie und einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber bakteriellen, viralen und Pilzinfektionen einhergeht. Unbehandelt sterben die Patienten meist im frühen Kindesalter an den schwerwiegenden Infektionen, während eine hochdosierte orale Zinktherapie zur Vollremission aller Symptome führt (21). Immundefekte, die durch einen Zinkmangel bedingt sind, treten jedoch nicht nur bei dieser spezifischen Zinkmangelerkrankung auf, sondern ebenfalls im Alter (4) und in Assoziation mit anderen Erkrankungen wie beispielsweise bei Dialysepatienten, Mangelernährung und nach parenteraler Ernährung (7, 16, 25).

Zinkmangel führt nicht nur zu Immundefekten, sondern eine zusätzliche Zinkgabe vermag Immunfunktionen sogar noch zu steigern. So lassen sich beispiels-

# SAMOA- der Verwand- lungskünstler



**M**obilität ist gefragt - nicht nur im Beruf, auch privat. **Samoa** eignet sich zur täglichen Verwandlung, z. B. vom Sofa zum breiten Bett mit höhenverstellbarem Kopfteil. Schlicht, schön und leicht zu handhaben. Sollten Sie ausprobieren.

**REESE**

DAS LÜBECKER EINRICHTUNGSHAUS  
Töpferweg 20-22 • Lübeck • Tel.: 0451/ 830 44

weise eine erhöhte Blasten-Transformation in T-Zellen, gesteigerte Cytokin-Sekretion sowie verstärkte Funktion der Neutrophilen nach Zinkstimulation nachweisen (7, 8, 10, 17). Zink wirkt nicht nur selbst immunmodulatorisch durch direkte Interaktion mit Immunzellen, sondern es beeinflusst auch die Wirkung von verschiedenen Immunstimulantien, wie zum Beispiel dem Mitogen Phytohämagglutinin und dem LPS (11). Das LPS, auch Endotoxin genannt, ist ein Pathogenitätsfaktor gram-negativer Bakterien, ein amphiphiles Molekül, das nach Bindung an das LPS-bindende Protein im Serum vor allem den CD14-Rezeptor auf Monocyten aktiviert (22). Dadurch wird die Sekretion von entzündungsfördernden Cytokinen, wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ , induziert. Diese Cytokine leiten dann das septische Geschehen im Körper ein. Auf noch ungeklärte Weise erhöht Zink die LPS-induzierte Cytokinsekretion (11, 12).

Trotz der umfassenden Bedeutung von Zink für die Aufrechterhaltung der Immunfunktion und der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten einer pharmakologischen Zinkgabe herrscht noch weitgehend Unklarheit über die hieran beteiligten Mechanismen. In der vorliegenden Arbeit sollen daher die Wechselwirkungen zwischen Zink und dem Immunsystem modellhaft anhand von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) untersucht werden. Dabei werden nicht nur direkte Effekte des Zink selbst, sondern auch Interaktionen mit verschiedenen Immunstimulantien berücksichtigt.

## Material und Methoden

Aus dem sogenannten „buffy coat“ gesunder Blutspender, einer leukocytenreichen Fraktion, die bei der Präparation der Blutkonserve anfällt, wurden die PBMC durch Dichtezentrifugation gewonnen. Diese wurden zum einen direkt für Stimulationsversuche eingesetzt, zum anderen konnten aus ihnen mittels Adhärenz an Plastikoberflächen und negativer Selektion in einer Nylon-Säule Monocyten- und Lymphocyten-Populationen aufgereinigt werden. Die Reinheit wurde anhand der durchflußcytometrisch meßbaren Expression bestimmter Oberflächenmarker, z. B. CD3 für T-Zellen, kontrolliert. Die Stimulation der Zellkulturen erfolgte zumeist in serumfreiem Kulturmedium, um unspezifische Effekte durch kleinste Verunreinigungen im Serum (z. B. LPS) auszuschließen. Zink- und Kontrollsalzlösungen wurden unmittelbar vor Zugabe zur Kultur verdünnt, wobei Endkonzentrationen von 0,05 bis 4,5 mM Zink verwandt wurden. Im 2-Kammer-Zellkultur-Modell wurden Monocyten und T-Zellen durch einen Membraneinsatz (3  $\mu$ m Porengröße) getrennt kultiviert, der einen direkten Zell-Zell-Kontakt, nicht jedoch den Durchtritt löslicher Substanzen verhindert. Mittels des Trypanblautests erfolgte eine

Überwachung der Vitalität der Zellen. Cytokinkonzentrationen im Kulturüberstand wurden mit kommerziell erhältlichen ELISA-Kits bestimmt. Der Nachweis der Expression von Cytokin-mRNA erfolgte mit der reversen Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Hierzu wurde die gesamte Zell-RNA nach einem modifiziertem Protokoll nach Chomczynski isoliert, in komplementäre DNA (cDNA) revers transkribiert und dann mittels der PCR selektiv amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit der Ethidiumbromidfärbung im Agarosegel sichtbar gemacht.

Die Beurteilung der zellulären Zinkaufnahme erfolgte anhand der Messung freien intrazellulären Zinks mittels einer zinkspezifischen Fluoreszenzsonde, dem Zinquinester. Nach Penetration durch die Zellmembran und Spaltung zu Zinquin kann die Zinkbindung fluoreszenzoptisch sichtbar gemacht werden. Eine Beteiligung spezifischer Rezeptoren (CD71, Insulin-Rezeptor) an der Zinkaufnahme wurde durch den Einsatz blockierender Antikörper gegen die jeweiligen Rezeptoren untersucht. Für die Untersuchung intrazellulärer Signalwege nach Zinkstimulation wurden spezifische Inhibitoren von Signaltransduktionsmolekülen zu den Zellkulturen zugesetzt, im einzelnen Herbimycin A, HA 1004 und Calphostin C für die Inhibition der Protein-Tyrosin-Kinasen, der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen bzw. der Proteinkinase C (PKC). Eine verminderte Cytokinsekretion nach Zugabe des Inhibitors läßt auf eine Beteiligung des jeweiligen Signalweges schließen. Der Einfluß von Zink auf die IL-1-Rezeptor-assoziierte Proteinkinase (IRAK) in den T-Zellen wurde in Kooperation mit dem Institut für Klinische und Molekulare Pharmakologie an der Medizinischen Hochschule Hannover (PD Dr. M. Martin) mittels Immunpräzipitationen untersucht.

Für die Untersuchung der Interaktion mit Immunstimulantien wurden Zink (0,1 mM, substimulatorische Konzentration) und LPS (Endkonzentration 250 ng/ml) bzw. Phorbolmyrestylacetat (PMA, Endkonzentration 8nM) oder hitze-inaktivierte *E. coli* (Stamm K12) simultan zur serumhaltigen Kultur hinzugegeben. Letztere wurden in Flüssigkulturen frisch angezüchtet und in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  CFU/ml entsprechend einer freien LPS-Konzentration in der Kultur von 230 ng/ml eingesetzt. Fluoreszenzpolarisationsoptische Messungen zur Aufklärung einer strukturellen Beeinflussung des LPS durch Zink wurden in Kooperation mit der Abteilung für Biophysik am Forschungsinstitut Borstel (Prof. Dr. U. Seydel) durchgeführt.

## Ergebnisse

Versetzt man PBMC mit Zinkionen, so stimuliert das Zink direkt die Monocyten in der Kultur und induziert verschiedene immunregulatorisch wirksame Cytokine, wie beispielsweise IL-1 und Tumor-Nekrose-Faktor

(TNF)- $\alpha$  (Details publiziert in 10). Zink ist somit das am einfachsten gebaute Immunstimulanz, das wir kennen. Zinkstimulation bewirkt nicht nur eine mit dem ELISA meßbare Cytokinsekretion, sondern es läßt sich auch die Expression der zugehörigen messenger RNA auf Transkriptionsebene nachweisen. Diese Cytokininduktion ist spezifisch für Zink, denn strukturell ähnliche zweiwertige Ionen wie Kobalt und Nickel oder die *in vivo* bedeutsamen Kationen Calcium und Magnesium zeigen keinen Effekt. In Abbildung 1 ist die spezifische Cytokininduktion durch Zink exemplarisch am Beispiel von TNF- $\alpha$  dargestellt. Bei der Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen stellte sich heraus, daß das Zink bereits innerhalb weniger Minuten in die Zellen gelangt und maximale intrazelluläre Konzentrationen innerhalb von 24 Stunden erreicht. Wie das Zink in die Zellen aufgenommen wird, ist allerdings noch nicht endgültig geklärt. Interessanterweise ist die Zinkstimulation abhängig von der Proteinzusammensetzung des Kulturmediums. In serumfreiem Medium induziert Zink in gleicher Dosis höhere Cytokin-konzentrationen als in serumhaltigem Medium (13). Dies spiegelt zum einen die erhöhte Bindung von Zink an Serumproteine wider, so daß es nicht mehr als freies Zink aktiv zur Verfügung steht (die in serumfreiem Medium optimal stimulatorische Zinkkonzentration von 0,1 mM entspricht daher einer substimulatorischen in serumhaltigem Medium), belegt aber zum anderen auch die besondere Bedeutung spezifischer Proteine im serumfreien, aber nicht proteinfreien, Medium. Da durch gezielten Proteinzusatz zur Kultur gezeigt werden konnte, daß Transferrin und Insulin die Zinkwirkung erhöhen, wurde eine Beteiligung ihrer spezifischen Rezeptoren (Transferrin (CD71)- und Insulin-Rezeptor) untersucht. Die Blockierung der jeweiligen Rezeptoren mittels spezifischer Antikörper zeigte jedoch, daß sie keine Rolle bei der Zinkaufnahme spielen. Einmal ins Zellinnere gelangt, sind dann Protein-Tyrosin-Kinasen sowie cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen als second messenger an der zink-induzierten Cytokinsekretion beteiligt. Zugabe von Calphostin C, einem spezifischen Inhibitor der Proteinkinase C, bewirkt dagegen keine verminderte Cytokinsekretion nach Zinkstimulation, so daß die PKC wohl nicht in die zink-induzierte Signaltransduktion involviert ist.

Zink stimuliert nicht nur Monocyten, sondern es beeinflußt auch die Funktion von T-Zellen. So induziert Zink beispielsweise die Sekretion des Lymphokins IFN- $\gamma$  in PBMC. Die T-Zell-Stimulation stellt jedoch, im Gegensatz zur direkten Monocyten-Stimulation, einen indirekten Effekt des Zinks dar, der von der Anwesenheit von Monocyten in der Kultur, insbesondere von dem sezernierten IL-1, abhängig ist (10, 23). In reinen T-Zell-Kulturen ließen sich in dieser Arbeit keine Lym-

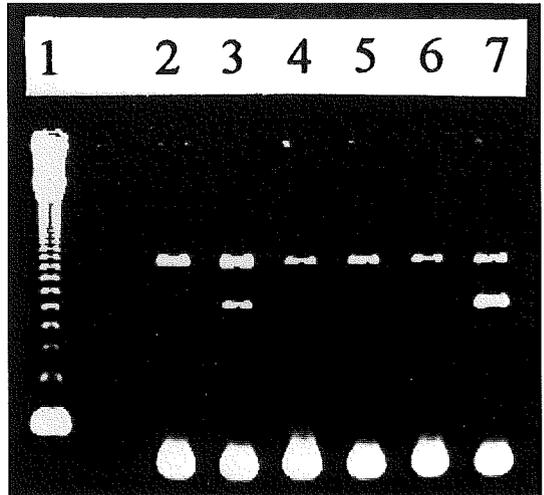
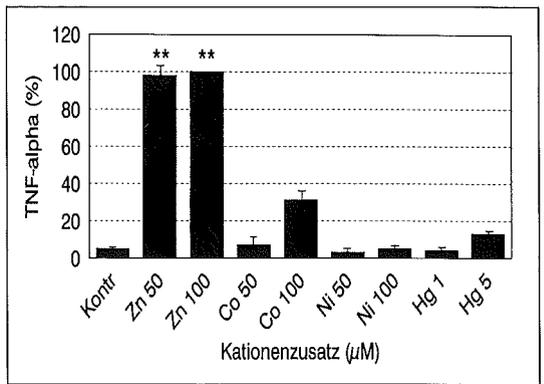
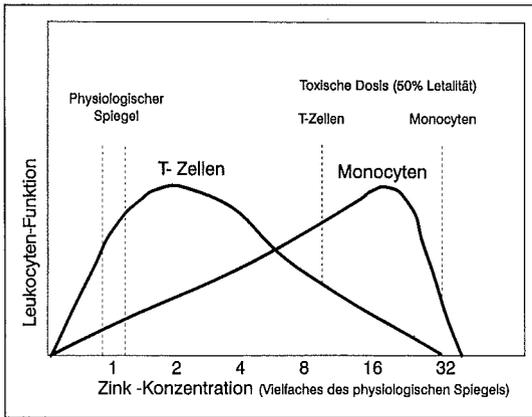


Abb. 1: TNF- $\alpha$  Induktion durch Zink im Vergleich zur Kobalt, Nickel und Quecksilber (Oben: TNF- $\alpha$ -Sekretion, unten: TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression). PBMC wurden in serumfreiem Medium mit  $ZnSO_4$ ,  $CoSO_4$ ,  $NiSO_4$  und  $HgSO_4$  über 24 Stunden (Cytokin-Sekretion) bzw. 3 Stunden (mRNA-Expression) stimuliert und TNF- $\alpha$  im Kulturüberstand im ELISA ( $n = 8$ ) bzw. mRNA-Expression mit der RT-PCR ( $n = 3$ ) nachgewiesen. \*\*:  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle. 1: 123 bp-Standard, 2: Kontrolle, 3: Zink (Zn), 4: Kobalt (Co), 5: Nickel (Ni), 6: Quecksilber (Hg), 7: LPS (Positivkontrolle).

phokine durch Zink induzieren. Durch Kultivierung in einem 2-Kammer-Zellkultur-Modell ließ sich jetzt nachweisen, daß zusätzlich zu den freigesetzten Monokinen ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen Monocyten und Lymphocyten für die Lymphokin-Induktion erforderlich ist. Versetzt man T-Zellen jedoch mit steigenden Zinkkonzentrationen (über 0,1 mM in serumfreiem Medium), zeigt sich überraschenderweise eine Hemmung der IL-1-vermittelten T-Zell-Stimulation (zur Übersicht siehe Abb. 2). Die Vitalität der T-Zellen bleibt dabei unberührt. Da T-Zellen, genau wie Mono-



Abhängigkeit der T-Zell- und Monocyten-Funktion vom Zinkspiegel (schematische Darstellung).

cyten, eine erhöhte zelluläre Zink-Aufnahme zeigen, liegt es nahe, daß ein intrazellulärer Mechanismus für diese beobachtete konzentrationsabhängige T-Zell-Hemmung verantwortlich ist. Tatsächlich ließ sich dieser negative Effekt des Zinks auf eine Hemmung der IL-1-Rezeptor-assoziierten Proteinkinase (IRAK) zurückführen. Diese stellt das erste Element der intrazellulären Signaltransduktion des IL-1-Rezeptors in den T-Zellen dar.

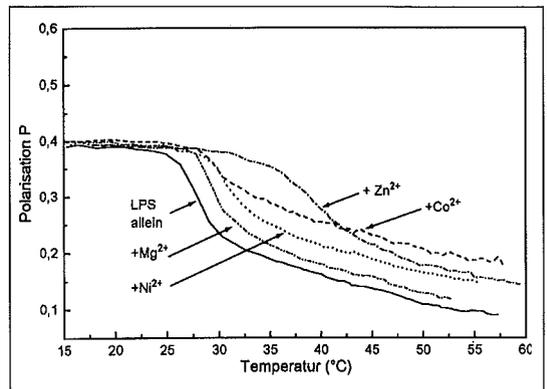
Wie schon frühere Arbeiten gezeigt haben (12, 13), erhöht Zinkzugabe die LPS-induzierte Cytokinsekretion in PBMC. Dabei führen sogar substimulatorische, alleine nicht wirksame Zinkkonzentrationen zusammen mit substimulatorischen LPS-Konzentrationen zu einer deutlich meßbaren Cytokinfreisetzung (11). Mit Hilfe fluoreszenzpolarisationsoptischer Messungen konnte jetzt der Mechanismus dieses Synergismus aufgeklärt werden: Zink überführt das LPS in eine weniger fluide (meßbar anhand einer erhöhten Polarisation), aber biologisch aktivere Konformation (Abb. 3). Um der *in vivo*-Situation des septischen Geschehens möglichst nahe zu kommen, wurden die Stimulationsversuche nicht nur mit synthetischem LPS, sondern auch mit hitze-inaktivierten *Escherichia coli*, also ganzen Bakterien, durchgeführt. Auch hier ließ sich der Synergismus zwischen Zink und LPS bestätigen. Bei dem Stimulans PMA, einem Aktivator der Proteinkinase C, der nicht strukturell durch Zink beeinflusst wird, ließ sich der beschriebene Synergismus erwartungsgemäß nicht nachweisen (Tabelle 1).

