

16. Jahrgang · Heft 1 · Januar 1999

C 5842

FOCUS MUL



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





SCHERING



Diagnostika

Wie als Partner

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

16. Jahrgang – Heft 1 – Januar 1999

Inhalt

Editorial

Der zertifizierte Lehrstuhl!?

H.L. Fehm

4

Originalarbeiten

Wärme induziert Suicid von Leukämiezellen

D.M. Katschinski

6

Die Rolle von Komplement in Immunantwort und Toleranz

S. Goerg, M.C. Carroll

14

Feld- und Hallenhockey: Belastung und Gefährdung des Bewegungsapparates durch Verletzungen und Sportschäden

R. Jung, R. Traut, P. Dufek

20

Übersichten

Das enterische Nervensystem: Von der Anatomie zur Klinik

T. Wedel, R. Eggers, J. Gleiß, T. Schiedeck, H.-P. Bruch, W. Sigge, H.-J. Krammer

22

Moderne Methoden der Infektionsdiagnostik

B. Albrecht, W. Solbach

31

Über Darmbrand, eine vor 50 Jahren in Lübeck beschriebene Erkrankung, und was aus ihr wurde

B. Kreft, K. Dalhoff, K. Sack

42

Wissenschaftskritische Überlegungen zum Evidenzbegriff

S. Voigt

50

Die Summa-cum-laude-Dissertation

Einfluß der cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP auf den Calciumspiegel und die Autakoidsynthese in Endothelzellen

St.-S. Bolz

54

Aus der Hochschule

62

In der Heftmitte: Focus MUL – Inhalt 15 Jahrgang (1998)

Die Abbildung auf der Titelseite ist dem Beitrag "Das enterische Nervensystem: Von der Anatomie zur Klinik" (S. 22 ff) entnommen.

Der zertifizierte Lehrstuhl!?

Im Rahmen des Qualitätsmanagements können Betriebe nach DIN ISO 9000 zertifiziert werden. Dies ist prinzipiell auch im Dienstleistungsbereich möglich. Tatsächlich gibt es inzwischen mindestens einen zertifizierten Lehrstuhl in Deutschland. Der Zug „Qualitätsmanagement nach DIN ISO 9000“ hat sich bereits in Bewegung gesetzt; wird es nicht höchste Zeit aufzusteigen? Zunächst die Frage: „Was ist Qualität?“ ISO 9000 bietet folgende Definition: „Qualität ist die Gesamtheit von Merkmalen einer Betrachtungseinheit bezüglich ihrer Eignung, festgelegte und vorausgesetzte Erfordernisse zu erfüllen.“ Die Betrachtungseinheit in unserem Falle wäre ein Lehrstuhl, zum Beispiel ein Lehrstuhl für Innere Medizin an der Medizinischen Universität Lübeck. Zunächst einmal muß es darum gehen, die für einen solchen Lehrstuhl vorausgesetzten Erfordernisse festzulegen. Diese Erfordernisse betreffen drei Bereiche, nämlich Lehre, Forschung und Patientenversorgung, und alle drei Bereiche sollen im folgenden kurz unter dem Gesichtspunkt des Qualitätsmanagements betrachtet werden.

1. Lehre

Es ist gar nicht so einfach festzulegen, welche Anforderungen an einen Lehrenden oder Dozenten im allgemeinen zu stellen sind. Diese Frage hat durchaus eine philosophische Dimension, und Anhänger unterschiedlicher philosophischer Richtungen werden diese Frage unterschiedlich beantworten. Wenn man zum Beispiel ein Anhänger des sogenannten „radikalen Konstruktivismus“ ist, wie er von Humberto Maturana und Francisco Varela begründet wurde, wird man sich gerne der von Ernst von Glasersfeld in seinem Aufsatz „Aspekte einer konstruktivistischen Didaktik“ getroffenen Feststellungen anschließen. Er sagt dort:

„Aus der konstruktivistischen Perspektive ist es eine Illusion, daß Sprache an und für sich die Fähigkeit habe, Begriffe und somit Wissen von einer Person zu einer anderen zu übermitteln.“

„Lehren ... soll im Schüler Verstehen hervorbringen – und Verstehen verlangt den Aufbau von Begriffsstrukturen, die sich nicht nur im gegebenen Erlebensbereich, sondern zumeist auch darüber hinaus erfolgreich anwenden lassen ... Sprachliche Wortverbindungen können solche Begriffsstrukturen zwar bedeuten, doch sie können sie weder vermitteln noch erzeugen, denn die nötigen Begriffe und Beziehungen müssen von jedem

einzelnen Sprachbenutzer im eigenen Kopf aufgebaut werden.“

„Damit sind wir bei einem Hauptproblem der Didaktik, und auch der Konstruktivismus kann da kein Universalmittel anbieten. Lehren ist eine Form der Kunst, und darum braucht der Lehrer nicht nur Erfahrung im Wissen, sondern auch Intuition und Fingerspitzengefühl im Umgang mit Schülern.“

Niemand, der die hier formulierten hohen Ansprüche akzeptiert, wird erwarten, daß sie in eine DIN ISO-Norm gegossen werden können.

2. Forschung

Die Forschung hat als wesentliches Charakteristikum Kreativität. Kreativität kann man nicht einfordern, nicht planen, nicht kontrollieren. Sie entzieht sich der bürokratischen Überprüfung noch entschiedener, als die Kunst der Lehre. Kreativität und Chaos sind Geschwister. So wundert es nicht, daß es kaum Anstrengungen gibt, die Qualität der Forschung nach ISO-Normen zu zertifizieren. Interessanterweise gibt es jedoch verschiedene Instrumente, um die Qualität von Forschung zu messen, nämlich den Impact-Faktor, den Science Citation Index sowie die Menge eingeworbener Drittmittel. Selbstverständlich kann man über diese Instrumente viel Kritisches äußern; sie stellen jedoch einen ersten Ansatz zur Qualitätssicherung in der Wissenschaft dar und werden von Fakultäten, Berufungskommissionen, Drittmittelgebern etc. gerne weltweit genutzt. Der Unterschied zur ISO-Norm besteht im wesentlichen darin, daß diese Instrumente von den Wissenschaftlern selbst geschaffen wurden und daß sich die Mehrheit der Wissenschaftler diesen Maßstäben gerne unterwirft.

3. Patientenversorgung

Wenn Qualitätssicherung und Qualitätsmanagement wichtig sind, dann ganz gewiß und insbesondere wenn es darum geht, Gesundheit von Menschen zu erhalten bzw. wieder herzustellen. Dies hat auch der Gesetzgeber erkannt und im § 137 des Sozialgesetzbuches V unter der Überschrift „Qualitätssicherung in der stationären Versorgung“ folgendes festgelegt: *„Die nach § 108 zugelassenen Krankenhäuser sowie die Vorsorge- oder Rehabilitationseinrichtungen, mit denen ein Vertrag nach § 111 besteht, sind verpflichtet, sich an Maßnahmen zur Qualitätssicherung zu beteiligen. Die*

Maßnahmen sind auf die Qualität der Behandlung, der Versorgungsabläufe und der Behandlungsergebnisse zu erstrecken. Sie sind so zu gestalten, daß vergleichende Prüfungen ermöglicht werden ...“ Nachdem dieses Gesetz vor 10 Jahren rechtskräftig wurde, stellt sich die Frage, wie die derzeitige Realität aussieht. Es ist sehr ernüchternd, daß es für den Bereich Innere Medizin in Schleswig-Holstein eine externe Qualitätssicherung praktisch nicht gibt. In Anbetracht der Fülle von Diagnosen und Therapien, die in der Inneren Medizin angewandt werden, erschien es von vornherein unmöglich, daß sich die Qualitätssicherung auf alle Teilaspekte bezieht. Die Ärztekammer Schleswig-Holstein hat vielmehr eine sogenannte Tracer-Diagnose ausgewählt, nämlich die thrombolytische Therapie des Herzinfarktes. Inzwischen ist es jedoch so, daß in Lübeck diese Therapie nur noch in Ausnahmefällen durchgeführt wird, so daß die Grundlage für die Qualitätssicherung entfällt. Das einzig vorzeigbare Resultat nach 10 Jahren externer Qualitätssicherung in der Inneren Medizin ist die Erkenntnis, daß externe Qualitätssicherung schwierig und teuer ist.

Die Bezeichnung der bisher getroffenen Maßnahmen als „externe Qualitätssicherung“ ist Augenwischerei.

Diese wenigen Beispiele müssen genügen, um zu zeigen, daß sich ein Qualitätsmanagement, das sich bei der Herstellung von Gummibärchen bewährt haben

mag, zur Qualitätssicherung im Bereich Forschung, Lehre und Krankenversorgung nicht ausreicht. Wahrscheinlich ist es eher schädlich, solche hochkomplexen und komplizierten Lebensbereiche durch überregionale und allgemein verbindliche Normen regulieren zu wollen. Haben denn die Experimente mit der Planwirtschaft nicht hinreichend klar gezeigt, wohin zentrales Reglement führt? Auch muß es bei allen Innovationen unser gemeinsames Ziel sein, Bürokratie zu verringern; wir drohen schon jetzt an zuviel Bürokratie zu ersticken. Mit der ISO-Norm wird aber zusätzliche Bürokratie in erheblichem Umfang neu eingeführt.

Die Qualitätsmerkmale für Lehre, Forschung und Patientenversorgung sollten nicht durch eine DIN ISO-Norm festgelegt werden, sondern vielmehr von möglichst kleinen und möglichst autonomen Arbeitsbereichen selbst definiert werden. Die Erfahrung zeigt, daß solche selbst festgelegten Normen fast immer in ihren Ansprüchen höher liegen als allgemein verbindliche Festlegungen. Der Typus des begeisterten und begeisternden Lehrers, des vor Wissensdurst glühenden Wissenschaftlers und des guten, menschenkundigen Arztes kann durch keine DIN ISO-Norm geschaffen werden, jedoch kann die Entstehung und Blüte dieses Typus durch die Schaffung eines geeigneten Klimas gefördert werden.

H. L. Fehm

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, Th. Peters

Wissenschaftlicher Beirat: T. Aach, H. Arnold, R. Birngruber, K. Diedrich, H. Dilling, H. v. Domarus, P. Dominiak, W. Dosch, D. v. Engelhardt, A. Ch. Feller, A. Fenner, 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. Maehle, P. Müller, D. O. Nutzinger, M. Oehmichen, S. Pöppel, 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, 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 31-01

Anzeigen: Hansisches Verlagskontor H. Scheffler, Christiane Kermel

Druck: Verlag Schmidt-Römhild KG, Mengstraße 16, 23552 Lübeck, Telefon (04 51) 70 31-01

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

Aus dem Institut für Physiologie der Medizinischen Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. W. Jelkmann)

Wärme induziert Suicid von Leukämiezellen

D. M. Katschinski

Zusammenfassung

Erwärmung von PLB-985 Leukämiezellen (für eine Stunde) führt ab einer kritischen Schwellentemperatur von 42° C zum apoptotischen Zelltod. Die Expression von Bcl-2 und Bax bleibt unverändert nach einer Exposition zu 43° C. Die wärmeinduzierte Apoptose korreliert jedoch mit einer endogen gesteigerten Produktion von Tumor Nekrose Faktor α (TNF α). Die Blockierung der wärmeabhängigen TNF α Expression (mit Pyrrolidinedithiocarbamat) bzw. Blockierung der biologischen Aktivität (mit neutralisierenden Antikörpern) hebt die wärmeinduzierte apoptotische Wirkung auf. Myeloide Differenzierung der Zellen mit 0.5 % N,N-Dimethylformamid verhindert eine temperaturabhängig gesteigerte TNF α Expression und bewirkt gleichzeitig einen Schutz vor wärmeinduzierter Apoptose. Diese Befunde stützen die Hypothese, daß durch Wärme die endogene Bildung von autokrinen wirksamen TNF α vermittelt wird, welches ein apoptotisches Suicidprogramm in Leukämiezellen einleitet.

Summary

The effects of heat ranging from 37° C to 43° C on the induction of apoptosis and cell cycle distribution were investigated in the promyelocytic leukemia cell line PLB-985. The threshold temperature for the onset of apoptosis was found to be 42° C. Whereas hyperthermia exerted no effect on the expression of Bcl-2 and Bax, heat induced an over 30fold increase of tumor necrosis factor (TNF) α mRNA expression. This endogenous production of TNF α correlated directly with the temperature induced apoptotic effect. Blocking TNF α expression via treatment with pyrrolidinedithiocarbamate or TNF α activity with neutralizing antibodies abrogated heat provoked apoptosis. Interestingly, this autocrine suicidal loop found in immature leukemia cells was lost when the cells were differentiated via treatment with 0.5 % N,N-dimethylformamide. These data are of critical importance for the understanding of the biological impact of fever as well as for developing new therapeutic approaches to malignant diseases.

Einleitung

Um im erwachsenen Organismus ein Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und Zelltod aufrechtzuerhalten, ist die Zellebensdauer vorprogrammiert. Das programmierte Absterben von Zellen wird als apoptotischer Zelltod bezeichnet. Der Begriff Apoptose wurde 1972 von den Pathologen Kerr, Wyllie und Currie in Anlehnung an das Abfallen eines welken Blattes (von griechisch *apo*: von, weg, los und *ptosis*: Senkung) eingeführt. Überleben Zellen, deren Absterben bestimmt war, kann das entstehende Ungleichgewicht zur Tumorbildung führen. Durch den gezielten Einsatz von zytotoxischen Substanzen kann Apoptose in Tumorzellen aber auch ausgelöst werden. Detaillierte Erkenntnisse über fehlgeleitete apoptotische Vorgänge oder über Möglichkeiten, Apoptose zu induzieren, können deshalb helfen, effizientere Antitumorstrategien zu entwickeln.

Apoptose folgt einem genetisch kontrollierten Programm, das durch Applikation von spezifischen Signalen ausgelöst wird (Barinaga et al, 1998, Raff, 1998). Der Verlust von sogenannten „Vitalitätsfaktoren“ – z. B. Wachstumsfaktoren und Hormonen – gehört ebenso wie das Einwirken von „Todesfaktoren“ – z. B. Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), FAS Ligand, Glucocorticoide und DNA Schädigung (Nagata, 1997) – zu den Apoptosesignalen. Bemerkenswerterweise reagieren einige Tumorzellen nicht nur auf exogene Zugabe von „Todesfaktoren“ wie TNF α oder dem FAS Liganden, sondern exprimieren die entsprechenden Gene unter bestimmten Bedingungen – z. B. nach Temperaturerhöhung, Stimulation mit Zytokinen oder Behandlung mit chemotherapeutischen Substanzen – auch endogen (Frede et al. 1996, Hug et al. 1997).

Hauptanliegen der gegenwärtigen onkologisch ausgerichteten Apoptoseforschung ist es, die Suszeptibilität maligner Zellen gegenüber dem breiten Spektrum der möglichen Apoptosesignale zu beschreiben sowie die dazugehörigen Signalübertragungswege funktionell zu charakterisieren. Wir untersuchen derzeit, ob durch erhöhte Temperaturen Apoptose in Leukämiezellen ausgelöst werden kann.

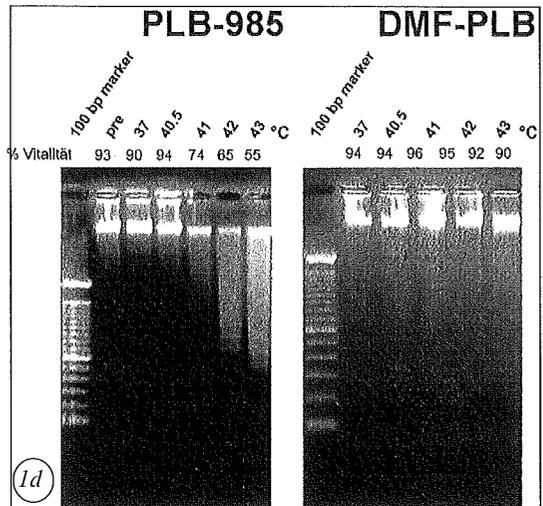
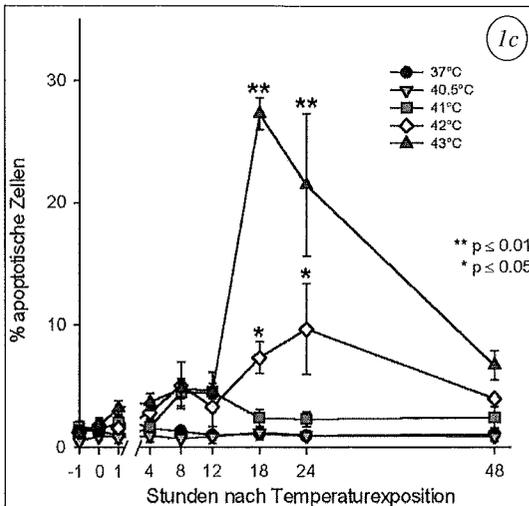
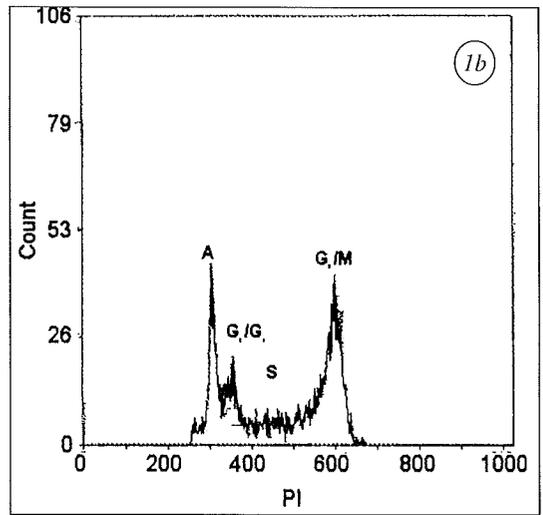
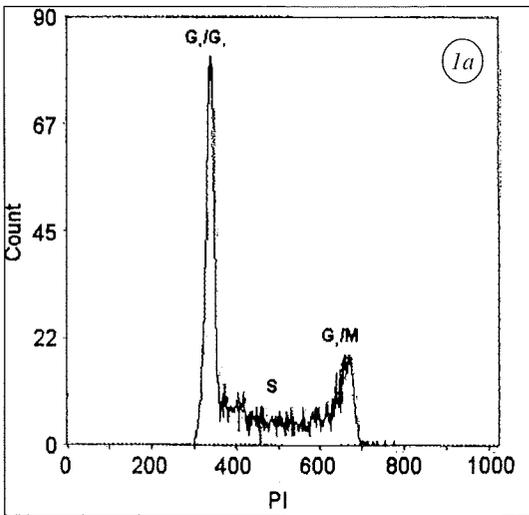


Abb. 1: Induktion von Apoptose durch Wärmeexposition von PLB-985 Zellen. (c) PLB-985 Zellen wurden für eine Stunde mit Temperaturen zwischen 37° C und 43° C behandelt. Anhand von Propidiumjodid-Färbungen und durchflußzytometrischer Messungen wurde der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen bis zu 48 Stunden nach der Wärmeexposition bestimmt. Typische DNA-Histogramme vor Wärmeexposition (a) sowie 18 Stunden nach einer Exposition zu 43° C [für eine Stunde] (b). (d), PLB-985 und DMF-PLB Zellen wurden für eine Stunde mit Temperaturen zwischen 37° C und 43° C behandelt. 18 Stunden nach der Wärmeexposition wurde die DNA extrahiert und elektrophoretisch in einem Agarose Gel untersucht.

Untersuchungsschwerpunkte dieses Projektes sind:

1. Auslösung von wärmeinduzierter Apoptose in Leukämiezellen in Abhängigkeit von deren Differenzierungsgrad.
2. Aufklärung der Mechanismen der wärmeinduzierten Apoptose mit besonderer Berücksichtigung der endogenen TNF α Produktion.

Material und Methoden

Zelllinien

Die humanen, promyelozytären Leukämiezellen PLB-985 (Dr. M. Dinauer, Indianapolis, USA) wurden in 90 % RPMI 1640 mit 10 % fetalem Kälberserum als Zellsuspension in Kultur gehalten. Für die neutrophile

Differenzierung wurden sie in Kulturmedium unter Zusatz von 0,5 % N-N Dimethylformamid (DMF) für sechs Tage kultiviert. Vor Versuchsbeginn wurde die morphologische und funktionelle Differenzierung der Zellen mittels Pappenheimfärbung bzw. Nitroblautrazolium-Reduktion und Lucigeninreaktion kontrolliert (Karnovsky, 1994).

Temperaturbehandlung

Für die Temperaturbehandlung wurden die Zellen unter standardisierten Wachstumsbedingungen in Zellkulturflaschen kultiviert. Unter diesen Bedingungen wurden die Kulturflaschen, die in einem mit 95 % Luft/5 %CO₂ gefüllten wasserdichten Polyethylenschlauch eingeschweißt wurden, in einem Wasserbad bei verschiedenen Temperaturen behandelt. Die Temperatur wurde mit Hilfe einer Thermosonde, die regelmäßig kalibriert wurde, kontrolliert. Wie in früheren Untersuchungen bestimmt, wird unter diesen Bedingungen im Zellkulturmedium die Umgebungstemperatur nach ca. 5 min erreicht (Katschinski und Robins, 1999).

Qualitative Darstellung von Apoptose mittels gelelektrophoretischer Trennung von DNA

Zelluläre DNA wurde aus den Zellen isoliert und mittels gelelektrophoretischer Trennung nach für Apoptose typischer, internukleosomaler DNA Fragmentierung untersucht. Dazu wurden die Zellen in 10 mM TrisHCl pH 8, 1 mM EDTA, 0,2 % Triton X-100 lysiert. Das Lysat wurde mit 20 mg/ml Proteinase K versetzt und eine Stunde bei 50° C inkubiert. Durch Hinzufügen einer 5 M NaCl Lösung wurden die nukleäre DNA und RNA gefällt und die DNA durch Behandlung mit DNase freier RNase A (2 mg/ml) bei 50° C von RNA gereinigt. Die DNA Proben wurden in einem 1,5 % Agarose Gel in 1 x TAE Puffer getrennt. Nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid war die DNA unter UV-Licht als fluoreszierende Bande(n) sichtbar. Während große DNA Fragmente (> 20 kbp) das Gel nicht durchwandern, sind kleine DNA Fragmente (20 kbp - 180 bp), die im Rahmen des apoptotischen Prozesses entstehen, als typische ‚DNA-Leiter‘ zu sehen.

Quantifizierung von apoptotischen Zellen mittels Durchflußzytometrie

Der zeitliche Verlauf der Zellzyklusverteilung sowie das Ausmaß der induzierten Apoptose wurde mittels Propidiumjodid Färbung und Durchflußzytometrie bestimmt (Darzynkiewicz et al. 1994). Die durchflußzytometrischen Bestimmungen wurden mit Unterstützung von Dr. P. Schlenke (Institut für Immunologie) durchgeführt.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Für eine morphologische Beurteilung wurden die Zellen mit 100 µg/ml Acridin-Orange und 100 µg/ml Pro-

pidiumjodid gefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop wurden die Beschaffenheit des Chromatins sowie die Unversehrtheit der Zellmembran als apoptotische Merkmale beurteilt.

RNA Extraktion, Reverse Transkriptase Reaktion (RT) und Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

RNA Extraktion sowie RT- und TNF α , p55 und GAPDH PCR Reaktionen wurden durchgeführt wie beschrieben (Frede et al. 1996)

Ergebnisse und Diskussion

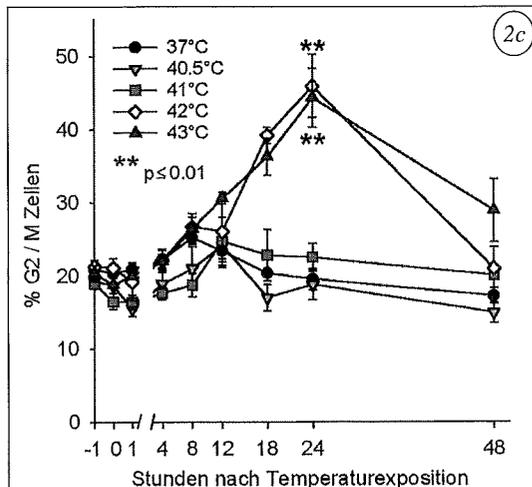
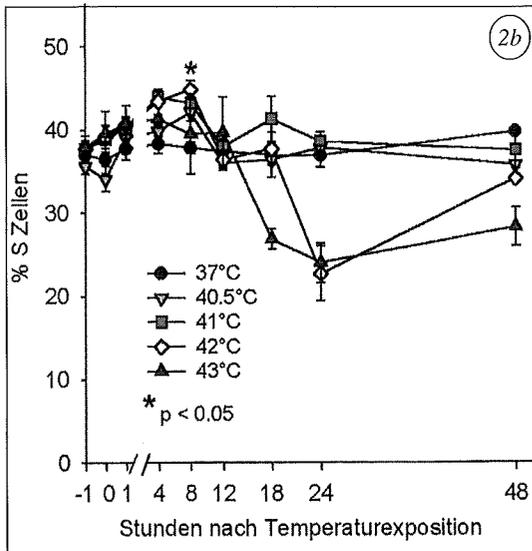
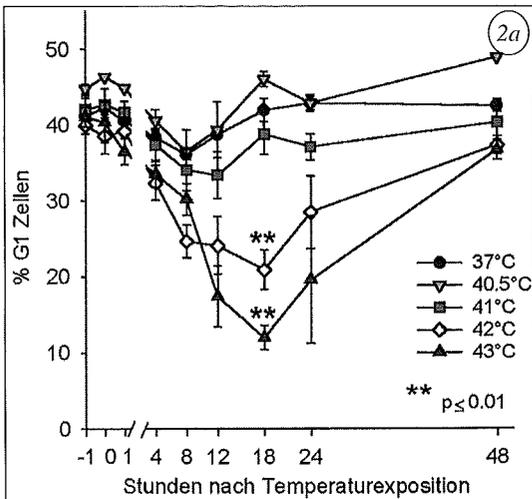
Wärmeinduzierte Apoptose in PLB-985 Leukämiezellen

Durchflußzytometrische Untersuchungen an wärmebehandelten PLB-985 Zellen ergaben, daß 18-24 Stunden nach einer einstündigen Behandlung mit 42° C und 43° C in signifikantem Ausmaß Apoptose induziert wird (Abb. 1c). Die Behandlung der Zellen mit 37° C, 40,5° C oder 41° C (jeweils für eine Stunde) dagegen führte nicht zum gesteigerten apoptotischen Zelltod. Diese Befunde wurden durch Extraktion von DNA und anschließender elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarosegel bestätigt. Typische apoptotische DNA Fragmentierung wurde 18 Stunden nach der Behandlung mit 42° C und 43° C beobachtet, während die DNA nach Behandlung bei 37° C, 40,5° C und 41° C intakt war (Abb. 1d). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PLB-985 Zellen 18 Stunden nach einer Exposition zu 43° C (für eine Stunde) zeigen zusätzlich typische apoptotische Merkmale wie das Ausbilden von apoptotischen Körperchen, aber auch Chromatinkondensation und Chromatindisintegration. Die Schwellentemperatur von 42° C, ab der in signifikantem Ausmaß Apoptose induziert wurde, stimmt mit Ergebnissen von Takasu et al. (1998) in HL-60 Zellen überein.

Zusätzlich zur durch Wärme ausgelösten Apoptose konnte in den PLB-985 Zellen auch ein Temperatureffekt auf die Zellzyklusverteilung beobachtet werden. Der prozentuale Anteil der Zellen in S-Phase war 4-8 Stunden nach Behandlung mit 40,5° C - 43° C signifikant erhöht (Abb. 2b). Bei den gleichen Temperaturen wurde 12 - 18 Stunden nach der Wärmeexposition eine signifikante Erhöhung der Zellen in G₂/M Phase gefunden (Abb. 2c), während der Anteil der Zellen in G₁ Phase zu dem gleichen Zeitpunkt in den 42° C und 43° C behandelten Zellen erniedrigt war (Abb. 2a).

Schutz vor wärmeinduzierter Apoptose durch myeloide Differenzierung von PLB-985 Zellen

Gegenstand weiterer Untersuchungen war die Frage, ob durch den Differenzierungsgrad der Leukämiezellen die Empfindlichkeit gegenüber Tempera-



terhöhung beeinflusst werden kann. Dazu wurden die PLB-985 Zellen durch eine sechstägige Behandlung mit 0,5 % N,N-Dimethylformamid (DMF) zu neutrophilen Vorläuferzellen (DMF-PLB) differenziert.

Die DMF-PLB Zellen zeigten nach Differenzierung eine Zellzyklusverteilung mit 73,2 % \pm 1,5 Zellen in G₀/G₁ Phase, 18 % \pm 1,3 Zellen in S-Phase und 8,7 % \pm 0,3 Zellen in G₂/M Phase (verglichen zu 41,2 % \pm 2,4 Zellen in G₀/G₁ Phase, 37 % \pm 1,1 Zellen in S-Phase und 20,9 % \pm 1,3 Zellen in G₂/M Phase in der undifferenzierten Zellpopulation).

Exposition von den DMF-PLB Zellen zu 37° C - 43°C (für eine Stunde) führte im Gegensatz zu den undifferenzierten PLB-985 Zellen zu keiner Induktion von Apoptose (Abb. 1d).

Wärmeinduzierte Apoptose korreliert nicht mit der Proteinexpression von Bcl-2 und Bax

Um einen Einblick in das durch Wärme ausgelöste Apoptoseprogramm zu gewinnen, wurde die Expression von Proteinen der Bcl-2 Familie untersucht. Bcl-2, dessen Gen als Onkogen der t(14;18)-Translokation in follikulären Non-Hodgkin Lymphomen entdeckt wurde, war eines der ersten beschriebenen Signalmoleküle für Apoptose (Hockenberry et al. 1990). Mittlerweile sind mehrere Bcl-2 verwandte Proteine mit pro- (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Bid, Bik, Hrk) oder anti-apoptotischer (Bcl-2, Bcl-XI, Bcl-w, Brag-1, Mcl-1, A1) Wirkung beschrieben worden (zur Übersicht Krömer, 1997). Die Proteine der Bcl-2 Familie sind im Zytosol hauptsächlich aber in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. Durch veränderte Proteinexpression von pro- oder anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen (Yang und Korsmeyer, 1996) oder durch die Ausbildung bestimmter Heterodimere (Yin et al. 1994) – z. B. begünstigt durch Dephosphorylierung von Bad (Zha et al, 1996) – kann die Hemmung oder Auslösung von Apoptose beeinflusst werden. Bcl-2 Proteine sind u. a. in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. Dort beeinflussen sie die Mitochondrienfunktion sowie die Freisetzung von Cytochrom C aus dem intramitochondrialen Raum (Green und Reed, 1998).

Die Basalexpression von Bcl-2 und Bax in den PLB-985 Zellen unterschied sich nicht von der in den DMF-PLB Zellen (Abb. 3a). Zusätzlich konnte durch

Abb. 2: Zellzyklusverteilung nach Wärmeexposition von PLB-985 Zellen. PLB-985 Zellen wurden für eine Stunde mit Temperaturen zwischen 37° C und 43° C behandelt. Anhand von Propidiumjodid-Färbungen und durchflußzytometrischen Messungen wurde der prozentuale Anteil der Zellen in G₀/G₁ (a), S (b) und G₂/M Phase (c) bis zu 48 Stunden nach der Wärmeexposition bestimmt.

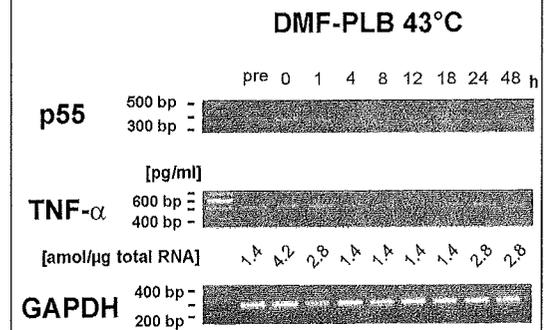
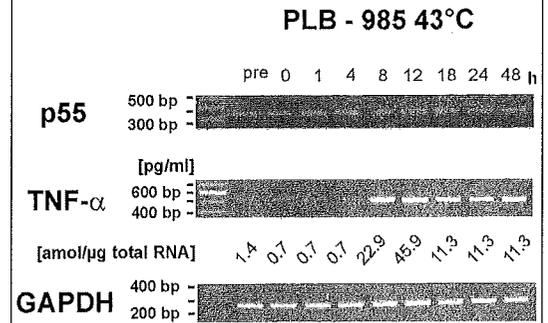
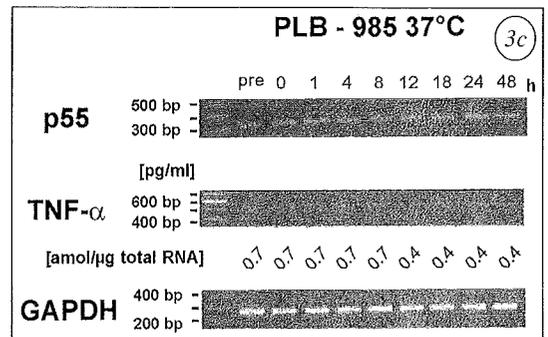
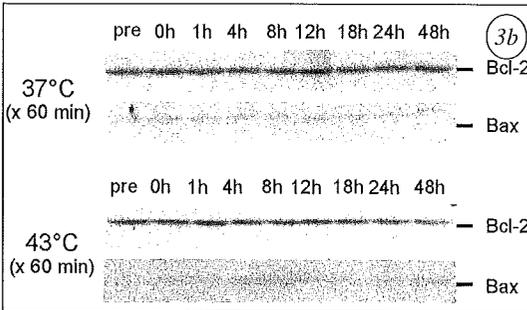
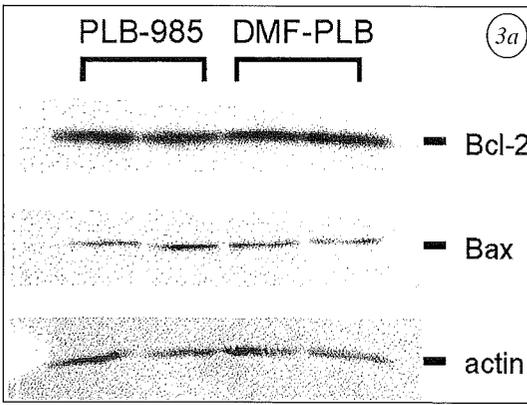


Abb. 3: Korrelation zwischen Bcl-2, Bax und Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) Expression mit der Induktion von temperaturinduzierter Apoptose. (a), Basal-Proteinexpression von Bcl-2 und Bax in PLB-985 verglichen mit DMF-PLB Zellen. (b), Bcl-2 und Bax Proteinexpression in Abhängigkeit von einer Exposition der PLB-985 Zellen zu 37° C oder 43° C (für eine Stunde). (c), Expression von p53, TNF α und Glycerinaldehydphosphatase (GAPDH) mRNA in Abhängigkeit von einer Exposition der PLB-985 oder DMF-PLB Zellen zu einer Temperatur von 37° C oder 43° C (für eine Stunde). Die Zahlen unter den TNF α Banden entsprechen den Ergebnissen der TNF α mRNA Quantifizierung mittels Polymerase Kettenreaktion.

Nachweis der Proteinexpression von Bcl-2 und Bax mittels Western blot Untersuchungen in Proteinextrakten von PLB-985 Zellen, die bis zu 48 Stunden nach Behandlung mit 37° C oder 43° C gewonnen wurden, eine veränderte Proteinexpression als Ursache für die temperaturabhängige Apoptose ausgeschlossen werden (Abb. 3b).

Induktion von Apoptose nach Wärmeexposition korreliert mit der endogenen TNF α Expression

Verbringt man PLB-985 Zellen für vier Stunden in Zellkulturüberstand von wärmebehandelten Zellen (43° C für eine Stunde), wird Apoptose induziert (Abb. 4a). Aus diesen Versuchen war auf das Vorhandensein

von „pro-apoptotischen Faktoren“ im Zellkulturüberstand in Abhängigkeit von einer Wärmeexposition zu schließen.

Einige Leukämiezellen wie auch die PLB-985 Zellen exprimieren spontan TNF α (Giri und Aggarwal, 1998). Die endogene Produktion dieses apoptotischen „Todesfaktors“ konnte durch die Wärmeexposition in den undifferenzierten PLB-985 Zellen deutlich gesteigert werden. Nach Behandlung mit 43° C (für eine Stunde) wurde mittels quantitativer RT-PCR Untersuchungen eine Induktion der TNF α mRNA Expression auf mehr als das 30fache des Ausgangswertes 12 Stunden nach der Temperaturbehandlung beobachtet (Abb. 3 c). Korrelierend zu den Apoptosebefunden wurde kein ver-

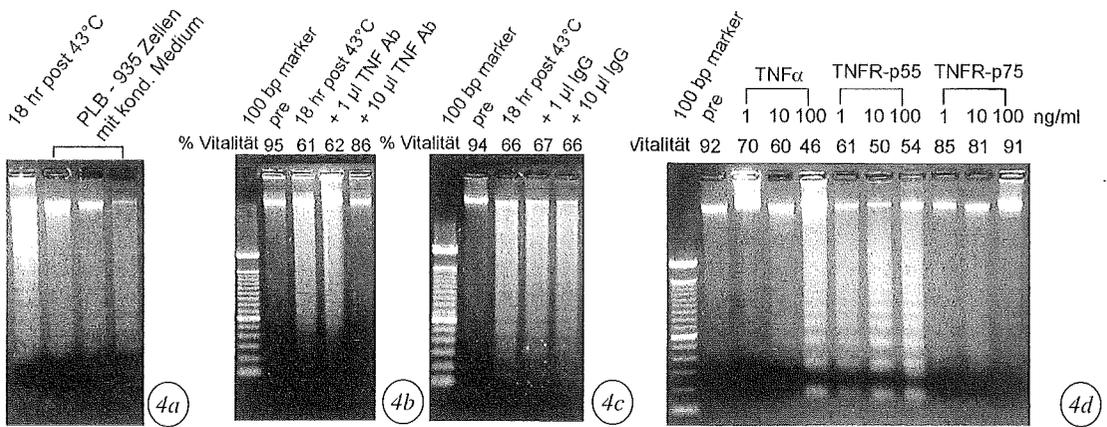


Abb. 4: Wärme induziert ein autokrines TNF α abhängiges Selbstmordprogramm in PLB-985 Zellen. (a), PLB-985 Zellen wurden für eine Stunde mit 43°C behandelt. 18 Stunden nach der Wärmeexposition wurde das Kulturmedium gewonnen (Konditioniertes Medium); anschließend wurden bis dahin unbehandelte PLB-985 Zellen mit dem konditioniertem Medium für 4 Stunden inkubiert. Sowohl aus den wärmebehandelten (Spur 1) als auch aus den mit konditioniertem Medium behandelten Zellen (Spur 2-4) wurde DNA extrahiert und elektrophoretisch in einem Agarose Gel untersucht. (b), PLB-985 Zellen wurden für eine Stunde zu Temperaturen von 37°C (Spur 2) oder 43°C (Spur 3) mit oder ohne Zugabe von 1 μ g (Spur 4) oder 10 μ g (Spur 5) neutralisierendem TNF α Antikörper exponiert (1 μ l neutralisierender TNF Antikörper entspricht 1 μ g). 18 Stunden nach der Wärmeexposition wurde DNA aus den Zellen extrahiert und elektrophoretisch in einem Agarose Gel untersucht. In (c), wurde das gleiche Experiment wie in b durchgeführt aber anstelle von neutralisierenden TNF α Antikörpern unspezifische IgG (1 μ l der IgG Antikörper entspricht 1 μ g) Kontrollantikörper verwendet. (d), PLB-985 Zellen wurden für vier Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Wildtyp TNF α oder den spezifischen p55 oder p75 Rezeptor Agonisten (TNF-R-p55 bzw. TNF-R-p75) behandelt. Anschließend wurde aus den Zellen DNA extrahiert und in einem Agarose Gel gelelektrophoretisch untersucht.

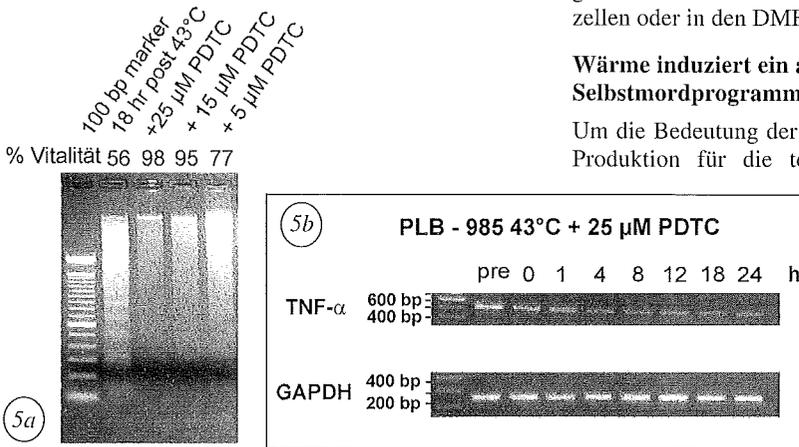


Abb. 5: Pyrrolidinedithiocarbamat (PDTC) verhindert temperaturinduzierte Apoptose in PLB-985 Zellen. (a), PLB-985 Zellen wurden für eine Stunde zu einer Temperatur von 43°C (Spur 2) mit oder ohne Zugabe von 25 μ M (Spur 3), 15 μ M (Spur 4) oder 5 μ M (Spur 5) PDTC exponiert. 18 Stunden nach der Wärmeexposition wurde DNA aus den Zellen extrahiert und elektrophoretisch in einem Agarose Gel untersucht. (b), Expression von Tumornekrose Faktor α mRNA in Abhängigkeit von einer Exposition der PLB-985 Zellen zu einer Temperatur von 43°C (für eine Stunde) unter Zugabe von 25 μ M PDTC.

gleichbarer Effekt in den 37°C behandelten Kontrollzellen oder in den DMF-PLB Zellen gefunden.

Wärme induziert ein autokrines TNF α abhängiges Selbstmordprogramm in PLB-985 Zellen

Um die Bedeutung der gesteigerten endogenen TNF α Produktion für die temperaturabhängige Apoptose funktionell zu charakterisieren, wurden PLB-985 Zellen mit 43°C unter Zugabe von neutralisierenden TNF α Antikörpern behandelt. Diese Kombination führte zu einer deutlichen Abschwächung der Apoptose (Abb. 4 b), während durch die Zugabe von unspezifischen IgG An-

tikörpern zur Wärmebehandlung die Initiierung von Apoptose nicht beeinflusst wurde (Abb. 4 c). Zusätzlich konnte durch Pyrrolidinedithiocarbamat (PDTC), einem Hemmstoff der TNF α Produktion (Schreck et al. 1992), die temperaturabhängig gesteigerte TNF α Expression verhindert werden (Abb. 5 b). Parallel dazu wurde durch die Kombination von PDTC und 43° C die temperaturinduzierte Apoptose deutlich abgeschwächt (Abb. 5 a). Diese Befunde deuten darauf hin, daß temperaturabhängig autokrin wirksames TNF α von den PLB-985 Zellen gebildet wird, das für die Initiierung des Apoptoseprogramms verantwortlich ist.

Behandlung von PLB-985 Zellen mit exogen zugegebenem TNF α bestätigte die Suszeptibilität der Zellen gegenüber diesem Apoptosestimulus (Abb. 4 d). Zusätzlich konnte durch die Behandlung mit TNF RI (p55) und TNF RII (p75) selektiven Agonisten (Loetscher et al. 1993, van Ostade et al. 1993) gezeigt werden, daß TNF α -induzierte Apoptose in den PLB-985 Zellen über eine Ligandenbindung mit dem p55 Rezeptor vermittelt wird (Abb. 4 d), was mit den Ergebnissen von anderen Untersuchern übereinstimmt (Chainy et al. 1996, Haridas et al. 1997). Die konstitutive Expression des p55 Rezeptors konnte auf mRNA Ebene in den PLB-985 Zellen dargestellt werden. Außerdem wurde eine Modulation der p55 mRNA Expression durch eine Exposition zu 43° C ausgeschlossen (Abb. 3 c).

Eine TNF α vermittelte endogene Suicidwirkung ist auch für andere Zellmodelle beschrieben worden. Nach Stimulation von NK-Zellen mit Interleukin (IL)-12 und IL-15 wurde die Initiierung von Apoptose in Abhängigkeit von einer endogenen gesteigerten TNF α Expression beobachtet (Jewett et al. 1997, Ross und Caliguri, 1997).

TNF α -induzierte Apoptose wird, wie in unserem Modell für die PLB-985 Zellen bestätigt, in der Regel durch eine extrazelluläre Bindung von TNF α an den transmembranären p55 TNF Rezeptor (TNF RI) eingeleitet. Die Liganden-Rezeptorbindung bewirkt eine Anlagerung von verschiedenen Signalmolekülen an die intrazelluläre „death domain“ wie z. B. FADD (Fas-associated protein with death domain), TRADD (TNFR I associated death domain protein) oder RIP (receptor interacting protein) [Boldin et al. 1995, Hsu et al. 1995, Stanger et al. 1995]. Als Folgereaktion der Rekrutierung von den verschiedenen Vermittlermolekülen werden „Interleukin-1 converting enzyme“-artige Proteasen (Caspasen) entweder direkt (z. B. Caspase 8) oder über eine gesteigerte Produktion von Ceramid (z. B. Caspase 2) aktiviert (Medema et al. 1997, Adam et al. 1996, Schwandner et al. 1998). Mittlerweile sind zehn verschiedene Caspasen identifiziert worden (Alnemri et al. 1996). Interaktion mit nur einer Initiatorcaspase führt zur wechselseitigen Aktivierung. Im aktiven Zustand katalysieren Caspasen die Frag-

mentierung von Enzymen wie der Poly (ADP-ribose) Polymerase, aber auch von Proteinen des Zell-Stützgerüsts und der DNA über eine Aktivierung einer DNase (Janicke et al, 1998, Sakahira et al, 1998, Enari et al, 1998). Dies führt zu den typischen morphologischen und biochemischen Charakteristika von apoptotischen Zellen. Neben dieser pro-apoptotischen Signalübertragung wird durch die Bindung von TNF α an den p55 Rezeptor zusätzlich über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B die Expression von anti-apoptotischen Proteinen, wie das erst kürzlich entdeckte IEX-1 $_L$, gesteigert (Wu et al 1998). Die Balance zwischen den pro- und anti-apoptotischen Signalwegen entscheidet über die Auslösung von TNF α -induzierter Apoptose. Gegenstand derzeitiger Untersuchungen ist es aufzuklären, über welche der beschriebenen intrazellulären Vermittlermoleküle das autokrine TNF α Apoptoseprogramm in den PLB-985 Leukämiezellen nach Wärmeexposition eingeleitet wird.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß ab einer Schwellentemperatur von 42° C Apoptose in Leukämiezellen induziert werden kann. Erhöhte Temperaturen sind klinisch als klassisches Symptom eines „Tumorfiebers“ zu beobachten. Therapeutisch werden erhöhte Temperaturen in Form von lokaler oder Ganzkörper-Hyperthermie klinisch gezielt für die Antitumorbehandlung eingesetzt (Feyerabend et al. 1997, Robins et al. 1992). Es gilt zu prüfen, inwieweit temperaturinduzierte spezifische Effekte zur Beeinflussung der Apoptose in undifferenzierten im Vergleich zu differenzierten Zellen im Rahmen von therapeutischen Konzepten wie z. B. der Aufreinigung von Knochenmarksproben im Rahmen von autologen Knochenmarkstransplantationen in der Tumorbehandlung genutzt werden können (Robins et al. 1984).

Danksagung:

Mein Dank gilt Frau S. Schindler für hervorragende technische Assistenz und Frau G. Fletschinger für grafische Arbeiten. Ich danke Frau B. Nürnberg für ihre Hilfe bei der Erstellung des Manuskripts.

Literatur

1. Adam D, Wiegmann K, Adam-Klages S, Ruff A, Kroenke M. A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway. *J Biol Chem* 1996;271:14617-14622
2. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yun J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87:174
3. Barinaga M. Death by a dozen of cuts. *Science* 1998;280:32-34
4. Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 1995;270:7795-7798

5. Chainy GBN, Singh S, Raju U, Aggarwal BB. Differential activation of the nuclear factor- κ B by TNF muteins specific for the p60 and p80 TNF receptors. *J Immunol* 1996;157:2410-2417
6. Darzynkiewicz Z, Li X, Gong J. Assays of cell viability: discrimination of cell dying by apoptosis. *Methods in Cell Biol* 1994;41:15-38
7. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43-50
8. Feyerabend T, Steeves R, Wiedemann GJ, Richter E, Robins HI. Rationale and clinical status of local hyperthermia, radiation, and chemotherapy in locally advanced malignancies. *Anticancer Res* 1997; 17:2895-2897.
9. Frede S, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin 1 β and phorbol ester induce tumor necrosis factor α production in α hepatic cell line (HepG2). *Pfluegers Arch* 1996;431: 923-927
10. Giri DK, Aggarwal BB. Constitutive activation of NFK κ B causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma HuT 78 cells. *J Biol Chem* 1998;273:14008-14014
11. Green DR, Reed JC. *Science* 1998;281:1309-1312
12. Haridas V, Darnay BG, Natarajan K, Heller R, Aggarwal BB. Overexpression of the p80 receptor leads to TNF dependent apoptosis nuclear factor- κ B activation and c jun kinase activation. *J Immunol* 1997; 160:3152-3162
13. Hockenberry D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer S. Bcl-2 is an inner mitochondrial protein that blocks programmed cell death *Nature (London)* 1990;348:334-336
14. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1 associated protein TRADD signals cell death and NFK κ B activation. *Cell* 1995;81:495-504
15. Hug H, Strand S, Grambihler A, Galle J, Hack V, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Reactive oxygen species intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells. *J Biol Chem* 1997;272:28191-28193
16. Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273: 9357-9360
17. Jewett A, Cavalcanti M, Bonavida B. Pivotal role of endogenous TNF α in the induction of functional inactivation and apoptosis in NK cells. *J Immunol* 1997;159:4815-4822
18. Karnovsky MJ. Cytochemistry and reactive oxygen species: a retrospective. *Histochemistry* 1999;80:104-109
19. Katschinski DM, Robins HI. Hyperthermic modulation of SN-38 cleavable complex formation and cytotoxicity through altered topoisomerase I activity. *Int J Cancer* 1999; 80: 104-109
20. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. A basic phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1999;80:104-109
21. Kroemer G. The proto oncogen Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Medicine* 1997;3:614-620
22. Loetscher H, Stueber D, Banner D, Mackay F, Lesslauer W. Human tumor necrosis factor- α (TNF- α) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors. *J Biol Chem* 1993;268:26350-26357
23. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. FLICE is activated by association with the CD95 death inducing signaling complex. *EMBO J* 1997; 16:2794-2804
24. Nagata S. Apoptosis by death factors. *Cell* 1997;88:355-365
25. Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature* 1998;396: 119-122
26. Robins HI, Cohen JD, Neville AJ. Whole body hyperthermia: biological and clinical aspects. Springer Verlag M Gautherie (Ed.) 1992
27. Robins HI, Dennis WH, Steeves RA, Sondel RA. A proposal for the addition of hyperthermia to treatment regimens for acute and chronic leukemia. *J Clin Oncol* 1984;2: 1050-1056
28. Ross ME, Caliguri MA. Cytokine induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. *Blood* 1997;89:910-918
29. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998;391:96-99
30. Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Baeuerle PA. Dithiocarbamate as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med* 1992;175:1181-1194
31. Schwandner R, Wiegmann K, Bernado K, Kreder D, Kroenke M. TNF receptor death domain associated proteins TRADD and FADD signals activation of acid sphingomyelinase. *J Biol Chem* 1998;273:5916-5922
32. Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. RIP: a novel protein containing a death domain interacts with Fas/APO1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 1995;81:513-523
33. Takasu T, Lyons JC, Park HJ, Song CW. Apoptosis and perturbation of cell cycle progression in an acidic environment after hyperthermia. *Cancer Res* 1998;58:2504-2508
34. Van Ostade X, Vandenabeele P, Everaerd T, Loetscher H, Gentz R, Brockhaus M, Lesslauer W, Tavenier J, Brouckaert P, Fiers W. Human TNF mutants with selective activity on the p55 receptor. *Nature* 1993;361:266-269
35. Wu MX, Ao Z, Prasad KV, Wu R, Schlossmann SF. IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappa B-mediated cell survival. *Science* 1998;281:998-1001
36. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* 1996;88:386-401
37. Yin XN, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 1994;369:321-323
38. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer S. Serine phosphorylation of death agonist Bad in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BclXL. *Cell* 1996;87:619-628

Die Rolle von Komplement in Immunantwort und Toleranz

S. Goerg¹ und M.C. Carroll²

Das Komplementsystem ist ein integrativer Bestandteil des Immunsystems. Ausgehend von Immunkomplexen, bestehend aus Antigen und Antikörpern wie IgM oder IgG, kann das Komplementsystem über die Komplementfaktoren C1, C4, C2 durch Bildung der klassischen C3-Konvertase aktiviert werden. Alternative Aktivierungsmechanismen beinhalten die spontane Autokatalyse von Komplement C3 (tick over), unter Einbeziehung des Faktors B, der die alternative C3-Konvertase stabilisiert. Ein weiterer neu entdeckter Aktivierungsweg erfolgt über Mannose bindendes Lektin. Aktiviertes C3b induziert die weiteren Komplementfaktoren C5 - C9 unter Bildung des Membranangriffskomplexes, der durch Porenbildung eine Zyto- oder Bakteriolyse hervorrufen kann (Abb. 1). Im Verlauf einer Komplementaktivierung können Komplementspaltprodukte wie C3a und C5a als Anaphylatoxine einerseits die Vasopermeabilität, andererseits die Chemotaxis von Leukozyten beeinflussen und über C5a-Rezeptoren Mastzellen aktivieren. Komplementspaltprodukte, die an bakteriellen Oberflächen angelagert sind, können über die Komplementrezeptoren CR3 und CR4 die Phagozytose unterstützen, und Komponenten des klassischen Aktivierungsweges wie C1, C4, oder C2 sind an Transportmechanismen von Immunkomplexen beteiligt. Regulatorische Proteine können die Komplementkaskade an verschiedenen Stufen inhibieren und kommen sowohl im Serum als auch zellgebunden vor.

Neben dem Einfluß auf das angeborene Immunsystem, ist auch die erworbene humorale Immunantwort vom Komplementsystem beeinflusst. Sowohl die transiente Depletion von C3 vor einer Immunisierung (1), als auch der genetisch bedingte Mangel an Komponenten des klassischen Aktivierungsweges in Meerschweinchen (2,3), Hunden (4) oder des Menschen (5) führen zu einer reduzierten Antikörperproduktion. Die Regulation der Antikörperproduzierenden B-Zellen erfolgt über die Komplementrezeptoren CR1 und CR2 (CD35/CD21) (6). CD21/CD35 bilden zusammen mit CD81 und CD19 den B-Zell-Korezeptorkomplex (Abb. 1). Die Komplementrezeptoren binden die Liganden C3d oder C4d, und CD19 ist aufgrund seines intrazytoplasmatischen Molekülbereichs für die Signaltransduktion verantwortlich (7,8). Antigene können an membranständigen Immunglobulinen (B-Zell-Rezeptoren

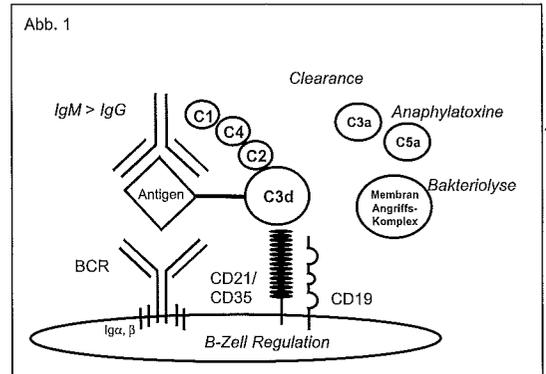


Abb. 1: Funktionen des Komplementsystems

(BCR)) spezifisch binden und über Ig α und Ig β B-Zellen aktivieren. Immunkomplexe aus spezifischem Antigen und Komplement C3d können B-Zell-Rezeptoren und CD21/CD35 kreuzvernetzen und so zu einer synergistischen Aktivierung von B-Zellen führen (9).

CD21/CD35 werden in der Maus von nur einem Gen (Cr2) kodiert und durch alternatives Splicen generiert (10). Defizienz von Cr2 führt daher zu einem Mangel an CD21 und CD35. Für die B-Zell-Regulation scheint jedoch CD21 wichtiger zu sein als CD35, da die Rezeptorblockade durch Injektion von monoklonalen Antikörpern nur mit Anti-CD21 zu einer reduzierten Immunantwort führte (11).

Um die Bedeutung von Komplement als Ligand für CD21/CD35 in Immunantwort und Toleranz zu untersuchen, wurden Mäuse generiert, die entweder defizient für Komplement C4, C3 oder CD21/CD35 waren (C4^{null}, C3^{null} oder Cr2^{null}, Komplement normale Tiere als Kontrolle = C⁺). Komplementdefiziente Mäuse, die in einer keimarmen Umgebung aufwachsen, haben eine normale Lebenserwartung und zeigen lediglich eine leicht reduzierte Immunglobulinsynthese, insbesondere für die Subklassen IgG 2a, IgG 2b und IgG 3. Die Immunisierung mit einem viralen Antigen (Lambdaphage 174) führte dagegen zu einer deutlich reduzierten Immunantwort in C4^{null}, C3^{null} oder Cr2^{null} Tieren (Abb. 2). Dies ist vergesellschaftet mit einer reduzierten Ausbildung von germinalen Keimzentren in Milz (Abb. 3a, b) und Lymphknoten (12-14). Germin-

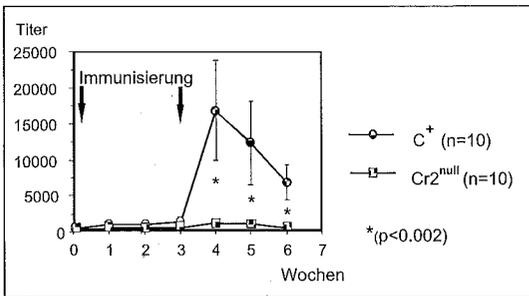


Abb. 2: Reduzierte humorale Immunantwort in Komplement Rezeptor defizienten Mäusen.

ale Keimzentren stellen den Ort der klonalen Selektion von B-Zellen dar, die durch Proliferation, Mutation, Selektion und Klassenswitch in der Lage sind, hochaffine Antikörper zu produzieren (15).

Die reduzierte Immunantwort in C3^{null} und Cr2^{null} Mäusen, kann durch eine Übertragung von Knochenmark von normalen Mäusen revidiert werden. Dabei zeigt es sich, daß bereits die lokale Produktion von geringen Mengen C3 durch Monozyten und Makrophagen ausreichend ist, um die Immunantwort wieder herzustellen (16).

Neben B-Zellen ist der Komplementrezeptor CD21 auf folliculär dentritischen Zellen (FDC) in der Milz und Lymphknoten exprimiert (17). FDC sind in der Lage, Immunkomplexe ohne weitere Prozessierung auf ihrer Oberfläche zu präsentieren (Trapping). Die Deposition von Immunkomplexen auf FDC führt zu einer Anreicherung von Antigenen und erlaubt so eine bessere Interaktion von Antigenen und B-Zellen. In C3^{null}, C4^{null}, Cr2^{null} Tieren ist dieses Trapping deutlich reduziert (Abb. 3c, d). (12). Dies zeigt, daß Komplementfaktoren C4 und C3 an der Bildung von Immunkomplexen beteiligt sind, und daß eine Bindung dieser Immunkomplexe über Komplementrezeptoren auf FDC stattfindet. Die Dekoration von Antigen mit C3d erlaubt die Bindung und Anreicherung an FDC, wo migrierende B-Zellen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit auf das Antigen treffen. Hier kann dann eine synergistische Aktivierung der B-Zelle durch Kreuzvernetzung von BCR und CD21/35 mit der Ausbildung von germinalen Zentren erfolgen. Auch wenn weitere Faktoren an der Aktivierung von B-Zellen *in vivo* beteiligt sind (z. B. T-Zell-Hilfe über CD40/CD40L, CD28/B7.2, Zytokine wie IFN γ oder IL-4), so sind die Komplementbestandteile C3, C4 bzw. die Komplementrezeptoren CD21/CD35 notwendig, um eine angemessene Immunreaktion gegenüber T-Zell-abhängigen Antigenen zu induzieren.

Um zu untersuchen, ob die reduzierte FDC-Lokalisation von Antigen oder aber die ausbleibende Stimulation von CD21/CD35 der B-Zelle für die ungenügende hu-

morale Immunantwort verantwortlich ist, wurden B-Zellen von anti-HEL Mäusen auf normale Mäuse übertragen. Anti-HEL Mäuse sind transgen (tg) für einen hochaffinen Antikörper gegen Hen Egg Lysozyme (anti-HEL). Transferiert man solche tg anti-HEL B-Zellen in Tiere, die mit HEL vorimmunisiert sind, so können die tg Zellen mit autochtonen B-Zellen im germinalen Zentrum kompetitiv interagieren. Tg B-Zellen, deren Komplement Rezeptoren fehlen, können dagegen nach dem adoptiven Transfer in normale Tiere nicht mehr erfolgreich um die Nischen im germinalen Zentrum konkurrieren und sterben ab (Abb. 3e, f). Da in diesem Experiment die Rezipienten gleich behandelt wurden, der Unterschied zwischen den zwei Gruppen lediglich im Rezeptormangel der transferierten B-Zellen lag, scheint CD21/CD35 auf B-Zellen unverzichtbar für eine erfolgreiche Immunantwort gegenüber fremden Antigenen zu sein (18).

Die Bedeutung der Komplementkomponenten des klassischen Aktivierungsweges bei Immunreaktionen gegen Fremdatigene läßt folgern, daß auch beim Kontakt von B-Zellen mit Selbstantigenen das Komplementsystem involviert ist. Da eine angemessene Immunreaktion gegen Selbstantigene als Toleranz verstanden werden kann, wurden zwei Toleranzmodelle an Komplementdefizienten Tieren überprüft. Zunächst wurden C4^{null} und Cr2^{null} defiziente Mäuse mit C57/B16 *lpr/lpr* Tieren gekreuzt. *Lpr*-Mäuse haben eine spontane Mutation innerhalb des FAS-Apo1-CD95-Gens. CD95 ist ein Rezeptormolekül, welches für die Induktion eines Apoptoseweges verantwortlich ist (20). Der Defekt von CD95 prädisponiert zu Lymphoproliferation und zur Produktion von Autoantikörpern gegen nukleäre Antigene und ds-DNA unter Ausbildung einer Glomerulonephritis (21). *Lpr*-Mäuse werden daher als Modell für den Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) akzeptiert. Während C57/B16 *lpr/lpr* Tiere in der Regel nur eine milde Erkrankung entwickeln, wird diese durch den Mangel von Komplement C4 oder den Komplementrezeptoren CD21/CD35 dramatisch attenuiert. C4^{null} *lpr/lpr* und Cr2^{null} *lpr/lpr* Tiere haben signifikant höhere IgG Autoantikörper Titer gegen nukleäre Antigene. In Übereinstimmung mit erhöhten ANA-Titern sezernieren C4^{null} *lpr/lpr* und Cr2^{null} *lpr/lpr* Mäuse signifikant mehr Autoantikörper gegen ds-DNA (Abb. 4). Die pathologische Konsequenz von zirkulierenden Autoantikörpern ist beim SLE die glomeruläre Deposition von Immunkomplexen, die zu einer Nephritis und Niereninsuffizienz führen kann. Die Untersuchung von renalen Gefrierschnitten zeigt eine gesteigerte Ablagerung von IgG in den Glomerula von Cr2^{null} und C4^{null} *lpr/lpr* Mäusen, verglichen mit C⁺ *lpr/lpr* Mäusen (Abb. 5a, b, c). Daneben werden in Übereinstimmung mit der Deposition von IgG verstärkte Zeichen einer Inflammation, wie Hyperzellularität und Membranverdickun-

gen beobachtet. Obwohl mehr Immunkomplexe in Komplement defizienten Tieren gebildet und in der Niere deponiert werden, können diese nicht an FDC der Milz abgelagert werden, wie mit anti-C3 Antikörpern gezeigt wurde (**Abb. 6a, b, c**). Dies belegt erneut, daß für das trapping von Immunkomplexen an FDC Komplement notwendig ist, andererseits wird hierdurch eine Auseinandersetzung von B-Zellen mit Selbstantigenen erschwert und könnte Ursache für eine fehlende negative Regulation sein. Insgesamt haben $C4^{null}$ oder $Cr2^{null} lprlpr$ Mäuse ein attenuiertes SLE-ähnliches Krankheitsbild, hervorgerufen durch höhere Konzentrationen an Autoantikörpern gegen nukleäre Antigene und dsDNA sowie einer gesteigerten glomerulären Deposition von Immunkomplexen (19).

Die Bedeutung von Komplement für die Toleranzentwicklung von selbstreaktiven B-Zellen wurde in einem weiteren Mausmodell getestet. Mäuse, die transgen (tg) für ein Antigen (soluble Hen Egg Lysozyme (sHEL)) und transgen für ein hochaffines HEL spezifisches Immunglobulin vom IgM-Typ sind (anti-HEL/sHEL Tiere), zeigen eine spezifische Toleranzentwicklung der tg anti-HEL B-Zellen (22). Die Toleranzinduktion durch lösliches HEL-Antigen erfolgt bereits im Knochenmark, tg B-Zellen können dennoch in die Peripherie auswandern, allerdings mit einer deutlich reduzierten Lebensdauer. Weiterhin zeigen solche Zellen eine dramatisch erniedrigte Expression von membranständigen IgM. Ex vivo können diese B-Zellen nicht mehr durch HEL aktiviert werden, was durch eine reduzierte Kalziummobilisation oder eine reduzierte Expression von Aktivierungsmarkern wie CD86 gezeigt werden kann. Durch die reduzierte Lebenserwartung ist der Anteil von tg B-Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl in Milz und Lymphknoten stark vermindert, und immunhistologisch sind ebenfalls nur wenige tg B-Zellen nachzuweisen (**Abb. 7a**) (23). Die Gesamtheit dieser Phänomene wurde ursprünglich als Anergy bezeichnet, heute wird eher der Begriff Toleranzinduktion verwendet. Kreuzt man $Cr2^{null}$ -Tiere mit doppelt-transgenen anti-HEL/sHEL Tieren, so zeigt sich, daß tg B-Lymphozyten in einer erhöhten Frequenz insbesondere in der Mantelzone der weißen Pulpa der Milz (**Abb. 7b, c**), aber auch im Lymphknoten akkumulieren (**Tabelle 1**). Die Expression von CD23 als Marker für reife B-Zellen ist bei $Cr2^{null}$ tg B-Zellen, verglichen mit C^+ tg B-Zellen erhöht, und die Lebensspanne ist gesteigert. In C^+ -Tieren werden ca. 45 % der tg B-Zellen innerhalb einer Woche erneuert, in $Cr2^{null}$ -Tieren dagegen nur ca. 25 %. Ex vivo ist die Kreuzvernetzung des B-Zell-Rezeptors durch spezifisches HEL-Antigen in der Lage, intrazelluläres Kalzium zu mobilisieren und die Expression des Aktivierungsmarkers CD86 zu induzieren (**Tabelle 1**). Zusammen ergibt sich, daß die Toleranzinduktion in $Cr2^{null}$ -transgenen B-Zellen be-

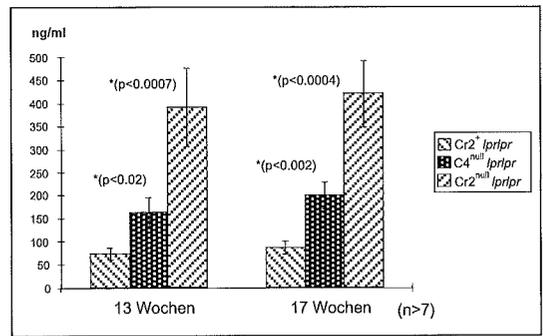


Abb. 4: Autoantikörper gegen dsDNA in lprlpr Mäusen.

reits im Knochenmark nur unzureichend erfolgt, die auswandernden B-Lymphozyten mit einer erhöhten Lebensspanne in Milz und Lymphknoten akkumulieren, sich zu reifen B-Zellen weiterentwickeln und normal durch das Kreuzvernetzen von B-Zell-Rezeptoren aktiviert werden können. Die Induktion von Toleranz in HEL-antiHEL Mäusen erfolgt daher nur unzureichend, wenn die Komplement Rezeptoren CD21/CD35 fehlen (19).

Da eine Kreuzung von anti-HEL Tieren mit $C4^{null}$ nicht möglich ist (beide Gene liegen auf dem gleichen Chromosom), wurden durch Knochenmarkstransplantation Chimären erzeugt. Dabei wurde Knochenmark von C^+ anti HEL Tieren auf C^+ sHEL oder $C4^{null}$ sHEL Rezipienten übertragen. Während C^+ sHEL Rezipienten die transplantierten tg B-Zellen in einen toleranten Zustand überführen konnten (reduzierte Anzahl, Lebensspanne, Aktivierbarkeit tg B-Zellen, Population von Milz und Lymphknoten (**Abb. 7**)), gelang dies den $C4^{null}$ sHEL Rezipienten nicht (**Tabelle 2**). Auch im an-

Abb. 3: Milz-Gefrierschnitte von C^+ (a, c und e) oder $Cr2^{null}$ (b, d und f) Mäusen. Darstellung von germinalen Keimzentren (braun) (a-f) und in blau B-Zellen (3a und 3b), an FDC deponierte Antigene (3c und 3d), transgene B-Zellen von C^+ (e) oder $Cr2^{null}$ (f) Donoren 5 Tage nach Transfer, jeweils in vorimmunisierte C^+ Rezipienten.

Abb. 5, 6, 7: C^+ jeweils repräsentiert in a, $Cr2^{null}$ in b und $C4^{null}$ in c.

Abb. 5: Nachweis von Immunkomplexen in Nieren-Gefrierschnitten von lprlpr Tieren mit anti-IgG-FITC.

Abb. 6: An FDC deponierte Immunkomplexe in lprlpr Mäusen, dargestellt mit anti C3 (blau), sowie germinale Keimzentren (braun).

Abb. 7: Drei Farben Immunhistochemie zum Nachweis von T-Zellen (CD3-braun), B-Zellen (B220-pink), sowie anti-HEL B-Zellen (HEL-blau) in Milzen von anti-HEL/sHEL Mäusen.