## Diskussion

Die essentielle Rolle von Zink für die Regulation der Immunfunktion wurde in zahlreichen Studien belegt. Zink als simples Kation wirkt direkt stimulierend auf Monocyten und induziert verschiedene immunmodulatorisch wirksame Cytokine. Dabei entspricht die in se-

rumfreiem Medium *in vitro* optimal stimulatorische Zinkkonzentration (0,1 mM) einem Zinkserumspiegel, der durch orale Zinkgabe nebenwirkungsfrei *in vivo* erzielt werden kann (2). Durch Vergleich mit strukturell ähnlichen Ionen konnte eine Spezifität für Zink belegt werden. Spezielle Serumproteine (Transferrin und Insulin), die zum Teil auch *in vivo* am Zinktransport beteiligt sind (25), vermögen, wie in dieser Arbeit aufgezeigt, die Zinkwirkung über einen rezeptor-unabhängigen Mechanismus noch zu verstärken (Details in 26). Für diesen stimulierenden Effekt scheint ein Synergismus auf Ebene der intrazellulären Signaltransduktion verantwortlich zu sein, denn die in dieser Arbeit aufgeklärten, für die Zinkstimulation bedeutsamen Signalmoleküle (Protein-Tyrosin-Kinasen, cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase) sind auch in die Übermittlung Transferrin- und Insulin-vermittelter Signale involviert. Neben der Interaktion mit Mediatoren der intrazellulären Signaltransduktion könnte sich der erhöhte intrazelluläre Zinkspiegel nach Zinkstimulation auch direkt auf die Funktion immunologisch bedeutsamer Transkriptionsfaktoren auswirken. So ist beispielsweise sowohl eine Stimulierung des Aktivator-Proteins-1 als auch eine verstärkte DNA-Bindung des zinkabhängigen Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B nach Zugabe von 0,1 mM Zink beschrieben (9,30). Eine Stabilisierung transkribierter mRNA durch Zinkionen könnte ebenfalls an der erhöhten Cytokinsekretion nach Zinkstimulation beteiligt sein (24).

Obleich die Untersuchungen mit Zinquinester zeigten, daß Zink von Monocyten und T-Zellen in vergleichbarem Maße aufgenommen wird, übt Zink in steigenden Konzentrationen unterschiedliche Wirkun-



Einfluß von Zink und Kontrollionen auf die Struktur des LPS. Die Fluoreszenzpolarisation des LPS wurde in Abhängigkeit von der Temperatur allein und nach Zugabe von äquimolaren Konzentrationen an Zink und Kontrollionen bestimmt. Eine hohe Polarisation  $P$  (niedrige Fluidität) geht einher mit einer erhöhten biologischen Aktivität des LPS.

	TNF- $\alpha$		IL-1 $\beta$	
	(pg/ml)		(pg/ml)	
	allein	+ Zink	allein	+ Zink
<b>LPS</b>	750 ** ( $\pm$ 229)	1825 ( $\pm$ 570)	14889 ** ( $\pm$ 3499)	18708 ( $\pm$ 3364)
<b>Inaktivierte Bakterien</b> ( <i>E. coli</i> )	4406 ** ( $\pm$ 1533)	9356 ( $\pm$ 2114)	27697 ** ( $\pm$ 3643)	35152 ( $\pm$ 4307)
<b>PMA</b>	6911 ( $\pm$ 1941)	6028 ( $\pm$ 1846)	4559 ( $\pm$ 1591)	4907 ( $\pm$ 1745)

Einfluß von Zink auf die Monokinsekretion nach Stimulation mit LPS, inaktivierten Bakterien und PMA. PBMC wurden über 24 Stunden mit LPS, hitze-inaktivierten *E. coli* bzw. PMA in serumhaltigem Medium stimuliert und 0,1 mM ZnSO<sub>4</sub> (substimulatorisch) zugesetzt. Cytokin-Konzentrationen im Kulturüberstand wurden im ELISA bestimmt (n = 8). \*\*:p<0,01.

gen auf diese beiden Zellpopulationen aus. Monocyten lassen sich über einen weiten Konzentrationsbereich durch Zink stimulieren. Eine T-Zell-Stimulation über das physiologische Maß hinaus findet jedoch nur bei gering erhöhtem Zinkspiegel statt. Weitere Steigerung der Zinkkonzentration (über etwa das 3fache der Norm) bewirkt, wie hier gezeigt, eine Hemmung der T-Zell-Funktion (zur Übersicht siehe Abb. 2, Details in 28). Die klinische Relevanz dieser Beobachtung wird deutlich in Studien, die eine Hemmung der T-Zell-Proliferation *in vitro* nach Gabe hoher Zinkdosen *in vivo* zeigen (6). Die dosisabhängig unterschiedliche Wirkung von Zink erfordert bei pharmakologischer Zinkgabe eine eng den jeweiligen Bedürfnissen angepaßte Zinkapplikation. Eine erwünschte Wiederherstellung oder sogar leichte Steigerung der Immunfunktion läßt sich durch Gabe niedriger Zinkdosen erzielen (5, 19), die primär stimulierend auf Monocyten wirken und sekundär die T-Zellen aktivieren. Bei Applikation höherer, aber noch nebenwirkungsfreier Zinkkonzentrationen überwiegt der direkt hemmende Effekt auf die T-Zellen den indirekt stimulierenden über die Monocyten, so daß mit einer Einschränkung der zellulären Immunfunktion zu rechnen ist. Die Anwendung von Zink als unspezifisches Immunstimulans sollte daher von Fall zu Fall kritisch überdacht werden. Auf der anderen Seite ließe sich jedoch der T-Zell-inhibierende Effekt von Zink in der Therapie von Erkrankungen zunutze machen, bei denen eine spezifische Inhibierung der zellulären Immunfunktion erwünscht ist, wie beispielsweise bei Graft-versus-Host-Reaktionen nach Transplantationen. Erste Versuche hierzu zeigen eine Hemmung der gemischten Lymphocytenkultur *in vitro* durch Zink (a Campo et al., in Vorbereitung). Neben einer T-Zell-spezifischen Immunsuppression böte eine Zinksubstitution zusätzlich den Vorteil einer äußerst geringen Toxizität (14).

Die Ergebnisse der unterschiedlichen Interaktion von Zink mit Monocyten und Lymphocyten weisen auf vielfältige Einsatzgebiete einer Zinkapplikation *in vivo* hin. Dabei ist jedoch auch eine mögliche Interaktion von Zink mit mikrobiellen Pathogenitätsfaktoren zu berücksichtigen. Für den bereits beschriebenen Synergismus zwischen Zink und LPS (12) konnte jetzt der Mechanismus aufgeklärt werden: Wie dargestellt, interagiert Zink direkt mit dem LPS und überführt es in eine weniger fluide, aber biologisch aktivere Konformation (ausführlich untersucht in 27). Die durch eine verminderte Fluidität repräsentierte höhere Ordnung der Kohlenwasserstoffketten des LPS könnte eine festere Bindung des LPS an das LPS-bindende Protein und somit eine Aktivitätssteigerung des LPS ermöglichen. Der Synergismus zwischen Zink und LPS konnte erstmals auch bei der Stimulation mit ganzen Bakterien (hitze-inaktivierten *E. coli*) als Modell des septischen Geschehens *in vivo* bestätigt werden. Eine pharmakologische Zinkgabe bei Patienten mit einer systemischen gram-negativen Infektion könnte somit verheerende Auswirkungen haben. Dies wird unterstrichen durch die Beobachtung, daß eine parenterale Zinkgabe in septischen Patienten die Akut-Phase-Reaktion verstärkt (3). Auf der anderen Seite kann eine prophylaktische Zinkgabe jedoch auch die entzündliche Reaktion durch Induktion von Stressproteinen vermindern, wie in einem porcinen Sepsis-Modell gezeigt wurde (18). Eine prophylaktische Zinkgabe könnte daher bei Patienten mit einem hohen Infektionsrisiko sinnvoll sein, während es bei der Behandlung bereits septischer Patienten ungeeignet erscheint.

Die in dieser Arbeit aufgeklärten direkten und indirekten Wirkungen von Zink auf Immunzellen *in vitro* belegen die essentielle Bedeutung von Zink für das Immunsystem. Sie bilden die Grundlage einer spezifischen, den jeweiligen Bedürfnissen angepaßten Zinkapplika-

tion *in vivo* und weisen auf neue Einsatzgebiete, aber auch mögliche Komplikationen und Nebenwirkungen einer Zinktherapie hin.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H. Kirchner für die uneingeschränkte Förderung und die Bereitstellung ausgezeichneter Arbeitsbedingungen am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin sowie Herrn Dr. rer. nat. L. Rink für die hervorragende Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft. Herrn Prof. Dr. U. Seydel (Abteilung für Biophysik, Forschungsinstitut Borstel) und Herrn PD Dr. M. Martin (Institut für Klinische und Molekulare Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover) danke ich herzlich für die Kooperation.

## Literatur

1. Bach, J. F.: The multi-faceted zinc dependency of the immune system. *Immunol. Today*. 1981. 4:225-227.
2. Boukaiba, N., Flament, C., Acher, S., Chappuis, P., Piau, A., Fusselier, M., Dardenne, M. and Lemonnier, D.: A physiological amount of zinc supplementation: Effects of nutritional, lipid, and thymic status in an elderly population. *Am. J. Clin. Nutr.* 1993. 57:566-572.
3. Braunschweig, C. L., Sowers, M., Kovacevich, D. S., Hill, G. M. and August, D. A.: Parenteral zinc supplementation in adult humans during the acute phase response increases the febrile response. *J. Nutr.* 1997. 127:70-74.
4. Cakman, I., Rohwer, J., Schütz, R.-M., Kirchner, H. and Rink, L.: Dysregulation between TH<sub>1</sub> and TH<sub>2</sub> T cell subpopulations in the elderly. *Mechan. Ageing Developm.* 1996. 87:197-209.
5. Cakman, I., Kirchner, H. and Rink, L.: Zinc supplementation reconstitutes the production of interferon- $\alpha$  by leukocytes from elderly persons. *J. Interferon Cytokine Res.* 1997. 17:469-472.
6. Chandra, R. K.: Excessive intake of zinc impairs immune response. *J.A.M.A.* 1984. 252:1443-1446.
7. Crea, A., Guerin, V., Ortega, F. and Hartemann, P.: Zinc et système immunitaire. *Ann. Med. Interne.* 1990. 141:447-451.
8. Cunningham-Rundles, S., Bockmann, R. S., Lin, A., Giardina, P. V., Hilgartner, M. W., Caldwell-Brown, D. and Carter, D. M.: Physiological and pharmacological effects of zinc on immune response. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1980. 587:113-122.
9. Daffada, A. A., Murray, E. J. and Young, S. P.: Control of activator protein-1 and nuclear factor kappa B activity by interleukin-1, interleukin-6 and metals in HEPG2 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994. 1222:234-240.
10. Driessen, C., Hirv, K., Rink, L. and Kirchner, H.: Induction of cytokines by zinc ions in human peripheral blood mononuclear cells and separated monocytes. *Lymphokine Cytokine Res.* 1994. 13:15-20.
11. Driessen, C., Hirv, K., Kirchner, H. and Rink, L.: Divergent effects of zinc on different bacterial pathogenic agents. *J. Infect. Dis.* 1995. 171:486-489.
12. Driessen, C., Hirv, K., Kirchner, H. and Rink, L.: Zinc regulates cytokine induction by superantigens and lipopolysaccharide. *Immunology.* 1995. 84:272-277.
13. Driessen, C., Hirv, K., Wellinghausen, N., Kirchner, H. and Rink, L.: Influence of serum on zinc, toxic shock syndrome toxin-1, and lipopolysaccharide-induced production of IFN- $\gamma$  and IL-1 $\beta$  by human mononuclear cells. *J. Leukoc. Biol.* 1995. 57:904-908.
14. Fosmire, G. J.: Zinc toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 1990. 15:225-227.
15. Hadden, J. W.: Thymic endocrinology. *Int. J. Immunopharmacol.* 1992. 14:345-352.
16. Keen, C. L. and Gershwin, M. E.: Zinc deficiency and immune function. *Annu. Rev. Nutr.* 1990. 10:415-431.
17. Kirchner, H. and Rühl, H.: Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by Zn<sup>2+</sup> in vitro. *Exp. Cell. Res.* 1970. 61:229-230.
18. Klosterhalfen, B., Töns, C., Hauptmann, S., Tietze, L., Offner, F. A., Küpper, W. and Kirkpatrick, C. J.: Influence of heat shock protein 70 and metallothionein induction by zinc-bis-(DL-hydrogenaspartate) on the release of inflammatory mediators in a porcine model of recurrent endotoxemia. *Biochem. Pharmacol.* 1996. 52:1201-1210.
19. Kruse-Jarres, J. D.: The significance of zinc for humoral and cellular immunity. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 1989. 3:1-8.
20. Kushner, J.: The phenomenon of the acute phase response. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1982. 389:39-48.
21. Neldner, K. H. and Hambidge, K. M.: Zinc therapy in acrodermatitis enteropathica. *New Engl. J. Med.* 1975. 292:879-882.
22. Rietschel, E. T. and Brade, H.: Bakterielle Endotoxine. *Spektrum der Wissenschaft.* 1993. 1:34-42.
23. Rühl, H. and Kirchner, H.: Monocyte-dependent stimulation of human T cells by zinc. *Clin. Exp. Immunol.* 1978. 32:484-488.
24. Taylor, G. A. and Blackshear, P. J.: Zinc inhibits turnover of labile mRNAs in intact cells. *J. Cell. Physiol.* 1995. 162:378-387.
25. Vallee, B. L. and Falchuk, K. H.: The biochemical basis of zinc physiology. *Phys. Rev.* 1993. 73:79-118.
26. Wellinghausen, N., Fischer, A., Kirchner, H. and Rink, L.: Interaction of zinc ions with human peripheral blood mononuclear cells. *Cell. Immunol.* 1996. 171:255-261.
27. Wellinghausen, N., Schromm, A. B., Seydel, U., Brandenburg, K., Luhm, J., Kirchner, H. and Rink, L.: Zinc enhances lipopolysaccharide-induced monokine secretion by a fluidity change of lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 1996. 157:3139-3145.
28. Wellinghausen, N., Martin, M. and Rink, L.: Zinc inhibits interleukin-1-dependent T cell stimulation. *Eur. J. Immunol.* 1997. 27:2529-2535.
29. Wellinghausen, N., Kirchner, H. and Rink, L.: The immunobiology of zinc. *Immunol. Today.* 1997. 18:519-521.
30. Zabel, U., Schreck, R. and Baeurle, P. A.: DNA binding of purified transcription factor NF $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* 1991. 266:252-260.

Aus der Medizinischen Klinik I der Medizinischen Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. H. L. Fehm)

# Leptin

A. Peters

LEPTIN (von griechisch *leptos* = dünn) wurde Ende 1994 nach einer achtjährigen Suche von Jeffrey Friedmans Team an der Rockefeller Universität in New York City entdeckt. (28) Seitdem ist Leptin als vielversprechendes „Sättigungshormon“ in das öffentliche Interesse gerückt. Die Entdeckung von Leptin ließ damals hoffen, daß man eine geeignete Substanz zur Behandlung der menschlichen Adipositas gefunden habe. Allerdings ist diese Hoffnung bis heute nicht in Erfüllung gegangen.