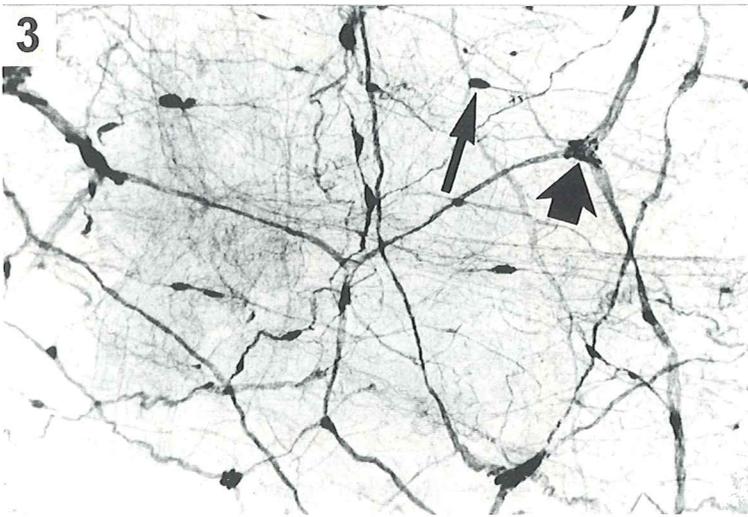


Abb. 3: Submuköse Plexus. Ganglien des Plexus submucosus externus (großer Pfeil) und internus (kleiner Pfeil) sind durch dünne Nervenfaserverstränge zu relativ zarten Nervengeflechten verbunden. Schichtpräparat, Kolon, PGP 9.5, x 60

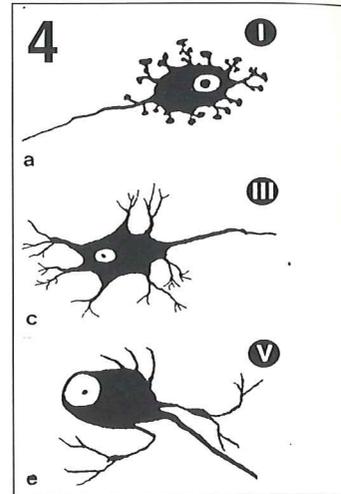


Abb. 4: Schema der Zytoarchitektur enterischer Nervenzellen (Typ I - VI) nach Silberimprägnation (nach Stach et al. 1989)

Abb. 9: Intestinale neuronale Dysplasie (IND). Submuköses Riesenganglion mit erhöhter Nervenzellanzahl ($n > 15$). PGP 9.5-immunreaktive Nervenzellen (rot, großer Pfeil) lassen sich deutlich von Gliazellen abgrenzen (blau, kleiner Pfeil). Nebenbefundlich *Melanosis coli* (Sternchen). Schnittpräparat, PGP 9.5, Hämalaun, x 600

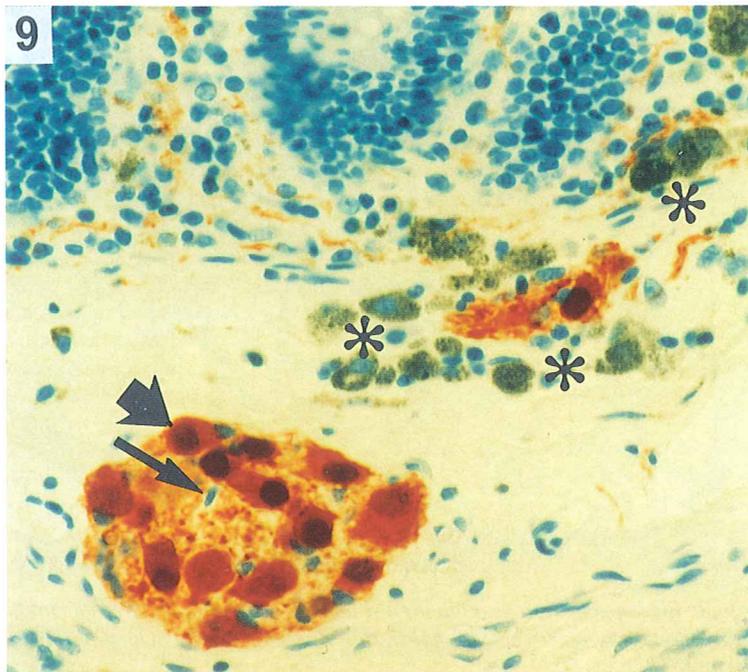
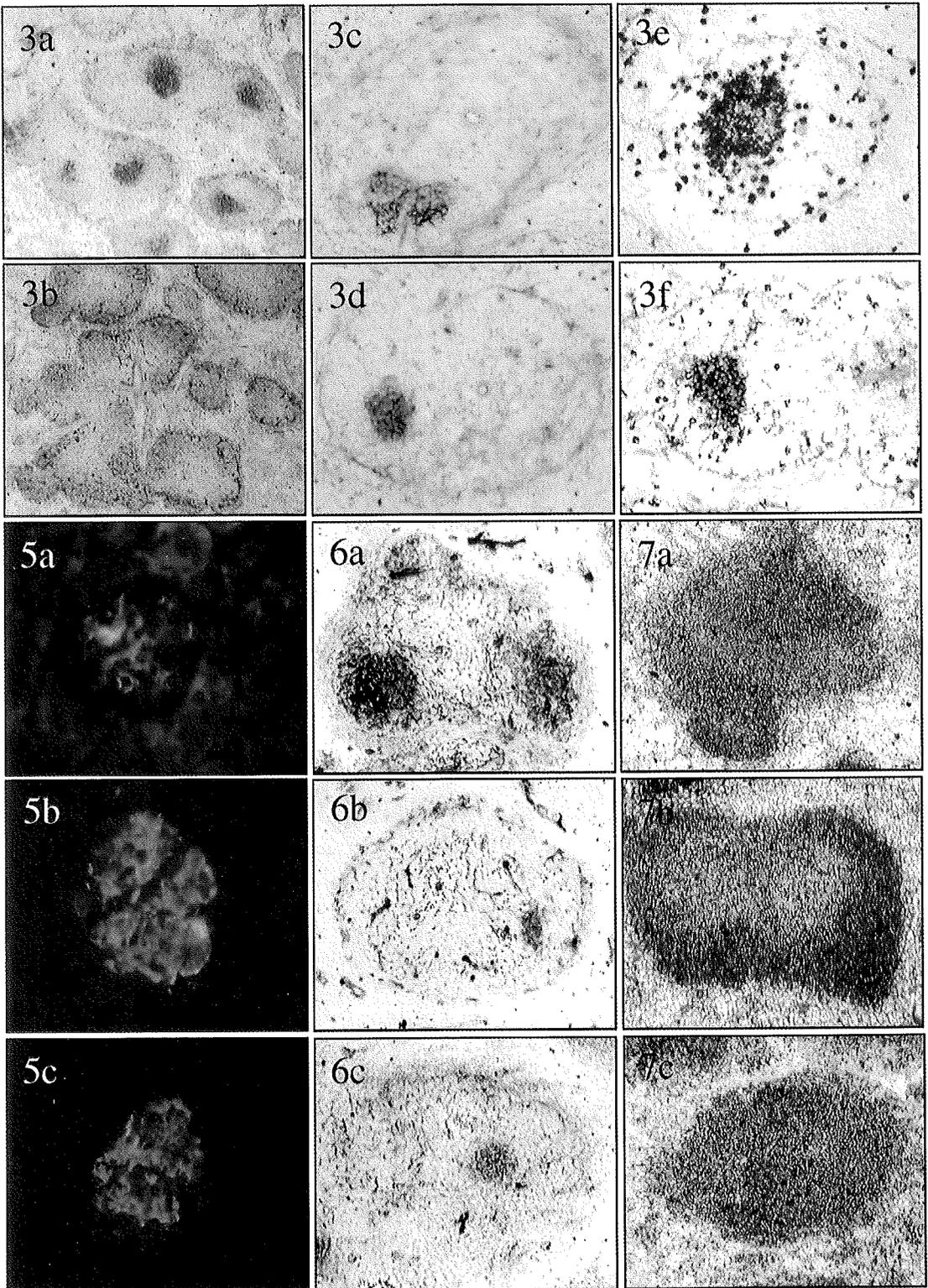


Abb. 7: Intestinale neuronale Dysplasie (IND). Submuköses Riesenganglion mit erhöhter Nervenzellanzahl. Schichtpräparat, Kolon, PGP 9.5, x 300

Abb. 8: Intestinale neuronale Dysplasie (IND). Verdickte und vermehrte Nervenfaserverstränge (Pfeile) im Plexus submucosus internus. Schnittpräparat, Kolon, PGP 9.5, Hämalaun, x 200



	HEL	Anzahl HEL ⁺ B-Zellen (x10 ⁶) in der Milz	Anzahl HEL ⁺ B-Zellen (x10 ⁵) im LK	Anzahl CD23 ⁺ HEL ⁺ B-Zellen (x10 ⁵) im LK	BrDU negative von HEL ⁺ Zellen im LK	ex vivo CD86 und B220 Expression nach HEL Stimulation von Milzzellen
C ⁺	none	23 +/- 5.7	10.0 +/- 1.9	5.3 +/- 0.9	76 %	15 %
Cr2 ^{null}	none	26 +/- 13.1	8.2 +/- 2.4	3.8 +/- 0.9	74 %	15.3 %
C ⁺	sHEL	25 +/- 9.1 a*	3.2 +/- 1.4 b*	0.5 +/- 0.3 c*	55 % d*	1.8 % e*
Cr2 ^{null}	sHEL	52 +/- 13.9 a*	8.2 +/- 2.5 b*	2.0 +/- 1.2 c*	75 % d*	11.1 % e*

(a* = p<0.0001), (b* = p<0.00007), (c* = p< 0.001), (d* = p < 0.0008), (e* = p<0.004)

Tab. 1: Rolle von CD21/CD35 im anti-HEL/sHEL Toleranz Modell

tiHEL/sHEL Modell zeigt sich zusammenfassend, daß Komplement C4 und die Komplementrezeptoren CD21/CD35 notwendig sind um Toleranz zu induzieren.

Insgesamt sieht man für Komplement defiziente Mäuse einen Immundefekt, der zu unangemessenen Reaktionen von B-Zellen gegenüber Antigenen führt. Während die angemessene Reaktion gegen ein fremdes Antigen zu einer Immunisierung führen sollte, erwartet man von einer angemessenen Reaktion gegen Selbstantigene Toleranz. Der Mangel an Komplement scheint daher zu einer Verschiebung der Schwellenwerte, die zwischen Ignoranz, Immunantwort und Toleranz entscheiden, zu führen. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit C1q defizienten Mäusen, die auch verstärkt zu Autoimmunphänomenen neigen (24). Andere Immundefekte wie der Mangel von CD45, (ein Tyrosinphosphatase Rezeptormolekül von B-Zellen) (23), resultierten ebenfalls in reduzierter Immunantwort gegenüber Fremd Antigen und geringerer Toleranzinduktion in einem Selbstantigen Modell. Da es verschiedene Mechanismen gibt, die zur Toleranz führen (Elimination, Rezeptor-Austausch, Fas und Antigen induzierte Apoptose) ist noch unklar, welcher am stärksten bei Komplementmangel inhibiert ist. Ob es einen weiteren, bislang unbekanntenen Komplement abhängigen Toleranzinduktionsweg gibt, soll in der Zukunft an der MUL untersucht werden.

Wichtig ist jedoch die Erkenntnis, daß ein lange bestehender Widerspruch beim Systemischen Lupus Erythematoses des Menschen geklärt werden konnte: Die Beobachtung, daß der Mangel an Komplementkomponenten des klassischen Aktivierungsweges einerseits zu Immundefizienz insbesondere gegenüber gramnegativen Erregern führt, gleichzeitig eine höhere Inzidenz für die Autoimmunerkrankung SLE auftritt. Die Reproduktion dieses Phänomens im Tiermodell erlaubt, die Mechanismen der Toleranzinduktion in Knochenmark, Lymphknoten und Milz besser zu verstehen und bietet die Option, neue therapeutische Verfahren für Autoimmunerkrankungen zu entwickeln.

Literatur

1. Pepys MB: Role of complement in induction of antibody production in vivo. Effect of cobra factor and other C3-reactive agents on thymus-dependent and thymus-independent antibody responses. J Exp Med 140:126-145, 1974
2. Ochs HD, Wedgwood RJ, Frank MM, Heller SR, Hosea SW: The role of complement in the induction of antibody responses. Clin Exp Immunol 53:208-216, 1983
3. Böttger EC, Metzger S, Bitter Suermann D, Stevenson G, Kleindienst S, Burger R: Impaired humoral immune response in complement C3-deficient guinea pigs: absence of secondary antibody response. Eur J Immunol 16:1231-1235, 1986
4. O'Neil KM, Ochs HD, Heller SR, Cork LC, Morris JM, Winkelstein JA: Role of C3 in humoral immunity. Defective

Rezipient		Anzahl HEL ⁺ B-Zellen (x10 ⁶) in der Milz	Anzahl HEL ⁺ B-Zellen (x10 ⁴) im LK	Anzahl CD23 ⁺ HEL ⁺ B-Zellen (x10 ⁴) im LK	ex vivo CD86 und B220 Expression nach HEL Stimulation von Milzzellen
C ⁺ none-HEL	(n = 9)	32 +/- 5.3	5.6 +/- 1.9	4.1 +/- 1.4	14.2 %
C4 ^{null} none-HEL	(n = 9)	26 +/- 5.2	7.2 +/- 2.2	4.3 +/- 1.3	14.9 %
C ⁺ sHEL	(n = 10)	10 +/- 2.8 a*	2.3 +/- 1.3 b*	0.5 +/- 0.3 c*	4.0 % d*
C4 ^{null} sHEL	(n = 10)	27 +/- 5.8	7.8 +/- 2.5	5.7 +/- 1.8	11.9 %

(a* = p<0.000001), (b* = p<0.0003), (c* = p< 0.0003), (d* = p < 0.02)

Tab. 2: Rolle von Komplement C4 im anti-HEL/sHEL Toleranz Modell. Tiere wurden 8 Wochen nach Transplantation von anti-HEL Knochenmark in sHEL Rezipienten untersucht.

- antibody production in C3-deficient dogs. *J Immunol* 140:1939-1945, 1988
5. Jackson CG, Ochs HD, Wedgwood RJ: Immune response of a patient with deficiency of the fourth component of complement and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 300:1124-1129, 1979
 6. Fearon DT, Ahearn JM: Complement receptor type 1 (C3b/C4b receptor; CD35) and complement receptor type 2 (C3d/Epstein-Barr virus receptor; CD21). *Curr Top Microbiol Immunol* 153:83-98, 1990
 7. Carter RH, Fearon DT: CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 256:105-107, 1992
 8. Rickert RC, Rajewsky K, Roes J: Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature* 376:352-355, 1995
 9. Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT: C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 271:348-350, 1996
 10. Molina H, Kinoshita T, Inoue K, Carel JC, Holers VM: A molecular and immunochemical characterization of mouse CR2. Evidence for a single gene model of mouse complement receptors 1 and 2. *J Immunol* 145:2974-2983, 1990
 11. Gustavsson S, Kinoshita T, Heyman B: Antibodies to murine complement receptor 1 and 2 can inhibit the antibody response in vivo without inhibiting T helper cell induction. *J Immunol* 154:6524-6528, 1995
 12. Ahearn JM, Fischer MB, Croix D, Goerg S, Ma M, Xia J, Zhou X, Howard RG, Rothstein TL, Carroll MC: Disruption of the Cr2 Locus Results in a Reduction in B-1a Cells in an Impaired B Cell Response to T-Dependent Antigen. *Immunity* 4:251-262, 1996
 13. Molina H, Holers VM, Li B, Fung Y, Mariathasan S, Goellner JS-S, J, Karr RW, Chaplin DD: Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3357-3361, 1996
 14. Fischer MB, Ma M, Goerg S, Zhou X, Xia J, Finco O, Han S, Kelsoe G, Howard RG, Rothstein TL, Kremmer E, Rosen FS, Carroll MC: Regulation of the B cell response to T-dependent antigens by classical pathway complement. *J Immunol* 157:549-556, 1996
 15. MacLennan IC: Germinal centers. [Review]. *Annu Rev Immunol* 12:117-139, 1994
 16. Fischer MB, Ma M, Hsu NC, Carroll MC: Local synthesis of C3 within the splenic lymphoid compartment can reconstitute the impaired immune response in C3-deficient mice. *J Immunol* 160:2619-2625, 1998
 17. Kinoshita T, Lavoie S, Nussenzweig V: Regulatory proteins for the activated third and fourth components of complement (C3b and C4b) in mice. II. Identification and properties of complement receptor type 1 (CR1). *J Immunol* 134:2564-2570, 1985
 18. Fischer MB, Goerg S, Shen L, Prodeus AP, Goodnow CC, Kelsoe G, Carroll MC: Dependence of germinal center B cells on expression of CD21/CD35 for survival. *Science* 280:582-585, 1998
 19. Prodeus AP, Goerg S, Shen L, Pozdnyakova OO, Chu L, Alicot EM, Goodnow CC, Carroll MC: A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. *Immunity* 9:721-731, 1998
 20. Adachi M, Watanabe-Fukunaga R, Nagata S: Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1756-1760, 1993
 21. Theofilopoulos AN, Dixon FJ: Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol* 37:269-390, 1985
 22. Goodnow CC, Crosbie J, Jorgensen H, Brink RA, Basten A: Induction of self tolerance in mature peripheral B lymphocytes. *Nature* 342:385-390, 1989
 23. Cyster JG, Healy JI, Kishihara K, Mak TW, Thomas ML, Goodnow CC: Regulation of B-lymphocyte negative and positive selection by tyrosine phosphatase CD45. *Nature* 381:325-328, 1996
 24. Botto M, Dell'Agnoia C, Bygrave AE, Thompson EM, Cook HT, Petry F, Loos M, Pandolfi PP, Walport MJ: Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies [see comments]. *Nat Genet* 19:56-59, 1998



Schütt & Grundei Sanitätshaus GmbH

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

Osterweide 2c
direkt gegenüber dem
Haupteingang der MÜZL

Lübeck: Königstraße/Ecke Wahnstr.
Fackenburger Allee 30 a
Osterweide 2c
Grapengießerstraße 21

Bad Schwartau: Lübecker Straße 12

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

SEIT ÜBER 25 JAHREN VERTRAGSPARTNER DER
MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Feld- und Hallenhockey: Eine ungefährliche Sportart?*

R. Jung, R. Traut, P. Dufek

Zusammenfassung

In einer retrospektiven Analyse wurden 130 Hockeyspieler/-innen (49 w / 81 m) aus sechs norddeutschen Hockeyvereinen nach Hockeyverletzungen und Sport-schäden befragt und nachuntersucht. Das Durchschnittsalter lag bei 23 / 27 Jahren (16 - 57 J.), die Spielpraxis bei 11/15 Jahren. Der Trainingsaufwand betrug 2 - 4 h pro Woche, es wurden 17/13 Spiele pro Feldsaison (25% Kunstrasen) und 16/14 Spiele pro Hallensaison absolviert.

Bei 3033 Verletzungen lag die Verletzungsinzidenz pro Spieler und Jahr bei 1,71 Verletzungen. Den Hauptanteil bildeten leichte Blessuren mit 92,6 %. Als schwerwiegend wurden 7,4 % der Verletzungen eingestuft, mit einer resultierenden Sportinvalidität in 3 Fällen. Die schweren Verletzungen zeigten eine Prävalenz für Kopf und Hände, wobei die untere Extremität ein breiteres Spektrum sowie eine größere Anzahl von Verletzungen aufwies. 63 % aller Verletzungen wurden durch Hockeyschläger oder -ball verursacht, 35 % entstanden ohne Fremdeinwirkung, 2 % durch direkten Gegnerkontakt.

Sekundäre Sportschäden traten nach Band- und Gelenkverletzungen bei 6 % der Spieler, als primäre Band- und Gelenkschäden bei 18 % auf. 43 % der Untersuchten gaben chronische Dorsalgien an. 6 Spieler erlitten beim Hockeyspielen einen Bandscheibenvorfall.

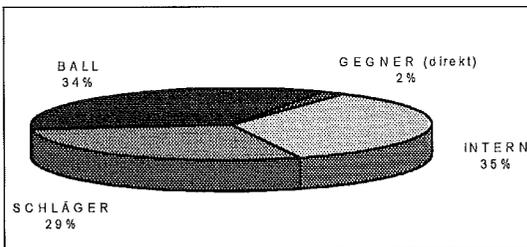


Abb. 1: Verletzungsursachen (n=3.033) – Hockey-schläger und -ball verursachen 2/3 aller Verletzungen.

* Ein zusammenfassender Artikel der an der Medizinischen Fakultät der Medizinischen Universität zu Lübeck angenommenen Dissertationsarbeit „Feld- und Hallenhockey: Belastung und Gefährdung des Bewegungsapparates durch Verletzungen und Sportschäden“

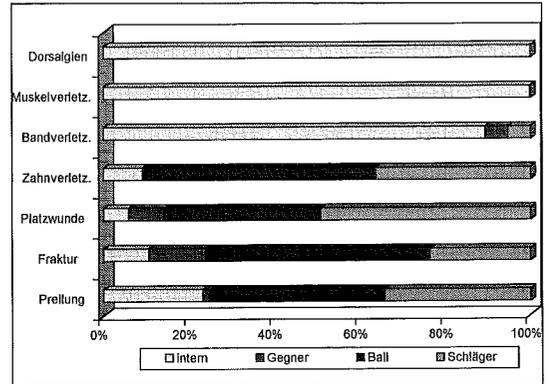


Abb. 2: Verletzungsverteilung nach Ursache je Verletzungstyp (n = 3.033) – Die Verletzungsursachen bedingen den Verletzungstyp. Exogene Anprelltraumata durch Hockeyschläger / -ball und endogene Überlastungsverletzungen ohne Fremdeinwirkung

Verletzungslokalisation

Im Verletzungsprofil stellten die schläger- und ballbedingten Traumata des Hand- und des Gesichtsbereiches eine hockeypische Gefährdung dar. Diese müssen als bestmöglich kontrollierbare Größe durch individuelle Protektoren (Bißkeile, Handschuhe, Schienbeinschoner) vermieden werden. Dieser Spieler trug bereits



Abb. 3: Verletzungslokalisation

während der Olympischen Spiele '72 eine Gesichtsmaske.

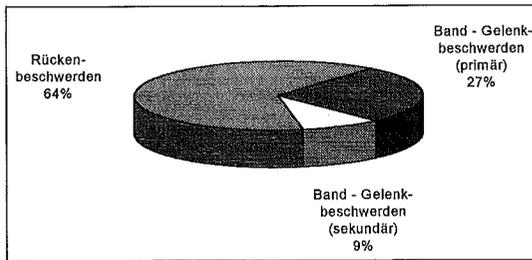


Abb. 4: Sportschäden beim Hockey (n = 81)

Diskussion

Unsere Studie zeigte einen Anteil an leichten Verletzungen von über 90 %. Dieses übertrifft die Angaben in der Literatur. Im Gegensatz zu früheren Studien wurde in unserer Arbeit die Gesamtsumme aller erlittenen Verletzungen erfaßt.

Die schweren Verletzungen zeigten eine Prävalenz für Kopf und Hände. Diese Verletzungen waren zumeist schläger- oder ballbedingt. Insbesondere die Platzwunden und Frakturen des Kopfes und der Hand sind als hockeypische Verletzungen einzustufen. Im Gegensatz zu den akzidentellen Kopfverletzungen werden Verletzungen von Hand und Fingern von den Sportlern als unvermeidlich in Kauf genommen.

Das gehäufte Auftreten von Bandscheibenvorfällen und die große Anzahl an hockeybedingten Rückenbeschwerden in der Probandengruppe deuten auf hohe Belastungen der Bewegungssegmente der Lendenwirbelsäule. Chronische Schäden sind hier nicht auszuschließen. Die Problematik von akuten Verletzungen oder chronischen Sportschäden der Wirbelsäule ist eine für den Hockeysport kontrovers geführte Diskussion. Unsere Studie zeigt eine signifikant erhöhte Anzahl an Rückenbeschwerden bei den Sportlern seit Aufnahme dieser Sportart. Als Erklärung für die hohe Zahl an Dorsalgien in unserem Untersuchungskollektiv kann eine nachgewiesene extreme Belastungszunahme auf die Bewegungssegmente der Lendenwirbelsäule bei unphysiologisch vorgeneigter Körperhaltung dienen.

Resumee

Der Hockeysport ist im Vergleich zu anderen Mannschaftsballsportarten eine relativ ungefährliche Sportart. Die Schnelligkeit des Spieles erfordert jedoch ein Höchstmaß an körperlicher Fitness und Konzentration zur Verhütung von Verletzungen. Schon durch die Berücksichtigung dieser notwendigen Voraussetzungen kann durch entsprechendes Training und Verhalten im Spielbetrieb die Verletzungsgefährdung gesenkt werden.

Hauptprotektion gegen Schläger- und Ballverletzungen muß in erster Linie die Vernunft des Gegenspielers sein. Dieses ist eine nicht erreichbare Prämisse im Wettkampf- und Leistungssport. Risikosituationen und akzidentelle Verletzungen können nur durch präventiv eingreifende Spielregeln und Körperprotektoren vermieden werden. Das Blocken mit flachgelegtem Schläger (Brettlegen) sollte als besondere Gefährdung für die Hände grundsätzlich verboten werden. Über eine Entschärfung gefährdeter Spielsituationen (Strafecke, kurze Ecke) muß nachgedacht werden.

Zukünftig muß eine intensivere Betreuung und Aufklärung der Spieler und Trainer von sportmedizinischer Seite gewährleistet werden, um Verletzungen schnell und adäquat zu therapieren und wenn möglich zu vermeiden.

Literatur

1. Fox N.: Risks in field hockey. In: T. Reilly (Hrsg.): Sports fitness and sports injuries. – 117, Faber and Faber Verl., London (1981)
2. Herrmann B., G. Eggers-Ströder, D. Steiner: Hallenhockey Verletzungen und Prävention. Sportverletzungen – Sportschäden 5, 85-89 (1991)
3. Leatt P., T. Reilly, J. D. G. Troup: Spinal loading during circuit weight-training and running. British Journal of Sports Medicine 20, 119-124 (1986)
4. Reilly T., A. Borrie: Physiology applied to Field hockey. Sports Medicine (Auckland) /1, 10-26(1992)
5. Reilly T., A. Seaton: Physiological strain unique to field hockey. Journal of Sports Medicine and Physical Fitness 30, 142-146 (1990).
6. Riel K.-A., N. Hampl, P. Bernett: Verletzungen im Damen- und Herrenhockey. Prakt. Sport-Traumatologie und Sportmedizin 4/ 90, 2 - 8 (1990)
7. Thelen E., D. Michel: Spezifische Verletzungen im Hockey. Dt. Zeitschrift für Sportmedizin 32/11, 281- 284 (1981).

Aus dem Institut für Anatomie¹ (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. W. Kühnel), der Klinik für Chirurgie² (Direktor: Prof. Dr. med. H.-P. Bruch) und der Klinik für Kinderchirurgie³ (Direktor: Prof. Dr. med. H. Halsband) der Medizinischen Universität zu Lübeck; IV. Medizinische Klinik⁴ (Direktor: Prof. Dr. med. M.V. Singer), Klinikum Mannheim der Universität Heidelberg

Das enterische Nervensystem: Von der Anatomie zur Klinik*

T. Wedel¹, R. Eggers¹, J. Gleiß², T. Schiedeck², H.-P. Bruch², W. Sigge³, H.-J. Krammer⁴

Zusammenfassung

Der Gastrointestinaltrakt verfügt über die größte Ansammlung von Nervenzellen außerhalb des Zentralnervensystems, die zusammen mit Gliazellen das enterische Nervensystem (ENS) bilden. Das ENS ist morphologisch gekennzeichnet durch Ganglien und Nervenfaserverstränge, die unterschiedlich geformte nervale Netzwerke in den Wänden des Gastrointestinaltrakts bilden. Die anatomische Topographie der Nervengeflechte innerhalb der Darmwand, die heterogene neuronale Zytoarchitektur und die Vielfalt der von den enterischen Nervenzellen synthetisierten Neurotransmitter sind Grundlage der funktionellen Komplexität des ENS. Auf der Basis intramuraler Reflexbögen vermittelt und koordiniert das ENS als „brain of the gut“ weitgehend unabhängig von zentralnervösen Einflüssen gastrointestinale Funktionen einschließlich Motilität. Zahlreiche Erkrankungen mit intestinalen Motilitätsstörungen im Kindes- und Erwachsenenalter beruhen auf qualitativen und quantitativen Veränderungen des ENS. Kolorektale Innervationsstörungen umfassen die intestinale Aganglionose (Morbus Hirschsprung), die Hypoganglionose, die intestinale neuronale Dysplasie (IND) sowie Ganglienheterotopien. Als isolierte oder kombinierte Formen können sie zur schweren chronischen Obstipation und zur Ausbildung eines Megakolon führen. Die histopathologische Diagnostik intestinaler Innervationsstörungen läßt sich mit enzym- und immunhistochemischen Methoden an Serienschritten oder Schichtpräparaten der Darmwand durchführen. Eine zuverlässige Befundung setzt genügend Darmwandgewebe sowie morphometrische Referenzwerte für unterschiedliche Kolonabschnitte und Altersgruppen voraus. Seit den anatomischen Erstbeschreibungen vor etwa 150 Jahren ist das ENS zunehmend in das Interesse der gastroenterologischen Grundlagenfor-

schung und Klinik gerückt. Ein interdisziplinärer Ansatz zur Erforschung des ENS schließt neben deskriptiver und quantitativer Morphologie neurophysiologische und molekulargenetische Untersuchungen ein, um neue Erkenntnisse zur Pathogenese, Diagnostik und Therapie intestinaler Innervationsstörungen zu gewinnen.

Summary

The gastrointestinal tract contains the largest amount of nerve cells outside the central nervous system constituting together with glial cells the enteric nervous system (ENS). The morphology of the ENS is characterised by ganglia and nerve fascicles forming differently shaped nervous networks within the walls of the gastrointestinal tract. The anatomical topography of the nerve plexus, the heterogeneous neuronal cytoarchitecture and the diversity of neurotransmitters synthesized by enteric nerve cells represent the basis for the functional complexity of the ENS. Based on intramural reflex pathways the ENS as the „brain of the gut“ mediates and coordinates virtually independent from central nervous influences gastrointestinal functions including motility. Numerous diseases associated with intestinal motility disorders in children and adults are caused by qualitative and quantitative abnormalities of the ENS. Colorectal innervation disorders involve intestinal aganglionosis (Hirschsprung's disease), hypoganglionosis, intestinal neuronal dysplasia (IND) and heterotopic ganglia. As isolated or combined forms they can lead to severe chronic constipation and to the formation of megacolon. The histopathological diagnosis is achieved by enzyme- and immunohistochemical methods applied to serial sections or whole-mount preparations of the intestinal wall. A reliable assessment requires sufficient disposal of intestinal tissue as well as morphometric reference values concerning the different colonic segments and age groups. Since the first anatomical descriptions approximately 150 years ago, the ENS has gained an increa-

* Herrn Professor Dr. med. Dr. h. c. Wolfgang Kühnel, Rektor der Medizinischen Universität zu Lübeck, anlässlich seines 65. Geburtstages gewidmet.

sing interest for the gastroenterological research and clinic. An interdisciplinary scientific approach to the ENS includes neurophysiological and moleculargenetical studies in addition to descriptive and quantitative morphology in order to achieve more detailed insights into the pathogenesis, diagnosis and therapy of intestinal innervation disorders.

Das enterische Nervensystem

Historisches

Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts schlug die „anatomische Geburtsstunde“ derjenigen Nerven, die den Verdauungstrakt vom Rachen bis zum Enddarm in Form von ganglionären Geflechtern durchziehen. Pioniere wie Georg Meissner („Über die Nerven der Darmwand“, 1857) und Leopold Auerbach („Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes“, 1864) lieferten mit den zur damaligen Zeit zur Verfügung stehenden histologischen Arbeitsmethoden anatomisch überzeugende Darstellungen und wurden so zu Namensgebern der intestinalen Nervengeflechte. Die detaillierten Zeichnungen von Alexander Dogiel (1899) stellten den ersten klaren Beleg dafür dar, daß die Nervenzellen der Darmwand keine einheitliche Zytoarchitektur aufweisen, sondern sich morphologisch unterschiedlichen Typen zuordnen lassen. Schließlich war es John Newport Langley (1900), der aufgrund seiner anatomischen und physiologischen Untersuchungen den Begriff „enteric nervous system“ als „third division of the autonomic nervous system“ prägte und damit die tradierte Vorstellung revidierte, daß die Nerven des Gastrointestinaltrakts lediglich Endstrecken des parasympathischen bzw. sympathischen Nervensystems sind.

Morphologie

Das enterische Nervensystem (ENS) läßt sich definieren als die Gesamtheit aller Nerven- und Gliazellen, die sich innerhalb des Gastrointestinaltrakts einschließlich Gallenblase und Pankreas befinden. Die auf etwa 100 Millionen bezifferte Anzahl enterischer Nervenzellen verdeutlicht, daß das ENS die größte Ansammlung von Nervenzellen außerhalb des Zentralnervensystems bildet [Furness und Costa 1987]. Morphologisch ist das ENS gekennzeichnet durch unterschiedlich geformte Ner-

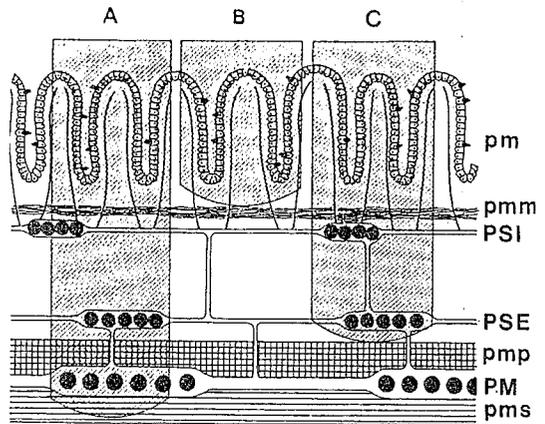


Abb. 1: ENS im transmuralen Querschnitt. Ganglionäre Nervengeflechte: Plexus myentericus (PM), Plexus submucosus externus (PSE) und internus (PSI). Nervengeflechte ohne Ganglien: Plexus muscularis superficialis (pms) und profundus (pmp), Plexus muscularis mucosae (pmm), Plexus mucosae (pm). Zur Beurteilung ganglionärer Plexus sind tiefe Biopsien (C, A) erforderlich.

vengeflechte, die die gesamte Darmwand in mehreren Ebenen durchziehen. Die darin eingelagerten Nervenzellen sind in Gruppen angeordnet und bilden die enterischen Ganglien, die durch Nervenfaserverstränge zu ganglionären Netzwerken verbunden sind (Abb. 1). Diese ganglionären Plexus befinden sich zwischen Ring- und Längsmuskulatur (Plexus myentericus) und

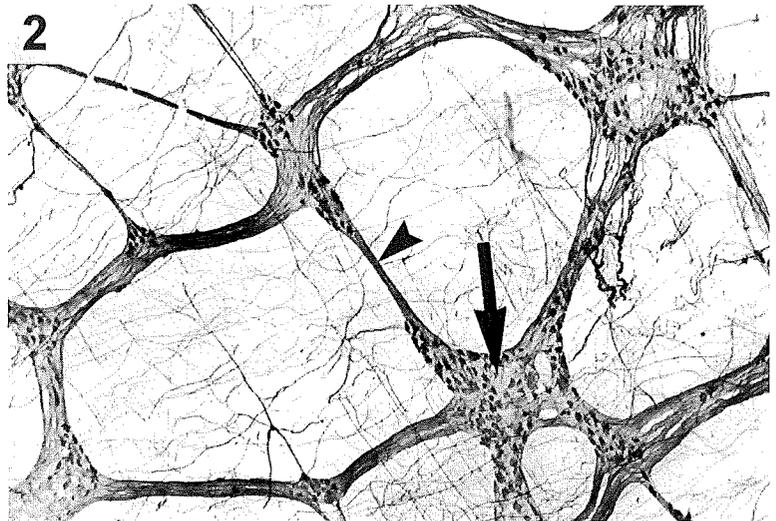


Abb. 2: Plexus myentericus. Ganglien (Pfeil) und Nervenfaserverstränge (Pfeilkopf) bilden ein regelrecht konfiguriertes Nervengeflecht. Schichtpräparat, Kolon, PGP 9.5, x 60

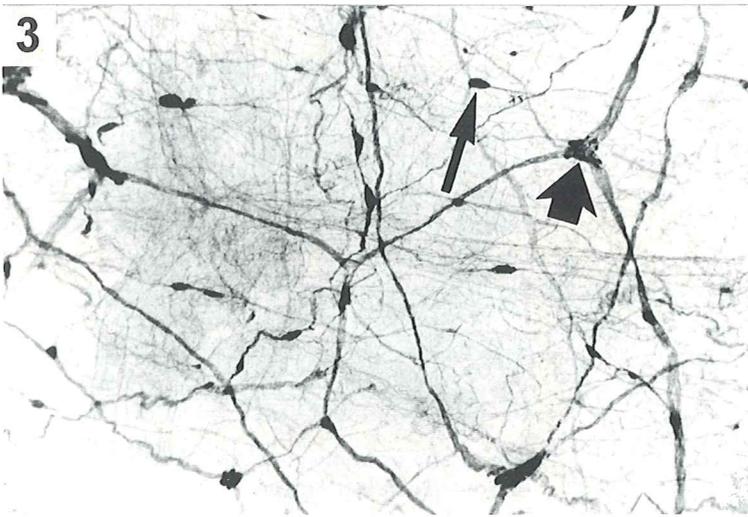


Abb. 3: Submuköse Plexus. Ganglien des Plexus submucosus externus (großer Pfeil) und internus (kleiner Pfeil) sind durch dünne Nervenfaserverstränge zu relativ zarten Nervengeflechten verbunden. Schichtpräparat, Kolon, PGP 9.5, x 60

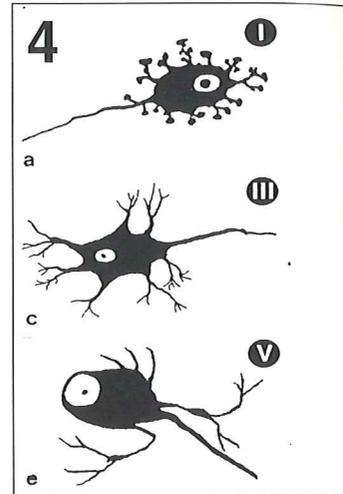


Abb. 4: Schema der Zytoarchitektur enterischer Nervenzellen (Typ I - VI) nach Silberimprägnation (nach Stach et al. 1989)

Abb. 9: Intestinale neuronale Dysplasie (IND). Submuköses Riesenganglion mit erhöhter Nervenzellanzahl ($n > 15$). PGP 9.5-immunreaktive Nervenzellen (rot, großer Pfeil) lassen sich deutlich von Gliazellen abgrenzen (blau, kleiner Pfeil). Nebenbefundlich *Melanosis coli* (Sternchen). Schnittpräparat, PGP 9.5, Hämalaun, x 600

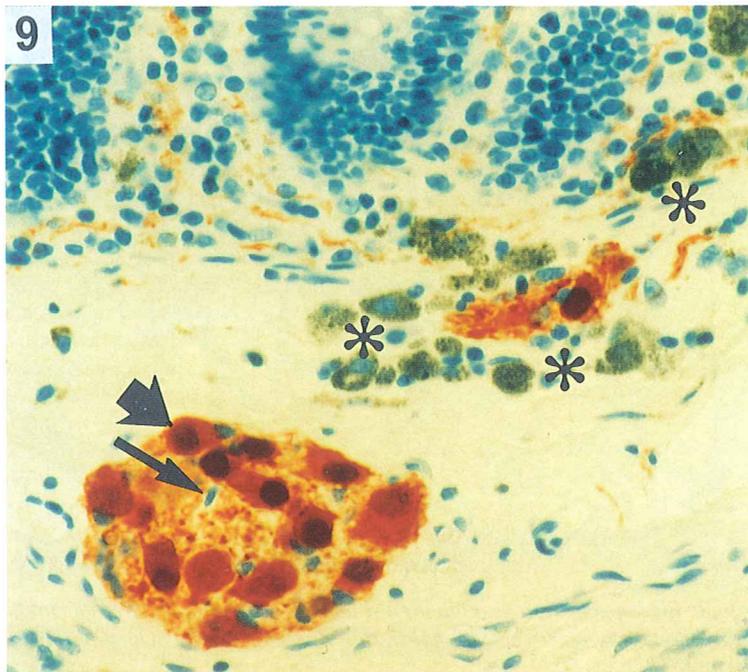


Abb. 7: Intestinale neuronale Dysplasie (IND). Submuköses Riesenganglion mit erhöhter Nervenzellanzahl. Schichtpräparat, Kolon, PGP 9.5, x 300

Abb. 8: Intestinale neuronale Dysplasie (IND). Verdickte und vermehrte Nervenfaserverstränge (Pfeile) im Plexus submucosus internus. Schnittpräparat, Kolon, PGP 9.5, Hämalaun, x 200

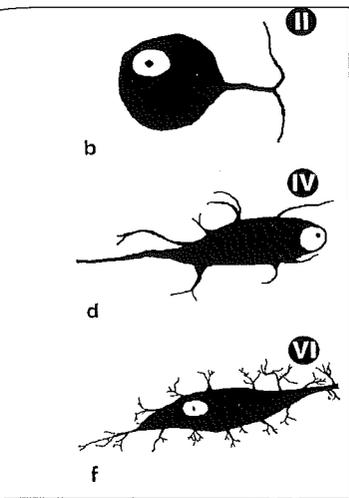


Abb. 5: Aganglionose. Prominente Nervenfasernstränge (Pfeile) durchziehen die Muskelloge in vorwiegend paralleler Verlaufsrichtung. Myenterische Ganglien fehlen vollständig. Schichtpräparat, Kolon, PGP 9.5, x 60

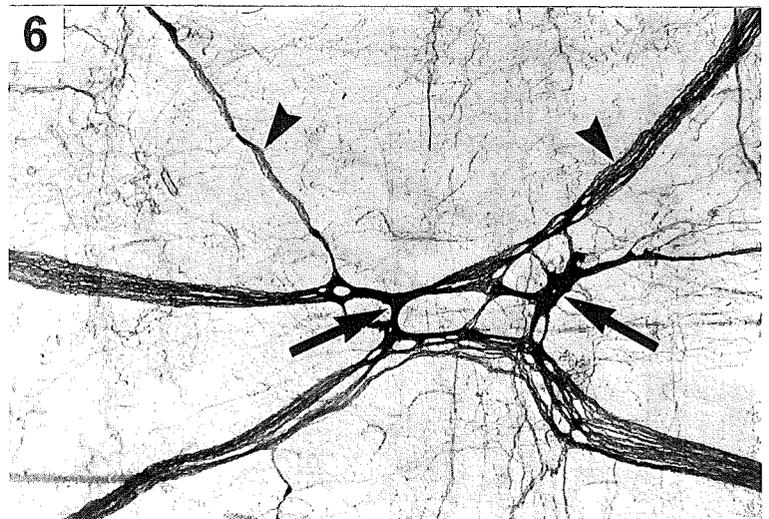
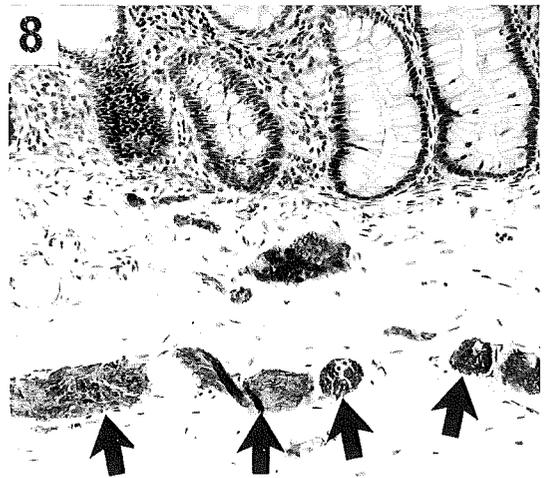


Abb. 6: Hypoganglionose. Der weitmaschige Plexus myentericus ist gekennzeichnet durch Rarefizierung der Nervenfasernstränge (Pfeilköpfe) und Ganglien (Pfeile). Schichtpräparat, Kolon, PGP 9.5, x 60



in verschiedenen Schichten der Submukosa (Plexus submucosus externus und internus) [Krammer et al. 1997]. Die komplexe Architektur und spezifische räumliche Anordnung lassen sich insbesondere anhand von Schichtpräparaten der Darmwand veranschaulichen; bei denen das ENS nicht im Querschnitt, sondern unter Wahrung der anatomischen Verhältnisse flächig zur Darstellung kommt (Abb. 2, 3). Neben ganglionären Plexus verfügen die einzelnen Darmwandschichten über Nervenfasergeflechte, die weitgehend nervenzellfrei sind und somit keine ganglionären Formationen enthalten (Abb. 1). Morphologischer Ausdruck der funktionellen Komplexität des ENS ist die Formenvielfalt der enterischen Nervenzellen. In Weiterführung der von Dogiel (1899) beobachteten zytoarchitektonischen Unterschiede etablierte Stach (1989) mit Hilfe von Silberungstechniken eine Typisierung, nach der sich mindestens sechs Nervenzellpopulationen aufgrund verschiedener Formen und Projektionsrichtungen differenzieren lassen (Abb. 4).