Leptin ist ein 167-Aminosäuren-Protein, das vom Obesitas-(*ob*)-Gen der Maus produziert wird. Tiere mit einem Defekt in beiden Kopien dieses Gens verhalten sich so, als wären sie in einem Zustand ständigen Hungers, unfähig sich fortzupflanzen, sich warmzuhalten, normal zu wachsen und, selbstverständlich, ihren Appetit zu zügeln. Deshalb werden diese Tiere fett und wiegen etwa dreimal soviel wie gesunde Tiere. Friedmans Gruppe und andere zeigten, daß Leptin im Fettgewebe selbst gebildet wird. Die Forscher fanden, daß Leptin in den Adipozyten produziert und in den Blutstrom sezerniert wird. So steigen die Leptinkonzentrationen im Blut, wenn die Fettmasse zunimmt. Das bedeutet, daß die Menge an produziertem Leptin gewöhnlich proportional zur Größe der Adipozyten zunimmt.

Dieser Befund führte zu der Idee, daß Leptin als ein „Lipostat“ fungiert (Abb. 1): Wenn die Fettspeicher zunehmen, produzieren die Adipozyten das Hormon Leptin und im Gegenzug signalisiert das Hormon dem Gehirn, das Essen einzustellen. Wenn umgekehrt die Fettspeicher abnehmen, sinken die Leptinkonzentrationen gleichermaßen und das signalisiert dem Gehirn, den Gewichtsverlust durch vermehrtes Essen und verminderte körperliche Aktivität auszugleichen.

Nachfolgende Forschung zum Rezeptor, der das Signal des Hormons Leptin im Gehirn empfängt, unterstreicht die Sichtweise von der Wirkungsweise dieses Moleküls. Ein Jahr nach der Entdeckung des Leptins fand das Team von Louis Tartaglia den Rezeptor, einen Klasse I Zytokin-Rezeptor, und klonete das Gen bei Mäusen und Menschen. (25) Kurz darauf zeigten unabhängig voneinander drei Arbeitsgruppen, von Tartaglia, von Friedman und von Leibel, daß bei einer ande-

ren Form von Adipositas, bei der sogenannten Diabetes-(*db*)-Maus eine Mutation in diesem Leptinrezeptor-Gen vorliegt. (3) Die *db*-Mäuse werden fett, weil sie nicht auf das Signal von Leptin reagieren können.

Die Lokalisation des Leptinrezeptors im Gehirn ist mit der Idee konsistent, daß Leptin eine entscheidende Rolle bei der Gewichtsregulation spielt. Dennis Baskin in Seattle und andere haben gefunden, daß das Leptinrezeptor-Gen in vier Hauptregionen des Hypothalamus expremiert wird, insbesondere im Nukleus arcuatus und im Nukleus paraventricularis, zwei Zentren, denen man seit langem entscheidende Bedeutung für die Regulation des Essverhaltens und des Stoffwechsels zuschreibt. (21)

Die menschliche Adipositas ist jedoch – trotz all dieser Evidenz, daß Leptin und sein Rezeptor das Körpergewicht zu regulieren scheinen – nicht so einfach durch Mutationen im Leptin-Gen zu erklären. Bisher ist erst ein einziger Fall beim Menschen publiziert, bei dem ein kongenitaler Leptinmangel mit einer schweren Adipositas assoziiert ist. (13) In einer Untersuchung an Pima-Indianern, einer Population mit einer extrem hohen Prävalenz an Adipositas und Diabetes, konnte Eric Ravussin zeigen, daß niedrige Leptinkonzentrationen eine Gewichtszunahme voraussagen. (15) Andere Un-

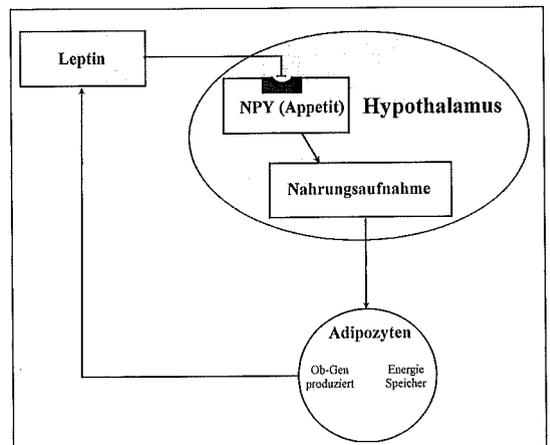


Abb. 1: Schematische vereinfachte Darstellung des Leptin Regelsystems; NPY: Neuropeptid Y

tersucher, u. a. Jose Caro, damals an der Thomas Jefferson Universität in Philadelphia, fanden, daß generell Menschen mit Übergewicht hohe Leptinkonzentrationen im Blut haben – nicht erniedrigt wie die bei den *ob*-Mäusen. Die großen Fettspeicher bei diesen Menschen scheinen das Hormon normal zu produzieren, was impliziert, daß das Leptin selbst unwirksam zur Behandlung der Adipositas ist. Stattdessen, so wurde vermutet, müsse ein Defekt bei der Wirkung des Leptins zu suchen sein, obwohl dieser wahrscheinlich nicht im Leptinrezeptor selbst zu finden wäre.

Ein möglicher Defekt in der Leptinwirkung kann auf dem Weg des Leptins von der Zirkulation (23) zum Gehirn liegen. (2, 19) Michael Schwartz in Seattle und Jose Caro fanden, daß der Liquor von Patienten mit Adipositas nur wenig mehr Leptin enthielt als der schlanker Kontrollpersonen, obwohl übergewichtige Personen im Durchschnitt etwa 5-fach höhere Leptinkonzentrationen im Blut haben. Ein alternativer Defekt könnte darin bestehen, daß das Gehirn seine Fähigkeit verliert, auf Leptin zu reagieren. Deshalb haben Forscher andere Moleküle untersucht, die im Gehirn mit Leptin interagieren und die das Körpergewicht kontrollieren. Kandidatenmoleküle sind das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH), das Melanin-Concentrating-Hormon (MCH), das Melanozyten-Stimulierende-Hormon (MSH) und das Neuropeptid Y (NPY). Im Abstand von wenigen Monaten werden in den letzten Jahren immer neue derartige Kandidatenmoleküle im Gehirn entdeckt, die in der Energie-Regulation eine potentielle Rolle spielen. Weiterhin im Mittelpunkt steht jedoch der potente appetit-stimulierende Neurotransmitter Neuropeptid Y.

Normalerweise inhibiert Leptin die NPY-Konzentrationen im Gehirn. Die Produktion dieses Appetit-Stimulators NPY ist z. B. bei den leptin-defizienten *ob*-Mäusen extrem erhöht. 1995 zeigten Thomas Steffens und seine Kollegen am Eli Lilly Labor in Indianapolis, daß Leptin bei Versuchstieren die NPY-Produktion unterdrückt, ein Befund der kurz darauf von Michael Schwartz bestätigt wurde. (17) Diese Ergebnisse zeigten, daß Tiere ohne Leptin ein entzücktes NPY-System haben, was zu weiterer Gewichtszunahme führt. Das Mapping von Leptinrezeptoren in verschiedenen Hirnregionen paßt konsistent zu dieser Hypothese, denn einer der Lokalisationen des Leptinrezeptors ist der Nucleus arcuatus, der Hauptort der NPY-Produktion. (21) Kurz darauf fand die Gruppe von Richard Palmiter in Washington direktere Hinweise dafür, daß die Leptinwirkung via NPY den Appetit reguliert. Sogenannte NPY-Knock-out-Tiere waren, anders als erwartet, nicht dünn, sondern eher normal im Körpergewicht und im Essverhalten. (6, 7) Als schließlich die gleiche Arbeitsgruppe diese normalgewichtigen NPY-Knock-out-Mäuse mit *ob*-Mäusen kreuzte, fanden sie, daß ein

Mangel an NPY den Defekt bei der *ob*-Maus abschwächte. Appetit und Körperfett bei diesen doppelmutanten Mäusen lagen zwischen dem der normalen und dem der *ob*-Maus. Diese Ergebnisse zeigten, daß ein Teil der Gewichtszunahme der *ob*-Maus, aber nicht die gesamte Gewichtszunahme, aus einer gesteigerten NPY-Produktion resultiert.

Die Leptin-Genexpression scheint durch eine Reihe von Faktoren eng kontrolliert zu sein: Bei Menschen konnte bisher allerdings nur der stimulatorische Effekt von Glukokorticoiden und von vermehrter Kalorienzufuhr, sowie der inhibitorische Effekt beim Fasten zweifelsfrei gezeigt werden. Die Ergebnisse zur Rolle des Insulins auf die Genexpression von Leptin waren bislang widersprüchlich, denn es wurden teils stimulatorische, inhibitorische oder gar keine Effekte beschrieben. Vor kurzem konnte unsere Arbeitsgruppe in Lübeck einen Teil dieser Widersprüche klären: Wir fanden, daß die insulinabhängige Glukoseaufnahme in die Zelle (sog. Glucose-Uptake) ein potenter Kurzzeitregulator der Leptinsekretion ist. (27)

Seit der Entdeckung des Leptins stand die Rolle des Peptidhormons zur Begrenzung von Fettmassen im Mittelpunkt des Interesses. Allerdings scheint dieses nicht die Hauptfunktion von Leptin zu sein, denn im Laufe der Evolution war Hunger – nicht Adipositas – ein Problem. Fliers Team konnte kürzlich zeigen, daß Leptin durch seine Wirkung auf verschiedene endokrine Organe (Nebennieren, Schilddrüse, Ovarien und Testes) die Körperfunktionen während des Hungerstresses aufrecht erhält. (1) Neuere Arbeiten zeigen zusätzliche periphere Effekte von Leptin auf das kardiovaskuläre System (10) und das hämatopoetische System. (4)

Während einer längeren Hungerperiode treten diverse neuroendokrine Adaptationen auf. (20) Zum Sparen von Energiereserven produzieren hungrige Tiere weniger Sexualhormone in Ovarien und Testes – der Sexualtrieb nimmt folglich ab. Gleichzeitig wird bei hungrigen Tieren die Produktion von Schilddrüsenhormonen vermindert, die generell die Stoffwechsellaktivität von Zellen aktivieren. Weiter wird die Produktion der adrenal Stresshormone Cortisol und Adrenalin gesteigert, die eine Vielzahl von Funktionen (z. B. Lipolyse, Aufrechterhaltung des Blutdrucks) ausüben. Flier und Mitarbeiter zeigten, daß ein Abfall im Serum Leptin beim Fasten diese Adaptationsmechanismen triggert. Gibt man umgekehrt hungrigen Tieren Leptin, so werden die reproduktiven, metabolischen und Stress-Adaptationen wieder aufgehoben. Die klassischen endokrinen Veränderungen in Hungerphasen werden wahrscheinlich zu einem großen Teil, wenn nicht gänzlich dadurch erklärt, daß in einer Hungerperiode die Leptinkonzentration absinkt. Zusätzlich zu Erkenntnissen über den verminderten Sexualtrieb bei hungrigen Tieren konnte die Arbeit über Leptin neue

Aspekte der normalen Sexualentwicklung aufzeigen. Fliers Team fand Hinweise darauf, daß das Hormon ein Signal für den Beginn der Pubertät darstellt. (26) Die Gabe von Leptin bei normalen weiblichen Mäusen konnte die sexuelle Reifung beschleunigen.

Wie genau Leptin die neuroendokrinen Veränderungen im Hungerzustand und bei Kalorienexzess bewirkt, ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, daß eine gesteigerte Aktivität von Faktoren, welche die Stresshormonproduktion regulieren, eine entscheidende Rolle spielt. Michael Schwartz fand, daß der Leptinabfall beim Fasten das NPY (Appetit-Stimulator) aktiviert, (17) während der Leptinanstieg beim Überfüttern das CRH (Appetit-Hemmer) stimuliert. (21) Beide, sowohl das NPY als auch das CRH, stimulieren hypophysäres ACTH und damit die Freisetzung der Nebennierensteroiden. (20) Die Nebennierensteroiden (katabol) (16) und das Insulin (anabol) (12) sind in ihrem Zusammenspiel wohl die beiden potentesten, reziproken Effektor-Signale der Gewichtsregulation: (5, 24) Im *Fasten* steigert NPY die Nahrungsaufnahme, stimuliert gleichzeitig das katabole Hormon Cortisol, welches – in der Abwesenheit von Insulin – Substrate aus den Energie-Speichern mobilisiert und zur Gewichtsabnahme führt. Bei *akutem Kalorienexzess* hemmt CRH die weitere Nahrungsaufnahme, stimuliert das katabole Cortisol, welches die anabole Wirkung des Insulins limitiert. Bei *chronischem Kalorienexzess* ist zwar das Cortisol/Insulin-Verhältnis zunächst ausgeglichen; der leichte Hypercortisolismus führt aber auf Dauer zur abdominalen Fettablagerung, die typisch ist für das metabolische Syndrom und die sehr an die Fettverteilung beim Cushing Syndrom erinnert. Ungünstigerweise wird wenig Leptin im omentalen, retroperitonealen und mesenterialen Fettgewebe gebildet, so daß die „Leptin-Bremse“ bei der stammbetonten Adipositas kaum wirksam ist. (9, 11, 14, 22)

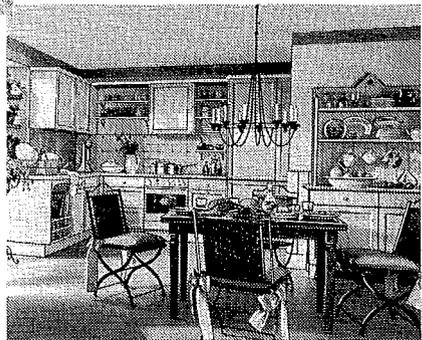
Interessanterweise haben Leptin und Insulin zwei gemeinsame Eigenschaften: 1.) die Fähigkeit, zentral die Nahrungsaufnahme zu hemmen (zumindest bei Tieren) und 2.) über zentrale Mechanismen die Produktion der Nebennierensteroiden zu stimulieren. Bereits vor acht Jahren konnte Michael Schwartz zeigen, daß Insulin die erste Eigenschaft erfüllt, als peripheres Feedback-Signal an die Appetit-Zentren im Gehirn. (18) Vor kurzem gelang unserer Arbeitsgruppe in Lübeck der Nachweis, daß Insulin auch die zweite Eigenschaft erfüllt, nämlich daß eine Hyperinsulinämie beim Menschen eine Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse verursacht. (8) Leptin und Insulin sind wahrscheinlich synergistische (im Hunger beide niedrig, bei Überernährung beide hoch), teilweise redundante, afferente Signale, die das Gehirn über den Zustand und die Veränderung der Energiereserven informieren.

Selbst wenn die Verbindung zwischen Leptin und den anderen endokrinen Systemen in der Evolution zur Adaptation am Hungerzustand entstand, stellt die Erforschung des Systems doch eine wichtige Hilfe für die Entwicklung von therapeutischen Strategien bei der Adipositas dar. Die biologische Bedeutung von Leptin mag nicht notwendigerweise etwas mit Adipositas oder deren Präventionen zu tun haben. Dennoch ist Leptin, über seine Rolle bei der Gewichtsregulation hinaus, sicherlich ein wichtiges Signal in der Kommunikation zwischen Peripherie und Gehirn.

## Literatur

1. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS: Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382: 250-252.1996
2. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV: Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348: 159-161.1996
3. Chua SC, Jr., Chung WK, Wu Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL: Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 271: 994-996.1996

**Miele**  
KÜCHEN



Wir beraten Sie gerne.  
Ihre Wünsche und unsere Erfahrung  
bringen die individuelle Lösung!