Das ENS als „brain of the gut“

Immunohistochemische Techniken erlaubten darüber hinaus eine Charakterisierung der enterischen Nervenzellen aufgrund ihres Gehaltes an Neurotransmittern

Peptide
Vasoaktives intestinales Peptid Substanz P Neuropeptid Y Calcitonin gene related peptide Cholecystokinin Galanin Bombesin Neurotensin Somatostatin
Amine
Acetylcholin Noradrenalin Serotonin Dopamin
Aminosäuren
γ -Amino-Buttersäure Tyrosin
Opioide
Enkephaline Endorphine
Purine
Adenosin-Triphosphat
Gase
Stickoxyd

Tabelle 1: Neuroaktive Substanzen im enterischen Nervensystem

im Sinne eines „neurochemical coding“ [Gershon et al. 1994]. Neben den klassischen Transmittern des sympathischen und parasympathischen Nervensystems wird eine stetig steigende Anzahl von non-adrener-gen non-choliner-gen (NANC) Über-trägerstoffen nachgewiesen, die zuvor im Zentralnervensystem gefunden worden waren (Tab. 1). Die komplexen Verschaltungen von intrinsischen afferenten Neuronen, Interneuronen und inhibitorischen bzw. exzitatorischen Motoneuronen zu intramuralen Reflexbögen („neuronal circuits“) ermöglichen dem ENS, seine Funktionen weitgehend unabhängig von zentralnervösen Einflüssen auszuüben [Furness und Bornstein 1995]. Die Vermittlung und Koordinierung intestinaler Motilität unterliegt somit überwiegend der Kontrolle des ENS, das aufgrund der aufgeführten Eigenschaften auch häufig als „brain of the gut“ bezeichnet wird. Vor diesem Hintergrund ist es verständlich, daß Veränderungen des ENS zu teilweise erheblichen Störungen der intestinalen Motilität führen können.

Intestinale Innervationsstörungen

Die klinische Relevanz des ENS läßt sich beispielhaft verdeutlichen anhand einer unlängst im New England Journal of Medicine veröffentlichten Auflistung von insgesamt 26 intestinalen Motilitätsstörungen, bei denen Veränderungen des ENS nachgewiesen wurden [Goyal und Hirano 1996]. Aus morphologischer Sicht können dabei zum einen quantitative Abweichungen von der Norm vorliegen im Sinne einer Aganglionose, Hypoganglionose oder Hyperganglionose, zum anderen qualitative Veränderungen im Sinne einer neuronalen Degeneration oder einer gestörten Neuro-transmitter-Homöostase. Klinisch kann es sich sowohl um angeborene als auch erworbene Defekte des ENS handeln. Die resultierenden intestinalen Motilitätsstörungen lassen sich ätiologisch zurückführen auf primäre Veränderungen des ENS oder auf Erkrankungen, bei denen es sekundär bzw. fakultativ zu Schädigungen des ENS kommt (Tab. 2). Im folgenden werden die häufigsten kolorektalen Innervationsstörungen als Übersicht dargestellt.

Aganglionose

Bereits 1899 berichtete der dänische Kinderarzt Harald Hirschsprung über „Stuhlträgheit Neugeborener in Folge von Dilatation und Hypertrophie des Kolon“. Die zugrundeliegende Histopathologie wurde jedoch erst zwei Jahrzehnte später durch Dalla-Valle (1920) erkannt. Der Morbus Hirschsprung ist gekennzeichnet durch das vollständige Fehlen von intramuralen Nervenzellen und einem vermehrten Auftreten von verbreiterten Nervenfaserversträngen innerhalb des betroffenen kaudalen Darmwandabschnittes (Abb. 5). Im aganglionären Segment scheint vor allem der Mangel an inhibitorischen Neurotransmittern (z. B. NO, VIP) ver-

Erkrankungen mit Veränderungen* des enterischen Nervensystems

obligat*

Morbus Hirschsprung (Aganglionose)
Hypoganglionose / Heterotopien
Intestinale neuronale Dysplasie
Chagas Krankheit
Achalasie

fakultativ*

Infantile hypertrophe Pylorusstenose
Intestinale Pseudo-Obstruktion
Mekoniumileus
Nekrotisierende Enterocolitis
Morbus Crohn
Colitis ulcerosa
Diabetes mellitus
Amyloidose
Sklerodermie
Neurofibromatose
Myotone Dystrophie
Parkinson-Syndrom
Zytomegalie

Tabelle 2: Beispiele für die klinische Relevanz des enterischen Nervensystems

antwortlich zu sein für das Überwiegen des glattmuskulären Tonus und die daraus resultierende dauerhafte funktionelle Obstruktion [Guo et al. 1997]. Konsequativ kommt es zur mechanischen Aufdehnung proximaler Darmabschnitte im Sinne eines Megakolon. Obwohl der Morbus Hirschsprung meistens im frühen Kindesalter diagnostiziert und therapiert wird, belegte eine Analyse zahlreicher Kasuistiken, daß schweren Obstipationen und einer Megakolonausbildung im Jugend- und Erwachsenenalter ebenfalls eine intestinale Aganglionose zugrunde liegen kann [Wheatley et al. 1990]. Mit der Einführung differenzierterer Untersuchungsmethoden konnte die Diagnostik intestinaler Innervationsstörungen entscheidend verbessert werden. Es zeigte sich, daß abgestuft zwischen der Aganglionose und der Normoganglionose weitere intestinale neuronale Fehlbildungen vorkommen, die ebenfalls eine schwere chronische Obstipation verursachen. Die Klassifikation dieser non- aganglionären intestinalen Innervationsstörungen [Borchard et al. 1991, Holschneider et al. 1994] umfaßt im wesentlichen folgende Formen:

Hypoganglionose

Bei der Hypoganglionose liegt eine deutliche Rarefizierung der myenterischen Ganglien und Reduzierung der Gangliengröße sowie des Nervenzellgehaltes der Ganglien vor. Im Schichtpräparat der Darmwand zeigt der Plexus myentericus im Vergleich zur Normoganglionose (Abb. 2) ein weitmaschigeres Nervengeflecht

auf (Abb. 6). In Abhängigkeit vom Ausmaß der hypoganglionären Veränderungen lassen sich unterschiedliche Schweregrade beschreiben. Die Hypoganglionose wird häufig beim Morbus Hirschsprung im Bereich der sog. Übergangzone vom aganglionären zum normoganglionären Segment gefunden oder kann als isolierte Form vorliegen.

Intestinale neuronale Dysplasie

Die als intestinale neuronale Dysplasie (IND) bezeichnete Innervationsstörung ist insbesondere durch morphologische Veränderungen der submukösen Plexus gekennzeichnet. Histopathologische Charakteristika sind zum einen das vermehrte Auftreten von sog. Rie-

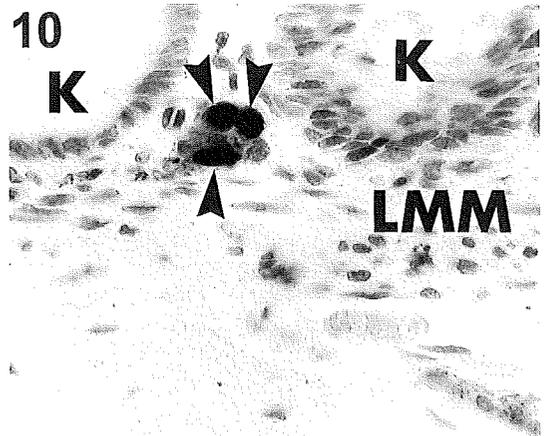


Abb. 10: Heterotopien der Lamina propria mucosae. Ektopy Nervenzellen (Pfeilköpfe) zwischen epithelialen Krypten (K) und der Lamina muscularis mucosae (LMM). Schnittpräparat, PGP 9.5, Hämalaun, x 625

senganglien, deren Nervenzellanzahl über dem zweibis dreifachen der Norm liegt, zum anderen verdickte Nervenfaserstränge, die das normalerweise feinstrukturierte submuköse Nervengeflecht unregelmäßig durchziehen und z.T. knospenförmig eingelagerte Nervenzellen enthalten (Abb. 7-9). Fakultativ kann es zur vermehrten Verlagerung von Nervenzellen in die Lamina propria mucosae bzw. Lamina muscularis mucosae kommen (Abb. 10). Neben der isolierten Form läßt sich die IND häufig proximal einer Aganglionose im Sinne einer „Hirschsprung-assoziierten IND“ (HA-IND) beobachten [Wedel et al. 1997].

Ganglien-Heterotopien

Als Heterotopien werden Ganglien bezeichnet, die sich in Darmwandschichten befinden, die normalerweise als nervenzellfrei angesehen werden. Neben den bei der IND auftretenden mukösen Nervenzell- Heteroto-

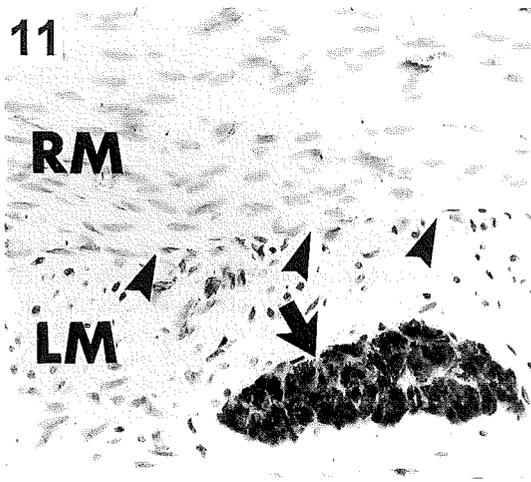


Abb. 11: Heterotopien der Tunica muscularis. Ektopes Ganglion (Pfeil) außerhalb der Muskelloge (Pfeilköpfe). Längsmuskelschicht (LM), Ringmuskelschicht (RM). Schnittpräparat, PGP 9.5, Hämalaun, x 400

pien (Abb. 10) sind es vor allem Ganglien- Heterotopien des Plexus myentericus, die innerhalb der Längs- oder Ringmuskulatur beobachtet werden (Abb. 11).

In eigenen Untersuchungen [Wedel et al. 1998a] ließen sich die Ergebnisse von Stoss et al. (1991) bestätigen, daß die aufgeführten intestinalen Innervationsstörungen nicht nur bei Kindern, sondern auch im Jugend- und fortgeschrittenen Erwachsenenalter anzutreffen sind. Zum anderen konnte gezeigt werden, daß auch non-aganglionäre Veränderungen des ENS zur chronisch persistierenden Obstipation mit Ausbildung eines Megakolon führen - ein Bild, das klinisch den Verhältnissen beim Morbus Hirschsprung gleicht.

Diagnostik intestinaler Innervationsstörungen

Aufgrund dieser Erkenntnisse erscheint es sinnvoll, bei der Differentialdiagnostik chronisch obstipativer Zustände, die sich nicht durch andere Ursachen klären lassen, das aufgezeigte Spektrum intestinaler Innervationsstörungen zu berücksichtigen. Die histopathologische Diagnostik ist dabei umso aussagekräftiger, je mehr Darmwandgewebe für die Beurteilung zur Verfügung steht. Mindestanforderung sind *Schleimhautstufenbiopsien*, bei denen eine ausgeprägte Acetylcholinesterase-Aktivität für das Vorliegen eines Morbus Hirschsprung spricht. Eine Befundung von Nervenfasernsträngen und Ganglienformationen innerhalb der submukösen Plexus zum Nachweis einer IND wird erst dann ermöglicht, wenn durch *tiefgreifende Stufenbiopsien* ausreichend submuköses Gewebe miterfaßt wurde (Abb. 1). Erfolgt die Gewebeentnahme unzureichend oder die anschließende Aufarbeitung der Schnittserien

unvollständig, können häufig nicht-repräsentative bzw. uneinheitliche Befunde resultieren. Um ein Gesamtbild der intramuralen Plexusmorphologie zu erhalten, ist eine *Ganzwandbiopsie* mit Anteilen des für die intestinale Motilität maßgeblichen Plexus myentericus erforderlich (Abb. 1). Nur auf diese Weise läßt sich das Ausmaß einer zugrundeliegenden intestinalen Innervationsstörung vollständig beurteilen. Resezierte Darmwandsegmente lassen sich darüber hinaus zu kaudo-kranial aufgewickelten Resektatrollen [Meier-Ruge et al. 1994] oder Darmwandstichtpräparaten [Krammer et al. 1994, Wedel et al. 1998a, b] aufarbeiten, die eine differenzierte flächenhafte Darstellung der intramuralen Plexus im Verlauf zulassen.

Die selektive Darstellung des ENS gelingt sowohl durch enzym- als auch immunhistochemische Verfahren. Eine zuverlässige enzymhistochemische Diagnostik setzt nativ und in einer Kühlkette versandtes Material voraus und sollte eine Nachweiskombination der Acetylcholinesterase, Lactatdehydrogenase und Succinatdehydrogenase umfassen [Meier-Ruge et al. 1994]. Als Alternative stehen immunhistochemische Methoden zur Verfügung, die am Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Gewebe durchgeführt werden können. In eigenen Untersuchungen [Krammer et al. 1993, Sigge et al. 1998, Wedel et al. 1998a] erwies sich Protein Gene Product (PGP) 9.5 unter den neuronalen Markern als zuverlässigster pan-neuronaler Antikörper, mit dem sich Ganglien, Nervenzellen und Nervenfasern optimal darstellen und eindeutig von Gliazellen abgrenzen lassen (z. B. Abb. 9). Hiermit sind auf der Basis eines standardisierten immunhistochemischen Verfahrens die Voraussetzungen gegeben, morphometrische Auswertungen des intramuralen Nervengewebes vorzunehmen. Insbesondere non-aganglionäre Formen intestinaler Innervationsstörungen können auf diese Weise in ihrer histopathologischen Ausprägung differenziert erfaßt und klassifiziert werden.

Das enterische Nervensystem – Gegenstand interdisziplinärer Forschung

Seit den ersten anatomischen Beschreibungen des ENS vor etwa 150 Jahren haben die modernen Methoden der Grundlagenwissenschaften und das gestiegene Interesse der Kliniker sowie der Pharmazeutischen Industrie zu einer deutlichen Weiterentwicklung der neurogastroenterologischen Forschung geführt. Die fächerübergreifende Bearbeitung des ENS umfaßt u. a. folgende Aspekte:

Morphologie

Angesichts des breiten Methodenspektrums (Enzym- und Immunhistochemie, Versilberungen, Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie, Schnitt- und Stichtpräparate), das für die Untersuchung des ENS

zur Verfügung steht, ist es erforderlich, einheitliche und standardisierte Verfahren zur histopathologischen Befundung des „ENS-Status“ festzulegen. Morphometrische Normwerte der intramuralen Plexus für die einzelnen Kolonabschnitte sowie für unterschiedliche Altersgruppen stellen die Voraussetzung dar, um entsprechende Abweichungen in ihrem Schweregrad systematisch erfassen zu können. Die Identifizierung zahlreicher Neurotransmitter innerhalb des ENS legt ein entsprechendes Screening insbesondere bei z. T. noch ätiologisch ungeklärten intestinalen Motilitätsstörungen wie der idiopathischen chronischen Obstipation („slow transit constipation“) nahe.

Neurophysiologie

In Ergänzung zur deskriptiven Morphologie können elektrophysiologische in-vitro-Untersuchungen resezierter Darmabschnitte Aussagen zum Kontraktilitätsverhalten ermöglichen und pathologische Motilitätsmuster diskriminieren. Darüber hinaus läßt sich der Einfluß von Neurotransmittern und Pharmaka unter standardisierten Bedingungen überprüfen und ggf. therapeutisch nutzen.

Klinische Genetik

Der Nachweis von Mutationen – Thyrosinkinase-Rezeptor RET [Puffenberger et al. 1994] und Endothelin B-Rezeptor [Romeo et al. 1994] - bei Patienten mit Morbus Hirschsprung gibt Anlaß dazu, das Vorliegen genetischer Defekte auch bei solchen Patientenkollektiven zu eruieren, die eine Hirschsprung-ähnliche Symptomatik und Histopathologie aufzeigen. Möglicherweise lassen sich damit auch non-aganglionäre intestinale Innervationsstörungen auf genetisch bedingte Entwicklungsstörungen des ENS zurückführen und entsprechend diagnostizieren.

Experimentelle Genetik

Die gezielte Ausschaltung von Genen am Tiermodell, deren Produkte die Entwicklung des ENS maßgeblich beeinflussen, erhöht das Verständnis für die noch weitgehend ungeklärten pathogenetischen Mechanismen der kongenitalen intestinalen Innervationsstörungen und assoziierter Organfehlbildungen. So ließ sich bei Mäusen nach Ausschaltung der Gene, die für die Tyrosinkinase-Domäne des RET-Rezeptors sowie für den Endothelin-B Rezeptor kodieren, jeweils eine intestinale Aganglionose auslösen [Schuchardt et al. 1994, Hosoda et al. 1994]. Eine Mutation des Protoonkogens C-kit, das u.a. für die Entwicklung der interstitiellen Cajal-Zellen verantwortlich ist, die als sog. non-neuronale Schrittmacherzellen des Darms fungieren, führte zu intestinalen Motilitätsstörungen mit schwerer Obstipation [Maeda et al. 1992].

Klinische Aspekte

Chronisch obstipative Zustände, die z. T. seit der Kindheit bestehen und bis ins fortgeschrittene Erwachsenenalter hinein persistieren, gehen häufig mit eindrucksvollen Veränderungen der Kolonanatomie einher (z. B. Sigma elongatum, Megacolon, Cul de sac, Intussuszeption, Rectumprolaps, Rectocele). Diese Formen der Obstipation sind unter Anwendung konservativer Maßnahmen therapierefraktär und erfordern zumeist ein operatives Vorgehen. Erste Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, daß bei diesen Patientenkollektiven Veränderungen des ENS vorliegen, die zu den chronischen intestinalen Motilitätsstörungen geführt haben. In diesem Zusammenhang ist es bedeutsam, inwieweit die subjektiven Beschwerden des Patienten, die objektivierbaren Motilitätsparameter, die Röntgenanatomie des Kolons sowie die zugrundeliegende Histopathologie miteinander korrelieren. Erstrebenswert sind allgemein gültige Richtlinien, nach denen Indikation und Ausmaß einer operativen Therapie festgelegt werden können, von der Patienten mit chronischer Obstipation langfristig profitieren.

Danksagung

Die Autoren danken W. Maaß, G. Knebel, K. Budler, E. Behrens, H. Strauchmann, B. Pretzsch (Institut für Anatomie) sowie dem OP-Pflegepersonal (Kliniken für Chirurgie und Kinderchirurgie) für die technische Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen. Die Arbeit ist Teil eines durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft geförderten Projektes (DFG Kr 1257/2-2).

Literatur

1. Auerbach L (1864) Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. Arch Pathol Anat Physiol 30: 457-460
2. Borchart E, Meier-Ruge W, Wiebecke B, Briner J, Müntefering H, Födisch HJ, Holschneider AM (1991) Innervationsstörungen des Dickdarms – Klassifikation und Diagnostik. Pathologie 12: 171-174
3. Dalla-Valle A (1920) Ricerche istologiche su di un caso megacolon congenito. Pediatría 28: 740-752
4. Dogiel AS (1899) Ueber den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. Arch Anat Physiol: 130-158
5. Furness JB, Bornstein JC (1995) The enteric nervous system and its extrinsic connections. In: Yamada T (Ed.): Textbook of gastroenterology. 2. ed., Vol 1, p 2-24. Philadelphia: J.B. Lippincott
6. Furness JB, Costa M (1987) The enteric nervous system. New York: Churchill Livingstone

7. Gershon MD, Kirchgessner AL, Wade PR (1994) Functional anatomy of the enteric nervous system. In: Johnson LR (Ed.): Physiology of the gastrointestinal tract. 3. ed., p 381-422. New York: Raven Press
8. Goyal RK, Hirano I (1996) Mechanisms of disease. The enteric nervous system. *N Engl J Med* 334: 1106-1115
9. Guo R, Nada O, Suita S, Taguchi T, Masumoto K (1997) The distribution and colocalization of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide in nerves of the colons with Hirschsprung's disease. *Virchows Arch* 430: 53-61
10. Hirschsprung H (1899) Stuhlträchtigkeit Neugeborener in Folge von Dilatation und Hypertrophie des Kolons. *Jahrb f Kinderh* 27: 1-7
11. Holschneider AM, Meier-Ruge W, Ure BM (1994). Hirschsprung's disease and allied disorders – a review. *Eur J Pediatr Surg* 4: 260-266
12. Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA (1994) Targeted and natural (piebaldlethal) mutation of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 79: 1267- 1276
13. Krammer HJ, Karahan TK, Rumpel E, Klinger M, Kühnel W (1993) Immunohistochemical visualization of the enteric nervous system using antibodies against protein gene product (PGP) 9.5. *Ann Anat* 175: 321-325
14. Krammer HJ, Karahan ST, Sigge W, Kühnel W (1994) Immunohistochemistry of markers of the enteric nervous system in whole-mount preparations of the human colon. *Eur J Pediatr Surg* 4: 274-278
15. Krammer HJ, Wedel T, Brehmer A, Stach W, Kühnel W, Singer MV (1997) The enteric nervous system – what can we learn from morphology? *Z Gastroenterol, Suppl* 2: 5-13
16. Langley JN (1900) The sympathetic and other related systems of nerves. In: Schaffer EA (Ed.) Textbook of physiology. Pentland, Edinburgh p 616-696
17. Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S (1992) Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Dev* 116: 369-375
18. Meier-Ruge W, Gambazzi F, Käufeler RE, Schmid P, Schmidt CP (1994) The neuropathological diagnosis of neuronal intestinal dysplasia (NID B). *Eur J Pediatr Surg* 4: 267-273
19. Meissner G (1857) Über die Nerven der Darmwand. *Z Ration Med N F* 8: 364-366
20. Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, Nakao K, deWit D, Yanagisawa M, Chakravart A (1994) A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 79: 1257-1266
21. Romeo G, Ronchetto P, Luo Y, Barone V, Seri M, Ceccerini I, Psini B, Bocciardi R, Lerone M, Kaarianinen H (1994) Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367: 377-378
22. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V (1994) Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 367: 380-383
23. Sigge W, Wedel T, Kühnel W, Krammer HJ (1998) Morphological alterations of the enteric nervous system and deficiency of non-adrenergic non-cholinergic inhibitory innervation in neonatal necrotizing enterocolitis. *Eur J Pediatr Surg* 8: 87-94
24. Stach W (1989) A revised morphological classification of neurons in the enteric nervous system. In: Singer MV, Goebell H (Eds.): Nerves and the gastrointestinal tract. p 29-45. Lancaster: Kluwer Academic Publishers
25. Stoss F, Meier-Ruge W (1991) Die neuronale Kolondysplasie im Erwachsenenalter. Diagnostik, Klinik und Therapie. *Fortschr Med* 109: 424-428
26. Wedel T, Krammer HJ, Herold A, Bruch HP, Kühnel W (1997) Hirschsprung assoziierte neuronale intestinale Dysplasie (HANID) beim Erwachsenen. In: Kühnel W (Ed.): Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft. p 344. Jena: Gustav Fischer Verlag
27. Wedel T, Gleiß J, Schiedeck T, Herold A, Krammer HJ, Bruch HP (1998a) Das neurogene Megakolon: Liegt immer ein Morbus Hirschsprung zugrunde? *Coloproctology* 20: 45-57
28. Wedel T, Krammer HJ, Kühnel W, Sigge W (1998b) Alterations of the enteric nervous system in neonatal necrotizing enterocolitis revealed by whole-mount immunohistochemistry. *Ped Pathol* 18: 57-70
29. Wheatley MJ, Wesley JR, Coran AG, Polley TZ (1990) Hirschsprung's disease in adolescents and adults. *Dis Colon Rectum* 33: 622-629

Moderne Methoden der Infektionsdiagnostik

B. Albrecht und W. Solbach

Der rasche und zweifelsfreie Nachweis medizinisch bedeutsamer Mikroorganismen, ein Hauptziel mikrobiologischer Diagnostik, ist bei der Anwendung der bisher üblichen „klassischen“ Labortechniken häufig nur unzureichend, manchmal gar nicht zu realisieren. Selbst die Identifizierung bereits isolierter Keime bereitet oftmals erhebliche Schwierigkeiten, so daß sich die endgültige Diagnose um Tage oder gar Wochen verzögern kann. Somit erscheint es sowohl aus zeitlichen, arbeitstechnischen als auch aus ätiopathogenetischen Gründen wünschenswert, die Diagnose von Infektionskrankheiten zu beschleunigen und zu erweitern. Wesentliche Fortschritte sind auf diesem Weg durch die Einführung molekularbiologischer Verfahren erzielt worden (21).

Dieser Artikel soll Methoden der Nukleinsäurediagnostik erläutern, die Grundlage für die moderne Infektionsdiagnostik sind.

DNA-Sonden

Diese Methode ermöglicht die Detektion und Quantifizierung spezifischer mikrobieller Nukleinsäuresequenzen. Sie nutzt die komplementäre Basenpaarung zweier Nukleinsäurestränge. Dem Aufschmelzen doppelsträngiger DNA folgt das Aneinanderlagern (Hybridisierung) zweier komplementärer einzelsträngiger Nukleinsäuremoleküle unter Ausbildung spezifischer Wasserstoffbrückenbindungen. Die experimentelle Durchführung sogenannter DNA-Sonden-Assays folgt immer einem gemeinsamen Prinzip: Die sogenannte "Ziel"-Nukleinsäure wird aus dem Patientenmaterial isoliert und auf einer Membran fixiert. Nach anschließender Aufschmelzung der doppelsträngigen Targetnukleinsäure durch z. B. Temperatur- oder pH-Änderung, kann eine einzelsträngige DNA-Sonde sequenzspezifisch hybridisieren (25; *Abbildung 1*). Diese ist markiert und ermöglicht so den Nachweis der spezifischen Bindung. Die Markierung der DNA-Sonde erfolgte anfänglich mit radioaktiv markiertem Phosphor (^{32}P), ist aber weitgehend durch nichtradioaktive Materialien wie Biotin oder Digoxigenin ersetzt worden (26).

Inzwischen sind, je nach Bedarf, andere membrangebundene Testformate für den Nachweis mittels DNA-Sonden entwickelt worden, wie der Dot (oder Slot) Blot, der reverse Dot (Slot) Blot oder die in situ Hybridisierung.

Dot bzw. Slot Blot bezeichnen hierbei das Design der Nukleinsäureimmobilisation auf der Membran (Dot=Punkt, Slot=Tasche). Diese platzsparenden Formate ermöglichen die gleichzeitige Hybridisierung mehrerer Targetnukleinsäuren mit einer DNA-Sonde. Beim reversen Blot hingegen wird nicht die Targetnu-

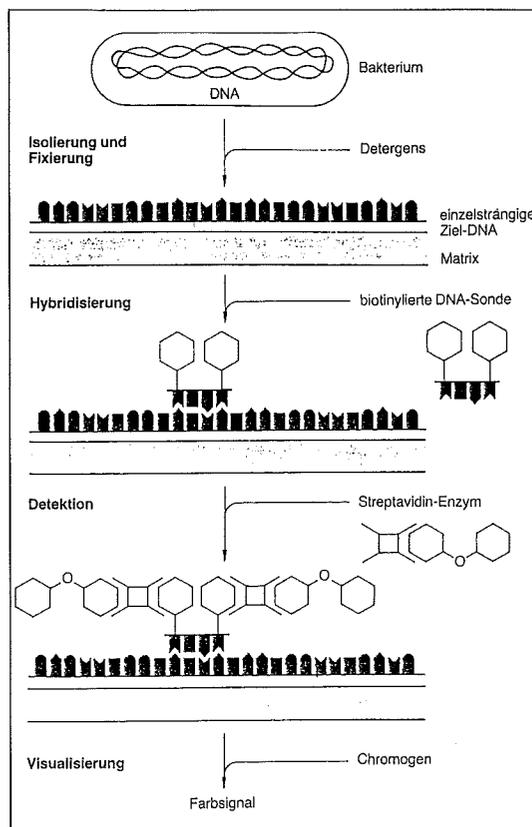


Abbildung 1: Prinzip der DNA-Sonde
Identifizierung einer einzelsträngigen, immobilisierten Ziel-DNA, durch basenkomplementäre Bindung mit einer markierten DNA-Sonde (z. B. Biotin).
Am Hybrid wird im Rahmen einer nichtradioaktiven Reaktion (z. B. Streptavidin-Enzym) ein detektierbares Signal generiert und mittels eines Chromogens visualisiert. Das entstandene Farbsignal kann quantitativ bestimmt werden.

kleinsäure, sondern die Sonde auf der Membran fixiert, dies ermöglicht die gleichzeitige Hybridisierung der Zielnukleinsäure mit verschiedenen DNA-Sonden.

Bei der *in situ* Hybridisierung findet die Hybridisierung von Zielsequenz und Sonde direkt im fixiertem Gewebe auf einem Objektträger statt. Für die Infektdiagnostik ist die Hybridisierung nur bedingt geeignet, da die mikrobielle Zielsequenz häufig in zu geringer Konzentration vorliegt. Daher wurden sogenannte *in vitro* Amplifikationssysteme entwickelt. Ziel der Amplifikationssysteme ist die millionenfache Vermehrung eines erregerspezifischen Nukleinsäurebereiches, der anschließend mit den zuvor beschriebenen Hybridisierungsmethoden detektiert werden kann. Erst über die Kombination eines effizienten *in vitro* Amplifikationssystems mit einem hochsensitiven, nichtradioaktiven Detektionssystem wird ein Nachweis geringster Mengen des Pathogen möglich.

Amplifikationsverfahren

Bisher gebräuchliche Verfahren lassen sich in Targetamplifikation und Signalamplifikation einteilen.

Targetamplifikation

Bei der Targetamplifikation (Abbildung 2) kommt es entweder über eine *in vitro* Replikationsreaktion, oder in Kombination mit einer *in vitro*-Transkriptionsreaktion zur millionenfachen Vervielfältigung der Zielsequenz (19). Die *in vitro*-Replikationsreaktion führt mittels DNA-Polymerasen zur Nukleinsäurevervielfältigung. Bei der Kombination mit einer *in vitro* Transkriptionsreaktion erfolgt zunächst die Transkription der RNA in cDNA durch Transkriptasen und anschließend die Vervielfältigung durch DNA-Polymerasen.

Im Verlauf der Amplifikationsreaktionen wird jedoch nicht nur die spezifische Zielsequenz vervielfältigt, sondern es kann auch zur Vermehrung unspezifischer

Targetamplifikation	
PCR	polymerase chain reaction (18)
RT-PCR	reverse transcription and PCR
LAT	ligation activated transcription (21)
3SR	self-sustained sequence replication (21)
TMA	target mediated amplification (15)
TAS	transcription amplification system (15)
NASBA	nucleid acid sequence based amplification (13)
SDA	strand displacement amplification (21)
LCR	ligase chain reaction (2)
LAR	ligation amplification reaction (30)

Abbildung 2: Verfahren zur Targetamplifikation

Nebenprodukte kommen (17), sodaß sich der Amplifikationsreaktion immer eine spezifische Detektion der Zielsequenz mittels Hybridisierungstechniken anschließen muß.

Signalamplifikation

Bei der Signalamplifikation (Abbildung 3) wird ein schwaches Signal einer spezifischen Sonden-Hybridi-

Signalamplifikation
verzweigte Sonde (8)
Cycling Probes (7)
Q β -Replikation (16)

Abbildung 3: Verfahren zur Signalamplifikation

sierung mit einer sehr geringen Menge der nachzuweisenden Ziel-Nukleinsäure über enzymatische Schritte auf ein detektierbares Niveau verstärkt. Es wird also nicht ein Teil der Nukleinsäure vermehrt, sondern das Signal der spezifischen Hybridisierung selbst. Je nach Anforderung werden eine Vielzahl von Verfahren eingesetzt. Im folgenden sollen die gebräuchlichsten Methoden der Targetamplifikation näher beschrieben werden.

Polymerase Kettenreaktion

Die von K. Mullis entwickelte Polymerase Kettenreaktion (PCR) erlaubt die selektive *in vitro* Amplifikation einer definierten DNA-Genregion durch Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase in einem zyklischen Thermoprofil (18,23). Während der PCR werden drei distinkte thermische Schritte durchlaufen (Abbildung 4):

- 1) Denaturierung doppelsträngiger mikrobieller DNA bei 92°C-96°C.
- 2) Anlagerung („annealing“) sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer) an die komplementäre Sequenz der DNA-Matrix bei einer Temperatur zwischen 45°-72°C (die Temperatur dieses Schrittes wird durch den Schmelzpunkt der Primer definiert).
- 3) Elongation („extension“) der Primer am 3'-OH-Ende durch Polymerisation von Desoxynukleosidtriphosphaten bei 72°C.

Die meist 30-40 fache Wiederholung dieses Zyklusses führt dann zur exponentiellen Vermehrung der Zielsequenz.

Die Spezifität der PCR für die nachzuweisenden Erreger wird durch die Wahl der Primersequenzen und die Stringenz ihrer Hybridisierung gewährleistet. Im Rahmen der medizinischen Diagnostik ist eine zweifelsfreie Analyse der PCR Produkte erforderlich. Deshalb

FOCUS MUL



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

Inhalt

15. Jahrgang (1998)

Inhalt 15. Jahrgang (1998)

Editorial

Rationierung an der MUL!?	
H.-L. Fehm	4
Klinische Forschung - Standortbestimmung und Perspektiven	
H. Raspe	72
Neue Medien in der Wissenschaft, Forschung und Lehre	
M. Herczeg	132
Ungewollte Kinderlosigkeit – Schicksal oder zu bewältigende Aufgabe?	
K. Diedrich	200

Originalarbeiten

Hypoxieinduzierte Genexpressionen – Hinweise auf den zellulären Sauerstoffsensor	
J. Fandrey	6
Fortschritte der forensischen Spurenanalytik durch Einsatz moderner molekulargenetischer Verfahren: Populationsdaten dreier ausgesuchter Genorte	
P. Minnasch, Ch. Meißner, N. von Wurmb, I. Gerling, M. Oehmichen	14
p53 Tumor-Suppressor-Gen: Prognostische Wertigkeit bei sporadischen kolorektalen Karzinomen	
H. Schimmelpennin, A. Warnecke, U. Roblick, U. Markert, R. Broll, G. Auer, H.-P. Bruch	20
Gibt es morphologische Parameter zur quantitativen Bestimmung der entzündlichen Infiltration des Peritoneums?	
A. Woltmann, S. Weiss, B. Martens, R. Broll, S. Krüger, H.-P. Bruch	27
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- β	
B. Bätge	90
Die quantitative Zytoarchitektonik der Areale nach Brodman des menschlichen Cortex cerebri	
O. Schmitt, U. Almert, E. Mecke, R. Eggers	144
Ereigniskorrelierte EEG-Rhythmen als meßbare Anzeichen der Gehirnaktivität	
M. Schürmann	156
Kryo TESE – Ein neues Konzept zur Behandlung der nicht obstruktiven Azoospermie	
W. Küpker, M. Bals-Pratsch, P.N. Schlegel, S. Al-Hasani, P. Fornara, R. Johannisson, J. Sandmann, T. Schill, M. Ludwig, K. Diedrich	206
Numerische Chromosomenaberrationen in Spermien von fertilen und infertilen Spendern	
H. Schlieker, H. Schultz, K. Mennicke, F. Hinrichs, P. Diercks, S. Al-Hasani, M. Bals-Pratsch, R. Sturm, K. Diedrich, E. Schwinger	213
Hyperthermie: Effekte auf die Keimzellreifung der männlichen Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)?	
C. Metzler, R. Johannisson	223
Rationelle Therapie bei unerfülltem Kinderwunsch aus gynäkologischer Sicht	
R. Felberbaum, K. Diedrich	232
Spermienentnahmetechniken zur intracytoplasmischen Spermieninjektion (ICSI)	
J. Sandmann, P. Fornara, D. Jocham	238
Mikrochirurgische Refertilisierung im Zeitalter der ICSI: Überholte Prozedur oder sinnvolle Ergänzung?	
P. Fornara, J. Sandmann, D. Jocham	244

Psychosomatische Aspekte in der Sterilitätsbehandlung I. Kowalcek, G. Buhrow, N. Wihstutz, K. Diedrich	247
Effekte von Progesteronantagonisten auf die uterinen Eosinophilen der Ratte E. Rumpel, A.-K. Schubert, O. Schmitt	255
<hr/>	
Die Summa-cum-laude-Dissertation	
Bradykinin-Metabolismus an Rindertrachealepithelien D. Vordermark	41
Untersuchungen zur Wirkungsweise von Zinkionen im menschlichen Immunsystem N. Wellinghausen	102
Polyproteinspaltung und Partikelbildung des Hepatitis-A-Virus: rekombinate, eukaryontische <i>in vivo</i> -Studien Ch. Probst	164
<hr/>	
Das Kolleg	
Biomechanische Herzen - Entwicklung und Perspektiven N.W. Guldner, P. Klapproth, M. Großherr, B. Keding, E. Joubert-Hübner, R. Keller, I. Klempien, M. Stephan, E. Rumpel, G. Vollmer, R. Noel, R. Tölg, A. Sheikhzadeh, H.H. Sievers	134
<hr/>	
Übersichten	
Thrombolyse oder PTCA im akuten Herzinfarkt? G. Richardt, F. Hartmann, R. Tölg, E. Giannitsis, H.-A. Katus	98
Die Präimplantationsdiagnostik im Spannungsfeld von Recht und Ethik W. Küpker, K. Diedrich	265
<hr/>	
Der besondere Fall - eine Kasuistik	
Geophagie A. Woywodt, E.F. Stange, W. Woywodt, A. Kiss	113
Ein 35 jähriger Mann mit grippalem Infekt, Thrombozytopenie und akutem Nierenversagen M. Schütt, P.M. Rob, S. Krüger, H.L. Fehm, J. Steinhoff	170
<hr/>	
Aktuelles	
Catechol-O-Methyltransferase-Hemmer: Eine neue Strategie zur Behandlung des M. Parkinson C. Neusch, A. Moser	37
Leptin A. Peters	109
Sildenafil – die Pille für den Mann U. Fingscheidt, H.L. Fehm	174
Aktuelle Aspekte der assistierten Reproduktion K. Diedrich, R. Felberbaum, M. Ludwig, O. Bauer	202
<hr/>	
Aus der Hochschule	
Intensivmedizin und Menschenwürde P. Schmucker	47
Die Zukunft der Universitätsmedizin H.-U. Erichsen	118
Untersuchungen an entnommenem körpereigenem Material: Votum der Ethik-Kommission? M. Oehmichen	191
Verfahrensordnung für die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Medizinischen Universität zu Lübeck	192
<hr/>	
Studium generale	
Telematik - eine schmucke Tochter der Informatik G. Krüger	51
FOCUS MUL 16, Heft 1 (1999)	III

Das Porträt

Direktor des Instituts für Technische Informatik Prof. Dr.-Ing. Eric Maehle	57
Direktor der Medizinischen Klinik II der MUL Prof. Dr. med. Hugo A. Katus	124
Direktor des MUL-Instituts für Telematik Prof. Dr. rer. nat. Dieter Hogrefe	181

Autorenverzeichnis

Al-Hasani, S.	206, 213	Mecke, E.	144
Almert, U.	144	Meißner, Ch.	14
Auer, G.	20	Mennicke, K.	213
Bals-Pratsch, M.	206, 213	Metzler, C.	223
Bauer, O.	202	Minnasch, P.	14
Broll, R.	20, 27	Moser, A.	37
Bätge, B.	90	Neusch, C.	37
Bruch, H.-P.	20, 27	Noel, R.	134
Buhrow, G.	247	Oehmichen, M.	14, 191
Diedrich, K.	202, 206, 213, 232, 247, 265	Peters, A.	109
Diercks, P.	213	Probst, Ch.	164
Eggers, R.	144	Richardt, G.	98
Erichsen, H.-U.	118	Rob, P.M.	170
Fandrey, J.	6	Roblick, U.	20
Fehm, H.L.	170, 174	Rumpel, E.	255, 134
Felberbaum, R.	202, 232	Sandmann, J.	206, 238, 244
Fingscheidt, U.	174	Schill, T.	206
Fornara, P.	206, 238, 244	Schimmelpfennig, H.	20
Gerling, I.	14	Schlegel, P.N.	206
Giannitsis, E.	98	Schlieker, H.	213
Großherr, M.	134	Schmitt, O.	144, 255
Guldner, N.W.	134	Schmucker, P.	47
Hartmann, F.	98	Schubert, A.-K.	255
Hinrichs, F.	213	Schubert, Ch.	82
Hogrefe, D.	181	Schürmann, M.	156
Jocham, D.	238, 244	Schütt, M.	170
Johannisson, R.	206, 223	Schüttig, H.	178
Joubert-Hübner, E.	134	Schultz, H.	213
Katus, H.A.	98, 124	Schwinger, E.	213
Keding, B.	134	Sheikhzadeh, A.	134
Keller, E.	134	Sievers, H.H.	134
Kiss, A.	113	Stange, E.F.	113
Klapproth, P.	134	Steinhoff, J.	170
Klempien, I.	134	Stephan, M.	134
Klinger, M.H.F.	76	Sturm, R.	213
Klüter, H.	76	Tölg, R.	134, 98
Kowalcek, E.	247	Vollmer, G.	134
Krüger, G.	51	Vordermark, D.	41
Krüger, S.	27, 170	Warnecke, A.	20
Kühnel, W.	82	Weiss, S.	27
Küpker, W.	206, 265	Wellinghausen, N.	102
Ludwig, M.	202, 206	Wihstutz, N.	247
Maehle, E.	57	Woltmann, A.	27
Markert, U.	20	Woywodt, A.	113
Martens, B.	27	Woywodt, W.	113
		Wurmb von, N.	14

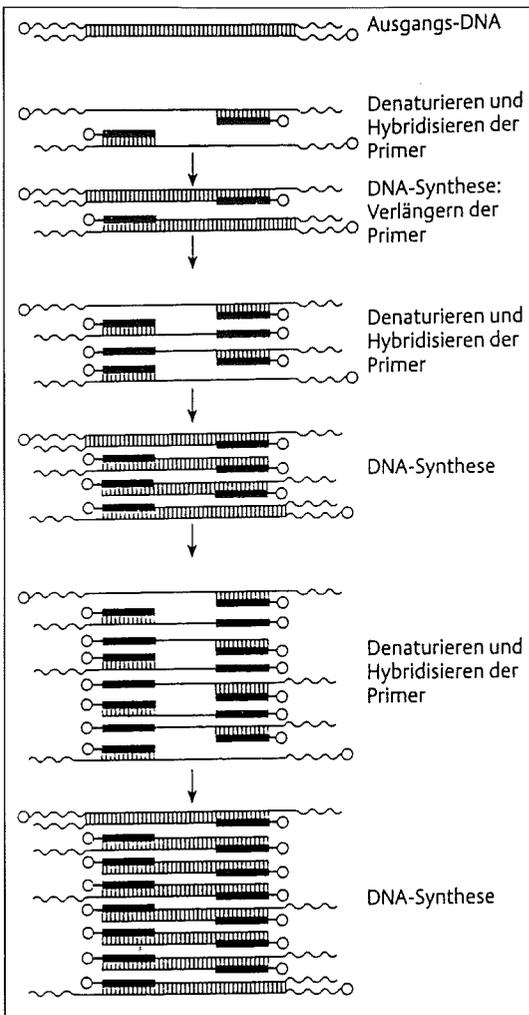


Abbildung 4: Prinzip der Polymerase Kettenreaktion
Die Ausgangs-DNA (z. B. bakteriell, viral) wird thermisch denaturiert, so daß die Oligonukleotidprimer unter stringent gewählten Bedingungen spezifisch hybridisieren können. Die thermostabile Polymerase führt nun zur Elongation der Primer. Die neu synthetisierte dsDNA wird nun wieder denaturiert und liegt somit erneut als Template vor.

müssen die Produkte über ihre charakteristische Größe, Klonierung, Sequenzierung, Restriktionsenzymverdau, Reamplifikation mit sogenannten inneren Primern (nested PCR) und/oder Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden genau charakterisiert werden.

Bei vielen Fragestellungen, wie zum Beispiel der HIV-Viruslast, muß mittels der PCR neben der qualitativen Aussage auch eine Quantifizierung der Amplifikationsprodukte ermöglicht werden. Laborinterne PCR-Systeme ermöglichen dies durch die Etablierung quan-

titativer PCRs anhand interner Standards. Eine automatisierte Weiterentwicklung der herkömmlichen PCR ermöglicht die online Messung der entstandenen spezifischen Amplifikationsprodukte.

Die hohe Kontaminationsgefahr der PCR liegt in der sonst angestrebten hohen Sensitivität der Methode begründet (17). Die Probenaufbereitung und die Durchführung der einzelnen Reaktionsschritte, sowie das Bearbeiten der Amplifikationsprodukte unterliegt daher besonders strengen Richtlinien.

Um eine möglichst hohe Konsistenz der Ergebnisse sowohl innerhalb eines diagnostischen Labors als auch zwischen verschiedenen Laboratorien zu gewährleisten, wird derzeit die Verwendung von vorgefertigten PCR-Kits und kompletten Testsystemen, die eine Kombination der PCR-Reaktion mit der anschließenden Amplifikatdetektion automatisiert gewährleistet, bevorzugt.

Ligase Kettenreaktion

Eine weitere Möglichkeit zur exponentiellen Amplifikation von Targetsequenzen wurde mit der Isolierung einer thermostabilen DNA-Ligase eröffnet (2). (Abbildung 5)

Zwei Paare von Oligonukleotiden werden während PCR-ähnlicher Thermozyklen nach ihrer unmittelbar benachbarten Hybridisierung mit einer einzelsträngigen Templatenukleinsäure durch die DNA-Ligase miteinander verknüpft. In Analogie zur PCR-Reaktion können diese Ligationsprodukte nach einem Denatu-

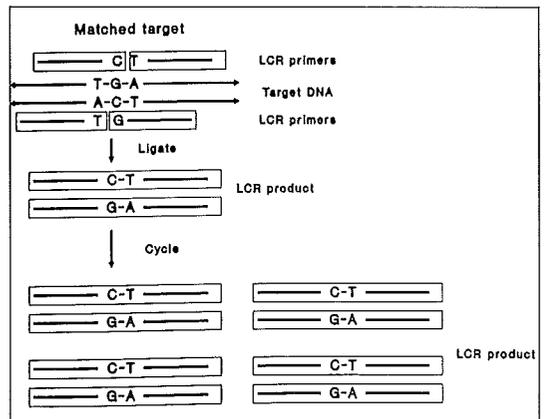


Abbildung 5: Prinzip der Ligasekettenreaktion
Bei der LCR erfolgt der gezielte Nachweis einer Targetsequenz über sukzessive Zyklen aus Denaturierung der DNA, der unmittelbar benachbarten Hybridisierung von 2 spezifischen Primern und deren anschließende Ligation. Die Ligationsprodukte dienen bei allen weiteren Reaktionszyklen als neue, zusätzliche Template.

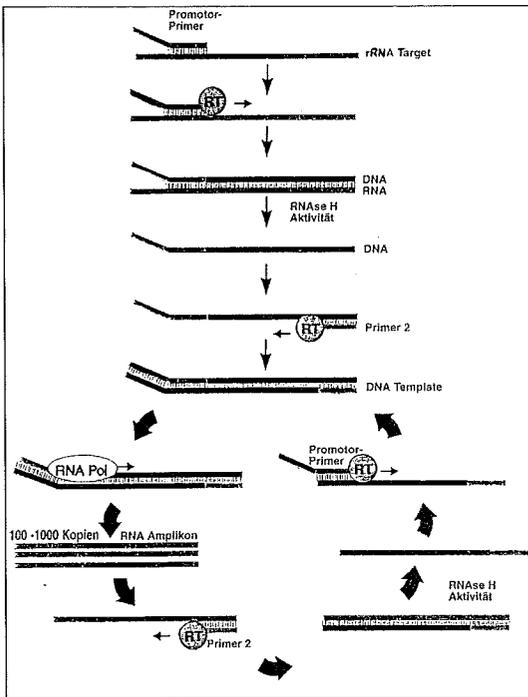


Abbildung 6: Prinzip der NASBA

Der Promotor-Primer (enthält T7 Polymerase) bindet an die mikrobielle Ziel RNA und wird mittels reverser Transkriptase (RT) verlängert. Das entstandene RNA/cDNA Hybrid wird durch die RNaseH degradiert, die freigewordene cDNA bindet mit dem spezifischen Primer 2, so daß die RT eine neue DNA Kopie synthetisieren kann. Als Ergebnis liegt eine doppelsträngige Template DNA mit integrierter T7 Promotorsequenz vor, die nun der zyklischen Vermehrung durch die RNA Polymerase (RNA Pol) zugeführt wird.

rierungsschritt ihrerseits wieder als neue Templatemoleküle dienen. Dabei ist ein Paar der Oligonukleotide komplementär zu dem einen und das andere Paar komplementär zu dem ersten Strang der Targetnukleinsäure.

Bei der Ligase Kettenreaktion (LCR) ist bereits ein positiver Nachweis von Ligationsprodukten für die Anwesenheit der entsprechenden Templatenukleinsäure im Probenmaterial beweisend. Eine genaue Analyse der Amplifikationsprodukte, die bei der PCR unabkömmlich ist, ist hier nicht notwendig und vereinfacht daher im Rahmen diagnostischer Anwendungen den routinemäßigen Einsatz dieser Methode.

Beide bisher vorgestellten Methoden zur in vitro Amplifikation müssen unter thermozyklischen Reaktionsbedingungen ablaufen. Mit dem Einsatz isotherm verlaufender Systeme wird eine neue Richtung beschritten.

Ihr Vorteil ist der geringe apparative Aufwand.

Nucleid Acid Sequence Based Amplification NASBA

Über eine von einem Primer induzierte reverse Transkription wird bei der 3SR (self-sustained sequence replication) nach mehreren isothermen Reaktionsschritten über RNA Intermediate eine hohe sequenzspezifische Amplifikation eines Zielnukleinsäurebereiches erzielt. Diese Methode entspricht weitgehend dem sogenannten TAS-Prinzip (transcription amplification system) und der NASBA Methode (Nucleid Acid Sequence Based Amplification) (13). (Abbildung 6)

Die Amplifikation basiert auf der Aktivität folgender Enzyme, der AMV Reverse Transkriptase, der E.coli RNaseH und der T7 Polymerase, und zwei targetkomplementären Oligonukleotiden. Eines dieser Oligonukleotide enthält die Konsensus-Promotorsequenz der T7 RNA Polymerase. Im Verlauf der Reaktion hybrid-

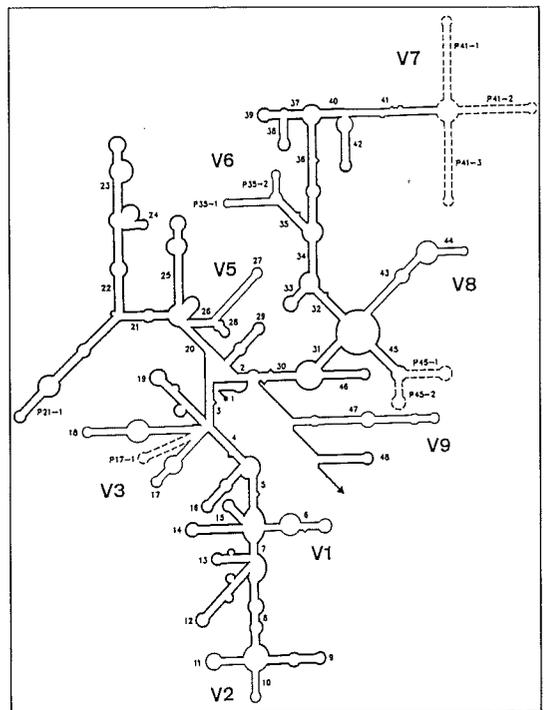


Abbildung 7: Sekundärstrukturmodell von Prokaryoten Das 5' Ende ist mit einem ausgefüllten Kreis gekennzeichnet; Helices sind in der Reihenfolge ihres Auftretens vom 5' zum 3' Ende beziffert; mit P beschriftete Bereiche sind spezifisch für Bakterien (Prokaryonten); Regionen konservierter Sequenzbereiche wurden mit fetter Linie, Regionen relativer Variabilität (in Sequenz und Länge) mit dünner Linie gezeichnet und mit V1 bis V9 bezeichnet, wobei V4 nicht bei Prokaryonten vorkommt; gestrichelte Linien stellen Bereiche dar, die in nur einigen der bekannten Strukturen vorkommen.

siert dieser Oligonukleotidprimer spezifisch an die Template RNA und wird durch die im Reaktionsansatz enthaltene Reverse Transkriptase templatespezifisch als cDNA verlängert. Die RNaseH baut nun den RNA Anteil des entstandenen RNA/cDNA Hybrids ab. Nun kann der zweite Primer spezifisch mit der einzelsträngigen cDNA hybridisieren und wird durch die Reverse Transkriptase verlängert. Ein doppelsträngiges DNA Molekül wird durch die T7 RNA Polymerase Promotorsequenz erzeugt. Die spezifische Promotorsequenz kann von der T7 Polymerase erkannt werden, so daß das doppelsträngige DNA Molekül als Matrize für eine effektive RNA Synthese dient. Die neu synthetisierten RNA Moleküle dienen nun selbst als Templatemoleküle. Es kann nach ca.15 Minuten Reaktionszeit ein Amplifikationsfaktor von 10^5 erreicht werden. Der Vorteil der isothermen Reaktionsbedingungen ist auch gleichzeitig ein Nachteil, da bei 37°C Reaktionstemperatur nur eine geringe Stringenz der Zielsequenz/Primer-Hybridisierungsreaktion zu erwarten ist. Bedeutender Vorteil ist der Einsatz von RNA als Template, da auf diese Weise nur lebende Erreger, nicht hingegen abgestorbene Mikroorganismen (z. B. nach Antibiotika-Therapie) nachgewiesen werden.

Auf Methoden zur epidemiologischen Charakterisierung von Krankheitserregern soll in diesem Artikel nicht eingegangen werden. Letztendlich lassen sich fast alle auf grundlegende Methoden der Molekularbiologie wie zum Beispiel den Restriktionsenzymverdau in Kombination mit anderen Techniken zurückführen. Allen gleich ist das Erstellen von Erreger-typischen Mustern (fingerprinting) auf der Basis bestimmter Gene und Genmuster (z. B. repetitive Elemente).

Universelle eubakterielle PCR

Neben den dargestellten diagnostischen Möglichkeiten bietet das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene eine weitere Methode zur Identifizierung von Bakterien, die universelle, eubakterielle PCR.

Bei diesem PCR-System werden Primer eingesetzt, die phylogenetisch hochkonservierte Bereiche im Bakteriengenom erkennen und in der Lage sind, alle bekannten Bakterienspezies mit hoher Wahrscheinlichkeit zu amplifizieren. Die Identifizierung erfolgt dann über die anschließende Sequenzierung und den computergestützten Datenabgleich mit bereits bekannten Sequenzen (1).

Bei Bakterien lassen sich drei ribosomale RNA (rRNA) Spezies unterschiedlicher Größe nachweisen, die durch die Angabe ihres Sedimentationskoeffizienten gekennzeichnet werden, 16S (ca.1500 Basen), 23S (ca. 300 Basen) und 5S (ca. 120 Basen) (20). (Abbildung 7)

Dazwischen liegen die sogenannten intergenischen oder internal transcribed spacer (ITS) (3). Die ribosomalen Gene (rRNA Gene) sind ubiquitär verbreitet, funktionell konstant, dadurch weitgehend gleich in der Primär- und Sekundärstruktur. Weiterhin besitzen sie eine hohe genetische Stabilität (5,10). Die 16S Genregion ist bisher am eingehendsten untersucht und stellt damit eine ausgezeichnete Zielstruktur für ein universelles PCR-System dar (6,9,1,11,12,28,30).

Aufgrund der Universalität des Systems werden alle im Material vorliegenden Bakterien gleichermaßen amplifiziert (17). Anzustreben ist daher der Einsatz des Systems zum Beispiel bei der Identifizierung von Reinkulturen, die auf herkömmliche Weise nicht identifiziert werden können, oder wenn eine weitere Anzucht nicht mehr möglich ist. Ein Fallbeispiel soll die Effizienz der Methode verdeutlichen.

Fallbeispiel

Ein 71jähriger männlicher, somnolenter Patient kam mit Fieber, Ikterus und reduziertem AZ zur stationären Aufnahme. Als auffälliger Untersuchungsbefund zeigte sich in der Sonographie der Leber im rechten Unterlappen ein Abszeß mit einem Durchmesser von 46 mm. Aufgrund der Somnolenz des Patienten wurde ein kranielles MRT durchgeführt, indem sich wenige Millimeter große Herde darstellen ließen. Die Therapie wurde mit Ciprofloxacin eingeleitet, der Leberabszeß wurde punktiert.

Alle angelegten mikrobiologischen Kulturen (Punktat, Blutkultur) blieben nach 7tägiger Bebrütung steril. Im mikroskopischen Direktpräparat des Leberpunktates fanden sich vereinzelt fadenförmige gramnegative Stäbchen.

Der Zustand des Patienten bessert sich nicht, so daß die Therapie auf Cefpodoxim und Metronidazol umgestellt wurde, worunter es zur deutlichen Befundbesserung kam und der Patient nach weiteren 7 Tagen in die häusliche Pflege entlassen werden konnte.

Das Punktatmaterial wurde einer DNA-Präparation und der universellen eubakteriellen 16S rDNA PCR zugeführt.

Zur Durchführung einer universellen eubakteriellen PCR mit anschließender direkter Sequenzierung verwenden wir zwei Primerpaare (fd1/244; PC3ModR/Bak11W), die Produkte von ca. 350bp, bzw. 700bp generieren, die sich in ihrer Sequenz ergänzen. Als Positivkontrolle dient *L.pneumophila* ATCC 33152. (Abbildung 8)

Die PCR-Produkte wurden anschließend direkt sequenziert und auf dem ABI PRISM™ -System 377A analysiert. (Abbildung 9) Die Sequenzen wurden in einem Blast Search (Basic Local Alignment Search Tool) am NCBI mit bekannten Bakteriensequenzen verglichen (1).

1 2 3 4 5 6 7 8

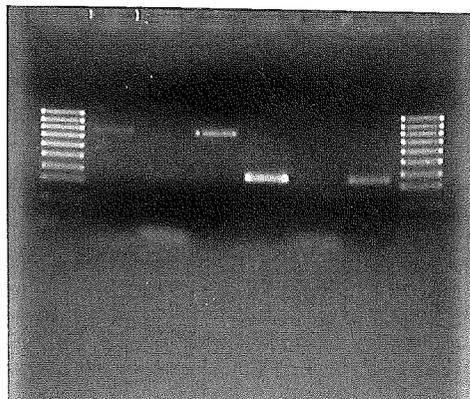


Abbildung 8: 16SrDNA PCR

Dargestellt ist das Ergebnis der PCR Reaktion der universellen eubakteriellen 16SrDNA PCR mit zwei Primerpaaren (*fd1/244*-ca.350bp; *PC3ModR/Bak11W*-ca.700bp); 1.5% Agarose, gefärbt mit Ethidiumbromid

Spur 1 100bp Molekulargewichtsstandard Fa. PeqLab
 Spur 2 Patienten DNA (Amplifikatlänge ca. 700bp)
 Spur 3 Negativkontrolle (H_2O)
 Spur 4 Positivkontrolle (*L.pneumophila* ATCC 33152)
 Spur 5 Patienten DNA (Amplifikatlänge ca. 350bp)
 Spur 6 Negativkontrolle (H_2O)
 Spur 7 Positivkontrolle (*L.pneumophila* ATCC 33152)
 Spur 8 100bp Molekulargewichtsstandard Fa. PeqLab
 Im Leberpunktatmaterial des Patienten konnte bakterielle DNA (Spur 2 und 5) nachgewiesen werden.

Dies ergab mit einer Wahrscheinlichkeit von 96% *Fusobacterium nucleatum*.

Mittels universeller eubakterieller 16S rDNA PCR konnte somit im Zusammenhang mit dem mikroskopischen Direktpräparat und der Klinik des Patienten *Fusobacterium nucleatum* als auslösendes Agens identifiziert werden.

Die hier aufgeführten Methoden der Nukleinsäurediagnostik mit ihren Vorteilen, aber auch Nachteilen, sollen nicht darüber hinwegtäuschen, daß der Goldstandard der mikrobiologischen Diagnostik auch heute noch die Anzucht des Krankheitserregers ist. Allerdings muß man auch einräumen, daß der eindeutige Nachweis einiger Krankheitserreger, wie *Tropheryma whippelli* erst durch diese Methoden ermöglicht wurde (22). Der diagnostische Aussagewert der neuen und der herkömmlichen Methoden wird sich auch weiterhin ergänzen und nicht ausschließen und weiterentwickeln.

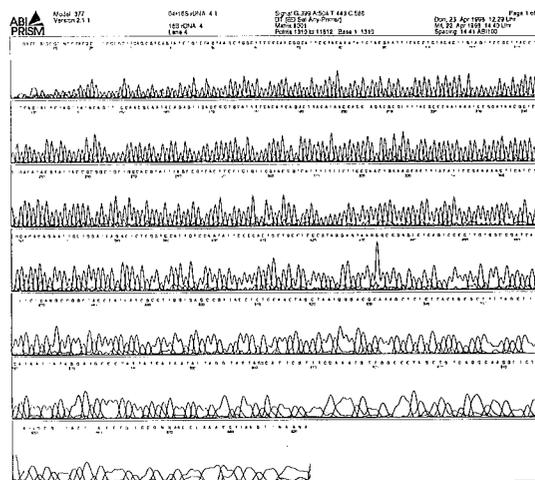


Abbildung 9: Chromatogramm

Das Chromatogramm zeigt die Basensequenz (690bp) des amplifizierten Produktes aus der Abb. 8. Die generierte Sequenz wird anschließend einem Datenabgleich im BLAST Search zugeführt.

Literatur

1. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402
2. Barany F (1991) Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:189-193
3. Barry T, Collieran G, Glennon M, Dunican LK, Gannon F (1991) The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify Eubacteria. *PCR Methods and Applications* 1:51-56
4. Böttger EC (1995) Ribosomale Nukleinsäuren-Eine universelle diagnostische Zielstruktur. *Biospektrum* 3:15-22
5. Burkhard F (1992) *Mikrobiologische Diagnostik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
6. Dasen G, Smutny J, Teuber M, Meile L (1998) Classification of propionibacteria based on ribosomal genes and PCR. *Syst Appl Microbiol* 21(2):251-9
7. Duck P, Alvarado-Urbina G, Burdick B, Collier B (1990) Probe amplifier system based on chimeric cycline oligonucleotides. *BioTechniques* 9:26-30
8. Fahrlander PD, Klausner A (1988) Amplifying DNA probe signals: a 'Christmas tree approach'. *BioTechnology* 6:1165-1168
9. Goldenberger D, Kunzli A, Vogt P, Zbinden R, Altwegg M (1997) Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol* 35(11):2733-2739
10. Göbel U (1992) *Mikrobiologische Diagnostik mit rRNA Sonden*. *Mikrobiologische Diagnostik*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, :754-757

11. Greisen K, Loeffelholz M, Purhoit A, Loeng D (1994) PCR primers and probes for the 16S rRNA Gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 32(2):335-351
12. Heritz DM, Lacroix JM, Batra SD, Jarvi KA, Behesti B, Mittelman MW (1997) Detection of eubacteria in intestinal cystitis by 16S rDNA amplification. *J Urol* 158(6):2291-5
13. Kieivits T, van Germen B, van Strijp D, Schukkink R, Dircks M, Adriaanse H, Malek L, Sooknanan R, Lens P (1991) NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J Virol Meth* 35:273-286
14. Knippers R (1995) *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
15. Kwok DY, Davis GR, Whitfield KM, Chapelle HL, Michele D, Gingeras TR (1989) Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1173-1177
16. Lizardi PM, Guerra CE, Lomeli H, Tussie-Luna I, Kramer R (1988) Exponential amplification of recombinant RNA hybridisation probes. *BioTechnology* 6:1197-1202
17. Meier A, Persing DH, Finken M, Böttger EC (1993) Elimination of contaminating DNA within polymerase reaction reagents: implications for a general approach to detection of uncultured pathogens. *J Clin Microbiol* 31(3):646-652
18. Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350
19. Myers TW, Gelfand DH (1991) Reverse transcription and DNA amplification by a Thermus aquaticus DNA polymerase. *Biochemistry* 30:7661-7666
20. Neefs JM, van der Peer Y, Hendriks L, de Wachter R (1990) Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *NAR Suppl* 18:2237-2318
21. Reischl U, Mayer J (1993) *Moderne Methoden der Nukleinsäure-Diagnostik*. Labmed 17:456-464
22. Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S, Tompkins LS (1990) The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med* 323(23):1573-80
23. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
24. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour, Cold Spring Harbour Laboratories
25. Steinmetz M (1988) DNS Sonden in der medizinischen Diagnostik. *Ärztl Lab* 34:307-313
26. Urdea MS, Kohlberg J, Clyne J, Running JA, Besemer D, Warner B, Sanches-Pescador R (1989) Application of rapid non-radioisotopic nucleic acid analysis system to the detection of sexually transmitted disease-causing organisms and their associated antimicrobial resistance. *Clin Chem* 35:1571-1575
27. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriology* 173(2):697-703
28. Wiedmann M, Wilson W, Czajka J, Barany F, Batt CA (1994) *Ligase-mediated detection techniques. Methods in DNA Amplification*. Plenum Press, New York and London
29. Wilbrink B, van der Heijden IM, Schouls LM, van Embden JD, Hazes JM, Breedveld FC, Tak PP (1998) Detection of bacterial DNA in joint samples from patients with undifferentiated arthritis and reactive arthritis, using polymerase chain reaction with universal 16S ribosomal RNA primers. *Arthritis Rheum* 41(3):535-43
30. Wu DY, Wallace RB (1989) The ligation amplification reaction (LAR)-amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. *Genomics* 4:560-569

Über Darmbrand, eine vor 50 Jahren in Lübeck beschriebene Erkrankung, und was aus ihr wurde

B. Kreft¹, K. Dalhoff², K. Sack¹

Zusammenfassung

In den Jahren 1946-1948 trat in Lübeck und anderen Städten Norddeutschlands eine epidemisch verlaufende Infektion auf, die bis dahin nicht bekannt war. Die Erkrankung wurde aufgrund ihrer Morphologie als *Darmbrand* (*Enteritis necroticans*) bezeichnet. Untersuchungen ergaben, daß es sich bei dem Infektionserreger um *Clostridium perfringens* Typ C handelte. In der Folge konnte die Pathogenese der Enteritis necroticans und die eine krankheitsauslösende Bedeutung des beta-Toxins von *Clostridium perfringens* Typ C gesichert werden. Entsprechend konnte durch die Immunisierung gegen dieses Toxin die Inzidenz der Enteritis necroticans in Papua Neu Guinea, einem Land, in dem die Erkrankung in bestimmten Regionen noch heute endemisch ist, deutlich gesenkt werden.

Vor 50 Jahren – 1949 – erschien im Thieme Verlag die Monographie *Darmbrand, Enteritis necroticans*, in der Lübecker Ärzte ihre Erfahrungen mit dieser Erkrankung mitteilten. Wenngleich der Darmbrand in Europa eine kaum noch auftretende Erkrankung ist, so ist mit seinem epidemischen Auftreten besonders in Notstandsgebieten zu rechnen. Die vorliegende Arbeit soll an die in Lübeck aufgetretene Darmbrandepidemie und die damit verbundene Arbeit der beteiligten Ärzte erinnern und eine Darstellung der Epidemiologie, Pathogenese und Therapie der Erkrankung unter Berücksichtigung inzwischen gewonnener Erkenntnisse geben.

Einleitung

1949 erschien im Thieme Verlag die Monographie *Darmbrand, Enteritis necroticans*, eine umfassende und sorgfältige Analyse der Erfahrungen, die in Lübeck mit der 1946 - 1948 abgelaufenen Epidemie gewonnen wurden, und zugleich das vorbildliche Resultat einer engen Kooperation zwischen Klinikern, Pathologen und Mikrobiologen (Abb. 1), der damaligen Chefarzte und ihrer Assistenten der Lübecker Kranken-

anstalten Süd und Ost (7). Die Autoren: Prof. Dr. med. K. Hansen, Chefarzt der Med. Klinik Süd. Dr. med. habil. E. Jeckeln, Prosektor am Pathologischen Institut.

Prof. Dr. med. J. Jochims, Chefarzt der Kinderklinik. Prof. Dr. med. A.p Lezius, Chefarzt der Chirurgischen Klinik Ost. Prof. Dr. H. Meyer Burgdorff, Chefarzt der Chirurgischen Klinik Süd. Prof. Dr. F. Schütz, Chefarzt des Hygienischen Institutes Ost. Im Vorwort danken die Autoren namentlich ihren Assistenten, die auch später als Ärzte in Lübeck tätig waren, u. a. den Herren Drs. Ebert, Edelhoff, Gahrmann, Langer, Lübbers, v. Romatowski, Schümann und Uthgenannt. Aus Anlaß der 50. Wiederkehr des Erscheinungsjahres der Monographie soll an die Darmbrandepidemie erinnert und dargestellt werden, welche Rolle Darmbrand regional, national und weltweit im Anschluß an die Epidemie bis heute spielt; ferner soll

die Enteritis necroticans von anderen *Clostridium perfringens* assoziierten Erkrankungen abgegrenzt werden.

I Die Darmbrandepidemie 1946 -1948 in Lübeck

Definition: Zu einer Zeit, als mikrobiologische Befunde noch nicht vorlagen, wurde die Erkrankung rein morphologisch durch Jeckeln definiert (9), der ihr auch den Namen gab: „Wir verstehen unter Darmbrand eine akute Erkrankung des Darmrohres, in deren Mittelpunkt eine die oberen Dünndarmabschnitte bevorzugende, die Darmwand abschnittsweise oder diffus befallende, von der Schleimhaut her einsetzende, zum Fortschreiten in die Tiefe neigende und nicht selten in Schüben verlaufende Nekrose steht.“

Epidemiologie: Die Erkrankung war, als sie im frühen Sommer 1946 erstmals auftrat, überraschend neu, denn keiner der behandelnden Ärzte hatte sie zuvor gesehen. Eine Literaturrecherche ergab, daß nur Jaffé 1918 (8) bei sechs russischen Kriegsgefangenen und einem deutschen Soldaten Darmbrand exakt morphologisch beschrieben und bereits als ätiologisches Agens ein vom Darmlumen her wirkendes bakterielles Gift ver-



Abb.1: Titelblatt der Monographie von 1949.

mutet hatte. 1946/47 wurden in Lübeck 364 Fälle gesehen, darunter 140, die histologisch gesichert wurden. In Norddeutschland gab es darüber hinaus zahlreiche Erkrankungsfälle, vor allem in den Regionen Hamburg und Kiel. Darmbrand gab es zu jeder Jahreszeit, gehäuft jedoch von Juni bis Oktober, vor allem im August. Unter den Erkrankten überwogen Männer, ein Altersgipfel fand sich im 5. Dezenium, die Todesfälle häuften sich im Säuglings- und Greisenalter. Die Gesamtmorbidität wurde auf 1,6 : 1000 Einwohner berechnet, die Mortalität betrug insgesamt 22 % – vor Einführung der Sulfonamidtherapie 44 %, danach 16 % (7).