**Schöppich**  
hat 'Ihre' Küche

Bad Schwartau / Gewerbegebiet  
Langenfelde 2-4 • ☎ 0451-280 880



4. Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith Gbur J, Mikhail A, Platika D, Snodgrass HR: Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med* 2: 585-589.1996
5. Dallman MF, Strack AM, Akana SF, Bradbury MJ, Hanson ES, Scribner KA, Smith M: Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. *Front Neuroendocrinol* 14: 303-347.1993
6. Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD: Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 381: 415-421.1996
7. Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD: Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* 274: 1704-1707.1996
8. Frühwald-Schultes B, Bong W, Kern W, Wellhöner P, Kerner W, Born J, Fehm HL, Peters A.: Effekte von Insulin auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse. *Diabet Stoffw.* 1998, 7: A.
9. Frühwald-Schultes B, Peters A, Kern W, Beyer J, Pfützner A: Influence of sex differences in subcutaneous fat mass on serum leptin concentrations. *Diabetes Care.* 1998, In press.
10. Haynes WG, Sivitz WI, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL: Sympathetic and cardiorenal actions of leptin. *Hypertension* 30: 619-623.1997
11. Hube F, Lietz U, Igel M, Jensen PB, Tornqvist H, Joost HG, Hauner H: Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. *Horm Metab Res* 28: 690-693.1996
12. Londos C: Hormon-sensitive lipase and the control of lipolysis in adipocytes, in LeRoith D, Taylor I, Olefsky J.(eds): *Diabetes mellitus*, Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 223-226, 1996.
13. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387: 903-908.1997
14. Montague CT, Prins JB, Sanders L, Digby JE, O'Rahilly S: Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes* 46: 342-347.1997
15. Ravussin E, Pratley RE, Maffei M, Wang H, Friedman JM, Bennett PH, Bogardus C: Relatively low plasma leptin concentrations precede weight gain in Pima Indians. *Nat Med* 3: 238-240.1997
16. Samra JS, Clark MO, Humphreys SM, Macdonald IA, Bannister R, Frayn KN: Effects of physiological hypercortisolemia on the regulation of lipolysis in subcutaneous adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 626-631.1998
17. Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, Kuijper JK, Foster D, Lasser G, Prunkard DE, Porte D, Jr., Woods SC, Seeley RJ, Weigle DS: Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y expression on ob/ob mice. *Diabetes* 45: 531-535.1996
18. Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods S, Porte DJ: Insulin in the brain: A hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev* 13: 387-414.1992
19. Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D, Jr. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med* 2: 589-593.1996
20. Schwartz MW, Seeley RJ: Neuroendocrine responses to starvation and weight loss. *N Engl J Med* 336: 1802-1811.1997
21. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG: Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98: 1101-1106.1996
22. Shimizu H, Shimomura Y, Hayashi R, Ohtani K, Sato N, Futawatari T, Mori M: Serum leptin concentration is associated with total body fat mass, but not abdominal fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21: 536-541.1997
23. Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, Becker GW, Bowsher RR, Stephens TW, Caro JF: Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest* 98: 1277-1282.1996
24. Strack AM, Sebastian RJ, Schwartz MW, Dallman MF: Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. *Am J Physiol* 268: R142-9.1995
25. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, et al: Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271.1995
26. Vogel G: Leptin: a trigger for puberty? *Science* 274: 1466-1467.1996
27. Wellhöner P, Kern W, Kerner W, Born J, Fehm HL, Peters A.: Glucose utilisation: a potent short-term regulator of leptin secretion, *Experim Clin Endocrinol Diabet.* 1998, 106: S40 A.
28. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.1994

Aus der Medizinischen Klinik der Medizinischen Universität zu Lübeck<sup>1</sup> und dem Department of Surgery<sup>2</sup> (Direktor: Prof. R. Saadia), Chris Hani Baragwanath Hospital, Soweto/University of the Witwatersrand, Johannesburg, Republic of South Africa

## Geophagie

A. Woywodt<sup>1,2</sup>, E. F. Stange<sup>1</sup>, W. Woywodt, A. Kiss<sup>2</sup>

### Summary

A 45-years old black woman presented to a tertiary care hospital in Soweto, Johannesburg, South Africa, with a short history of abdominal pain and constipation. Plain abdominal X-ray showed the entire colon to be densely impacted with radioopaque material. Further questioning failed to reveal any previous barium enema or other gastrointestinal contrast studies. The diagnosis remained entirely enigmatic at that stage. Within 24 hours, however, the patient deteriorated and developed surgical acute abdomen. At laparotomy, the entire colon was densely packed with dry soil that proved impossible to remove. A perforated sigmoid abscess was the evident cause of her peritonism. Attempts to evacuate the colonic contents by colotomy and on-table lavage failed. Sigmoid resection was performed and a Hartmann's colostomy was fashioned. The patient developed sepsis, intensive care was unavailable and she demised in the ward within 24 hours. We provide a short review of geophagia, the habit of eating earth, soil or clay with an emphasis on classification, clinical manifestations, descriptions in history and cultural contexts of this remarkable disorder.

### Einleitung

Geophagie bezeichnet eine Eßstörung, bei der Erde, Sand oder Lehm verzehrt werden. Die Erkrankung ist weltweit vermutlich nicht selten, jedoch in der Literatur vernachlässigt. Besonders bei Frauen schwarzer Hautfarbe ist Geophagie weltweit erstaunlich häufig. Wir berichten über eine 45 Jahre alte schwarze Patientin, die sich mit unklaren abdominalen Beschwerden und Obstipation in einem Krankenhaus in Johannesburg/Südafrika vorstellte. Bei akutem Abdomen wurde eine Laparotomie durchgeführt, die eine Sigma-Perforation ins Mesosigmoid mit Perforation in die freie Bauchhöhle und Peritonitis aufdeckte. Die Patientin verstarb kurze Zeit später in der Sepsis bei Peritonitis. Geophagie ist normalerweise eine benigne Erkrankung. Diese Eßstörung ist in typischer Weise mit Eisenmangelanämie assoziiert, die genauen Zusammenhänge sind jedoch unklar. Geophagie ist unter Schwan-

geren schwarzer Hautfarbe beispielsweise in Großstädten der USA bis heute häufig. Man mag spekulieren, ob nicht vielleicht auch in Deutschland Emigranten aus tropischen Ländern Geophagie praktizieren. Interessanterweise ist die Erkrankung bereits im Altertum und später auch in Deutschland erwähnt worden. Wir beschreiben einen weiteren letalen Fall von Geophagie, geben eine Übersicht über die Literatur zu dieser bemerkenswerten Erkrankung und gehen kulturellen Wurzeln wie historischen Beschreibungen nach.

### Kasuistik

Eine 45 Jahre alte Patientin stellte sich im Juli 1997 mit neu aufgetretenen abdominellen Beschwerden und Obstipation in einem Krankenhaus in Soweto/Johannesburg, Südafrika, vor (1). Sie beschrieb einen seit drei Tagen zunehmenden Dauerschmerz von zuletzt erheblicher Intensität im linken Unterbauch. Ferner berichtete die Patientin, seit erheblicher Zeit unter Verstopfung zu leiden. Bei näherem Nachfragen schilderte sie eine schon vor längerer Zeit eingetretene Verschlechterung ihres Allgemeinzustandes mit Appetitlosigkeit und Amenorrhoe. Die frühere Annese der Patientin war leer, und sie nahm keine Medikamente ein. Sie war eine Hausfrau aus Soweto, einem nahezu ausschließlich von Schwarzen dicht bewohnten Stadtviertel an der Peripherie Johannesburgs. Am Aufnahmetag hatte sie sich bei ihrem Hausarzt vorgestellt und war unter der Verdachtsdiagnose „Uterus myomatosus“ in die gynäkologische Ambulanz eingewiesen worden, von wo sie unter der Diagnose „Ileus“ in die chirurgische Abteilung verlegt worden war. Ein Schwangerschaftstest war negativ ausgefallen.

Bei der klinischen Untersuchung sahen wir eine laut Ausweis 45 Jahre alte, jedoch deutlich vorgealterte Patientin in schlechtem Allgemeinzustand. Sie war blaß, kachektisch und febril. Das Abdomen war bei Palpation lediglich im linken Unterbauch lokalisiert sehr druckschmerzhaft. Darmgeräusche waren nur spärlich zu auskultieren. Laboruntersuchungen zeigten eine Leukozytose von 12000/µl und eine Hypokaliämie von

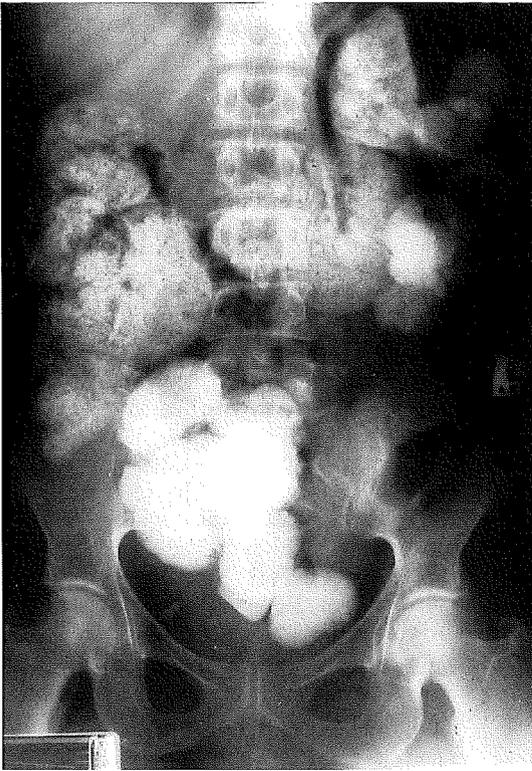


Abbildung 1: Röntgen-Abdomenübersichtsaufnahme im Stehen (Nativbild). Der Kolonrahmen ist dicht mit einer röntgendichten Masse gefüllt.

3.1 mmol/l, der Hb war 12.9 mg/dl. Eine Abdomenübersichtsaufnahme im Stehen zeigte einen mit röntgendichter Substanz ausgefüllten Kolonrahmen, freie Luft war nicht nachweisbar (Abbildung 1). Die Patientin verneinte jegliche Untersuchungen mit Kontrastmittel am Verdauungstrakt. Am nächsten Morgen war ihr Abdomen diffus druckdolent, und es wurde die Indikation zur Laparotomie gestellt. Differentialdiagnostisch wurden Perforation eines Kolonkarzinoms oder eines divertikulitischen Abszesses favorisiert. Als Ursache des akuten Abdomens zeigte sich eine frische kotige Peritonitis des linken Unterbauches bei sekundär in die freie Bauchhöhle perforiertem Abszeß im Mesosigmoid. Das gesamte Kolon war fragil und vulnerabel und in ganzer Länge mit Hartschubstanz prall gefüllt. Versuche, das Kolon durch Kolotomie und Lavage zu entleeren, scheiterten, die Hartschubstanz entpuppte sich als trockene, bröckelige Erde. Eine Diskontinuitätsresektion nach Hartmann mit Resektion des Sigma wurde durchgeführt und ein Kolostoma angelegt. Die Patientin wurde von der chirurgischen Intensivstation abgelehnt und mit den Zeichen der Sepsis auf eine periphere Station verlegt, wo sie etwa 12 Stunden postoperativ verstarb.

## Diskussion

Geophagie, das Essen von Erde, Sand oder Lehm, ist nosologisch betrachtet eine Variante von Pica. Pica wiederum, von *Pica pica*, dem lateinischen Namen für die in ihrem Eßverhalten wenig wählerische Elster, bezeichnet das habituelle Essen nichtnutritiver Substanzen, die nicht dem Alter des Patienten adäquat, nicht Teil kulturell determinierter Praktiken und nicht Symptom einer anderen psychischen Erkrankung ist. Nach dieser Definition der DSM IV (2) sind also das Essen von nicht-Nahrungsmitteln wie Erde etwa bei einem kleinen Kind, im Rahmen von Stammesritualen oder als Symptom einer Psychose nicht als Pica zu klassifizieren. Wenn auch Pica insgesamt wohl nicht so häufig ist wie andere Eßstörungen (3), so ist die Erkrankung dennoch weltweit anzutreffen und keineswegs wirklich selten, sondern vielmehr selten erfragt und berichtet (4). Die Erkrankung ist am häufigsten assoziiert mit Eisenmangelanämie, ohne daß jedoch klare Vorstellungen zu Ursache und Wirkung bestehen (5). Bei taktvoller Befragung liegt die Prävalenz von Pica unter Patienten und vor allem Patientinnen mit Eisenmangelan-

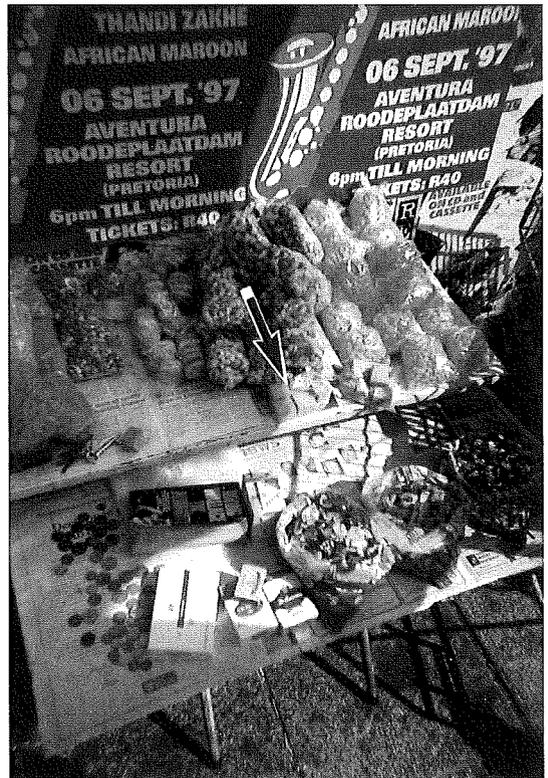


Abbildung 2: Ein typischer Stand eines Straßenhändlers in Johannesburg/Südafrika mit Süßigkeiten, Zigaretten, Erdnüssen und zum Verkauf angebotener Lehm in kleinen Beuteln (Pfeil)



Abbildung 3: Eine Straßenhändlerin, die nur Lehm anbietet

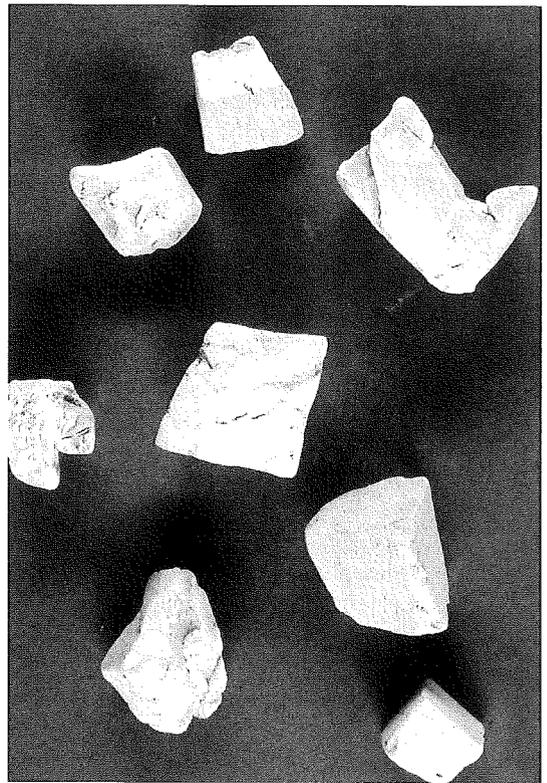


Abbildung 4: Einige Brocken des dort erstandenen Lehms in Nahaufnahme

ämie in manchen Serien bei bis zu 50 % (5). Auch vernachlässigte Kinder und geistig behinderte Anstaltsinsassen gelten als Risikogruppen. Das Spektrum der im Rahmen von Pica konsumierten Substanzen ist beeindruckend und reicht von Holz und Papier über Sodapulver und Wäschestärke bis hin zu Zement und Zigarettenasche (6). Auch unter Schwangeren ist Pica nicht selten anzutreffen. In einer zeitgenössischen Studie aus Washington D.C. unter 553 schwarzen Frauen einer Schwangerensprechstunde war Pica bei immerhin 45 Patientinnen (8.1 %) anzutreffen (7). Pica ist nicht in typischer Weise mit schweren Komplikationen behaftet, kann jedoch diagnostisch verwirrende Phänomene hervorrufen (8, 9). Gastrointestinale Probleme wie Obstipation oder Infektion mit Parasiten stehen im Vordergrund (3). Bei Kindern ist vor allem die Intoxikation mit Blei aus weißer Innenraumfarbe zu fürchten. Chirurgische Komplikationen wie Perforation sind jedoch beschrieben und vor allem bei geistig behinderten Patienten mit häufig bizarren Eßgewohnheiten anzutreffen (10, 11, 12), auch tödliche Fälle sind berichtet worden (13). Sofern nicht explizit erfragt, entgeht die Erkrankung in typischer Weise der Diagnose, da Patienten Pica häufig als beschämend empfinden und nicht von sich aus zugeben. Gelegentlich sind Röntgenbe-

funde gastrointestinaler Fremdkörper wegweisend (14). Zur Behandlung der Erkrankung ist eine Vielzahl verhaltenstherapeutischer Interventionen geeignet (3, 4). Geophagie ist im wesentlichen eine Erkrankung von Frauen und Kindern und Patienten mit Eisenmangelanämie (15). Die typische Patientin ist eine Schwangere schwarzer Hautfarbe (16). In einer älteren Studie, interessanterweise ebenfalls aus Johannesburg, zeigten 72 % von 348 nicht weißen Patientinnen einer gynäkologischen Sprechstunde Geophagie (17). Wir interessieren uns für die Prävalenz von Geophagie im Einzugsbereich unserer Klinik. Befragung zahlreicher Patienten und des farbigen Personals unserer Klinik ergab, daß Geophagie hier vor allem bei jungen Frauen vor allem während der Gravidität außerordentlich häufig sei. Nunmehr für dieses Thema sensibilisiert entdeckten wir an etlichen Ständen der Straßenhändler zum Verkauf angebotene Beutel mit einer erdartigen Substanz (Abbildung 2). Die Händler bestätigten die Häufigkeit geophager Praktiken unter jungen Frauen und Schwangeren. Nachfrage bei einer auf den Verkauf dieser Erde spezialisierten Verkäuferin (Abbildung 3) ergab, daß diese Substanz in einer Vorstadt Johannesburgs speziell für den menschlichen Genuß abgebaut werde und wegen seines Wohlgeschmacks allgemein

berühmt sei. Die angebotenen Beutel enthalten etwa 250 g Ton von hellgelber Farbe und cremiger Konsistenz, dessen Geschmack von uns (A.W.) als eigenartig, jedoch nicht unangenehm empfunden wurde. Erste Untersuchungen ergaben, daß es sich um einen stark schluffigen, feinkörnigen und kalkarmen Ton handelt, der seine braungelbe Farbe Beimengungen von Eisen verdankt.