Klinik: Es gab drei Verlaufsformen:

1. Der *perakute Verlauf* führte innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen zum Tode unter dem Bilde des toxischen Herzkreislaufversagens, oft mit neurologischen Symptomen, wie Bulbärparalyse oder Tetraplegie. Diese Form dominierte bei Säuglingen und Kleinkindern.
2. Die akute Verlaufsform, die das zentrale klinische Problem darstellte. Die häufigste Trias der Anamnese war: unerträgliche, plötzlich auftretende Leibschmerzen, betont links vom Nabel, Diarrhoe und strikte Nahrungsverweigerung. Klinisch beeindruckten vorrangig: schwerstes Krankheitsgefühl, Temperaturen um 38°C, starke lokale Hyperalgesie der Haut, bei ausgeprägtem lokalen Druckschmerz, Fehlen einer groben Abwehrspannung infolge nur infraomentaler ausgeprägter Peritonitis, blutige Diarrhoen, Petechien der bleichen Haut bei normalen Thrombozytenzahlen. Es bestand allenfalls eine geringe Leukozytose mit deutlicher Linksverschiebung und toxischer Granulation.
3. Die leichte Verlaufsform infolge geringfügigen Darmbrandes, die symptomlos war oder sich als unspezifische Gastroenteritis äußerte, keinen wesentlichen Ausfall der Darmfunktion nach sich zog und als Zufallsbefund bei Sektionen erkannt wurde.

Bei günstigem Verlauf der akuten Form bildeten sich die Lokalsymptome in 5 bis 10 Tagen zurück, nach 4 Wochen war der Stuhl blutfrei. Bettruhe wurde bis zur 5. Woche eingehalten, Entlassung erfolgte in der 6. bis 7. Krankheitswoche. Andere innere Organe blieben weitgehend unbehelligt, eine Neigung zu schmerzhaften Darmpassagen blieb gelegentlich bestehen.

Komplikationen der akuten Form waren zahlreich: paralytischer Ileus infolge Darmlähmung bei ausgedehntem Darmbrand; frühe Stenose infolge des Darmwandödems mit mechanischem, meist hohem Ileus; Spätstenose infolge zirkulärer Darmwandnarbe mit Ileus oder prä- bzw. intrastenotischer Perforation (Abb. 2) und Perforationsperitonitis; Blutung ins Darmlumen infolge Abstoßens der Nekrosen; Adhäsionsileus. Infolge

dessen ergab sich eine äußerst komplexe und oftmals schwierige Differentialdiagnose des akuten Abdomens, insbesondere bei vereinzelt auftretendem Darmbrand außerhalb der Epidemie.

Pathologische Anatomie, Makroskopische Befunde: Singuläre oder multiple Darmabschnitte von 6 cm bis 330 cm Länge sahen aus wie hämorrhagisch infarziert und waren von gummischlauchartiger Konsistenz. Bevorzugt betroffen waren das Jejunum, besonders in seinen proximalen Abschnitten, und das Ileum; selten befallen waren Ösophagus und Magen (jeweils 5/102 Fälle). Lokal bestand eine fibrinöse Peritonitis (Abb. 3).

Mikroskopische Befunde: Strotzende Hyperämie der dilatierten Darmwandkapillaren mit Fibrinthromben sowie ein massives Ödem der Mukosa und Submukosa wurden als frühe Veränderungen gefunden (Abb. 4). Wenig später folgten ausgedehnte Blutungen in allen Darmwandschichten, danach Nekrosen der Zotten und nachfolgend auch tief in die Darmwand reichende Ne-



Abb. 2: Jejunumstenose mit stecknadelkopf- und linsengroßer Wandperforation nach 11 Monate zurückliegendem Darmbrand. Makrophoto, 1,2x. Aus: v. Romatowski (20).



Abb. 3: Situs der Bauchhöhle (links) und Querschnitt des Jejunums (rechts) bei akutem Darmbrand. Aus: E. Jeckeln: Die pathologische Anatomie des Darmbrandes. In (7).



Abb. 5: Narbe nach Darmbrand: vollständige Wiederherstellung des Faltenreliefs. Makrophoto, 1,2x. Aus: v. Romatowski (20).

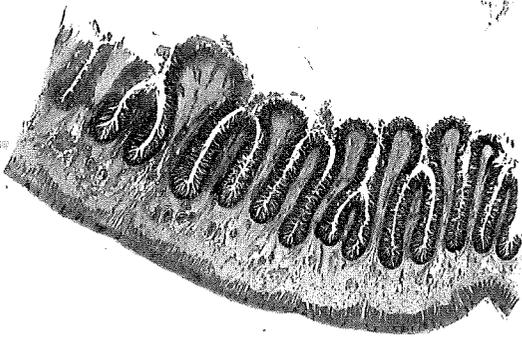


Abb. 4: Akuter Darmbrand, 2 Abschnitte aus dem Resektat der Kasuistik A.D. Ödem der Submucosa und apikale Nekrose einer Kerkring'schen Falte (oben). Ausgedehnte Schleimhautnekrosen und thrombosierte Kapillaren der Submucosa (unten, Path E 6869/67. HE, Lupe).

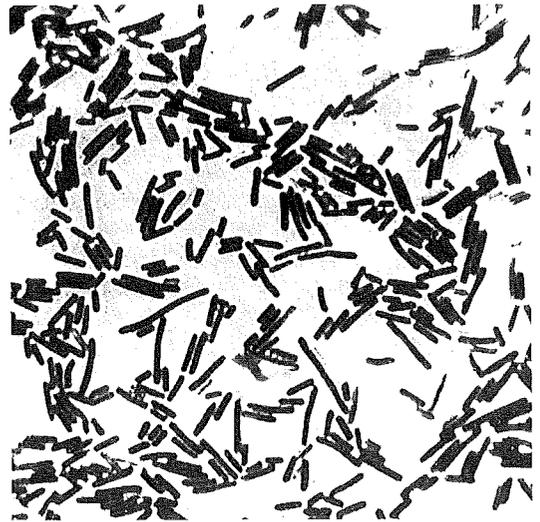


Abb. 6

krosen, die gelegentlich Gasblasen enthielten. Vor Abstoßung der Nekrosen fehlten stets nennenswerte Leukozyteninfiltrate, erst in der 3. Krankheitswoche entstanden Geschwüre mit reaktivem Granulationsgewebe. Nach Abheilung derselben wurden mehr oder weniger ausgedehnte Narben gefunden, deren schiefergraue Farbe auf

Siderinablagerungen in der Ödemsklerose der Darmwand beruhen. Keine Regeneration der Kerkring'schen Falten und der Zotten (Abb. 5). – Extraintestinal wurden lediglich petechiale Blutungen in Gehirn und Rückenmark, insbesondere bei perakuten Verlaufsformen, gefunden, als Ausdruck einer generalisierten „Kapillartoxikose“.

Ätiologie: Fast stets gelang der Nachweis von anaerob wachsenden grampositiven Stäbchen (Abb. 6) aus Tupfpräparaten von resezierten Darmabschnitten chemotherapeutisch nicht behandelter Patienten sowie in deren Stuhl, häufig auch aus Erbrochenem, gehebertem Magen- bzw. Duodenalinhalt, gelegentlich auch aus dem Blut. Ferner gelang die Anzüchtung aus Fischpasten, Fischdarm und aus Milch. Tierexperimentell war die Erzeugung von Darmbrand durch direkte transmurale intraduodenale Applikationen der angezüchteten Anaerobier möglich. Diese wurden identifiziert als eine Subspezies von *Clostridium perfringens* Fraenkel, die sich vom Gasbranderreger sowohl morphologisch als auch durch die Leichtigkeit der Versporung, die hohe Kochresistenz der Sporen und die Produktion von wenig α -, aber viel β -Toxin unterschied und von Zeisler (33) als *Bacterium enterotoxigenum* bezeichnet, von Oakley dem Typ F der Welch-Nuttai-Bakterien zugeordnet wurden; spätere Taxonomie: *C. perfringens* Typ C.

Pathogenese: Da auch bei Gesunden Darmbranderreger im Stuhl in geringen Mengen nachzuweisen waren, schienen u. a. quantitative Aspekte wichtig zu sein. Das bevorzugt saisonale Auftreten der Erkrankung wurde erklärt durch die günstigen Wachstumsbedingungen für die Krankheitserreger in der warmen Jahreszeit. Da Männer häufiger undiszipliniert und viel aßen, hätten sie eine größere Erkrankungschance als Frauen. Die besonders hohe Sterblichkeit von Säuglingen wurde zurückgeführt auf die höhere Durchlässigkeit der Darmwand für Proteine, also auch für das β -Toxin des Krankheitserregers.

Folgende Vorstellung zum Ablauf der Erkrankung wurde entwickelt; Die Infektion erfolge mit Nahrung, die Sporen der Erreger enthält; nur bei Subazidität des Magensaftes reiche erregerhaltige sporenlose Nahrung aus. Als wichtig wurden darüber hinaus angesehen Motilitätsstörungen des Gastrointestinaltrakts infolge kohlenhydratreicher Nachkriegsernährung, die außerdem über ein akzentuiert alkalisches Duodenalmilieu für maximale Bakteriendichte Sorge. Bedeutsam sei ferner der experimentell ermittelte Befund, daß die gleichzeitige Aufnahme von gramnegativen Aerobiern infolge Sauerstoffverbrauchs das Wachstum der Darmbranderreger begünstige. Im Anschluß an eine enteritische Schädigung erfolge dann das Eindringen des bakteriellen β -Toxins.

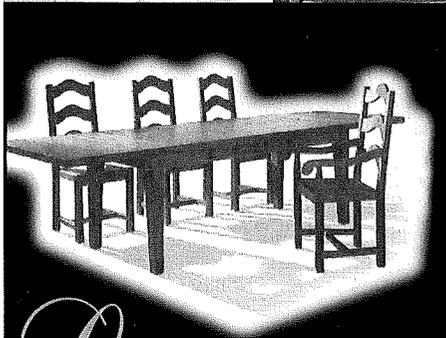
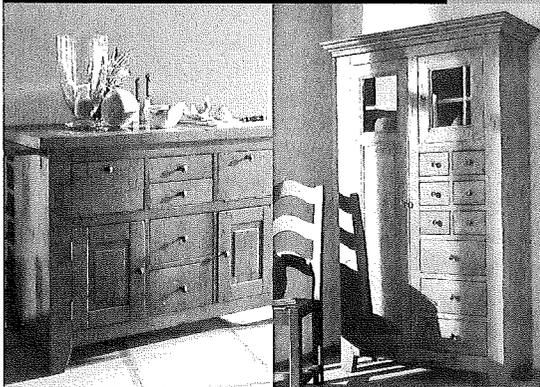
Dieses verursache eine Kapillarlähmung mit konsekutiven Durchblutungsstörungen und den geschilderten pathologisch-anatomischen und klinischen Folgen.

Therapie: Entscheidend waren folgende Maßnahmen:

1. Der Entleerung des Magens und der oberen Darmabschnitte mittels Miller-Abbot-Sonde schloß sich eine Dauerabsaugung des Darminhaltes über Tage an.

Unikate zum Verlieben

HARR • RÜTNER & HARR



Carlos – geschaffen für Lebenskünstler und Genießer. Möbel aus massiver Eiche mit wunderschön gearbeiteten Oberflächen, die nicht nur zum Anschauen sondern auch zum Anfassen gemacht sind. Möbel zum Leben. Lassen Sie sich begeistern - bei uns!

REESE

DAS LÜBECKER EINRICHTUNGSHAUS

Töpferweg 20-22 • Lübeck • Telefon: 0451/8 30 44

Parkplätze vor der Tür.

2. Applikation der von Domagk auf Veranlassung von Lezius zur Verfügung gestellten Sulfonamide Sulfatolamid (Marbadal, 20 g/d) und Homosulfanilamid (Marfanil, 5 g/d) in jeweils 5 Einzeldosen/d, zunächst über die liegende Sonde, für mindestens 8 bis 10 Tage.
3. Intravenöse Applikation von Serum, das Anti- β -Toxin enthielt, über mehrere Tage; eine günstige Wirkung wurde bereits nach wenigen Stunden gesehen.
4. Bluttransfusionen, sofern die Blutungsanämie infolge Darmbrandes dies erforderte.
5. Chirurgische Therapie der Folgen der Darmwandnekrosen – blutende oder vor der Perforation stehende Geschwüre – mittels Resektion möglichst nach internistischer Vorbehandlung.

II Was wurde nach dem Abklingen der Epidemie 1947 aus der Erkrankung Darmbrand?

1. Regional: Singuläre Erkrankungen wurden nach 1950 unseres Wissens nach kaum, epidemische Erkrankungen sicher nicht publiziert. Im Kolleg der speziellen pathologischen Anatomie wurde um 1960 an der CAU in Kiel von Prof. Wilhelm Doerr auf die im „nasen Dreieck“ zwischen Hamburg, Kiel und Lübeck 1946/47 abgelaufene Epidemie im Sinne einer historischen Tatsache hingewiesen, wie Kollegaufzeichnungen belegen. Als Assistent am von Prof. Ernst Jeckeln geleiteten pathologischen Institut der Städtischen Krankenanstalten Lübeck hatte man noch 1964 bei der makroskopischen Befundung des Dünndarmes im Rahmen von Obduktionen sorgfältig auf Residuen des abgelaufenen Darmbrandes zu achten. In der Tat fanden sich nicht selten (bei damals ca. 1500 Sektionen/Jahr) einzelne schiefrige flache Narben mit unvollständig wiederhergestelltem Faltenrelief, wie sie von Romatowski beschrieben hat (Abb. 5). Schließlich könnte die folgende Kasuistik aus 1988 auf eine potentiell langfristige Bedeutung eines unter Narbenbildung abgeheilten Darmbrandes hinweisen.

Kasuistik

Anamnese: Der 58jährige Patient, G. F., geb. am 04.12.1929, aus Travemünde, gab im März 1988 an, 1946 oder 1947 längere Zeit in der chirurgischen Klinik des Krankenhauses Süd gelegen zu haben; man habe ärztlicherseits damals mehrfach eine Bauchoperation erwogen und gesagt, er habe einen Darmbrand. Diese Vorgeschichte war nicht zu objektivieren, da die Krankenakten vernichtet waren.

Seit 5 Tagen „Erkältung“ mit Husten, Auswurf und Luftnot. Seit dem Vortag Schmerzen im rechten Fuß mit Rötung und Schwellung, nachdem er sich 2 Wochen zuvor eine Platzwunde am re. Schienbein zugezo-

gen hatte. Deswegen Einweisung in das Krankenhaus Priwall.

Klinischer Befund am 20.03.1988: Patient mit deutlichen Krankheitserscheinungen. Rechter Vorfuß gerötet und bis in die Knöchelregion geschwollen. Daneben feinfleckige rote Effloreszenzen an der Haut des Unterschenkels (Vaskulitis?). Leib unauffällig. Bronchitische RG über den Lungen. BSG 20/43 mm n. W., Leuko 8,2/nl mit geringfügiger Linksverschiebung. Körpertemperatur 38° C. Verdachtsdiagnose: Erysipel. Infektarthritis?

Klinischer Verlauf: Unter 2 x 750 mg Cefuroxim/d i. v. weitgehende Rückbildung des Lokalbefundes am rechten Fuß innerhalb von 2 Tagen. Deshalb Umsetzen des Antibiotikums auf 3 x 500 mg Cefaclor/d. Am 22.03. Auftreten von krampfartigen Leibschmerzen und wäßrigen Durchfällen mit Blut- und Schleimbeimengungen. Auch nach Absetzen des Cephalosporins Leib zunehmend druckschmerzhaft und Entwicklung eines Subileus. Daher Verlegung des Patienten in die MUL unter der Verdachtsdiagnose: antibiotikaassoziierte pseudomembranöse Colitis.

Befund bei Verlegung in die MUL am 30.03.1988: Sigmoidoskopie ohne pathologischen Befund. Sonographisch Aszites bei Hypalbuminämie (22,7 gA). Abdomen gebläht, diffus druckschmerzhaft, klingende Darmgeräusche. Stuhl etwas blutig tingiert. Radiologisch mehrere Dünn- und Dickdarmspiegel. Temperatur 38,3° C. CRP 106 mg/l. Im übrigen keine auffälligen Laborwerte.

Befund bei Laparatomie am 31.03.1988: 1000 ml blutig tingiertes Exsudat in der Bauchhöhle. 10 und 20 cm distal des Treitz'schen Bandes fanden sich 2 blande, 2 bis 3 cm breite Stenosen des oberen Jejunums. 80 cm distal hiervon beginnend fanden sich 8 weitere Stenosen von 6 bis 8 cm Breite verteilt bis zum terminalen Ileum; die Darmwand war hier rötlich und leicht ödematös. Magen und Dickdarm unauffällig, ebenso das gesamte übrige Abdomen. Von einer Resektion, bei der lediglich 60 cm Jejunum belassen worden wäre, wurde abgesehen.

Perioperative Befunde: Mesenterialer Lymphknoten: unspezifische Lymphadenitis. Aszites: Zytologisch Zeichen der geringen chronischen Entzündung. Kein Nachweis von Krankheitserregern bei kulturellen Anzüchtungsversuchen aus Aszites, Magensaft, Stuhl, Harn und Blut. Serologische Untersuchungen auf *Clostridium difficile*, *Campylobacter*, Typhus, Paratyphus, Enteritissalmonellen, Shigellen, Brucellen, Yersinien und Leptospiren fielen sämtlich negativ aus.

Postoperativer Verlauf: Mehrwöchiger Aufenthalt auf der Intensivstation wegen protrahierter Ileussympomatik und interkurrenter Aspirationspneumonie. Nach konservativer Beherrschung des Krankheitsbildes

zeigte die radiologische Untersuchung des Dünndarmes nach Sellink am 06.05. keinen sicher krankhaften Befund mehr. Entlassung am 10.05.88 in die ambulante hausärztliche Behandlung. Der weitere Verlauf ist unbekannt. Eine aktenkundige ärztliche Anamnese anlässlich einer Parotisionoperation im Januar 1991 ergab jedoch keine Hinweise auf eine abdominelle Symptomatik; klinisch war zu diesem Zeitpunkt am Leib kein krankhafter Befund zu erheben.

In dieser Kasuistik sind die ätiologischen Zusammenhänge zweifellos unsicher. Wenn berücksichtigt wird, daß multiple Dünndarmstenosen lediglich entstehen in der Folge von Darmbrand, wie durch von Romatowski beschriebene (20), oder des Morbus Crohn, der hier nicht vorliegen dürfte, weil es keine Hinweise auf eine chronischprogrediente Erkrankung gibt, könnte folgende Pathogenese zutreffen: Der aus der Nachkriegszeit erinnerte Darmbrand hat 10 blande stenosierende Dünndarmnarben hinterlassen, die, bedingt durch eine nachhaltige Motilitätsbeschleunigung infolge der aktuellen Infektion oder der antibakteriellen Chemotherapie, akut dekompensierten und einen Ileus verursachten.

2. National: Unseres Wissens liegen nur wenige Publikationen über vereinzelte frische Darmbranderkrankungen nach 1950 vor, so zum Beispiel von Wechner et al., (31), die in Berlin 1979/80 4 Fälle beobachteten. Folgende Kasuistik stammt aus Westfalen, die 1967 im Institut für Pathologie der Medizinischen Akademie Lübeck mitbefundet wurde:

Kasuistik

Anamnese des H. D., geb. am 15.02.1937, aus Hagen/Westfalen: Als Kind Gelbsucht. Seit dem 19. Lebensjahr Thrombophlebitiden der Beine, später Ulcus cruris, deswegen 4 Wochen stationäre Behandlung. Nach der Entlassung in der 3. Juliwoche 1967 unklare Sensationen im Oberbauch bei Nikotin- und Alkoholkonsum. Am 31.07. plötzlich heftige Leibscherzen von der Nabelgegend her gürtelförmig ausstrahlend, Zunahme der Beschwerden bei Nahrungsaufnahme. Am 06.08.67 erstmals Übelkeit, mehrfaches Erbrechen und daher Einweisung in die Klinik.

Klinischer Befund: Reduzierter AZ und KZ. Peritonealer Reizzustand mit Druck- und Loslaßschmerz, BSG 19/36 mm n. W., normal sind Körpertemperatur, Puls sowie Harn- und Serumbilastase. Wegen zunehmender Beschwerden und radiologischem Nachweis von Dünndarmspiegeln Laparotomie am 09.08.

Operationsbefund: Im oberen Jejunum fand sich eine 15 cm lange gangränöse Darmschlinge, die reseziert wurde; Ödem des zugehörigen Mesenteriums. Alle übrigen Organe und Darmabschnitte waren unauffällig. Chirurgischerseits wurde der Verdacht auf eine Mesen-

terialvenenthrombose geäußert. Mikrobiologische Untersuchungen erfolgten nicht.

Pathologisch-anatomischer Befund: Kein Nachweis einer über das Resektat hinausgehenden Mesenterialvenenthrombose oder einer Invagination. Makroskopische Darmveränderungen wie bei Darmbrand (PD Dr. Laubmann/Hagen). Prof. Jekkel, MUL, der das Resektat zugesandt erhielt: Akuter Darmbrand mit sekundären Gefäßveränderungen (Path. E-Nr.: 6869/67; Abb. 4).

3. Weltweit: In den letzten Jahrzehnten ist der Darmbrand in den westlichen Ländern zu einer seltenen Erkrankung geworden, die nur noch sporadisch vorkommt, die jedoch aufgrund ihrer Seltenheit zu diagnostischen Problemen führen kann (19). Über die Diagnostik und (chirurgische) Therapie der Enteritis necroticans liegen daher mehrere kasuistische Mitteilungen vor (26). Da der Darmbrand in Deutschland nicht meldepflichtig ist, liegen exakte Zahlen über seine Inzidenz nicht vor. Die Enteritis necroticans ist nicht auf die Norddeutsche Region und die Jahre nach dem Zweiten Weltkrieg beschränkt gewesen. Eine schwer verlaufende Enteritis necroticans, die klinisch, epidemiologisch, histomorphologisch und mikrobiologisch der in Norddeutschland beschriebenen Darmbranderkrankung weitgehend gleicht, wurde bei den Bewohnern des Hochlandes von Papua Neu Guinea (PNG) beschrieben. Sie wird dort aufgrund des Zusammenhanges mit dem Verzehr von Schweinefleisch als ‚pig-bel‘ (wörtlich etwa: ‚Schweine-Bauch‘) bezeichnet (13, 15). In den Arbeiten, die diese Enteritis necroticans beschreiben, wird explizit Bezug auf die von den Lübecker Ärzten publizierte Schrift genommen (15).

Die Enteritis necroticans in PNG weist einige Besonderheiten auf, die die Erkrankung auch in Norddeutschland besser verstehen lassen und pathogenetische Gesichtspunkte beleuchten. Zur Entstehung der Enteritis necroticans tragen nach dem derzeitigen Kenntnisstand alimentäre Besonderheiten bei, die für das epidemische Auftreten der Erkrankung in Neu Guinea, aber auch in Deutschland 1946-1948 relevant sind (12). Hierzu zählen vor allem der Mangel an digestiven Proteasen im Dünndarm, wie er nach vorwiegend proteinarmer, kohlenhydratreicher Diät auftritt, und die Zufuhr hitzestabiler Trypsin-Inhibitoren, die in bestimmten Speisen (z. B. Süß-Kartoffeln: *Ipomoea batata*) enthalten sind. Nach der aus rituellen Gründen im Hochland PNGs ausgeübten plötzlichen Aufnahme großer Mengen von Schweinefleisch, von dem eine Kontamination mit *C. perfringens* angenommen wird, kann das β -Toxin dieses Erregers, das sehr empfindlich gegenüber proteolytischen Vorgängen ist, der Trypsinwirkung entgehen und seine toxische Wirkung entfalten (12). Auch Bohnen und Erdnüsse enthalten Proteaseinhibitoren; das Entstehen einer Enteritis necroti-

cans nach deren Verzehr und der nachfolgenden Aufnahme von Schweinefleisch ist beschrieben worden (12). Zudem kann eine Infestation mit Nematoden zu einem Proteasemangel führen, da *Ascaris lumbricoides* Trypsin-Inhibitoren produziert und damit einer Verdauung entgegen (16). In diesem Zusammenhang ist bedeutsam, daß 70-80 % der Bewohner des Hochlandes von Neu Guinea von *Ascaris lumbricoides* befallen sind (16). Askariden sind bei den in Lübeck 1946/47 diagnostizierten Fällen dagegen nicht beschrieben worden.

Die einseitige proteinarme Ernährung, die weite Verbreitung des Krankheitserregers *C. perfringens* und die plötzliche Zufuhr vermutlich größerer Mengen des Krankheitserregers mit dem Genuß kontaminierten Schweinefleisches erklärt das häufige Auftreten der Enteritis necroticans in Papua Neu Guinea. Bei den einheimischen Bewohnern des Hochlandes PNGs konnten zu 86 % Antikörper gegen das β -Toxin von *C. perfringens* nachgewiesen werden. Die Erkrankung wird jedoch gelegentlich auch in küstennahen Städten PNGs diagnostiziert, ihr relativ seltenes Auftreten dort wird mit einem regelmäßigeren Verzehr von Schweinefleisch, das damit verbundenen höheren Proteasenaktivität im Verdauungstrakt und hygienischeren Schlacht- und Lagerbedingungen erklärt (27). Die Bedeutung des Verzehrs von Fleisch als Risikofaktor für die Erkrankung an der Enteritis necroticans wird in mehreren Berichten aus der Region beschrieben (26) und ist in einer Fall-Kontroll-Studie analysiert und belegt worden (14). Hier zeigte sich, daß besonders der Verzehr von Schweinefleisch mit einem signifikanten Erkrankungsrisiko verbunden war (relatives Risiko: 14,1). Mit zunehmender Häufigkeit des Verzehrs von Schweinefleisch pro Woche jedoch sank das relative Risiko. Andererseits sind auch Fälle von Enteritis necroticans dokumentiert, in denen ein Verzehr von Schweinefleisch der akuten Erkrankung nicht voranging (5, 27) und Untersuchungen, die eine Kontamination des Fleisches mit *C. perfringens* oder seines β -Toxins belegt hätten, fehlen. Daher ist eine Bedeutung von *C. perfringens* als Teil der vorhandenen intestinalen Flora für die Erkrankung nicht auszuschließen (18). Die pathogenetische Rolle von *C. perfringens* Typ C und dessen β -Toxin für diese Infektionserkrankung ist dagegen auch tierexperimentell gesichert (7, 16, 30).

Auch in anderen Ländern mit oftmals kriegsbedingten Notlagen (10) ist die Enteritis necroticans eine in der Differentialdiagnose der Diarrhoe und des akuten Abdomens zu berücksichtigende Erkrankung (1, 3, 17, 19). Insbesondere in China ist die Erkrankung (einer Mitteilung aus dem Jahre 1979 zufolge) nicht selten (25), ihr Vorkommen wird unter anderem in Uganda (28, 32), Nepal (17) und auf den Salomonischen Inseln (5, 28) beschrieben. Die Enteritis necroticans ist daher

vor allem in den Tropen und Ländern, in denen ein Nahrungsmangel herrscht, auch heute noch in die Differentialdiagnose der Diarrhoe und des akuten Abdomens einzubeziehen (1, 3, 5, 28). Entsprechend könnte die Verbesserung der Ernährungssituation in den 1950er Jahren das Verschwinden der Erkrankung in Deutschland erklären. In PNG ist die Infektionserkrankung noch immer existent, es wird über besondere Verläufe auch heute noch berichtet (2, 4, 31). Der Darmbrand ist somit nicht unbedingt eine Erkrankung vergangener Zeiten und es ist mit Epidemien in Notstandsgebieten und gelegentlichen sporadischen Erkrankungen (2, 23, 31) zu rechnen.

Therapie der Enteritis necroticans: Die auf den Schweregrad der Erkrankung abzustimmende medizinische Therapie besteht in der intravenösen Infusionstherapie, einer Nahrungskarenz, der Drainage des Mageninhaltes über eine naso-gastrale Sonde, der antibiotischen Therapie (Penicillin, Chloramphenicol, und Piperazillin) und Bluttransfusionen (24). In der chirurgischen Therapie der Enteritis necroticans stellt sich stets die Frage nach dem richtigen Operationszeitpunkt (früh oder später) und dem Ausmaß der Resektion (Resektion aller erkrankten Abschnitte oder Resektion von möglichst wenig Darm; 6, 26).

Impfung gegen Darmbrand: In bestimmten Regionen PNGs betrug die Inzidenz der Enteritis necroticans bis zu 50/10.000 bei Erwachsenen und etwa 33/10.000 bei Kindern bis zu 15 Jahren. 500 Kinder sollen jährlich vor Einführung der Immunisierung an der Enteritis necroticans auf Papua Neu Guinea verstorben sein (16, 29). Die Erkrankung war zumindest in den 1970er Jahren in bestimmten Regionen Papua Neu Guineas die häufigste Todesursache bei Kindern über 12 Monate (23% aller Todesfälle in dieser Altersgruppe). Versuche, Enteritis necroticans in PNG durch Verbesserungen der Nahrungsmittelhygiene zu verhindern, waren u.a. aufgrund des ubiquitären Vorkommens des Erregers nicht erfolgreich (16). 1979 wurde daher eine kontrollierte Studie zur Immunisierung gegen das β -Toxin von *C. perfringens* erstmals bei 5070 Kindern in PNG durchgeführt. Von 2538 Kindern, die mit dem von der Firma Wellcome Research Laboratories hergestellten β -Toxoid geimpft wurden, erkrankten in den nachfolgenden 2 Jahren 2 Kinder an ‚pig-bel‘, von 2532 kontrollgeimpften Kindern (immunisiert mit Tetanustoxoid) erkrankten in dieser Doppelblindstudie dagegen 17 an der Enteritis necroticans ($p < 0.01$). Hieraus errechnete sich ein Rückgang der jährlichen Inzidenz von 33/10.000 auf 4/10.000 (11). Die Zahl der Einweisungen in das Medi Hospital, Southern Highlands in PNG mit der Diagnose ‚pig-bel‘ ging in den Jahren 1981 bis 1983 sehr deutlich zurück (16). Bei der Behandlung einer klinisch manifesten Enteritis necroticans ist dagegen die Gabe eines Antitoxins – anders, als es die Lü-

becker Erfahrungen vor 50 Jahren nahelegten – ohne eine signifikante Auswirkung auf den Krankheitsverlauf geblieben (22), wobei sich nähere Angaben zu Eigenschaften des applizierten Antitoxins (hergestellt von der Firma Wellcome) in der zitierten Studie nicht finden.

Danksagung

Die Autoren danken Herrn Dr. med. W. von Romatowski und Herrn Dr. med. H. Ebert für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Literatur

1. Bockemühl J: Epidemiologie, Ätiologie und Laboratoriumsdiagnostik der infektiösen Durchfallserkrankungen in den Tropen. *Immun. Infekt* 1985, 13: 269-275.
2. Clarke LE, Diekmann-Guiroy B, McNamee W, Java D, Weiss SM: Enteritis necroticans with midgut necrosis caused by *Clostridium perfringens*. *Arch. Surg.* 1994, 229: 557-560.
3. Cook GC: Gastroenterological emergencies in the tropic. *Bailliere's Clin. Gastroenterol.* 1991, 5: 861-886.
4. Devitt PG, Stamp GWH: Acute clostridial enteritis – or pigbel? *Gut* 1983, 24: 678-679.
5. Eason RJ, van Rij R: Pigless pigbel: Enteritis necroticans in the Solomon islands. *Papua New Guinea Med. J.* 1984, 27: 42-44
6. Freedman D, Gandionco R: A case of enteritis necroticans in pregnancy. *Papua New Guinea Med. J.* 1976, 19: 173-175.
7. Hansen K, Jeckeln E, Jochims J, Lezius A, Meyer-Burgdorff H, Schütz F: Darmbrand (Enteritis necroticans). Thieme, Stuttgart 1949
8. Jaffé R: Über nekrotisierende und ulceröse Entzündungen im Dünndarm. *Med. Klin.* 14 (1918), 90.
9. Jeckeln E: Über Darmbrand. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 72 (1947), 105-108
10. Johnson S, Echeverria P, Taylor DN, Paul SR, Coninx R, Sakurai J, Eampokalap B, Jimakorn P, Cooke RA, Lawrence GW, Walker PD: Enteritis necroticans among Kmer children at an evacuation site in Thailand. *Lancet* 1987, 496-500.
11. Lawrence GW, Lehmann D, Anian G, Coakley CA, Saleu G, Barker MJ, Davis MW: Impact of active immunisation against Enteritis necroticans in Papua New Guinea. *Lancet* 1990, 336: 1165-1167.
12. Lawrence G, Walker PD: Pathogenesis of Enteritis necroticans in Papua New Guinea. *Lancet* 1976, I, 125-126.
13. Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE: Inflammatory Enteritis. In: *Principels and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone, New York, Tokyo. 4. Auflage, 1990, 991-992.
14. Millar JS, Smellie S, Coldman AJ: Meat consumption as a risk factor in enteritis necroticans. *Int. J. Epidemiol.* 1985, 14: 318-321.
15. Murrell TGC: A history of enteritis necroticans. *Papua New Guinea Med. J.* 1979, 22: 5-17.
16. Murrell TGC, Walker PD: The pigbel story of Papua New Guinea. *Transact. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1991, 85: 119-122.
17. Murrell TGC: Enteritis necroticans in Nepal. *Lancet* 1979, I, 279.
18. Onderdonk AB, Allen SD: Clostridium. In: Murray, PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (editors): *Manual of Clinical Microbiology*, Sechste Auflage, ASM Press, Washington D.C., pp 574-586.
19. Pfüschmann L: Enteritis necroticans. Ein besonderer Verlauf. *Zbl. Chirurgie* 1977, 104: 600-602.
20. von Romatowski W: Über geringfügigen und schleichend verlaufenden Darmbrand. *Frankf. Z. Pathol.* 61 (1949), 207-249
21. von Romatowski W: Über die Formen der Peritonitis bei Darmbrand. *Brunns Beitr. klin. Chir.* 1949, 179: 65-104.
22. Rooney J, Shepherd A, Suebu A: Clostridium Welchii type C antitoxin in the treatment of „pig-bel“ (Enteritis necroticans): acontrolled trial in Papua New Guinea. *Papua Neu Guinea Med. J.* 1979, 22: 57-59.
23. Severin WPJ, dela Fuente M, Stringer MF: Clostridium perfringens type C causing necrotising enteritis. *J. Clin. Pathol* 1984, 37: 942-944.
24. Shann F, Lawrence G: The medical management of Enteritis necroticans (pigbel). *Papua Neu Guinea Med. J.* 1979, 22: 24-29.
25. Shann F, Lawrence G, Jun-Di, P: Enteritis necroticans in China. *Lancet* 1979, I, 1083-1084.
26. Shepherd A.: Clinical features and operative treatment of pigbel Enteritis necroticans. *Papua Neu Guinea Med. J.* 1979, 22: 18-23.
27. Simpson RL, Sinha SN: Enteritis necroticans in Port Moresby-report of three cases. *Papua New Guinea Med. J.* 1983, 26: 146-148.
28. Smith F: Enteritis necroticans – an international disease of tropical communities. *Papua New Guinea Med. J.* 1979, 22: 60-61.
29. Smith D: Mortality from pigbel (Enteritis necroticans) in children in Tari 1971 to 1976. *Papua New Guinea Med. J.* 1979, 22: 74-78.
30. Walker PD, Murrell TGC, Nagy LK: Scanning electronmicroscopy of the jejunum in Enteritis necroticans. *J. Med. Microbiol.* 1980, 13: 445-450.
31. Weckner W, Schau HP, May D: Die Enteritis necroticans. *Zbl. Chirurgie* 1982, 107: 369-377.
32. Wright DH, Path MC, Stanfield JP: Enteritis necroticans in Uganda. *Trop. Pediat.* 1967, 71: 264-268.
33. Zeissler J, Rassfeld-Sternberg L: Enteritis necroticans due to clostridium Welchii type F. *Br. Med. J.* 1949, 1: 267-269.

Wissenschaftskritische Überlegungen zum Evidenzbegriff

S. Voigt*

1. Einleitung

„Wer irrt, weiß nicht, daß er irrt.“¹

Dieser Ausspruch Carl Friedrich von Weizsäckers ist Motto für die folgenden Überlegungen zum Evidenzbegriff und zu der heute modernen englischsprachigen Bezeichnung der *evidence based medicine*. Nicht zufällig hat Weizsäcker den Begriff Evidenz in seinen erkenntnistheoretischen Überlegungen zum Zweifel aufgegriffen. Er unterscheidet in diesem Zusammenhang drei Auslegungen des Evidenzbegriffs:

„Man kann die Weise des Gegebenseins von Unangezweifelter *schlichte Evidenz* nennen. Daß die schlichte Evidenz keine absolute Gewißheit bietet, weiß jeder. Der Schein trügt, und die Schwierigkeit ist, daß man nicht weiß, wo man es mit Schein zu tun hat. Aber in der Praxis bringt man es meist zu der fürs Leben nötigen Gewißheit, die man, wenn Zweifel vorangegangen ist, *reflektierte Evidenz* nennen kann. Philosophen meinen manchmal, reflektierte Evidenz könne bis zur *absoluten Evidenz* gesteigert werden.“²

Der Begriff der Evidenz hat eine lange medizinhistorische Tradition. Evident ist zunächst das, was sich dem Beobachter als sichtbar und wahrnehmbar darstellt.

„Der Grundsatz, daß sich das Wissen des Arztes am Krankenbett bildet, stammt nicht erst vom Ende des 18. Jahrhunderts. Für viele – wenn nicht für alle Revolutionen der Medizin – war diese Erfahrung erste Quelle und bleibende Norm.“³

Der reine klinische Blick ist auch ein qualitativer, der Krankheit nach evidenten Kriterien erfaßt: „[man] muß dorthin sehen, wo es Trockenheit, Brennen, Reizung oder Feuchtigkeit, Verschleimung, Schwächung gibt.“⁴

Die Beobachtung der Kranken durch Kliniker gilt auch im 20. Jahrhundert noch als Grundlage für die Behandlung: „Um jedem unserer Kranken eine seiner Krankheit und ihm selber vollkommen angemessene Behandlung vorschlagen zu können, suchen wir, von seinem Fall eine objektive und vollständige Idee zu gewinnen; wir sammeln in einem Dossier, das ihm gehört und das seine *Beobachtung* ausmacht, Informationen, die wir über ihn haben. Wir *beobachten ihn* in derselben Wei-

se, wie wir die Sterne beobachten oder ein Experiment im Laboratorium.“⁵

Evidenz ist also ein Begriff, der sowohl in Kliniken als auch in Laboratorien Anwendung findet. An beiden Orten spielt der Blick des Klinikers bzw. der Forscherin die entscheidende Rolle.

In den folgenden Ausführungen wird zunächst eine wissenschaftshistorische sowie theoretische Einordnung des Evidenzbegriffs vor dem Hintergrund der aktuell gebräuchlichen Bezeichnung der *evidence based medicine* versucht. Hierbei soll die Frage gestellt werden, ob und inwieweit sich die Bedeutung des Begriffs Evidenz in der derzeitigen gesundheitspolitischen Diskussion verschoben hat bzw. auf welche Weise Evidenz im gesundheitspolitischen Denken vernetzt ist.

2. Definition der Begriffe *Evidenz* und *evidence based medicine*

Nach dem Duden heißt Evidenz „Deutlichkeit; vollständige, überwiegende Gewißheit; einleuchtende Erkenntnis“.⁶

Im theologischen Sinne wird Evidenz mit Gewißheit synonym gesetzt. Hier wird zwischen *praktischer* und *theoretischer* Gewißheit unterschieden: „Die *praktische* G[e]w[iß]heit des natürlichen Verhaltens ist gewöhnlich eine nur moralische. Die theoretische G[e]w[iß]heit der Wiss. u. der Philosophie ist dem jeweiligen Gegenstand u. der Evidenz der Prinzipien entsprechend verschieden. Die höchste erreicht die Mathematik, in ihrer Exaktheit das Ideal der Wiss. u. häufig auch der Philosophie. [...] Die G[e]w[iß]heit der Geisteswissenschaften beruht dagegen auf *Sicherheit der Erfahrung* u. steht damit der des alltäglichen Lebens am nächsten.“⁷

Es ist Cicero, der das Wort *evidentia* als Übersetzung und Nachbildung aus dem Griechischen ins Lateinische einführt und mit dem Begriff *perspicuitas* synonym setzte.

¹ C.F. v. Weizsäcker 1995, S. 45.

² C.F. v. Weizsäcker 1995, S. 46.

³ Foucault 1993, S. 69.

⁴ Foucault 1993, S. 30.

⁵ J.-Ch. Sournia, *Logique et morale du diagnostic*, Paris 1962, S. 19, zitiert in: Foucault 1993, S. 13.

⁶ Duden 1990, S. 234.

⁷ Lexikon für Theologie und Kirche, Freiburg 1986, S. 874.

* Frau Dr. Sabine Voigt hat sich mit einer Arbeit über „Die Tagebücher der Bashkirtseff von 1877-1884“ an dem Fachbereich Neuere Deutsche Literatur und Kunstwissenschaften der Philipps-Universität Marburg promoviert. Sie ist die Frauenbeauftragte der Medizinischen Universität zu Lübeck.

Innerhalb der griechischen Philosophie ist der Begriff der Evidenz überwiegend in der epikureischen Erkenntnislehre beheimatet – „als Augenscheinlichkeit und offenkundige Präsenz im Bereich der sinnlichen Wahrnehmung.“⁸

In der Philosophie wird Evidenz gleichermaßen als „zentrale wie umstrittene Instanz der offenkundigen, unmittelbar einleuchtenden Selbstbezeugung wahrer Erkenntnis und der immanenten Legitimation von Urteilen“ bezeichnet.⁹ Somit hängen Evidenz und Urteilsbegründung eng zusammen, was auch für Brentano Grundlage seiner erkenntnistheoretischen Abhandlungen zur Wahrheit und Evidenz darstellt.¹⁰ Demnach ist ein Urteil, welches evident ist, eo ipso ein wahres Urteil; mit anderen Worten ist ein Irrtum bei Evidenz immer ausgeschlossen. Brentano unterscheidet dabei zwischen zwei Klassen evidenter Wahrheiten: die Vernunftwahrheiten oder Einsichten und die Tatsachenerkenntnisse. Den Vernunftwahrheiten kommt eine „apodiktische Evidenz zu, weil sie keine Existenzvoraussetzungen machen, sondern lediglich die Behauptung enthalten, daß etwas unmöglich ist.“¹¹ Tatsachenerkenntnisse hingegen beziehen sich auf die innere Wahrnehmung und beruhen also auf das je eigene Bewußtseinsleben. Überträgt man diese Aussage auf die medizinische Ebene, könnte der Satz wie folgt umformuliert werden: Evidenz ist in erster Linie die bewußte innere Wahrnehmung einer Krankheit durch den Kranken. Doch heute in einer Zeit mit immer komplexer werdenden Krankheitsbildern spielt die innere Wahrnehmung der Kranken eine eher unbedeutende Rolle. Aus medizinischer Sicht geht es vielmehr um das Erkennen einer Krankheit durch den Blick des Arztes, also durch die äußere Wahrnehmung des anderen.

In Abgrenzung zum Evidenzbegriff, der kurzgefaßt die Wahrnehmung des Ist-Zustandes der Kranken beschreibt, bezieht sich der Begriff der *evidence-based medicine* zunächst auf alles, was auf eine effiziente und effektive Versorgung sowie Therapie der Kranken abzielt. Dies soll, so Sackett, auch auf der Basis von externen klinischen Studien passieren: „The practice of evidence-based medicine means integrating individual clinical expertise with the best available external clinical evidence from systematic research.“¹² An dieser Definition von Sackett wird bereits deutlich, daß der englische Begriff *evidence* etwas anderes meint als der

deutsche Evidenzbegriff, der in seiner wissenschaftstheoretischen und -historischen Tradition gerade das, was *evidence* zum Ausdruck bringen will, nämlich Effizienz und Effektivität, nicht meint. Es geht bei der *evidence-based medicine* also um den Einsatz der gegenwärtig wirksamsten und besten Therapie aus der medizinischen Forschung. Die Erkenntnis über die beste Therapie für eine bestimmte Erkrankung wiederum erhält man, nach Sackett, durch Meta-Analysen aus randomisierten kontrollierten Studien. Somit basiert *evidence-based medicine* im wesentlichen auf Epidemiologie und ihre statistischen Methoden.

3. Wissenschaftshistorische und -theoretische Eingliederung des Evidenzbegriffs

Traditionell repräsentiert die Familie den Ort der Krankheit: in physischer Abgeschlossenheit werden kranke Familienmitglieder gepflegt. Die Signifikanten (Symptome und Zeichen) der Krankheit werden weder verglichen noch dokumentiert; familiäre Fürsorge und die Pflege des kranken Menschen stehen hier im Vordergrund. Erst mit Gründung der ersten Spitäler ändert sich der Status der Kranken:

„Im Spital ist der Kranke Subjekt seiner Krankheit, d. h. es handelt sich um einen *Fall*; in der Klinik geht es nur um ein *Beispiel*: hier ist der Kranke ein Akzidens seiner Krankheit, das vorübergehende Objekt, dessen sie sich bemächtigt hat.“¹³

Nicht mehr auf den Kranken, sondern auf die Krankheit fokussiert sich nunmehr der Blick des Klinikers. Die Klinik wird zum Ort der Krankheit, deren Symptome und Zeichen verglichen und mathematisch versprachlicht werden: heute würde man diese Vorgehensweise als epidemiologisch beschreiben.

Im 18. Jahrhundert konzentrierte sich dieser Blick zunächst auf die Aufstellung eines Systems von Zuordnungen: „ein Symptom wird in einer Krankheit situiert, eine Krankheit in einer Artgruppe, und diese wird in den allgemeinen Plan der pathologischen Welt eingeordnet.“¹⁴

Doch im Verlauf der Wissenschaft vom Menschen ist der medizinische Blick des Arztes immer komplizierteren Gegenständen ausgeliefert. Es gilt, eine Vielheit von Fakten und Symptomen wahrzunehmen, die eine immer größere Anzahl von Kombinationsmöglichkeiten ergeben. Viele Elemente einer Krankheit sind so subtil, daß sie nicht mehr wahrgenommen werden, sie entgehen dem medizinischen Blick. In dieser Vielheit von mathematischen und physikalischen Gegebenheiten

⁸ Historisches Wörterbuch der Philosophie, Basel/Stuttgart 1972, S. 830.

⁹ Historisches Wörterbuch der Philosophie, Basel/Stuttgart 1972, S. 830.

¹⁰ Brentano 1962.

¹¹ Handbuch philosophischer Grundbegriffe, Bd. 2, S. 431

¹² Sackett et al. 1997, S. 2.

¹³ Foucault 1993, S. 75

¹⁴ Foucault 1993, S. 46.

ten kann es keine Evidenz und Gewißheit im klassischen Sinne mehr geben.

So existiert nach Popper nur die „Evidenz einer Wahrnehmung“. Subjektive Überzeugungserlebnisse können somit niemals die Wahrheit wissenschaftlicher Sätze begründen. Evidenz hat, nach Popper, nichts mit der Begründung wissenschaftlicher Annahmen zu tun.¹⁵

Auch *evidence-based medicine* bedeutet weniger Forschung nach neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen als vielmehr die statistische Zusammenfassung verschiedenster randomisierter Studien über nutzvolle und nutzlose Therapien. Diese systematische Analyse soll, so Sackett, zu einer besseren medizinischen Praxis führen.

Doch welche Rolle spielen in diesem Kontext die wissenschaftlichen Laboratorien?

Im Spannungsfeld von Labor und Klinik vernetzen sich Leitvorstellungen über Gesundheit und Krankheit sowie Implementierungen medizinischer Programme.

Das Labor grenzt sich von der Klinik aufgrund seiner experimentell evozierbaren Phänomene ab. Dabei können Experimente Ausdruck einer gezielten Strategie, aber auch die Bestätigung von bereits wahrgenommenen Fakten sein. Allerdings existieren auch Experimentalsysteme, die nur durch blindes Tasten medizinisches Neuland zu erschließen vermögen. Denn wir haben es bei Experimenten in der Regel nicht „mit einem klaren Verständnis von Theorie und Experiment, sondern vielmehr mit einer komplexen Experimentalanordnung zu tun, die so eingerichtet ist, daß sie ein Wissen produziert, das wir *noch nicht haben*.“¹⁶

In diesem Sinne wird Natur oder in unserem Fall Krankheit erst als wissenschaftliches Modell verständlich und faßbar. Denn die wissenschaftliche Repräsentation der Natur erfolgt erst durch das Modell.

In Abgrenzung zum Labor könnte aus der vorherigen These der Schluß gezogen werden, daß die Klinik selbst „kein Instrument zur Entdeckung einer noch unbekanntes Wahrheit, sondern eine bestimmte Methode der systematischen Präsentierung und Anordnung der schon erkannten Wahrheit“¹⁷ repräsentiert.

Im Labor finden wissenschaftliche Aktivitäten statt, die häufig Überraschungen in sich bergen und die uns bisher Unbekanntes offenbaren. Nach Rheinberger produzieren also Experimente die Zukunft, während bisherige im Sinne der *evidence-based medicine* durchaus bewährte technische Konstruktionen die Gegenwart verlängern würden.¹⁸

Die Experimentalsysteme¹⁹ in den Laboratorien, die sich erst zu Beginn des 19. Jahrhunderts durchgesetzt haben, schaffen Raum, Dinge darzustellen, die andernfalls als Wissenschaftsobjekte nicht greifbar wären. Für den Evidenzbegriff bedeutet dies wiederum, daß in diesem Wissenschaftsraum zunächst keine unmittelbare Evidenz existiert. Es handelt sich hier, wenn überhaupt, um eine mittelbare Evidenz, „mit der wir einsehen können, was bei Operationen herauskommen kann, die wir nach verabredeten Regeln durchführen.“²⁰

4. Schlußbetrachtung

So wie ich meine Überlegungen begonnen habe, möchte ich sie auch beenden: nämlich mit einem Zitat von Carl Friedrich von Weizsäcker:

„Berufung auf Evidenz ist aber dort kein Argument, wo jemand da ist, der diese Evidenz nicht in sich erlebt. Das mag daran liegen, daß er etwas nicht sieht, was ihm, wenn er es sähe, evident wäre; es kann aber auch daran liegen, daß er ein Gegenargument oder Gegenbeispiel sieht. Der im Wort Evidenz steckende Begriff des Sehens erscheint nun der empiristischen oder sensualistischen Reflexion als Metapher.“²¹ Evidenz als Metapher für sinnliche Wahrnehmung spiegelt sicherlich nicht die Inhalte des heute modernen Begriffs der *evidence based medicine* wider. Somit stehen wir vor einem Übersetzungsproblem: der englischsprachige Begriff der *evidence* kann offensichtlich nicht mit dem deutschen Wort Evidenz übersetzt werden. Denn Evidenz im medizinhistorischen Kontext ist zunächst das, was sichtbar und wahrnehmbar ist. Somit folgt der klinische Blick zunächst einer evidenten Logik. Doch je komplizierter medizinische Fakten und Symptome werden, desto ungewisser und unzuverlässiger wird der Wahrnehmungsakt des Arztes. Dies bedeutet, daß heute der evidente ärztliche Blick, wenn überhaupt, nur unter Zuhilfenahme von Apparaten und technischen Geräten sozusagen als Übersetzungsmaschinen möglich ist.

Mit dem Aufkommen wissenschaftlicher Laboratorien, in denen durchgeführte Experimentalanordnungen in der Regel auf Annahmen und Hypothesen beruhen, erscheint uns der Begriff der Evidenz zunehmend als ein konservatives Konzept, welches wissenschaftlichem Bestreben entgegensteht. Allein die Beweisführungen eines Experimentes mag einer mittelbaren Evidenz entsprechen.

Welche Bedeutung wird nun dem englischsprachigen Begriff der *evidence-based medicine* zuerkannt? Seine

¹⁵ Vgl. Popper 1984, S. 20f.

¹⁶ Rheinberger 1992, S. 25.

¹⁷ Foucault 1993, S. 75.

¹⁸ Vgl. Rheinberger 1992, S. 71.

¹⁹ Vgl. dazu auch Rheinberger/Hagner (Hg.) 1993.

²⁰ Weizsäcker 1995, S. 682.

²¹ Weizsäcker 1995, S. 134.

Bedeutung läßt sich in erster Linie auf zwei Fragen reduzieren: Wirkt etwas und warum wirkt es. Die Antworten auf diese Fragen sind nach dem Verständnis von *evidence-based medicine* in der Meta-Analyse klinischer Studien zu finden. Somit impliziert *evidence-based medicine* auch weniger wissenschaftlichen Fortschritt als vielmehr die Suche nach den besten Daten bereits durchgeführter Studien für die Therapie einer bestimmten Erkrankung. Damit könnte das Konzept der *evidence-based medicine* in die Nähe von Qualitätssicherungsmaßnahmen rücken, für die Bezeichnungen wie Effizienz und Effektivität maßgebend sind. Dies ist jedoch in keinem Fall gleichzusetzen mit dem hier vorgestellten Evidenzbegriff. Um in diesem Zusammenhang Mißverständnissen vorzubeugen, sei Vorsicht bei der Übersetzung der Bezeichnung *evidence-based medicine* geboten. *Evidence* zumindest kann nicht mit dem bereits wissenschaftshistorisch und -philosophisch etablierten Begriff Evidenz übersetzt werden.

Literatur

1. Brentano, Franz, Wahrheit und Evidenz, Erkenntnistheoretische Abhandlungen und Briefe, ausgewählt, erläutert u. eingeleitet von Oskar Kraus, Hamburg 1962.
2. Duden: d. Fremdwörterbuch, 5. Aufl., Mannheim u.a. 1990.
3. Charlton, B. G., Restoring the balance: evidence-based medicine put in its place, in: *Journal of Evaluation in Clinical Practice* 3 (1997) (2) 87-98.
4. Foucault, Michel, Die Geburt der Klinik, Frankfurt a. M. 1993.
5. Handbuch philosophischer Grundbegriffe, München 1973.
6. Historisches Wörterbuch der Philosophie, hrsg. von J. Ritter, Basel/Stuttgart 1972.
7. Kunz, Regina et al., Das Richtige richtig machen: Warum wir Evidence-based-medicine brauchen, in: *Berliner Ärzte* (1998) (3) 11-16.
8. Oudhoorn, Nelly, Labortests und die gemeinsame Klassifikation von Sexualität und Geschlecht, in: Rheinberger, Hans-Jörg; Hagner, Michael (Hg.), *Die Experimentalisierung des Lebens*, Berlin 1993, S. 150-161.
9. Popper, Karl R., *Logik der Forschung*, 8., weiter verb. u. verm. Aufl., Tübingen 1984.
10. Rheinberger, Hans-Jörg, *Experiment, Differenz, Schrift: Zur Geschichte epistemischer Dinge*, Marburg 1992.
11. Rheinberger, Hans-Jörg; Hagner, Michael (Hg.), *Die Experimentalisierung des Lebens*, Berlin 1993.
12. Sackett, D. L. et al., Evidence-based medicine: What it is and what it isn't, in: *BMJ* 312 (1996) 71-72.
13. Sackett, D. L. et al., *Evidence-based medicine, how to practice and teach ebm*, New York 1997.
14. Weizsäcker, Carl Friedrich von, *Zeit und Wissen*, München 1995.

Aus dem Institut für Physiologie der Medizinischen Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann):

Einfluß der cyclischen Nucleotide cAMP und cGMP auf den Calciumspiegel und die Autakoidsynthese in Endothelzellen*

St.-S. Bolz, U. Pohl

Zusammenfassung

Die Vasodilatoren Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI₂) werden kontinuierlich aus Endothelzellen freigesetzt. Während die Hemmung der NO-Synthese jedoch zu Vasokonstriktion und Blutdruckanstieg führt, bleibt die Blockade der PGI₂-Produktion ohne Effekt. Denkbar wäre, daß bei Hemmung der PGI₂-Synthese die Produktion von NO kompensatorisch gesteigert wird. Dies bedeutete, daß PGI₂ unter Normalbedingungen die Aktivierung der endothelialen NO-Produktion reduziert. Möglich wäre dies über eine Kontrolle der endothelialen Calciumhomöostase, da die Synthesewege beider Autakoide calciumabhängig reguliert werden. Wir untersuchten deshalb, ob PGI₂ und NO über ihre „second-messenger“ cAMP und cGMP die Calciumkonzentration ([Ca²⁺]_i) in Endothelzellen und damit die endotheliale Autakoidproduktion beeinflussen. Histamin- und Bradykinin-induzierte [Ca²⁺]_i-Anstiege wurden mit der Fura 2-Methode in humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVECs) vor und nach Cyclooxygenasehemmung bzw. Gabe cAMP-erhöhender Substanzen gemessen. Als Maß für die NO-Produktion dienten die endothelialen cGMP-Anstiege, die nach NO-Synthasehemmung vollständig aufgehoben und somit NO-vermittelt waren. Die Konzentrationen der cyclischen Nucleotide cAMP und cGMP wurden mit einem Radioimmunoassay bestimmt. Die Agonist-induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiege waren nach Vorbehandlung der HUVECs mit PGI₂ und dem Adenylatcyclaseaktivator Forskolin, welche beide die endotheliale cAMP-Konzentration erhöhten, signifikant reduziert. Stimulation der cAMP-abhängigen Proteinkinase mit cBIMPS reduzierte die [Ca²⁺]_i-Anstiege ebenfalls und hemmte vollständig die Histamin-induzierte PGI₂-Freisetzung. Umgekehrt waren die Histamin-induzier-

ten [Ca²⁺]_i-Anstiege und die calciumabhängige NO-Produktion nach PGI₂-Hemmung signifikant verstärkt. Im Gegensatz dazu beeinflussten weder die Erhöhung der endothelialen cGMP-Spiegel durch Natriumnitroprussid oder C-Typ-Natriuretisches Peptid noch ihre Senkung durch den NO-Synthasehemmer LNNA die endotheliale Calciumhomöostase.

PGI₂ reduzierte cAMP-abhängig die Agonist-induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiege und modulierte so nicht nur seine eigene calciumabhängige Synthese über einen negativen Feedbackmechanismus, sondern auch die von NO. Folglich führte die Hemmung der PGI₂-Synthese zu einer Erhöhung der NO-Produktion. Da NO über seinen second messenger cGMP die endotheliale Calciumhomöostase und damit die Autakoidproduktion nicht beeinflusste, könnte es den Wegfall der PGI₂-Effekte kompensieren. Dieser Mechanismus könnte erklären, warum selbst chronische Gaben von Cyclooxygenasehemmern von Patienten mit intakter Endothelfunktion ohne signifikante Änderungen des Blutdrucks toleriert werden, während NO-Synthasehemmer durch periphere Vasokonstriktion erhebliche Blutdruckanstiege induzieren.

1. Einleitung

Die kontinuierliche Freisetzung der Vasodilatoren Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI₂) aus Endothelzellen spielt eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle des Basaltonus der Blutgefäße [1-3]. In der Tat führt die systemische Hemmung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), welche aus dem Substrat L-Arginin NO bildet, zu einem Blutdruckanstieg [4]. Dagegen haben Cyclooxygenasehemmer, welche die PGI₂-Synthese blockieren, keinen derartigen Effekt [5]. Dies läßt vermuten, daß der Wegfall des Vasodilators PGI₂ [6, 7] durch vermehrte Bildung eines anderen Vasodilators, z. B. NO, kompensiert werden kann. Solch ein Kompensationsmechanismus wäre denkbar, wenn PGI₂ die NO-Synthase oder vorgeschaltete Aktivierungsmechanismen unter Normalbedingungen hemmte. Eine direkte Hemmung der eNOS durch PGI₂ konn-

* Dr. med. Steffen-Sebastian Bolz hat über dieses Thema bei Prof. Dr. med. Ulrich Pohl promoviert. Beide sind heute an der Universität Mainz tätig. Die Dissertation von Dr. Bolz wurde von der Medizinischen Fakultät der Medizinischen Universität zu Lübeck mit summa cum laude beurteilt.

te jedoch nicht nachgewiesen werden. Dagegen zeigen Befunde an glatten Muskelzellen und Thrombozyten [8-11], daß das PGI₂ über seinen „second messenger“ cAMP die intrazelluläre Calciumkonzentration ([Ca²⁺]_i) reduziert [12-14, 16]. Da die eNOS durch einen Anstieg von [Ca²⁺]_i aktiviert wird [15], könnte so PGI₂ in der Tat die NO-Bildung über einen negativen Feedbackmechanismus hemmen. Allerdings wäre dies wenig effektiv, wenn umgekehrt auch die calciumabhängige PGI₂-Synthese über NO bzw. seinen „second messenger“ cGMP reduziert würde. Über eine mögliche gegenseitige Beeinflussung beider Autakoide auf Ebene der einzelnen Endothelzelle ist bisher nur wenig bekannt. Ziel dieser Studie war es deshalb, die Effekte von cAMP- und cGMP-medierte Signalwegen auf die Agonist-induzierten Calciumanstiege in Endothelzellen zu analysieren. Besonders sollte die Rolle des cAMP-steigernden PGI₂ bei der Kontrolle der calciumabhängigen endothelialen NO-Produktion geprüft werden, um so eventuell zu verstehen, wie im Falle einer PGI₂-Hemmung vermehrt NO gebildet werden könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVECs) wurden nach der Methode von Jaffe et al. [17] aus frischen Nabelschnurvenen gewonnen und auf Fibronectin-beschichteten (5µg/cm², Boehringer) Kulturplatten (Nunc, Dänemark) ausgesät. Das Kulturmedium M199 enthielt 25 % fetales Kälberserum, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/l Streptomycin. Konfluente Monolayer von HUVECs zeigten nach durchschnittlich 3 Tagen das endothelzelltypische pflastersteinartige Aussehen. Zusätzlich wurden die HUVECs anhand ihrer Fähigkeit, acetyliertes LDL (acLDL) aufzunehmen, charakterisiert [18]. Für alle Versuche wurden ausschließlich Primärkulturen verwendet.

2.2 Intrazelluläre Calciummessung

[Ca²⁺]_i wurde in den Zellen mit der Fura 2-Methode [19] gemessen. Die Zellkulturplatten wurden hierfür auf dem modifizierten Tisch eines invertierten Mikroskops (IMT 2, Olympus, Japan) plaziert. Die Anregungswellenlänge alternierte mit 4Hz zwischen 340nm und 380nm. Die emittierte Fluoreszenz bei 510nm (Photomultiplier, PTI, Wedel, Deutschland) entsprach der Summe der Einzelemissionen von ca. 50 Zellen im Beobachtungsfeld. Am Ende jeder Messung wurde die Fura 2-Fluoreszenz mit MnCl₂ (8mM) aufgehoben. Die verbleibende Autofluoreszenz der Zellen und des Trägermediums wurde anschließend von den Einzelregistrierungen abgezogen. Aus den so korrigierten Fluoreszenzsignalen wurde das Verhältnis zwischen der Emission bei der Anregungswellenlänge 340nm (F₃₄₀) bzw. 380nm (F₃₈₀) gebildet. Diese Verhältnisbildung

erlaubt eine Bestimmung der Calciumkonzentration, die unabhängig von der tatsächlichen Fura 2-Konzentration in der Zelle und eventuellen Bleicheffekten des Farbstoffs ist. Die Ratio F_{340nm}/F_{380nm} wurde mit Hilfe einer gespeicherten Kalibrationskurve (PTI, calibration software) in Calciumkonzentrationen umgerechnet.

2.3 Messung der cyclischen Nucleotide cAMP und cGMP

Die basale und stimulierte Freisetzung der cyclischen Nucleotide wurde in denselben Zellen gemessen. Diese wurden für 2min mit 500µl HEPES-Pufferlösung mit oder ohne den betreffenden Agonisten überschichtet. Die Freisetzung der Nucleotide errechnete sich aus dem absoluten Nucleotidgehalt des Überstandes dividiert durch die Expositionszeit (2 min). Die Messung der intrazellulären Nucleotidkonzentration setzt die Lyse der Zellen voraus, so daß diese Konzentrationen unter basalen und stimulierten Bedingungen nur in verschiedenen Zellen verglichen werden konnten. Nach 2min Inkubation der Zellen mit HEPES-Pufferlösung (basal) oder 2- bzw. 5-minütiger Exposition gegenüber Agonisten wurden die Zellen mit Trichloressigsäure (TCA, 6 %, Sigma) lysiert. Nach weiteren 30min auf Eis wurde die TCA durch 4-faches Waschen mit wassergesättigtem Äther aus dem Zelllysate entfernt. Die cAMP- und cGMP-Konzentrationen wurden mit einem Radioimmunoassay (RIA, New England Nuclear, Dreieich) bestimmt, wobei das cyclische GMP vor der Messung acetyliert wurde. Die gemessenen Nucleotidkonzentrationen wurden auf den zellulären Proteingehalt (Lowry Methode, [20]) des Ansatzes normalisiert.

2.4 Medikamente und Substanzen

Die physiologische Pufferlösung (HEPES/Tyrode) enthielt (in mmol/l): NaCl 144, KCl 4, CaCl₂ 1.6, MgCl₂ 1, HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure) 10, NaH₂PO₄ 0.4, Glucose 10 (pH auf 7,4 durch Titration mit 1M NaOH eingestellt).

Bradykinin, Histamin, SNP, ANP, CNP, Forskolin, Isobutylmethylxanthine (IBMX) und EGTA wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Ionomycin von Calbiochem (La Jolla, CA, U.S.A.), cBIMPS von Biolog (Bremen, Deutschland), LNNA von Serva (Heidelberg, Deutschland), Rinderserumalbumin (BSA) von Biomol (Hamburg, Deutschland), HEPES/Tyrode, MnCl₂ und Trichloressigsäure (TCA) von Merck (Darmstadt, Deutschland) und Flolan® von Wellcome (London, U.K.) bezogen.

SNP (Stammlösung 10mM) wurde in 1mM Natriumacetat, Flolan (PGI₂, Stammlösung 10mM) in Glycinpuffer gelöst und erst unmittelbar vor Inkubationsbeginn in HEPES/Tyrode-Puffer bis zur gewünschten Endkonzentration weiterverdünnt. IBMX und LNNA mußten bis zur vollständigen Lösung in HEPES/Tyr-

ode auf 50°C erhitzt werden. Alle anderen Substanzen wurden vor Versuchsbeginn direkt in der Pufferlösung (HEPES/Tyrode) gelöst. Alle Kontrollgruppen wurden mit dem Lösungsmittel allein behandelt. Alle Lösungen wurden täglich frisch angesetzt.

Im Text angegebene Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen im Organbad.

2.5 Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt (n entspricht der Zahl der Experimente). Die intrazellulären Konzentrationen der cyclischen Nucleotide wurden mit dem Students t-Test für nicht gepaarte Daten verglichen, da sie in unterschiedlichen Zellen gemessen wurden. Die Werte der Nucleotidfreisetzung (extrazelluläre cAMP-Messung), in denselben Zellen vor und nach Stimulation gemessen, wurden mit dem t-Test für gepaarte Daten verglichen. Die Kinetiken der $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen nach Applikation unterschiedlicher Stimuli wurden mit einer nicht-linearen Regressionsanalyse verglichen. Zunächst wurden die Einzelkurven und danach die zusammengefaßten Daten beider Einzelkurven an eine Gompertzfunktion angepaßt. Die Einzelkurven waren signifikant voneinander verschieden, wenn der F-Test eine signifikant niedrigere Summe der Quadrate der Abweichungen jeder Einzelkurvenanpassung verglichen mit den Abweichungen der Anpassung der gepoolten Daten an die Gompertzfunktion ergab [21]. Einzelwerte zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kurven wurden anschließend mit dem Student's t-Test für gepaarte Daten verglichen. Die Daten wurden als signifikant unterschiedlich erkannt, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit geringer als 5% war.

3. Ergebnisse

3.1 Agonist-induzierte Calciumanstiege

Histamin und Bradykinin steigerten $[Ca^{2+}]_i$ in HUVECs dosisabhängig. In denselben Zellen erhöhte Histamin (0.3µM, n=9) $[Ca^{2+}]_i$ von basal 77 ± 2 auf 418 ± 59 nM und Bradykinin (3nM, n=9) von 74 ± 4 auf 391 ± 57 nM. In allen Experimenten zur Untersuchung des Einflusses der cyclischen Nucleotide auf den Agonist-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg wurden die o.g. Histamin- bzw. Bradykininkonzentrationen verwendet, die $[Ca^{2+}]_i$ vergleichbar steigerten. Die intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege hatten eine charakteristische Kinetik (Abb.1) mit einem initialen, innerhalb von Sekunden erreichten $[Ca^{2+}]_i$ -Maximalwert, gefolgt von einer niedrigeren Plateauphase.

3.2 Einfluß von PGI₂, Forskolin und cBIMPS auf den Agonist-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg

Vorinkubation der Zellen mit PGI₂ (0.1µM, 2min) beeinflusste den basalen Calciumspiegel in HUVECs

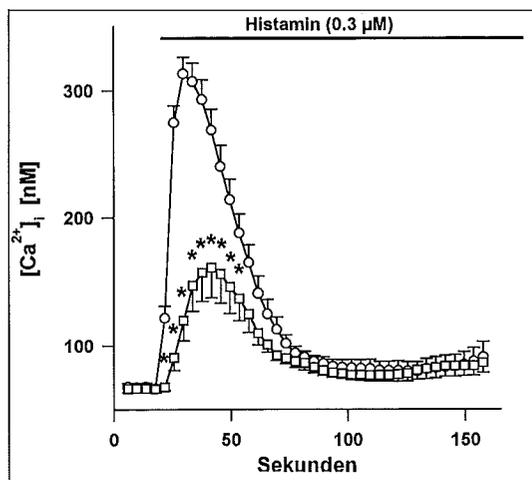


Abb. 1 : Der Histamin-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg unter Kontrollbedingungen (O, n=8) war nach Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase mit cBIMPS (500 µM, (, n=8) signifikant reduziert (um 61 %). Zusätzlich war der Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ auf den initialen Maximalwert in Gegenwart von cBIMPS verzögert. (* = $p < 0.05$ Kontrolle vs. cBIMPS-Behandlung)

nicht, reduzierte jedoch den Bradykinin-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg um 23 % (von 386 ± 62 auf 296 ± 48 nM, $p < 0.005$, n=19). Fast identische Ergebnisse zeigten sich in drei Experimenten, in denen anstelle des Bradykinins Histamin als Stimulus verwendet wurde. Inkubation der Zellen mit 0.1µM PGI₂ über 2min erhöhte den intrazellulären cAMP-Spiegel nicht signifikant (von 55 ± 3 auf 56 ± 1 pmol/mg_{protein}), allerdings stieg die cAMP-Freisetzung aus den Zellen unter gleichen Bedingungen signifikant an (von 3.9 ± 0.4 auf 5.8 ± 0.4 pmol/min/mg_{protein}, $p < 0.005$, n=14).

Die Bedeutung des cAMPs und der cAMP-abhängigen Proteinkinase (cAMP-Pk) für die Regulation des Agonist-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs wurde in weiteren Experimenten durch Verwendung des Adenylatcyclaseaktivators Forskolin und eines cAMP-Pk-Aktivators, cBIMPS, untersucht. Inkubation der Zellen mit Forskolin (10µM, 3min) erhöhte den intrazellulären cAMP-Spiegel von 53 ± 7 auf 85 ± 1 pmol/mg_{protein} ($p < 0.05$, n=12), die cAMP-Freisetzung stieg von 4.2 ± 0.4 auf 7 ± 0.7 pmol/min/mg_{protein} ($p < 0.005$, n=12) an. Der Histamin-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg wurde durch 10µM Forskolin um 33% ($p < 0.05$) reduziert, ohne die basalen $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel zu beeinflussen. Vorinkubation mit cBIMPS (500µM, 2min) reduzierte den Histamin-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg signifikant von 313 ± 13 auf 120 ± 16 nM (61 %, $p < 0.005$, n=8), das Erreichen des initialen $[Ca^{2+}]_i$ -Maximums war signifikant verzögert (Abb. 1). Der Histamin-induzierte Anstieg der PGI₂-Freisetzung aus HUVECs (40±3 % unter

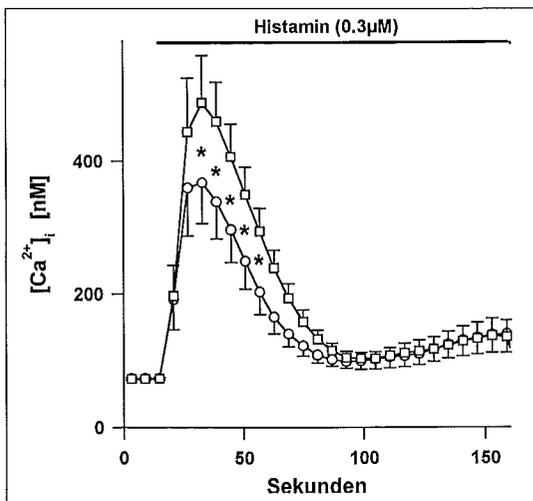


Abb. 2 : Der Histamin (0,3 µM, O, n=19)-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg war nach Hemmung der PGI_2 -Produktion mit Indomethacin (□, n=19) signifikant verstärkt. (* = $p < 0.05$ Kontrolle vs. Indomethacinbehandlung)

Kontrollbedingungen) war in Gegenwart von cBIMPS vollständig gehemmt ($p < 0.005$, n=16).

3.3 Effekte der Cyclooxygenasehemmung auf den Agonist-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg und die NO-Produktion

Inkubation der HUVECs mit dem COX-Hemmer Indomethacin (30µM, 30min) reduzierte die PGI_2 -Konzentration im Zellüberstand signifikant (von 1928 ± 300 pmol/ml auf 113 ± 23 pmol/ml, $p < 0.005$, n=7). Indomethacin hemmte außerdem vollständig den Histamin-induzierten Anstieg der extrazellulären PGI_2 -Konzentration (unter Kontrollbedingungen von 1928 ± 300 auf 3462 ± 561 pmol/ml, $p < 0.005$, n=7).

Indomethacinvorbehandlung der HUVECs verstärkte den Histamin-induzierten initialen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg signifikant ($p < 0.05$, Abb. 2), ohne die $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel der Plateauphase zu beeinflussen. Indomethacin hatte dieselben Effekte auf Bradykinin-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege.

Da bei Hemmung der Cyclooxygenase Arachidonsäure (AA) oder AA-metabolite (13-HODE; 14,15-HETE; 15-HETE) in den Zellen akkumulieren können, von denen bekannt ist, daß sie in glatten Muskelzellen $[Ca^{2+}]_i$ -steigernd wirken [22,23], überprüften wir, ob AA ähnliche Effekte in HUVECs hat. Allerdings beeinflusste AA in ansteigenden Konzentrationen (0.1-10µM) auch nach einer Inkubationszeit von 30min weder die basalen, noch die stimulierten $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel.