Geophagie ist wohl noch gutartiger als Pica im allgemeinen. Ausgeprägte Kachexie soll bei massiver Geophagie recht charakteristisch sein und gab Anlaß zur Bezeichnung „Cachexia africana“. Infektionen mit Parasiten wie *Toxocara* oder *Ankylostoma* sind häufig. Perforationen des Kolons und Todesfälle sind bereits beschrieben worden (18, 19, 20). Röntgenaufnahmen des Abdomens liefern oft diagnostische Hinweise, falls die Existenz dieser Erkrankung dem Kliniker nicht, wie in unserem Fall, von vorneherein unbekannt ist.

Geophagie wird offenbar in unterschiedlichsten Kulturen zum Teil bis heute praktiziert. Von der hohen Prävalenz geophager Praktiken in Südafrika konnten wir uns selbst überzeugen. Über historische Aspekte von Pica ist einiges bekannt (21), es gibt jedoch ebenso faszinierende Berichte über Geophagie in der Literatur des Altertums. So berichtet schon Hippokrates von Geophagie bei Schwangeren (22). Auch der römische Mediziner Celsus beschreibt die Erkrankung in „De medicina“. Dort heißt es:

Quibus diu color sine morbo regio malus est, ii vel capitis doloribus conflictantur, vel terram edunt. (23) [übersetzt etwa: Patienten ohne Ikterus, deren Hautfarbe schlecht ist, leiden unter Kopfschmerzen oder essen Erde.]

Es erscheint bemerkenswert, daß schon dort der Zusammenhang zwischen Geophagie und Anämie hergestellt wird. Aber auch in klassischen arabischen, persischen, indischen und chinesischen Quellen soll Geophagie erwähnt sein (24). Die Werke der Entdeckungsreisenden sowie die Kolonialliteratur enthält zahllose Schilderungen von „Erdessern“ in Kulturen aller Kontinente. So berichtet Alexander von Humboldt von Geophagie ausgelöst durch Hunger bei Ureinwohnern am Orinokko (25). Auch andere Berichte weisen auf Hunger und Not als zumindest eine Wurzel geophager Praktiken. So hat es offenbar während des Dreißigjährigen Krieges in Deutschland während schwerer Hungersnöte epidemieartige Ausbrüche von Geophagie gegeben (26). Es erscheint bemerkenswert, daß bis zum Beginn dieses Jahrhunderts verarmte Bergleute in Österreich und Süddeutschland fetthaltige Erden, sogenannten „Bergtal“, als Butterersatz verwendet haben sollen (27). In der Gegenwart wird über Geophagie vor allem aus den Südstaaten der USA berichtet, wo geophage Praktiken offenbar eine lange Tradition unter

der farbigen Bevölkerung haben. So berichtet der aus Italien stammende Cessare Bressa im achtzehnten Jahrhundert eindrucksvoll von der hohen Prävalenz und den gesundheitlichen Folgen von Geophagie in Louisiana (28). Es wird berichtet, daß die farbige Bevölkerung selbst nach Umzug in den Norden oder an die Westküste der USA geophage Praktiken beibehält, ja sich sogar die bevorzugte Erdsorte nachsenden läßt (29, 30). Über die Bedeutung dieser Schilderungen kann spekuliert werden. So erscheint doch bemerkenswert, daß geophage Praktiken über Jahrtausende hinweg und in so unterschiedlichen Kulturen Erwähnung findet. Könnte Geophagie ein uralter Reaktionsmechanismus auf Hunger sein? Es ist sogar postuliert worden, daß bestimmte Erden Kohlenhydrate, Proteine und Fette enthalten, ihr Verzehr mithin tatsächlich der Ernährung dienen kann. Es erscheint also durchaus vorstellbar, daß geophages Verhalten teleonomisch sinnvoll sein, also mit evolutionärem Vorteil einhergehen könnte. Man könnte annehmen, daß Anämie, heute viel häufiger als Hunger, mit Geophagie assoziiert, dieses Verhalten als eine Art atavistische Reaktion wieder in Gang setzt. Stämme Afrikas könnten dieses Verhalten anlässlich häufig wiederkehrender Hungersnöte in ihr kulturelles Repertoire aufgenommen haben. So ließe sich erklären, daß bis heute Menschen dunkler Hautfarbe etwa in Afrika in typischer Weise auch ohne Hungersnöte geophage Praktiken als Teil ihrer Kultur praktizieren. Insgesamt jedoch bleibt Geophagie, eine bemerkenswerte und auch heute nicht seltene Erkrankung, trotz aller Erklärungsansätze bis heute weitgehend unverstanden. Schließlich sei erwähnt, daß diese bizarre Spielart menschlichen Verhaltens auch in der Belletristik der Gegenwart Erwähnung findet, nicht zuletzt bei Gabriel García Márquez:

„Nun steckte sie [Rebecca, die Verf.] sich Händevoll Erde in die Taschen und aß sie krumenweise, ohne gesehen zu werden, mit einer wirren Empfindung von Glück und Wut...“ (31)

### Danksagung

Wir danken Prof. Roger Saadia und Prof. G. Dekker (Department of Surgery, Chris Hani Baragwanath Hospital, University of the Witwatersrand, Johannesburg, Südafrika) für uneingeschränkte Förderung und fruchtbare Diskussionen über das Thema. Ferner stehen wir in der Schuld von Dr. Blumssohn (Consultant emeritus, Department of Medicine, Chris Hani Baragwanath Hospital), der sich als erster von unserem Interesse an Geophagie begeistern ließ. Dank gebührt ferner Herrn Professor Dr. P. Voswinkel (Institut für Medizin- und Wissenschaftsgeschichte der Universität Lübeck) für Hilfe bei der Beschaffung historischer Quellen. Schließlich danken wir Dr.-Ing. C. Lehnert, Geologe in Lübeck, sowie Dr. rer. nat. Stein, Chemisches Labor

Lübeck, für die Untersuchung der mitgebrachten Ge-  
steinsproben sowie dem Personal der Bibliothek der  
University of the Witwatersrand, Johannesburg, Südaf-  
rika, für beeindruckenden Service unter wahrhaft er-  
schweren Bedingungen.

## Literatur

1. Woywodt A., Fernandes S., Kiss A.: Cachexia africana. Surgery (zur Veröffentlichung eingereicht)
2. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4th ed. . American Psychiatric Association, Washington D.C.: 95 (1994)
3. McLoughlin, I.J.: The picas. Br J Hosp Med 37: 286-290 (1987)
4. Sayetta, R.B.: Pica: An Overview. Am Fam Phys 33: 181-185 (1987)
5. Mokhobo, K.P.: Iron deficiency anaemia and pica. S Afr Med J 70: 473-475 (1986)
6. Moore, D.F., Sears, D.A.: Pica, Iron Deficiency, and the Medical History. Am J Med 97: 390-393 (1994)
7. Edwards, C.H., Johnson, A.A., Knight, E.M., Oyemade, U.J., Cole, O.J., Westney, O.E., Jones, S., Laryea, H., Westney, L.S.: Pica in an Urban Environment. J Nutr 124: 954S-962S (1994)
8. Johnsen, B.E.: Resistant Hypertension due to pica (baking soda). Lancet i: 550-551 (1989)
9. Gonzalez, J.J., Owens, W., Ungaro, P.C.: Clay ingestion: a rare cause of hypokalemia. Ann Intern Med 97: 65-66 (1982)
10. Anderson, J.E., Akmal, M., Kittur, D.S.: Surgical Complications of Pica: Report of a Case of Intestinal Obstruction and a Review of the Literature. Am Surg 57: 663-667 (1991)
11. Decker, C.J.: Pica in the Mentally Handicapped: a 15-Year Surgical Perspective. Can J Surg 36: 551-554
12. Graham, P.W.: Stercoraceous Perforation of the pelvic colon - an unusual complication of pica. Med J Aust 2: 385-386 (1976)
13. Jancar, J., Speller C.J.: Fatal intestinal obstruction in the mentally handicapped. J Intellect Disab Res 38: 413-422 (1994)
14. Maravilla, A.M., Berk, R.N.: The Radiographic Diagnosis of Pica. Am J Gastroenterol 70: 94-99 (1978)
15. Hawass, N.E.D., Alnozha, M.M., Kolawole, T.: Adult geophagia - report of three cases with review of the literature. Trop Geogr Med 39: 191-195 (1987)
16. O'Rourke, D.E., Quinn, J.G., Nicholson, J.O., Gibson, H.H.: Geophagia During Pregnancy. Obstet Gynecol 29: 581-584 (1967)
17. Sayers, G., Lipschitz, D.A., Sayers, M., Seftel, H.C., Bothwell, T.H., Charlton, R.W.: Relationship between Pica and Iron Nutrition in Johannesburg Black Adults. S Afr Med J 68: 1655-1660 (1974)
18. Delaitre, B., Lemaigre, G, Acar, J.F., Atsamena, M., Bouhroum, A.: Enterité nécrisante et geophagie. Nouv Presse Méd 5: 1743-1756 (1976)
19. Key, T.C., Horger, E.O., Miller, J.M.: Geophagia as a cause of maternal death. Obstet Gynecol 60: 525 (1982)
20. Rake, B.: A Fatal case of earth-eating. Brit Med J i: 994-995 (1884)

21. Parry-Jones, B., Parry-Jones, W.L.: Pica: Symptom or Eating Disorder? A Historical Assessment. Br J Psych 160: 341-354 (1992)
22. Hippocrates. Oevres Completes d' Hippocrate. Übersetzt ins Französische von Littre, E.. Paris, Balliere, Bd. 8: S. 487 (1839-1861)
23. Celsus: De Medicina. Übersetzung von Spencer, W.G.. Cambridge/Massachusetts, Harvard University Press, S. 116-117 (1971)
24. Reimann, F., Koptagel, G.: Geophagia in Iron deficiency disease. New Istanbul Contrib Clin Sci 13: 63-79 (1980)
25. von Humboldt, A.: Vom Orinoko zum Amazonas. Wiesbaden, F.A.Brockhaus, S. 340 (1985)
26. Ströse, K. : Mitteilung über das Diatomeenlager bei Klieken in Anhalt. In: Suhle, H.: IX. Jahresbericht des Friedrichs-Realgymnasiums und der Vorschule des Fridericianum für das Schuljahr 1890-1891. Dessau, L. Reiter Herzogl. Hofbuchdrucker (1891)
27. Buschan, G.: Vom Erde-Essen. Janus 34: 337-350 (1930)
28. Mustacchi, P.: Cesare Bressa (1785-1836) on dirt-eating in Louisiana. A critical analysis of his unpublished manuscript De La Dissolution Scorbutique. JAMA 218: 229-232 (1971)
29. Vermeer, D.E.: Geophagia in rural Mississippi: Environmental and cultural contexts and nutritional implications. Am J Clin Nutr 32: 2129-2135 (1979)
30. Roselle, H.A.: Association of laundry starch and clay ingestion with anemia in New York City. Arch Intern Med 125: 57-61 (1970)
31. Márquez GG: Hundert Jahre Einsamkeit. München, dtv, S. 77 (1984)

## K. JEPSEN & CO.

### 1-Fam-Häuser Nähe MUL

Grdst 790 m<sup>2</sup>,  
Bj 1970, 145 m<sup>2</sup> Wfl,  
DM 550.000,-

Exklusives Reetdach-  
haus 360 m<sup>2</sup> Wfl f. 1-2  
Fam. in Rondeshagen

Grdst 1.300 m<sup>2</sup>,  
Bj 1972, 240 m<sup>2</sup> Wfl,  
DM 1,2 Mio.

Grdst 4.000 m<sup>2</sup>,  
Bj 1991, 470 m<sup>2</sup> Wfl,  
DM 1,95 Mio.



IMMOBILIEN · LÜBECK  
TRAVEMÜNDER ALLEE 16  
TELEFON 04 51/3 11 17

## Die Zukunft der Universitätsmedizin\*

H.-U. Erichsen

Magnifizenz,  
verehrte Festversammlung!

Zunächst darf ich mich für die Einladung, heute hier den Festvortrag zu halten, herzlich bedanken. Ich bin ihr gerne gefolgt und in die Stadt gekommen, die mir in Untersekunda durch Thomas Mann, ihren großen Sohn, bekannt und vertraut gemacht wurde. Auch wenn das Lübeck von heute mit dem der Buddenbrooks nicht gar zu viel mehr gemeinsam haben mag, Namen wie Mengstraße oder Becker- und Fischergrube klingen einem Thomas Mann Verehrer gut in den Ohren und wecken Assoziationen, wecken Erinnerungen etwa an den Konsul Jean Buddenbrook, den ein nüchterner kaufmännischer Blick und jenes gesunde Augenmaß auszeichnete, welches mir fehlte, als ich als Thema für den heutigen Festvortrag wählte: „Die Zukunft der Universitätsmedizin“. Ich werde in der Kürze der mir zu Verfügung stehenden Zeit nur einige Aspekte des Themas und diese auch nur thesenartig behandeln können.

Schon vor mehr als 10 Jahren als Rektor der Westfälischen Wilhelms-Universität und dann später als Präsident der Hochschulrektorenkonferenz habe ich es als Defizit empfunden, daß sich die Hochschulrektorenkonferenz in der Vergangenheit nur selten zu Problemen und Entwicklungen der Hochschulmedizin geäußert hat. Solange indes Medizin Bestandteil des wissenschaftlichen Spektrums der Universität in Deutschland ist, hat die Rektorenkonferenz die Legitimation und Aufgabe zugleich, sich zu Fragen der Hochschulmedizin zu äußern. Das Plenum der HRK hat deshalb meiner Bitte entsprochen, eine Arbeitsgruppe Hochschulmedizin einzusetzen, die sich zunächst Fragen der Organisation der Hochschulmedizin, der Disziplinarität und Transdisziplinarität der Medizin auch im Hinblick auf den wissenschaftlichen Nachwuchs und die Einbeziehung von Naturwissenschaftlerinnen und Naturwissenschaftlern in die Forschung zu medizinischen Zwecken sowie der Gestaltung des Medizinstudiums widmet.

\* Festvortrag, gehalten bei der Promotionsfeier der Medizinischen Universität zu Lübeck am 30. 01. 1998 von Prof. Dr. Hans-Uwe Erichsen, Münster. Professor Erichsen war von 1990 bis 1997 Präsident der Hochschulkonferenz (HRK) und ist seit 1996 Präsident der europäischen Vereinigung der Rektorenkonferenzen, CRE (Confédération des Conférences de Recteurs de l'Union Européenne)

Meine Ausführungen in der folgenden guten halben Stunde werden Fragen aus diesen Problembereichen aufgreifen.

### II.

Als Rektor der Westfälischen Wilhelms-Universität stieß ich immer wieder darauf, daß in der Medizin der WWU besondere Befunde im Bereich von Forschung, Lehre, Studium und Selbstverwaltung vorlagen oder jedenfalls behauptet wurden und daß im Zusammenhang damit – aber auch unabhängig davon – Ansprüche auf Sonderbehandlung im Verhältnis zu den anderen Fakultäten der Universität erhoben wurden. Für mich stellte sich damals die Frage, ob die Medizin Teil der Universität bleiben oder sich selbst überlassen werden sollte. Das Ergebnis vieler Gespräche war, daß die medizinische Fakultät und das ihr zugeordnete Universitätsklinikum auch weiter Teil der WWU bleiben wollte und sollte, allerdings unter der von mir als unverzichtbar angesehenen Voraussetzung einer der weitgehenden Adaption der für die Universität im übrigen geltenden Regelungen.

Daß eben diese Frage bis heute nicht zur Ruhe gekommen ist, vielmehr allgemein gestellt wird, liegt nicht nur aber auch daran, daß es bei der Organisation von Forschung einerseits, Lehre und Studium andererseits sowie der Krankenversorgung um die Ermöglichung und Förderung von Prozessen geht, die durch ständig neue Herausforderungen gekennzeichnet sind. Die Optimierung dieser Prozesse, ihrer Zuordnung zueinander und Trennung voneinander ist eine ständige Aufgabe für die Aufbau- und Ablauforganisation, für die Personalbemessung und Sachmittelverteilung. Es gibt Anzeichen dafür, daß diese Optimierung gegenwärtig nicht durchweg überzeugend gelingt. Lassen Sie mich das mit wenigen Hinweisen deutlich machen:

### III.

Das Ungenügen klinischer Forschung in Deutschland wird schon seit längerer Zeit – aus meiner Sicht vielfach mit Recht – beklagt. Der Wissenschaftsrat hat mehrfach Defizite der klinischen Forschung in Deutschland festgestellt. Ausgehend von der Überzeugung, „daß der Leistungsstand der klinischen Forschung in der Bundesrepublik Deutschland trotz der

zahlreichen Vorschläge und Bemühungen zu seiner Verbesserung – und unbeschadet mancher hervorragender Einzelergebnisse – insgesamt unbefriedigend ist“, heißt es in seinen Empfehlungen zur klinischen Forschung aus dem Jahr 1986:

„Die derzeitige Organisationsstruktur der Hochschulkliniken ist überwiegend an Gesichtspunkten der Krankenversorgung und des traditionellen Fächerkanons orientiert und trägt den Belangen der klinischen Forschung unzureichend Rechnung. Der Wissenschaftsrat sieht darin Gefahren nicht nur für die klinische Forschung und die Förderung des ärztlich-wissenschaftlichen Nachwuchses, sondern auch für die Aus- und Weiterbildung der Ärzte und für die angemessene Versorgung der Patienten der Hochschulkliniken.“

Nun werden Sie einwenden, daß dies vor gut zehn Jahren geäußert wurde, aber der Wissenschaftsrat hat diese Einschätzung bis heute trotz vielfacher Möglichkeiten dazu nicht korrigiert. Er hat vielmehr in seiner Stellungnahme zum Programm „Klinische Forschergruppen in Hochschulen“ v. Juni 1994 vermehrte Anstrengungen von Bund, Ländern und Universitäten gefordert. Das Ungenügen der klinischen Forschung gehört zu den Kontinua der häufig eher desolaten Wissenschaftsberichterstattung überregionaler und regionaler Tageszeitungen und – allerdings eher gelegentlich – zu den Themen der Jahrestagungen medizinischer Fachgesellschaften.

Das u. a. Anregungen des Wissenschaftsrats aufnehmende Programm der Bundesregierung „Gesundheitsforschung 2000“ läßt in der Zieldefinition zugleich die bestehenden Mängel deutlich werden. Es heißt dort: Das auf Aufbau- und Strukturförderung für klinische Forschung und Gesundheitswissenschaft gerichtete Programm soll „helfen, neue Akzente in Hochschulen und außeruniversitären Einrichtungen zu setzen, vorhandene Arbeitsgruppen zu vernetzen und innovative Organisationsformen zu entwickeln“. „Die themenübergreifenden Strukturmodelle des Programms zielen ... insbesondere auf strukturelle Verbesserung für die klinische Forschung in den Hochschulen.“

#### IV.

Symptomatisch für das Ungenügen gegenwärtiger Organisation ist die gegenwärtig – auch in Schleswig-Holstein – wechselseitig geführte Klage über die zweckwidrige Nutzung der in die Universitätsmedizin fließenden Mittel. So klagen die Träger der Krankenversicherung darüber, daß die von ihnen bereitgestellten Mittel für die Krankenversorgung in der wenig überschaubaren Organisation der Hochschulkliniken für Zwecke verwandt wurden, die sachfremd seien,

und sie meinen damit Forschung und Lehre. Die Sachverwalter der den Hochschulen zufließenden staatlichen Mittel beklagen demgegenüber, daß die den Hochschulen für Forschung und Lehre zugewandten Mittel in den Bereich der Krankenversorgung diffundieren.

Die damit angesprochene Problematik hat sich dadurch verschärft, daß der Anteil der außerordentlichen kostenintensiven Hochleistungsmedizin der den Universitätsklinika überbürdet wird, ständig steigt, ohne daß dieser Belastungsverlagerung durch besondere, auf angemessenen Kostenersatz gerichtete Regelungen Rechnung getragen wird. Die dadurch verursachte, durch strengere Maßstäbe der Wirtschaftsführung verstärkte personalwirtschaftliche und budgetäre Sogwirkung läßt – wie auch in Schleswig-Holstein im Hinblick auf die Universitätskliniken in Kiel und Lübeck – die Frage nach Gegenmaßnahmen unter Einschluß der Verselbständigung der Universitätskliniken aufkommen.

#### V.

Nicht nur im Bereich der Forschung und der Krankenversicherung gibt es Indikatoren einer suboptimalen Befindlichkeit. Gleiches gilt für Lehre und Studium. Aussagekräftig ist, daß gegenwärtig ein Entwurf einer neuen Approbationsordnung für Ärzte vorliegt, der im Grunde genommen die 8. Änderung der aus dem Jahre 1970 stammenden Approbationsordnung darstellt. Weiter sind jedenfalls für denjenigen, dessen Verständnis vom Universitätsstudium auch durch die Prüfungskultur bestimmt ist, multiple choice Fragen, wie wir sie im schriftlichen Teil der Ärztlichen Vorprüfung und im 1. und 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ausschließlich finden, schwer verdaulich. Schließlich kommt der Wissenschaftsrat in seinen Leitlinien zur Reform des Medizinstudiums v. 09.07.1992 zu dem Schluß, „daß trotz zahlreicher Bemühungen engagierter Hochschullehrer und einzelner Fakultäten die Medizinische Ausbildung nicht mehr in der Lage ist, den Wandel der wissenschaftlichen, technischen und gesellschaftlichen Verhältnisse sowie der vielfältigen Erwartungen an den Arzt adäquat in das Studium zu integrieren“.

#### VI.

Auf die Frage, ob die Medizin ganz oder teilweise, d. h. nur die Universitätskliniken, aus den Universitäten ausgegliedert werden sollte, sind durchaus unterschiedliche Antworten denkbar. Ich kann Ihnen hier nur einige anreißen. Vor dem Hintergrund des Bestehens der Medizinischen Universitäten Hannover und Lübeck, aber auch der von der Max-Planck-Gesellschaft getragenen Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen in Bad Nauheim kann man sich die

Ausgliederung der Medizin aus der traditionellen Universität und ihre Verselbständigung nicht nur vorstellen.

Denkbar ist auch vor dem Hintergrund des sog. Bochumer Modells die vollständige Auslagerung der Krankenversorgung und der Ausbildung am Krankenbett sowie des klinischen Teils der Forschung an kommunal, kirchlich oder von Privaten getragene Krankenhäuser, die dann neben der Grundversorgung auch die Maximalversorgung zu übernehmen haben, und zugleich über ein Netzwerk von Verträgen für die Klinische Lehre und Forschung verantwortlich sind.

Denkbar ist eine nicht ganz so weitgehende Lösung durch rechtliche Verselbständigung der Universitätskliniken und deren Einbindung in ein auf Forschung, Lehre und Studium in der Universität gerichtetes Funktionsnetzwerk mit Hilfe vertraglicher Regelungen und Elementen der Personalunion. Darauf zielt der in Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg bereits zum Gesetz geronnene, in Schleswig-Holstein in der Form eines Referentenentwurfs vorliegende politische Wille.

Denkbar ist weiter eine weitgehende Verselbständigung der Wirtschaftsführung der Krankenversorgung in den auch weiterhin organisatorisch zur Universität gehörenden Kliniken. Auch diese etwa die Auffassung des Wissenschaftsrats bestimmende Sicht hat kehrseitig die Abtrennung und Verselbständigung des Budgets für Forschung, Lehre und Studium zur Folge.

In jedem Fall wird man ausgehend von der durch die Krankversorgung bestimmten Anwendungsorientierung von Forschung, Lehre und Studium - ebenso wie bei den Juristen - die Frage zu beantworten haben, ob es sich um ein Funktionsprofil mit Universitätszuschnitt handelt, ob es hier nicht zumindest teilweise um einen Befund geht, der den Kriterien universitärer Forschung, Lehre und Studium kaum oder nicht entspricht sondern eher dem Fachhochschulprofil zuzuordnen ist.

## VII.

Soweit zur Analyse und nun zur Remedur:

Was sicher nicht ernsthaft in Betracht kommt, ist, daß alles so bleibt, wie es ist. Damit sind wir bei den Gründen, bei den Kriterien angekommen, die bei der Beantwortung der aufgeworfenen Fragen und damit im Rahmen der anstehenden Richtungsentscheidungen erheblich sind.

Standes- und Status- sowie Einkommensgesichtspunkte können insoweit schwerlich besonderes Gewicht beanspruchen. Von wesentlicher Bedeutung im Hinblick auf die Beantwortung der gestellten Fragen ist hingegen, ob auch im Hinblick auf die Medizin an der Einheit von Forschung und Lehre in institutioneller und - zumindest im Grundsatz - auch in personeller Hinsicht festgehalten werden soll und ob der Verbund

von Forschung und Lehre mit der Krankenversorgung ein notwendiger ist.

Ziel von Lehre und Studium an den Hochschulen ist es, den Absolventen oder die Absolventen berufsfähig zu machen. Es gehört zu den Essentialia des ärztlichen Berufs, sich Menschen diagnostisch und therapeutisch zuzuwenden. Hierfür müssen die Grundlagen im Studium gelegt werden. Dies geschieht durch Unterricht und Experiment im nicht klinischen Bereich der Medizin und der Naturwissenschaften sowie durch bedside-teaching und exemplarischen sich im Verlauf des Studiums an Intensität und Häufigkeit steigernden Patientenkontakt. Hierzu gibt es keine Alternative, zumal dann nicht, wenn man vermeiden möchte, daß die durch die Auswahlkriterien für die Zulassung zum Studium der Medizin beförderte intellektuelle und theoretische Ausrichtung nicht noch durch Graphiken, Bilder und Computersimulationen gefördert wird.

Auch wenn - wie der Wissenschaftsrat schon 1982 festgestellt hat - die Erwartung aufgegeben werden muß, daß am Ende des Medizinstudiums der berufsfertige Arzt steht, und wie immer auch das Medizinstudium gestaltet wird, die Einbeziehung des Patientenkontakts, die Herstellung „klinischer Bezüge“ ist in Lehre und Studium der Medizin unverzichtbar.

Insoweit spricht allerdings manches dafür, entsprechend einem Vorschlag des Wissenschaftsrates abweichend vom heute dominierenden Konzept zu einer Gestaltung von Lehre und Studium zu kommen, die organ- bzw. organsystembezogen, Vorklinik, Naturwissenschaften und Klinik strukturell und exemplarisch integriert. Insoweit ist der am 17.12.1997 von der Bundesregierung gebilligte Entwurf einer Approbationsordnung für Ärzte ein Schritt in die richtige Richtung, wenn es dort in der allgemeinen Begründung heißt, daß eine kontinuierliche Integration klinischer und theoretischer Inhalte über das gesamte Studium erfolgen muß und daß es zur frühest möglichen Einbeziehung von klinischen Inhalten und zu einer fortlaufenden Verknüpfung von theoretischem und klinischem Unterricht während des gesamten Studiums kommen muß. Wenn die neue Approbationsordnung darauf zielt, daß der Unterricht sich nicht mehr an den einzelnen Fachgebieten, sondern fächerübergreifend am Lehrgegenstand i. S. von Organ- oder Organsystem ausrichten soll, ist dem beizupflichten.

## VIII.

Was das Verhältnis von Forschung und Lehre betrifft, so wird dieses wesentlich durch die Befindlichkeit und Qualität von Forschung bestimmt. Wenn Forschung, sei es wegen fehlender finanzieller und/oder zeitlicher Ressourcen, sei es wegen fehlenden Interesses und Engagement nicht stattfindet, dann verwirklicht sich

die Einheit von Forschung und Lehre weder institutionell noch personell.

Angesicht der immer wieder zu vernehmenden Klage, daß insbesondere die zeitlichen Ressourcen weitgehend durch die Krankenversorgung verbraucht werden und Forschung deshalb als „Feierabendbeschäftigung“ betrieben werden müsse, stellt sich die Frage, ob die Krankenversorgung für die medizinische Forschung unverzichtbar ist.

Wenn man medizinisch hier nicht zur Kennzeichnung einer Disziplin gebraucht, sondern zur Kennzeichnung des Ziels der Forschung, dann gehört auch die naturwissenschaftliche und – wie hier in Lübeck – auch ingenieurwissenschaftliche Forschung dazu.

Für die Forschung zu medizinischen Zwecken – mit dieser Formulierung ist die Dominanz der Medizin bereits relativiert – spielt zunächst einmal die Krankenversorgung als Problem- und Datenlieferant eine wesentliche und unverzichtbare Rolle, ohne daß dies notwendig eine institutionelle und personelle Verschränkung von Forschung und Krankenversorgung fordert. Andererseits hat gerade die Einbeziehung der naturwissenschaftlichen Forschung, etwa der Molekular- und Zellbiologie, in der letzten Zeit wesentlichen Erkenntnis- und Entdeckungsfortschritt in der – anwendungsorientierten – medizinischen Grundlagenforschung gebracht.

Die naturwissenschaftliche Analyse und das naturwissenschaftliche Experiment als solche sind schwerlich auf die Krankenversorgung angewiesen. Dies ändert sich indes, wenn es um Antworten auf die Frage der Wirkungsansätze und -folgen im Makrokosmos des menschlichen Organismus geht. Hier kommt die Klinik, d. h. die Krankenversorgung nicht nur als Daten- und Problemlieferant in den Blick, hier gewinnt sie Bedeutung für die Anwendung und Evaluation, was institutionelle und individuelle Verschränkung von Forschung und Krankenversorgung und personelle Kooperation erfordert.

## IX.

Wenn Erkenntnis- und Entdeckungsfortschritt heute im wesentlichen an Schnittstellen der bisherigen Disziplinen und damit als Ergebnis transdisziplinären Bemühens und transdisziplinärer Kooperation auftreten, so liegt die Folgerung nahe, auch die anwendungsorientierte Grundlagenforschung zu medizinischen Zwecken in besonderer Weise zu organisieren. Die HRK hat aus der Einsicht in die Notwendigkeit von Spitzenforschung disziplinären und transdisziplinären Zuschnitts 1993 die Forderung abgeleitet, sog. Forschungskollegs zu etablieren. Dabei handelt es sich um von der Universität oder einem Hochschulverbund getragene Einrichtungen, die für einen begrenzten Zeit-

raum institutionell, ggf. Fächer- und Fachbereichsgrenzen überschreitend, auch haushaltsmäßig verselbstständigt werden und damit über eine verlässliche Infrastruktur verfügen. Es geht um eine Kombination von Wissenschafts- und Graduiertenkolleg, es geht um die Errichtung von centers of excellence in den Universitäten und damit um die Stärkung des innovativen Klimas in ihnen. Die im Programm „Gesundheitsforschung 2000“ der Bundesregierung vorgesehenen interdisziplinären Zentren für Klinische Forschung stellen eine teilweise Umsetzung dieses Konzepts dar, und die DFG hat jüngst dieses Konzept für den Bereich der Kulturwissenschaften aufgegriffen und für förderungsfähig erklärt.

Ziel der Forschungskollegs ist es, durch organisatorische Vorkehrungen die kritische Masse für Hochleistungsforschung – in unserem Fall zu medizinischen Zwecken – und Lehre in der Universität zusammenzubringen, und damit einerseits im global ausgerichteten Wettbewerb zu bestehen und andererseits in die Universität hinein Maßstäbe zu setzen, Anreize zu schaffen, Wettbewerb um das Dabeisein und um Ergebnisse entstehen zu lassen. Das Forschungskolleg oder Zentrum soll also der Pfahl im Fleisch universitären Gleichmaßes, es soll Wegbereiter und Antriebsmotor hochqualifizierter Forschungs- und Lehrprofile sein.

Diese Forschungskollegs bzw. Zentren lassen sich nur schwer in die gegenwärtigen Organisationsstrukturen der Universitäten einpassen, liegen sie doch gewissermaßen quer zu den traditionellen Fakultäten, sollen sie doch zeitlich begrenzt sein und sind damit labil. Sie sind andererseits in der Lage, Grundlagenforschung zu medizinischen Zwecken disziplinübergreifend zu organisieren. Wenn ihnen das Promotions- und Habilitationsrecht zugestanden wird und wenn die Vertreter der vorklinischen und klinischen Medizin sowie der Natur-, ggf. auch der Technikwissenschaften gleichberechtigt in gemeinsamer Verantwortung im Rahmen eines solchen Forschungskollegs oder Zentrums dessen Aufgaben wahrnehmen, läßt sich auch das Karriereproblem für die beteiligten Natur- und Technikwissenschaftler und -wissenschaftlerinnen lösen.

## X.

Lassen Sie mich noch einmal auf die Frage der Ausgliederung und Verselbständigung der Medizin aus der Universität zurückkommen. Nach den vorgetragenen notwendig fragmentarischen Überlegungen spricht vieles dafür, die Medizin als Teil einer multidisziplinären und potentiell transdisziplinären Institution zu erhalten. Es ist aber unabdingbar, zu einer Trennung der Budgets für Forschung und Lehre unter Einbeziehung der für sie notwendigen Elemente der Kran-

kenversorgung einerseits und der Krankenversorgung im übrigen andererseits zu kommen.

Daß dies notwendig über eine Vernetzung des Klinikums geschehen muß, die dann zur Gewährleistung des Funktionszusammenhangs von Fakultät bzw. Zentren und Klinikum beträchtlich relativiert werden muß, überzeugt mich nicht. Auch wenn man mit dem alten Johann Buddenbrook, „einem aufgeklärten Mann“ – wie Thomas Mann sagt – nicht alles für verurteilungswürdig hält, was von außerhalb der Tore seiner giebelförmigen Vaterstadt kommt, so fällt es doch schwer, in dem vorliegenden Kieler Referentenentwurf eines Gesetzes zur Neuordnung der Universitätsklinik ein sachgemäßes Beitrag zur Lösung der Probleme zu sehen. Vergewöhnt man sich an die Zusammenfassung, Funktion und Zuordnung von Organen des Klinikums und die im Verhältnis der Fachbereiche zum Klinikum und seinen Abteilungen geplante Verteilung der Einfluß- und Steuerungsmöglichkeiten, dann ist eher eine Verschlechterung als eine Verbesserung des gegenwärtigen Zustands zu erwarten.

Zu prüfen bleibt, ob sich – wie dies in einigen Universitäten (Gießen) erprobt wird – mit Hilfe einer die Eigenarten von Forschung, Lehre und Krankenversorgung aufnehmenden Kostenrechnung die Probleme getrennter Budgetierung und notwendiger Transparenz lösen lassen. Daß „sich die Grenzen mit Leichtigkeit und Sicherheit“ bestimmen lassen, „wenn man nur von dem Grund ausgeht“, wie Wilhelm v. Humboldt im Hinblick auf die Organisation des Medizinalwesens formuliert hat, erscheint mir zweifelhaft, ein hoffnungsloses Unterfangen dürfte es indes kaum sein.

## XI.

Die Medizin hat allerdings als Teil der Universität oder der Universitätslandschaft nur dann eine Zukunft, wenn sie sich auch den Herausforderungen stellt, die die Universität als Ganzes treffen. Auf der Jahresversammlung der HRK 1994 in Halle, die unter dem Titel „Hochschulen im Wettbewerb“ stand, ist mit Recht darauf hingewiesen worden, daß die staatliche Finanzierung der Hochschulen in Deutschland heute keine Selbstverständlichkeit mehr ist.

Der sich in dieser Situation ergebende Wettbewerb mit anderen Politikbereichen um die Verteilung der staatlichen Haushaltsmittel hat dazu geführt, daß die früher zugunsten der Universitäten bestehende Leistungsvermutung heute nicht mehr oder kaum noch gilt. Dies hat einen wachsenden Rechtfertigungsdruck auf die Hochschulen zur Folge, der dazu führt, daß sie stärker als in der Vergangenheit und auch öffentlich bereit sein müssen, über die Notwendigkeit des Umfangs und über den Einsatz der ihnen zugewandten Mittel Rechenschaft abzulegen.

Die Hochschulen werden im Verteilungskampf nur dann mit Aussicht auf Erfolg bestehen können, wenn sie Staat und Gesellschaft von der Notwendigkeit und Qualität ihrer Leistungen in Forschung, Lehre und Studium und schließlich von der optimalen Verwendung der ihnen zugewandten Mittel überzeugen. Die Hochschulen werden das Ungenügen der Wahrnehmung staatlicher Finanzverantwortung mit umso mehr Resonanz in der Öffentlichkeit rügen können, wenn sie darauf verweisen können, daß sie ihrerseits alle Mittel der Effektivitäts- und Effizienzsteigerung ausgeschöpft haben. Das Mittel dazu ist der Wettbewerb in Forschung und Lehre. Er ist dann effektivitäts- und effizienzsteigernd und damit profilbildend, wenn das Unterliegen im Wettbewerb Folgen hat. Um sie entstehen zu lassen, brauchen wir – wie das etwa in Tübingen in der Medizin schon seit längerem geschieht und künftig auch im Hochschulrahmengesetz vorgesehen sein wird – eine Zuweisung von Personal- und Sachmitteln und Räumen nach Maßgabe der Qualität der erbrachten Leistungen und projektierten Vorhaben in Forschung und Lehre, brauchen wir die zeitlich begrenzte Zuweisung der Ausstattung und die zeitlich begrenzte Übertragung von Zuständigkeit, Befugnis und Verantwortung, wie sie etwa im Konzept der Zentren angelegt ist.

Manches von diesen Grundsätzen ist in der Krankenversorgung bereits verwirklicht, manches – etwa eine nachfrageorientierte Flexibilität der Zuordnung der Krankenhausbetten – ist unerledigt.

## XII.

Die Universitäten werden nur dann weiterhin den Anspruch erheben können, Oberzentren der Wissenschaftslandschaft zu sein, wenn in ihnen hochkarätige Grundlagenforschung und damit verbunden Ausbildung des wissenschaftlichen Nachwuchses sowie eine wissenschaftsgeprägte Lehre und Studium stattfinden. Das gilt auch für den Bereich der Medizin, sei sie Teil einer Universität im herkömmlichen Sinne oder – wie hier in Lübeck – prägender Bestandteil der Institution. Ich kann insoweit Bezug nehmen auf W. v. Humboldt, der dreierlei Arten medizinischer Bildungsanstalten unterschied. Unter ihnen „1. Die Universitäten, also theoretisch-wissenschaftlichen Unterricht in Verbindung mit dem ganzen Gebiet der Wissenschaft und mit soviel praktischer Einleitung als zum Übergang aus der Theorie in die Praxis und zur Verbindung beider nötig ist“ (aaO. S. 62).

## XIII.

Ein wettbewerblich ausgestattetes Hochschulwesen wird zu einer Hochschullandschaft führen, die durch Individualität und Profil der einzelnen Fakultäten und Fachbereiche und damit auch der Hochschulen bestimmt ist. Es gilt Abschied zu nehmen von der über

viele Jahre hinweg aufrecht erhaltenen Fiktion, daß alle Universitäten bzw. Fachhochschulen in Deutschland in all ihren Fakultäten und Fachbereichen von gleicher Qualität seien. Die Notwendigkeit, sich in einem sich zunehmend verschärfenden und international ausgerichteten Wettbewerb durch Spitzenleistung zu behaupten, muß zur Konzentration auf die Stärken und damit ggf. zur Stilllegung oder Schließung der Schwachstellen führen. Es gilt eine „Kultur der Schließung“ zu entwickeln und Abschied zu nehmen vom Konzept der Universalität der Wissenschaft in einer Universität, vom Konzept der vollständigen Universität, welches ja in Deutschland ohnehin nur in ganz

wenigen Fällen Realität geworden ist. Die Zukunft gehört der unvollständigen Universität.

Das heißt zugleich, daß neben die Kultur der Schließung von Einrichtungen und Studiengängen eine Kultur der Kooperation im lokalen und regionalen Verbund treten muß. Es muß in jedem Fall Sorge für das Überleben der Universalität der Wissenschaft im Gesamtsystem getragen werden. Es muß andererseits aber auch Freiraum für die Entwicklung eigenständigen Profils und einer dazu passenden Organisation gefunden werden. Auch insoweit ist der Kieler Referentenentwurf eines Gesetzes zur Neuordnung der Universitätsklinika nicht unbedingt ein Schritt in die richtige Richtung.

Seit Juli 1984, also mittlerweile im 10. Jahrgang, erscheint FOCUS MUL, die Zeitschrift für Wissenschaft, Forschung und Lehre an der Medizinischen Universität zu Lübeck. Sie hat sich zu einer anerkannten und gern gelesenen Veröffentlichungsform für wissenschaftliche Beiträge und Hochschulnachrichten aus der Lübecker Universität entwickelt.

FOCUS MUL erreicht in vierteljährlicher Erscheinungsweise mit einer Auflage von 5 000 Exemplaren in erster Linie die niedergelassenen praktizierenden Ärzte in der weiter gefaßten Region Lübeck (bis an Hamburg und Kiel heran und in das nordöstliche Niedersachsen hinein), aber ebenso die Kliniken, Institute und die Hochschullehrer der Medizinischen Universität, Vertreter aus Parlament und Ministerien, zahlreiche Persönlichkeiten des öffentlichen Lebens im Lübecker Raum sowie die Mitglieder der Gesellschaft der Freunde und Förderer der Medizinischen Universität.

## Beiträge für FOCUS MUL

sind der Schriftleitung stets willkommen und werden mit Interesse begutachtet. Für die Veröffentlichung in FOCUS MUL bestehen die folgenden Rubriken:

Das Kolleg. Eine wissenschaftlich besonders interessante Antrittsvorlesung an der Medizinischen Universität.

**Originalarbeiten:** Die wissenschaftlichen Maßstäben entsprechende detaillierte Darstellung von Untersuchungen, Methoden und Forschungsergebnissen aus den Abteilungen der Medizinischen Universität. Originalia in FOCUS MUL haben eine Kurzzusammenfassung in deutscher und englischer Sprache.

**Übersichten:** Eine über die Darstellung einer einzelnen Untersuchung hinausgehende Behandlung eines Wissenschaftsbereiches, der in besonderer Beziehung zu den Arbeitsschwerpunkten einer der Abteilungen der Medizinischen Universität steht.

**Der besondere Fall –** Die Darstellung und Diskussion eines besonders bemerkenswerten oder beispielhaften

**Eine Kasuistik:** Falles aus der klinischen Praxis.

Wissenschaftliche Beiträge in FOCUS MUL enthalten ein Literaturverzeichnis. Der Manuskriptumfang des Textteils soll 8-10 Schreibmaschinenseiten (1 1/2-zeilig), die Gesamtzahl der Abbildungen und Tabellen 10 nicht überschreiten. Bei Übernahme des Kostenmehrbetrages können Abbildungen auch farbig wiedergegeben werden. Die sprachliche Form der Beiträge soll berücksichtigen, daß FOCUS MUL sich nicht an die Angehörigen einer wissenschaftlichen Fachgesellschaft, sondern an eine Leserschaft aus allen medizinischen Teilgebieten richtet. Beiträge, die mit einem Textverarbeitungssystem erfaßt sind, sollten auch auf Diskette eingereicht werden.

Manuskripte wie auch Mitteilungen für die Rubrik „Personalialia“ und Kurzberichte zu Tagungen an der Medizinischen Universität sind zu richten

An die Medizinische Universität zu Lübeck – Redaktion FOCUS MUL – Informations- und Pressestelle Ratzeburger Allee 160, 23562 Lübeck.

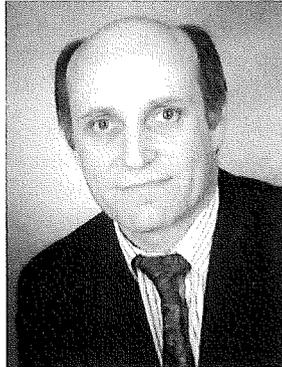
## Professor Dr. med. Hugo A. Katus

Direktor der Medizinischen Klinik II der Universität Lübeck

Seit zwei Jahren leitet Professor Katus die neu eingerichtete Medizinische Klinik II der Medizinischen Universität. Zeit für einen ersten Rückblick und eine Zwischenbilanz. Kardiologie, Angiologie und Psychosomatik, im Lübecker Klinikum früher als eigenständige Kliniken vertreten, sind jetzt unter dem neuen gemeinsamen Dach zusammengeführt – eine Konzeption, die Professor Katus mit ihrem umfassenden Fachspektrum von Anfang an fasziniert hat und die sich nach seiner Einschätzung hervorragend bewährt. Er betont die inhaltlichen Berührungspunkte der Einzeldisziplinen und die enge Verzahnung innerhalb seiner Klinik, die etwa die Untersuchung verbindender Fragestellungen wie „Psychosomatik und Herzinfarkt“ in besonderer Weise nahelegt und begünstigt.

Professor Katus ist vom Neckar an die Trave gekommen. 1951 im rheinland-pfälzischen Steinfeld geboren, studierte er 1970 bis 1976 in Heidelberg Medizin. Er promovierte über ein kardiologisches Grundlagenthema und habilitierte über neue Methoden der Infarkt Diagnostik. 1978 bis 1980 war er an der Harvard University in Boston, 1986 Facharztanerkennung, 1992 bis 1996 Leitender Oberarzt der Kardiologischen Universitätsklinik in Heidelberg. International hat sich Professor Katus in der Labor-Infarkt Diagnostik einen Namen gemacht; 1995 erhielt er den renommierten Innovationspreis der Deutschen Wirtschaft für den von ihm entwickelten Troponin-T-Test.

Sein wissenschaftliches Interesse konzentriert sich aktuell auf molekulare Mechanismen bei Herzinsuffizienz und Herzmuskelerkrankungen. An seiner Klinik werden zur Zeit fünf DFG-Projekte und ein BMBF-Projekt bearbeitet. Die Medizinische Klinik II hat sich an der MUL schnell als ausgesprochen forschungsorientiert dargestellt. Professor Katus findet im Lübecker Klinikum günstige Kooperationsmöglichkeiten mit Herzchirurgie, Pädiatrie, Gynäkologie und ebenso mit Pharmakologie, Physiologie und Anästhesiologie vor. Seine Vision ist, den Begriff „Herzzentrum Lübeck“ sowohl klinisch als auch wissenschaftlich zu untermauern und nach außen deutlich zu machen.



Invasive Kardiologie und Herzkatheter, Therapie komplexer Herzrhythmusstörungen, Defibrillatorbehandlung, Nachsorge bei Herztransplantationen, nichtinvasive Gefäßdiagnostik mit dem Duplexverfahren, der Aufbau einer Anlaufstelle für Bluterkrankte und der Schwerpunkt HIV in der Pneumologie kennzeichnen das klinische Angebotsprofil der Lübecker Medizinischen Klinik II mit besonderer Bedeutung für Lübeck und die Region.

Inwieweit muß denn heute der Leiter einer 144-Betten-Klinik Klinikmanager sein? In ganz erheblichem Maße natürlich, aber dennoch ist ihm vor allem anderen daran gelegen, seinen Patienten und Patientinnen als Arzt zu begegnen. Patientenzufriedenheit hat Priorität. Gleiches gilt, weil ursächlich damit verbunden, für den Kontakt zu den niedergelassenen Ärzten – gemeinsame Fortbildungen und das direkte Gespräch haben hier, so sieht es Professor Katus, zu einem ausgezeichneten Miteinander beigetragen.

Trotzdem noch einmal: Das Klinikmanagement. Dringend ist in der Lübecker Medizinischen Klinik II der Bau einer neuen Herzkathetereinheit, gegenwärtig geht es in diesem Bereich sehr beengt zu. Strukturell, organisatorisch und mit besonderem Blick auf die persönliche Motivation aller einzelnen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter liegt Professor Katus aber vorrangig am Herzen, daß mit der angekündigten Dezentralisierung von Verantwortung tatsächlich endlich Ernst gemacht wird. Mehr Selbständigkeit – dahin zielen seine Erwartungen auch bei der geplanten rechtlichen Neustrukturierung der Universitätsklinik in Schleswig-Holstein.

Für einen Kliniker etwas ganz Unerwartetes, wenn die tägliche Arbeit plötzlich zum Gegenstand von Literatur und Dichtung wird: „(...) sah die Arterie und in ihr den Schlauch, / mit dem Professor Katus summend finger-te“ heißt es im Gedicht „Dank Kontrastmittel“ von Günter Grass in der Sammlung „Fundsachen für Nichtleser“. Vielleicht hat auch das, sehr unmittelbar, mit Patientenzufriedenheit zu tun?

R. Labahn

# Personalia

## Ruf nach auswärts angenommen

Medizinische Fakultät:

Privatdozent Dr. med. Volker A r o l t, Klinik für Psychiatrie der Medizinischen Universität zu Lübeck hat den Ruf auf die C4-Professur für Psychiatrie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Nachfolge Prof. Dr. R. Tölle) angenommen.

## Fachgesellschaften, Kommissionen

Medizinische Fakultät:

Professor Dr. med. Wolfgang J e l k m a n n, Direktor des Instituts für Physiologie der Medizinischen Universität zu Lübeck, wurde in das Editorial Board der Zeitschrift *Journal of Interferon & Cytokine Research* gewählt.

Professor Dr. med. Eckart R i c h t e r, Direktor der Klinik für Strahlentherapie und Nuklearmedizin der Medizinischen Universität zu Lübeck, wurde als Schriftführer in den Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO) gewählt.

Professor Dr. med. Claus-Peter S i e g e r s, Institut für Toxikologie der Medizinischen Universität zu Lübeck, wurde ab September 1997 in die EMEA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit) in London als Experte für Rückstände pflanzlicher Stoffe in Nutztieren berufen. Professor Dr. med. Eduard F. S t a n g e, Medizinische Klinik I der Medizinischen Universität zu Lübeck, ist von der International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Disease (IOIBD) in diesem Jahr als eines von zwei neuen Mitgliedern gewählt worden.

Privatdozent Dr. med. Peter V i e r e g g e, Klinik für Neurologie der Medizinischen Universität zu Lübeck, wurde im Februar 1998 in den wissenschaftlichen Beirat der neu gegründeten Deutschen Parkinson-Gesellschaft gewählt.

## Preise

Medizinische Fakultät:

Dr. med. Thilo W e d e l, Institut für Anatomie der Medizinischen Universität zu Lübeck, hat gemeinsam mit der Arbeitsgruppe „Intestinale Innervationsstörungen“ aus der Klinik für Chirurgie der MUL (Dr. med. Joachim G l e i ß, Dr. med. Thomas S c h i e d e c k, Professor Dr. med. H.-P. B r u c h) den diesjährigen Preis der Deutschen Gesellschaft für Koloproktologie in Höhe von DM 2.000,— gewonnen. Damit wurden die Ergebnisse der Arbeit „Das neurogene Megacolon: Liegt immer ein Morbus Hirschsprung zugrunde?“

ausgezeichnet, die während der 24. Koloproktologie-Tage in München (5.-8.3.1998) vorgestellt wurden.

## Forschungsförderung

Technisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Dr. rer. nat Jürgen R o h w e d e l, Institut für Medizinische Molekularbiologie der Medizinischen Universität zu Lübeck, wurde ein DFG-Antrag zum Thema „Untersuchung der Chondrogenese und Osteogenese in vitro durch Differenzierung pluripotenter embryonaler Stammzellen der Maus“ genehmigt. Die Genehmigung umfaßt Sachmittel sowie ein BAT IIA/2 und eine BAT VIb für zwei Jahre.

Professor Dr. rer. nat Alfred X. T r a u t w e i n, Direktor des Instituts für Physik der Medizinischen Universität zu Lübeck, gehört zu den Beteiligten der von der EU für drei Jahre bewilligten Forschungsvorhaben „Thermal and Optical Switching of Molecular Spin States“, TOSS, (zusammen mit Kollegen aus Österreich, Frankreich, den Niederlanden, Spanien, Nordirland, Dänemark und der Schweiz) und „Dioxygen reactions of iron-oxygen proteins“ (zusammen mit Kollegen aus Norwegen, Schweden, Dänemark, Großbritannien und Frankreich). Ihm wurde außerdem, ebenfalls für drei Jahre, eine BMBF-Förderung für das zusammen mit dem Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY), Hamburg, betriebene Projekt „XAFS-Untersuchungen an Metallproteinen und Metallkomplexen unter Berücksichtigung der Moleküldynamik“ bewilligt.

Professor Dr. med. Peter V o s w i n c k e l, Institut für Medizin- und Wissenschaftsgeschichte der Medizinischen Universität zu Lübeck, leitet das DFG-Projekt „Biographisches Ärztelexikon“. Er nahm als einziger Delegierter Deutschlands am Internationalen Medizinhistorikerkongreß vom 11. bis 15. März 1998 in Moskau teil. Der Kongreß, der erste dieser Art seit der Wende im ehemaligen „Ostblock“, tagte im Museum der Russischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften.

Medizinische Fakultät:

Professor Dr. med. Wolfgang L. G r o s s, Direktor der Poliklinik für Rheumatologie der Medizinischen Universität zu Lübeck, wurde vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) für das Vorhaben „Forschungsverbund: Vasculitiden – Aetiopathogenese, Therapie und Epidemiologie – ANCA, AECA, Interstitielle Lungenerkrankungen und Epidemiologie“ eine weitere Zuwendung bis zu DM 1.597.775,— bewilligt.

Dipl.-Biochem. Eva-Maria W o l b e r, Institut für Physiologie der Medizinischen Universität zu Lübeck, erhielt einen NIH young investigator's travel award (Reisestipendium für Nachwuchsforscher von der amerika-

nischen Gesundheitsbehörde) über \$ 1.100 anlässlich eines Symposiums über die „Molekulare Regulation der Plättchenbildung“. Frau Wolber untersucht als naturwissenschaftliche Doktorandin im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 367 der DFG („Molekulare Mechanismen entzündlicher und degenerativer Prozesse“) das Hormon Thrombopoietin, welches die Plättchenbildung fördert.

#### Gastwissenschaftler

Medizinische Fakultät

Professor Dr. med. Nikolai B a r t o s h vom Anatomischen Institut der Medizinischen Akademie „Setchenov“ in Moskau war vom 1. bis 31. März 1998 als Gastwissenschaftler im Institut für Anatomie der Medizinischen Universität zu Lübeck tätig. Professor Bar-tosh machte sich in der Lübecker Anatomie mit den Techniken der Interaktiven Bildanalyse und der dreidimensionalen Rekonstruktion von Gewebeschnitten vertraut.

Dr. med. Baha El Din El Khair E l A w a d, Universität Juba, Sudan, ist seit Mitte Februar 1998 für drei Jahre am Institut für Physiologie der Medizinischen Universität zu Lübeck tätig. Dr. El Awad ist Stipendiat des sudanesischen Ministeriums für Erziehung und wissenschaftliche Forschung und wird an der MUL Untersuchungen zur Expression des Gens für den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor in humanen Lymphozyten durchführen.

#### Erratum

FOCUS MUL 14. Jahrgang, Heft 4, 12/97;

Beitrag „Optimierte individualisierte Ganzkörperbestrahlung mit 3-D-CT-Planung“

Auf S. 268, Spalte 2, Zeile 14, muß es richtigerweise heißen: „Mit Hilfe einer von Hebbinghaus programmierten Software (6) können daraus in der CT-Schichtebene wasseräquivalente Weglängen berechnet werden, ...“

## NEUERSCHEINUNG

### Themen der Kinderheilkunde Band 12 „Drogen bei Kindern und Jugendlichen“

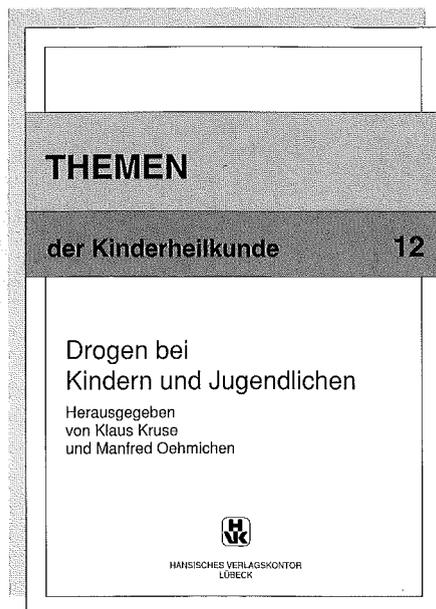
hrsg. von Klaus Kruse und Manfred Oehmichen

Die Zahl der Rauschgifttoten hat in den letzten Jahrzehnten in der westlichen Welt beängstigend zugenommen. Der Drogengenuß selbst gaukelt Leichtfertigkeit und Freiheit, Träume von schöneren Welten oder erhöhte Leistungsfähigkeit vor. Eine therapeutische Einflußnahme nach Beginn der Abhängigkeit erwies sich bisher durchgängig als äußerst schwierig. Der langfristige Schutz gegen Sucht und Drogen sind seelisch ausgeglichene, selbstbewußte Kinder, die sich zu selbständigen und kritikfähigen Jugendlichen und Erwachsenen entwickeln.

ISBN 3-87302-090-4 • 90 Seiten

Preis DM 24,80

**Im Buchhandel erhältlich oder  
zu beziehen über:  
Hansisches Verlagskontor  
Mengstraße 16  
23552 Lübeck**



## Fraxiparin 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0

Wirkstoff: Nadroparin-Calcium. **Zusammensetzung:** 1 ml Injektionslösung enthält: 9.500 I.E. AXa Nadroparin-Calcium (entsprechend 95-130 I.E. AXa/mg). *Sonstige Bestandteile:* Calciumhydroxid/Salzsäure 10% (zur pH-Einstellung), Wasser für Injektionszwecke.

**Anwendungsgebiete:** Perioperative Thromboseprophylaxe: a) Peri- und postoperative Primärprophylaxe tiefer Venenthrombosen bei Patienten mit niedrigem oder mittlerem thromboembolischem Risiko (z. B. Allgemeinchirurgie). b) Peri- und postoperative Primärprophylaxe tiefer Venenthrombosen bei Patienten mit hohem thromboembolischem Risiko (z. B. orthopädische Chirurgie, wie z.B. Hüftersatzchirurgie). Therapie tiefer Venenthrombose, Thromboseprophylaxe und Gerinnungshemmung bei extrakorporalem Kreislauf

**sanofi** während der Hämodialyse und Hämofiltration. **Gegenanzeigen:** Überempfindlichkeit gegen

Nadroparin-Calcium und/oder Heparin, aktuelle oder aus der Anamnese bekannte heparinassoziierte Thrombozytopenie (Typ II), akute Magen-Darm-Geschwüre, zerebrale Blutungen und zerebrales Aneurysma, schwere Gerinnungsstörungen (hämorrhagische Diathese, Mangel an Gerinnungsfaktoren, schwere Thrombozytopenie), schwerer unkontrollierbarer Bluthochdruck, schwere Beeinträchtigung der Leberfunktion, schwere Beeinträchtigung der Nierenfunktion bei Patienten, die nicht wegen Hämodialyse behandelt werden, akute infektiöse Endokarditis, Verletzungen und operative Eingriffe am Zentralnervensystem sowie am Auge und Ohr, intraokulare Blutungen oder andere aktive Blutungsprozesse, Retinopathien, Glaskörperblutungen, Abortus imminens, bei der Behandlung von tiefer Venenthrombose: Regionalanästhesie.

**Nebenwirkungen:** Bei etwa 3% der prophylaktisch behandelten Patienten traten Nebenwirkungen auf. Häufig (> 1%): Allgemein: Subkutane Hämatome an der Injektionsstelle. Offene oder versteckte Blutungskomplikationen (insbesondere an Haut, Schleimhäuten, Wunden sowie im Bereich des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes). Anstieg der Serum-Kalium-Konzentration. Anstieg der Aminotransferase-, Gamma-GT-, LDH- und Lipase-Konzentration. Gelegentlich (> 0,1% und < 1%): Leichte, vorübergehende Thrombozytopenie (Typ II). Selten (< 0,1%): Allgemein: allergische Reaktionen mit Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen, Temperaturanstieg, Kopfschmerzen, Urtikaria, Pruritus, Dyspnoe, Bronchospasmen, Blutdruckabfall; Hautnekrosen an der Injektionsstelle, anaphylaktoide Reaktionen, anaphylaktischer Schock, vorübergehender Haarverlust, Antikörper-vermittelte schwere Thrombozytopenie (Typ II). Endokrines System: reversibler Hypoaldosteronismus. Leber: Transaminasenanstieg auf das 3- bis 5fache des Normalwertes, normalerweise vorübergehend. Fälle von Priapismus wurden berichtet. Fälle von schweren unerwünschten Arzneimittelwirkungen, wie z. B. intrakranielle Blutungen und Augenblutungen, wurden ebenfalls berichtet. Peridurale Blutungen im Lumbalbereich nach Katheter-Spinalanästhesie, die zu Paraplegie führten, wurden beobachtet. **Hinweis:** Kontrollen der Thrombozytenzahl sollten regelmäßig durchgeführt werden (siehe Gebrauchsinformation). **Packungsgrößen:** Jeweils Packungen mit 10 Fertigspritzen für Fraxiparin 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; Packung mit 20 Fertigspritzen für Fraxiparin 0,3; Klinikpackungen. Verschreibungspflichtig. Stand: August 1997.

**SANOFI WINTHROP GmbH, 80323 München**



# GRÜNER WIRD'S NICHT!

**Fraxiparin® macht dem Fortschritt Beine.**

Neu: Postoperative Hochrisiko-Prophylaxe.

Neu: Therapie tiefer Beinvenenthrombosen.

Neu: Gerinnungshemmung bei Hämodialyse und Hämofiltration.

**Fraxiparin® 0,3 – die Basis für den Fortschritt.**

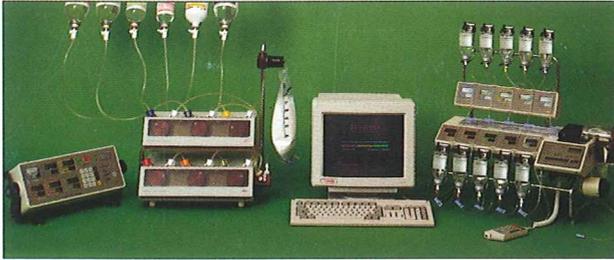
Bleibt: Standard in der postoperativen Thromboembolie-Prophylaxe.

## Fraxiparin®

Das Menschenmögliche

# All-In-One - Lösungen von **Clintec**<sup>®</sup> : Mehr Sicherheit in weniger Zeit

## Compounding-Systeme



## Dual Bag-Konzept



## Das All-In-One - Konzept:

- senkt das Kontaminationsrisiko
- erhöht die Arzneimittelsicherheit
- optimiert die Patientencompliance
- verringert den Zeitaufwand
- reduziert den Materialeinsatz
- verbessert die Kosteneffektivität

**Baxter**

Baxter Deutschland GmbH • Bereich Clintec Parenterale Ernährung  
Edisonstraße 3 - 4 • 85719 Unterschleißheim • Tel.: (089) 31701-683 / - 682 / - 225