Zur Untersuchung der Effekte einer COX-Hemmung auf die NO-Synthese wurde der vollständig LNNA-

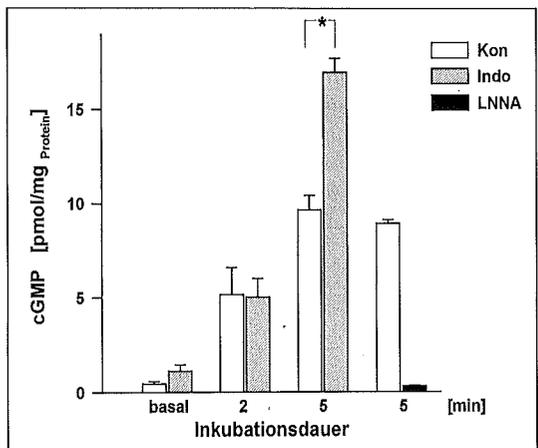


Abb. 3 : Der Histamin (0,3 µM) -induzierte cGMP-Anstieg in HUVECs (Kon, n=8) war nach Hemmung der endogenen PGI_2 Produktion mit Indomethacin (Indo, n=8) signifikant verstärkt. Der Anstieg war komplett gehemmt nach Vorbehandlung der Zellen mit N(-Nitro-L-Arginin (LNNA, 30µM, n=8), was zeigt, daß dieser Anstieg vollständig NO-vermittelt war. (* = $p < 0.05$ Kontrolle vs. Indomethacinbehandlung)

hemmbare und damit NO-vermittelte cGMP-Anstieg in HUVECs gemessen. Histamin (0,3µM) erhöhte die intrazellulären cGMP-Spiegel in Gegenwart des Phosphodiesterasenhemmers IBMX 12-fach nach 2min und 22-fach nach 5min. Der Anstieg nach 5min wurde durch Indomethacin signifikant verstärkt (16.9 ± 0.8 vs. 9.7 ± 0.8 pmol/mg_{Protein} in der Kontrollgruppe, Abb. 3).

3.4 Effekte von Histamin, SNP und CNP auf den intrazellulären cGMP- und $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel

Stimulation der HUVECs mit Histamin (3-300nM, n=9) erhöhte die intrazellulären cGMP-Spiegel dosisabhängig (Abb. 4). Die Histamin-induzierten cGMP-Anstiege wurden durch zusätzliche Hemmung der Phosphodiesterasen (IBMX, 10µM, 30min) verstärkt (von 2.9 ± 0.5 auf 9.4 ± 1.1 , $p < 0.01$, n=9) und durch LNNA (30µM, 30min) vollständig gehemmt.

Stimulation mit dem C-Typ-Natriuretischen Peptid (CNP, 0.01 bis 10µM, 2min) erhöhte den endothelialen cGMP-Spiegel dosisabhängig. Diese CNP-induzierten Anstiege waren ebensowenig durch LNNA hemmbar (Abb. 4), wie die durch exogenes NO (SNP, 10µM, 2min) induzierten (von 0.42 ± 0.07 auf 21.9 ± 2.1 pmol/mg_{Protein} unter Kontrollbedingungen und auf 22 ± 2.1 pmol/mg_{Protein} unter LNNA, n=8). Keine dieser cGMP-steigernden Maßnahmen modulierte den basalen oder Histamin-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel. Um auszuschließen, daß bereits die basalen cGMP-Spiegel hemmend auf den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg wirkten, wurden die Zellen vor Wiederholung der Experimente mit LNNA vorinku-

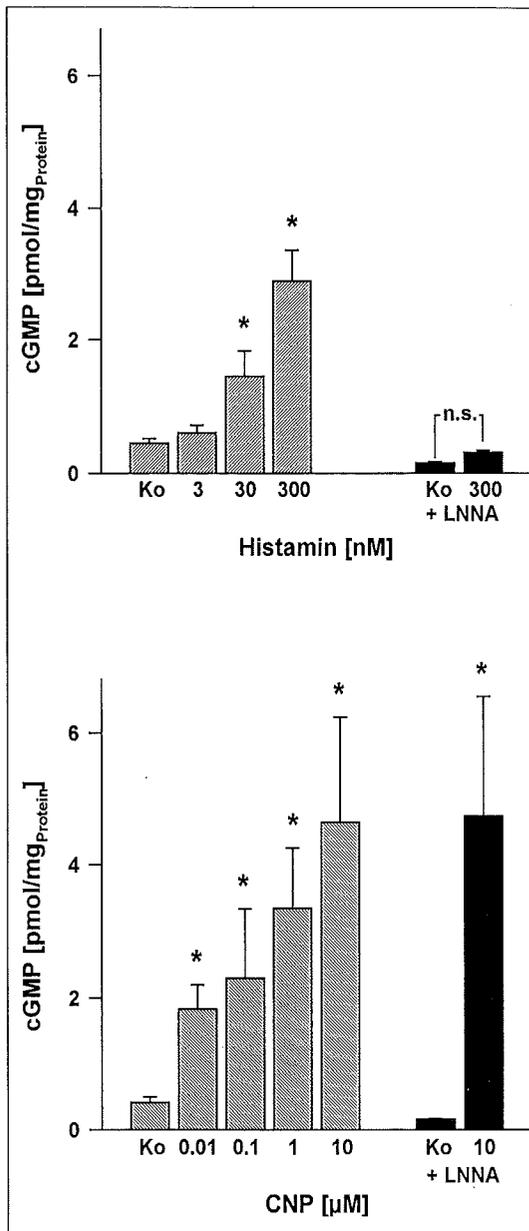


Abb. 4 : Agonist-induzierte cGMP-Anstiege in Endothelzellen. Der obere Graph zeigt Histamin (3-300 nM, n=9)-induzierte intrazelluläre cGMP-Anstiege. Vorbehandlung mit 30 μM LNNNA hemmte die cGMP-Anstieg nach Stimulation mit 300 nM Histamin (n=9) vollständig.

Der untere Graph zeigt intrazelluläre cGMP-Anstiege nach Stimulation der HUVECs mit dem C-Typ-Natriuretischen Peptid (CNP, 0.01-10 μM, n=5). Vorbehandlung mit 30 μM LNNNA hatte keinen Effekt auf die CNP-induzierten cGMP-Anstiege.

biert. Auch unter diesen Bedingungen zeigten sich keine Effekte des cGMPs auf den $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel (Tabelle 1). Im Gegensatz zu HUVECs reduzierte eine Vorbehandlung von glatten Muskelzellen (VSMCs) mit SNP den Histamin-abhängigen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in diesem Zelltyp um 30% (n=6, p<0.05). Zusätzlich war in SNP-behandelten VSMCs die Zeitspanne bis zum Erreichen der maximalen initialen $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration signifikant verlängert (66±4.7 vs. 33±1.6s).

Behandlung	cGMP [pmol/mg _{protein}]	basales $[Ca^{2+}]_i$ [nM]	Maximum $[Ca^{2+}]_i$ [nM]
Kontrollen	0.42±0.07	77.4±1.88	418±59.8
30 μM LNNNA	0.15±0.01*	74.7±5.31 ^{n.s.}	396±61.3 ^{n.s.}
10 μM LNNNA	4.63±1.59*	77.4±1.78 ^{n.s.}	409.4±70.1 ^{n.s.}
10 μM LNNNA	21.92±2.09*	75.3±4.77 ^{n.s.}	402.4±66.2 ^{n.s.}

Tab. 1: Intrazelluläre cGMP-Spiegel in HUVECs, moduliert durch LNNNA, SNP und CNPO (Behandlung), hatten weder Einfluß auf den basalen $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel noch auf den Histamin (0.3 μM-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. (n.S. = nicht signifikant unterschiedlich von der Kontrolle; * = p<0.05; ** = py0.01 Behandlung vs. Kontrolle)

4. Diskussion

Sowohl PGI₂ als auch NO haben durch Erhöhung der intrazellulären Konzentrationen ihrer second messenger cAMP und cGMP autokrine und parakrine Effekte auf kultivierte menschliche Nabelschnurendothelzellen (HUVECs). Anstiege des cGMP hatten jedoch weder einen Effekt auf den intrazellulären Calciumspiegel noch auf die calciumabhängige Autakoidsynthese. Im Gegensatz dazu reduzierten cAMP-Anstiege sowohl die Agonist-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege wie auch die calciumabhängige Synthese von NO und PGI₂. Die Hemmung der Prostacyclinsynthese mit dem COX-Hemmer Indomethacin führte daher zu verstärkten Agonist-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen mit nachfolgend erhöhter Synthese von NO. Das nachfolgend vermehrt freigesetzte NO könnte den Ausfall des Vasodilators PGI₂ bei der Kontrolle des glattmuskulären Tonus zumindest teilweise kompensieren (Abb. 5).

Anstiege der cyclischen Nucleotide cAMP und cGMP in Endothelzellen sind schon in früheren Studien gezeigt worden, allerdings nur unter Verwendung stabiler PGI₂-Analoga und gleichzeitiger Phosphodiesterasenhemmung [24, 25]. Die vorliegenden Befunde zeigen nun, daß die unter physiologischen Bedingungen von Endothelzellen freigesetzten Mengen PGI₂ und NO ausreichen, die o.g. autokrinen Effekte zu bewirken. PGI₂-induzierte cAMP-Anstiege waren reproduzierbar allerdings nur als Anstiege der extrazellulären cAMP-

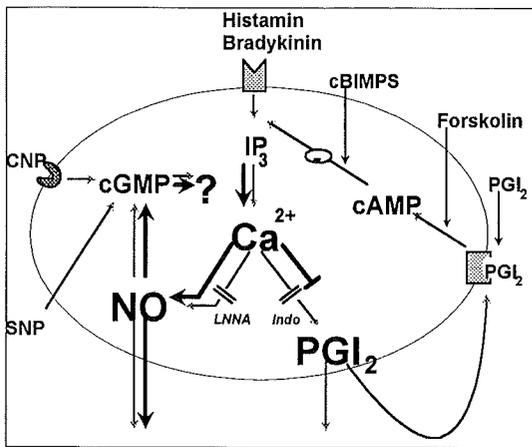


Abb. 5: Modellvorschlag zur Erklärung der verstärkten endothelialen NO-Produktion bei Hemmung des cyclooxygenaseabhängigen Signalweges. Die grauen Pfeile kennzeichnen die Signalwege, welche zur Synthese von NO und PGI₂ führen, unter Kontrollbedingungen. Die schwarzen Pfeile markieren den Signalweg, über den die Hemmung der Cyclooxygenase durch eine verstärkte NO-/cGMP-Produktion kompensiert werden kann.

Konzentration als Ergebnis einer verstärkten cAMP-Freisetzung der stimulierten HUVECs zu messen. Ein Anstieg der cAMP-Freisetzung setzt allerdings einen erhöhten intrazellulären cAMP-Umsatz oder lokale intrazelluläre cAMP-Anstiege voraus. Tatsächlich sind in einer früheren Untersuchung nach Stimulation von LLC-Pk1-Zellen mit Forskolin, PGE₂ und Isoproterenol nur sehr stark lokalisierte cAMP-Anstiege nachgewiesen worden [26]. Lokalisierte cAMP-Anstiege wären in Endothelzellen, welche schon unter Basalbedingungen einen sehr hohen cAMP-Spiegel aufweisen, nach Lyse der Zellen im RIA nicht mehr nachweisbar. Dennoch spielten sie eine wichtige Rolle für die Feedback-Kontrolle der endothelialen Autakoidsynthese.

Im Gegensatz zu cAMP war cGMP an der Regulation der Calciumhomöostase in HUVECs nicht beteiligt. Weder durch Senkung der cGMP-Spiegel mit LNNA unter Basalniveau, noch durch Erhöhung mit Histamin, SNP oder CNP [27, 28] wurde der Agonist-induzierte [Ca²⁺]_i-Anstieg beeinflusst. Übereinstimmend mit diesen Befunden fanden Draijer et al. ebenfalls keinen Effekt von cGMP auf den Thrombin-induzierten [Ca²⁺]_i-Anstieg in HUVECs. Die Autoren führten dies auf das Fehlen der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGMP-Pk), welche die meisten cGMP-Wirkungen vermittelt, in kultivierten und frisch isolierten HUVECs zurück [29]. Endothelzellen anderer Herkunft (z. B.: Schweineaortenendothelzellen, PAECs) besitzen kleine Men-

gen cGMP-Pk [30, 31], die hauptsächlich mit dem Zytoskelett assoziiert ist. Allerdings scheint cGMP auch in diesen Zellen keine calciumregulierende Wirkung zu haben (eigene Befunde, [24]). Das Fehlen von cGMP-Effekten auf [Ca²⁺]_i bedeutet nicht, daß dieses Nucleotid keine Wirkungen in Endothelzellen hat. Es ist vielmehr wahrscheinlich, daß es in anderen zellulären Prozessen, z. B. der Kontrolle der endothelialen Permeabilität für Makromoleküle, cGMP-Pk-unabhängig wichtige Funktionen ausübt [32].

Anders als cGMP spielt das cAMP eine wesentliche Rolle bei der Regulation des endothelialen Calciumhaushaltes. Dabei waren die Agonist-induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiege nicht nur nach Stimulation der Zellen mit PGI₂ oder Forskolin reduziert, sondern auch nach direkter Aktivierung der cAMP-Pk mit cBIMPS [33]. Dies weist darauf hin, daß die cAMP-Pk funktionell in die Kontrolle von [Ca²⁺]_i integriert ist und die Wirkung von cAMP auf die Zielproteine vermittelt. Der physiologische Vasodilatator PGI₂ reduzierte den [Ca²⁺]_i-Anstieg zwar weniger ausgeprägt als Forskolin und cBIMPS. Seine wichtige Rolle für die negative Kontrolle von [Ca²⁺]_i läßt sich jedoch zusätzlich dadurch belegen, daß nach Hemmung der PGI₂-Synthese mit Indomethacin die [Ca²⁺]_i-Anstiege verstärkt waren. Exogenes PGI₂ mußte allerdings in zehnfach höherer Konzentration appliziert werden, als die Zellen unter Stimulation mit Histamin oder Bradykinin freisetzten, um vergleichbare Effekte auf [Ca²⁺]_i und cAMP zu erreichen. Diese schon in anderen Studien [34, 35] dokumentierte Beobachtung resultiert wahrscheinlich aus der Tatsache, daß stimulierte HUVECs außer PGI₂ andere cAMP-steigernde Prostaglandine freisetzen, deren Wegfall unter Indomethacin durch zusätzlich appliziertes PGI₂ ausgeglichen werden muß.

Aus technischen Gründen war der Effekt exogenen PGI₂ auf die endotheliale PGI₂-Freisetzung nicht meßbar. Allerdings war die cBIMPS-abhängige Reduktion des [Ca²⁺]_i-Anstieges verbunden mit einer vollständigen Hemmung der PGI₂-Freisetzung aus HUVECs. Dies weist darauf hin, daß die PLA₂-Aktivität über die cAMP-abhängige Modulation von [Ca²⁺]_i reguliert wird und PGI₂ somit seine eigene Synthese über einen negativen Feedback kontrolliert.

Die Hemmung der PGI₂-Synthese führte nicht nur zu erhöhten [Ca²⁺]_i-Spiegeln nach Histaminstimulation, sondern auch zu einer erhöhten NO-Produktion und nachfolgend erhöhten cGMP-Spiegeln im Endothel. Die NO-Freisetzung, gemessen als LNNA-sensitiver cGMP-Anstieg, war nach 5min signifikant erhöht, obwohl nach PGI₂-Synthesehemmung lediglich der initiale [Ca²⁺]_i-Anstieg, welcher die Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern repräsentiert, verstärkt war. Dies zeigt, daß schon der initiale [Ca²⁺]_i-Anstieg eine wichtige Funktion für die längerfristige Aktivie-

zung der NO-Synthese hat. Passend dazu demonstrieren Blatter et al., daß die Bradykinin-induzierte NO-Produktion über den intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg hinaus anhält [36] und somit ein kontinuierlich erhöhter Calciumspiegel für die Stimulation der NO-Synthese nicht notwendig zu sein scheint.

Die hier dargelegten Befunde belegen, daß cAMP im Endothel über die Regulation der Agonist-induzierten Calciumanstiege nicht nur die Produktion von PGI_2 , sondern auch die von NO reguliert. Folglich resultiert aus erniedrigten PGI_2 -Spiegeln, z. B. nach Cyclooxygenasehemmung, eine erhöhte endotheliale NO-Produktion. Da diese nicht durch negativen Feedback über cGMP reguliert wird, könnten die erhöhten NO- und damit cGMP-Spiegel das Fehlen von PGI_2 bei der Kontrolle des vaskulären Tonus kompensieren. Wäre dieser auf zellulärer Ebene gezeigte Kompensationsmechanismus auf intakte Gefäße übertragbar, ließe sich erklären, warum Indomethacin bei Patienten mit intakter Endothelfunktion ohne Effekt auf den peripheren Widerstand und den systemischen Blutdruck bliebe. Es wäre weiterhin verständlich, warum Indomethacin im Gegensatz dazu bei Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion (z. B. Hyperlipidämie, Diabetes, Herzinsuffizienz), die sich vor allem in einer Abschwächung der NO-Produktion und / oder Wirkung äußert, die Agonist-induzierte Vasodilatation reduziert und blutdrucksteigernd wirkt.

(Diese Arbeit wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft [DFG Po 307/1-3])

Literatur

- Parkington HC, Tare M, Tonta MA, Coleman HA. Stretch revealed three components in the hyperpolarization of guinea-pig coronary artery in response to acetylcholine. *J Physiol Lond* 1993; 465: 459-476.
- Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K, Johns A, Harder DR. Mechanoreception by the endothelium: mediators and mechanisms of pressure- and flow-induced vascular responses. *Blood Vessels* 1990; 27: 246-257.
- Koller A, Sun D, Huang A, Kaley G. Corelease of nitric oxide and prostaglandins mediates flow-dependent dilation of rat gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol* 1994; 267: H326-332.
- Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3375-3378
- Leffler CW, Fedinec AL, Shibata M. Prostacyclin receptor activation and pial arteriolar dilation after endothelial injury in piglets. *Stroke* 1995; 26: 2103-2110
- de Wit C, von Bismarck P, Pohl U. Synergistic action of vasodilators that increase cGMP and cAMP in the hamster cremaster microcirculation. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1513-1518
- Ferri C, Bellini C, Piccoli A, Carlomagno A, Bonavita MS, Santucci A, Balsano F. Enhanced blood pressure response to cyclooxygenase inhibition in salt-sensitive human essential hypertension. *Hypertension* 1993; 21: 875-881
- Pohl U, Nolte C, Bunse A, Eigenthaler M, Walter U. Endothelium-dependent phosphorylation of vasodilator-stimulated protein in platelets during coronary passage. *Am J Physiol* 1994; 266: H606-612
- Oida H, Namba T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ohishi H, Ichikawa A, Narumiya S. In situ hybridization studies of prostacyclin receptor mRNA expression in various mouse organs. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 2828-2837
- Cornwell TL, Lincoln TM. cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca^{2+} by cAMP in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 1146-1155.
- Schmidt HHHW, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system, regulation and mechanism of action. *Biochem Biophys Acta* 1993; 1178: 153-175.
- Brotherton AFA, Hoak JC. Role of Ca^{2+} and cyclic AMP in the regulation of the production of prostacyclin by the vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 495-499.
- Buchan K W, Martin W. Modulation of agonist-induced calcium mobilisation in bovine aortic endothelial cells by phorbol myristate acetate and cyclic AMP but not cyclic GMP. *Br J Pharmacol* 1991; 104: 361-366.
- Lückhoff A, Pohl U, Mülsch A, Busse R. Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1988; 95: 189-196.
- Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 682-685
- Lückhoff A, Mülsch A, Busse R. cAMP attenuates autacid release from endothelial cells: relation to internal calcium. *Am J Physiol* 1990; 258: H960-H966.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; 52: 2745-2756.
- Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-Low Density Lipoprotein. *J Cell Biol* 1984; 99: 2034-2040.
- Grynkiwicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 3440-3450.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275
- Motulsky HJ, Ransnas LA. Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review. *FASEB J* 1987; 1: 365-374.
- Force T, Hyman G, Hajjar R, Sellmayer A, Bonventre JV. Noncyclooxygenase metabolites of arachidonic acid amplify the vasopressin-induced Ca^{2+} signal in glomerular mesangial cells by releasing Ca^{2+} from intracellular stores. *J Biol Chem* 1991; 266: 4295-4302.
- Stoll LL, Morland MR, Spector AA. 13-HODE increases intracellular calcium in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1994; 266: C990-C996.

24. Kuhn M, Förstermann U. Does EDRF/NO regulate its own release by increasing endothelial cyclic GMP? *Basic Res Cardiol*, 1991; 86: 27-36.
25. Marczin N, Ryan US, Catravas JD. Endothelial cGMP does not regulate basal release of endothelium-derived relaxing factor in culture. *Am J Physiol* 1992; 263: L113-L121.
26. Barsony J, Marx SJ. Immunocytology on microwave-fixed cells reveals rapid and agonist-specific changes in subcellular accumulation patterns for cAMP or cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1188-1192.
27. Suga S, Nakao K, Itoh H, Komatsu Y, Ogawa Y, Hama N, Imura H. Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 1992; 90: 1145-1149.
28. Furuya M, Aisaka K, Miyazaki T, Honbou N, Kawashima K, Ohno T, Tanaka S, Minmino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide inhibits intimal thickening after vascular injury. *Biochem Biophys Res Com* 1993; 193: 248-253.
29. Draijer R, Vaandrager AB, Nolte C, de Jonge HR, Walter U, van Hinsbergh VWM. Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin. *Circ Res* 1995; 77: 897-905.
30. MacMillan-Crow LA, Murphy-Ullrich JE, Lincoln TM. Identification and possible localization of cGMP-dependent protein kinase in bovine aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com* 1994; 201: 531-537.
31. Diwan AH, Thompson WJ, Lee AK, Strada SJ. Cyclic GMP-dependent protein kinase activity in rat pulmonary microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com* 1994; 202: 728-735.
32. Draijer R, Atsma DE, van der Laarse A, van Hinsbergh VW. cGMP and nitric oxide modulate thrombin-induced endothelial permeability. Regulation via different pathways in human aortic and umbilical vein endothelial cells. *Circ Res* 1995; 76: 199-208.
33. Sandberg M, Butt E, Nolte C, Fischer L, Halbrügge M, Beltman J, Jahnsen T, Genieser HG, Jastorff B, Walter U. Characterization of Sp-5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosyl-benzimidazole-3',5'-monophosphorothioate (Sp-5,6-DCI-BIMPS) as a potent and specific activator of cyclic-AMP-dependent protein kinase in cell extracts and intact cells. *Biochem J* 1991; 279: 521-527.
34. Busse R, Förstermann U, Matsuda H, Pohl U. The role of prostaglandins in the endothelium-mediated vasodilatory response to hypoxia. *Pflügers Arch* 1984; 401: 77-83.
35. Simmet T, Förstermann U, Peskar BA. Effect of exogenous and endogenous prostacyclin on the contractility of rabbit splenic capsular smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1980; 312: 245-253.
36. Blatter LA, Taha Z, Mesaros S, Shacklock PS, Wier WG, Malinski T. Simultaneous measurements of Ca²⁺ and nitric oxide in bradykinin-stimulated vascular endothelial cells. *Circ Res* 1995; 76: 922-924.

Professor Dr. rer. nat. Bernd Fischer

Direktor des Instituts für Mathematik der MUL

Mit einer kurzfristigen Titeländerung überraschte Professor Dr. rer. nat. Bernd Fischer die Gäste seiner Antrittsvorlesung an der MUL am 17. November vergangenen Jahres. Nicht, wie auf den Einladungskarten angekündigt, zum Thema „Mathematik in der Medizin“ werde er sprechen, eröffnete er mit dem notwendigen Selbstbehauptungswillen eines Mathematikers an einer Medizinischen Universität. Vielmehr müsse es richtig heißen: „Mathematik ist Medizin“.

Professor Fischer, seit Mai 1997 Direktor des Instituts für Mathematik der MUL, ist in der Lübecker Informatik einer der Männer der ersten Stunde; am ersten Vorlesungstag des neuen Studiengangs im Oktober 1993 war er schon dabei. Damals war er allerdings noch vor allem an der Universität Hamburg tätig und nahm in Lübeck eine Vertretungsprofessur wahr.

Bernd Fischer, gebürtiger Möllner, begann nach dem Abitur 1976 in Schwarzenbek sein Mathematik-Studium mit dem Nebenfach Informatik in Hamburg. 1983 machte er das Diplom, 1987 promovierte er und 1994 habilitierte er sich. Aus den Jahren der täglichen kurzen Bahnfahrt aus dem Lauenburgischen nach Hamburg ist bezeugt, daß Professor Fischer von Fahrstülern gelegentlich um Hilfestellung bei ihren Mathematik-Hausaufgaben gebeten wurde. Erwies sich der Lösungsweg als so schwierig, daß er in den zehn Minuten zwischen Büchen und Schwarzenbek nicht abzuschließen war, konnten die Schüler ihren Lehrer mit Fug und Recht darauf hinweisen, daß er auch von einem angehenden Mathematik-Professor nicht bewältigt worden war.

Seit März 1996 ist er Professor für Numerische Mathematik an der MUL. Professor Fischer hielt Lübeck auch die Treue, als er im August 1996 einen Ruf an die Universität Magdeburg erhielt, und lehnte ab. Er schätzt an der MUL vor allem die sehr guten Kooperationsbedingungen, schränkt aber scherzhaft ein, daß eine kleine Fakultät wie die Technisch-Naturwissenschaftliche in Lübeck doch den Nachteil habe, daß man die zeitraubende Mitarbeit in den akademischen Gremien kaum umgehen könne.

Drei fächerübergreifende Forschungsprojekte von Lübecker Mathematikern und Medizinerinnen stellte Profes-

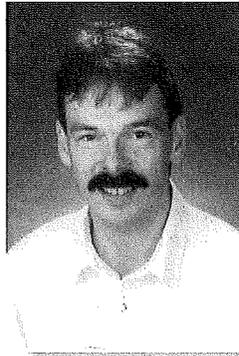
sor Fischer in seiner Antrittsvorlesung eingehend dar. Sie geben zugleich einen Einblick in aktuelle Fragestellungen und Methoden seines Faches: Mathematik in der Medizin am Beispiel von EEG, Bildverarbeitung und Thermoregulation.

Das Elektroenzephalogramm (EEG) ist eine Überlagerung einer Vielzahl von Schwingungen unterschiedlicher Frequenzen. Bei auditorischen und visuellen Reizen ergeben sich spezifische Veränderungen des EEGs in den verschiedenen Arealen des Gehirns, die ereigniskorrelierten Potentiale (EKP). Zum Aufspüren eines EKPs war es bisher notwendig, die Stimulationen vielfach zu wiederholen und die dabei aufgezeichneten EEG-Antworten zu mitteln. Gemeinsam mit Physiologen der MUL versuchen die Mathematiker vermittels Wavelet-Denoising-Techniken, jeweils aus der Einzel-EEG-Antwort das enthaltene EKP zu extrahieren.

Die Wavelet-Zerlegung ist eine relativ neue Technik in der Signalverarbeitung.

Die Fouriertransformation eines Signals liefert genaue Auskunft über den Frequenzinhalt, aber keine Information über das zeitliche Auftreten der Frequenzen im Signal. Während die Standardfouriertransformation daher nur für stationäre Signale geeignet ist, ist es mit der Wavelet-Transformation möglich, auch zeitliche Aussagen über Frequenzinhalte eines Signals zu treffen und damit transiente Signale zu analysieren. Die für das Projekt erforderlichen Wavelet-Zerlegungen sind in Lübeck entwickelt worden – ein Beleg dafür, wie die Erfordernisse einer bestimmten medizinischen Fragestellung auf die Mathematik zurückwirken und auch hier zu neuen Ergebnissen führen können.

Auch die Hirnforschung profitiert von Mathematik. In einem Projekt des MUL-Instituts für Anatomie geht es um die Bestimmung der räumlichen Verteilung der Neuronen in der Hirnrinde sowie die funktionale Zuordnung der Neuronen. Dabei tritt das grundsätzliche Problem auf, das dreidimensionale Objekt auf der Grundlage zweidimensionaler CT-, PET- oder MR-Bilder zu rekonstruieren. Man ist für die angestrebte Bildauflösung schnell mit Differentialgleichungen konfrontiert, die über 500000 Unbekannte enthalten. Ziel



des gemeinsamen Projektes ist die Erstellung eines Softwarepaketes, mit dem sich das dreidimensionale Bild eines individuellen Gehirnes und dessen Visualisierung bis zur Auflösung der Neuronen automatisch erstellen läßt. Dazu wird die mathematische Methode des „Elastic matching“ genutzt.

Die erwähnte Kooperation auf dem Gebiet der Thermoregulation betrifft ein Projekt in der Frühgeborenenmedizin und in der Medizintechnik zusammen mit dem Drägerwerk und der Universität Hamburg. Im Rahmen dieses Projektes soll ein Softwarepaket erstellt werden, das es ermöglicht, die Temperaturverteilung eines Frühgeborenen unter verschiedensten Umwelteinflüssen am Rechner zu simulieren. Ein typische klinische Fragestellung ist hier: Ist es möglich, den Kopf eines Frühchens zu kühlen, ohne das Kind insgesamt zu unterkühlen?

Für die künftige Arbeit an der Medizinischen Universität wünscht sich Professor Fischer, auch in Hinblick auf die Standortsicherung, eine Vergrößerung des Studienangebots in Lübeck. Ganz besonders am Herzen liegt ihm der geplante Studiengang „Mathematik in Medizin und Biowissenschaften“. Dieser interdisziplinär angelegte Studiengang paßt zum einen ausgezeichnet in die Lübecker Hochschullandschaft und trägt zum anderen modernen und innovativen Entwicklungen in den genannten Wissenschaften Rechnung.

Außerhalb der Mathematik betätigt Professor Fischer sich gerne sportlich. So spielt er Tennis und unternimmt mit seinen beiden Söhnen Inlineskating-Touren, auch wenn sie ihn noch nicht auf die Halbpipeline bekommen haben.

R. Labahn

Lübecker Studentengruppe nimmt erfolgreich am Benjamin-Franklin-Contest in Berlin teil

Anlässlich des 30jährigen Jubiläums des Universitätsklinikums Benjamin-Franklin (Steglitz) veranstaltete die Freie Universität Berlin einen Wettbewerb für Studenten. Jeweils fünf Teilnehmer von den Universitäten Aachen, Heidelberg, Lübeck, Marburg und München (LMU) sollten gegen das eigene Team bei der Auflösung klinischer Fälle, im schnellen Diagnose-Diagnose, auf Informationsjagd im Internet und mit praktischen Aufgaben wie Gipsen oder Nähen in Wettstreit treten. In Lübeck meldeten sich zwei Teams, die fleißig trainierten und zu einer Vorentscheidung gegeneinander antraten. Bei den Vorbereitungen, an denen sich Dozenten aus verschiedenen Kliniken engagiert beteiligten, stellte sich ein ganz neues Lehr- und Lerngefühl ein: die kleine Gruppe hoch motivierter Studenten begeisterte uns Lehrende – so sollte Unterricht immer sein! Der Erfolg blieb denn auch nicht aus.

Mit Unterstützung der Freunde und Förderer unserer Universität konnte dann sowohl die knapp vorn liegende Gruppe als aktive, die zweite Gruppe als „Fancub“ mit nach Berlin fahren. Der ehrenvolle 2. Platz knapp hinter den siegreichen Heidelbergern wurde für Stefan Arndt, Kai Block, Ute Buschmann, Rolf Gebser und Christian Ehrenberg mit einem hochwertigen PC belohnt. Der folgende Bericht der Studenten spricht für sich.

Prof. Dr. med. H. H. Wolff, Direktor der Klinik für Dermatologie und Venerologie der MUL

Im Dezember vergangenen Jahres hätte es keiner von uns für möglich gehalten, daß wir sechs Freunde einmal unsere Uni in Berlin vertreten sollten, aber nach sechsmonatigem gemeinsamem Training und denkbar knappem Sieg in den Vorausscheidungen standen wir sichtlich überrascht als frischgebackene „Benjamin-Franklin-Olympioniken“ fest. Sechs Freunde auf dem Weg nach Berlin.

Am Abend der ersten Besprechung hatten sich zwölf Mutige unter der Leitung unserer Professoren Wolff und Schmucker eingefunden. Bereits am Anfang stellte sich ein großes Problem. Wie sollten wir die Gruppe auswählen, die am Ende um Ruhm und Preise in Berlin kämpfen würde? Da gingen die Meinungen doch weit auseinander. Der Teamgeist und die Gemeinschaft sollten im Vordergrund stehen und nicht eine Auswahl an Einzelkämpfern. Eine Hälfte der Anwesenden kannte sich schon vom ersten Semester an, vier wohnten gemeinsam in einer WG, so daß sich schnell zwei Gruppen zukünftiger Lern- und Leidensgefährten fanden, die gemeinsam von ausgesuchten Professoren trainiert und vorbereitet werden sollten. Fünf Fächer, vier Monate Zeit, anfangs noch ganz lockere Abende mit ein paar Gläsern Wein, später lange Nächte, ausufernde Diskussionen über große Kleinigkeiten, viel Spaß, viel Zweifel und gegen Ende immer mehr nervöse Gewißheit darüber, viel zu wenig zu wissen. Unsere Professoren haben sich unglaublich viel Mühe mit uns gegeben. Jeder ein kleiner Bundestrainer mit seiner Crew Auserwählter, haben sie uns begeistert durch die Vorbereitung geführt. Sie hatten wie wir Spaß am Unterricht in

der kleinen Gruppe, am Krankenbett und in den Seminarräumen. Das ideale Studium zum Greifen nahe.

Sommer, Sonne, Fußball-WM, 30° C, Deutschland 0:2 hinten, volles Gepäck auf dem Weg zum Clubhaus der Berliner, und der ortskundige Mitstreiter immer vorneweg: „Sind gleich da!“ Irgendwann kamen wir an, nette Menschen mit gelben Namensschildern begrüßten uns, ein freundlicher Sekttempfang mit Dekan, ein leckeres Büfett, Wein und ein improvisiertes Volleyballspiel gegen die Marburger. So lernten wir uns erst einmal kennen, und der Nachmittag wurde ein voller Erfolg. Doch gegen Abend wurde die Stimmung im „Haus der Naturfreunde“ zunehmend gedämpfter. Aufgeregt, mit einem flauen, ungewissen Gefühl in der Magengegend, wurden noch ein paar Krankheitsbilder und Differentialdiagnosen diskutiert, bevor wir uns sehr früh ins Bett begaben. Nur ein paar Mitstreiter aus München bewiesen wahre Nervenstärke und blieben bis spät in die Nacht in einem Biergarten.

Der nächste Tag, Tag der Entscheidung. In der Cafeteria der Uni treffen wir zufällig auf unsere Schlachtenbummler, Freunde die es sich nicht nehmen lassen wollten, uns auf unserer Mission Beistand zu leisten. Eine wirklich gelungene Überraschung, und Unterstützung konnten wir, so nervös wir waren, wirklich gebrauchen. Noch ein paar Photos mit unseren Betreuern, angespannte Gesichter mit entspannten Prof's und schon ging es los, auf in den Hörsaal West, da fehlten nur noch die Bengalischen Lichter der Tiffosi, Hexenkessel Berlin, oder kam es einem nur so vor?

Nach Runde eins wich die Anspannung: Uneinholbar schien unser Rückstand zu den anderen Teams. Wieder eine Serie von Dias, noch ein paar Laborwerte und eine abenteuerliche Anamnese, plötzlich lagen wir auf dem zweiten Platz. Die Teams der verschiedenen Universitäten sind alle so gut vorbereitet, daß oft einfach nur die Schnelligkeit entscheidet. Die Dias werden kaum mehr angesehen, oberste Taktik ist es, als erster den Buzzer zu betätigen. Die Nerven liegen bloß. Bei einigen Fragen ist sich selbst die Jury nicht ganz sicher. Vielleicht hätte eine Pause gutgetan, um ein bißchen Ruhe ins Spiel zu bringen. Vielleicht waren es gerade die vielversprechenden Preise der ersten Plätze, die das Blut jedes einzelnen zum Kochen brachten, und manchmal viel zu ernsten Konkurrenzkampf durchblicken ließen, den wir nun gerade vermeiden wollten. Internetjagd nach medizinischem Wissen, Nähen, Augenspiegeln, vor dem Gipsen lag der Sieg zum Greifen nahe. Doch die Heidelberger gehen als knappe Sieger hervor.

Nach einem feudalen Abendessen mit unseren Professoren ging es auf zur Siegerehrung und anschließenden Party im Festzelt vor dem Klinikum, in dem endgültig alle Anspannung der Erleichterung wich und ausgelassen fröhlich gefeiert wurde.

Der Benjamin-Franklin-Contest war für uns alle ein unvergeßliches Erlebnis. Die fast halbjährige Vorbereitungsphase zeigte uns, daß ein Medizinstudium auch etwas anderes bedeuten kann als irreführende Multiple-Choice-Fragen nach den kleinen versteckten Molekülen in unserem Körper, nämlich Teamgeist, Lernen an Fallbeispielen, Blickdiagnosen, Diskussionen, die Spaß bereiten, und praktischen Übungen, die einen auf den späteren Klinikalltag vorbereiten. Vielen Dank an alle, die uns dabei geholfen haben, und selbstverständlich auch ein großes Lob nach Berlin. Denn dort wurde dieser einzigartige Wettstreit ins Leben gerufen und mit viel Mühe und Liebe vorbereitet.

Stefan Arndt, Kai Block, Ute Buschmann, Rolf Gebser, Christian Ehrenberg

Personalia

Ruf an die MUL

M a r t i n e t z, Thomas, Professor Dr. rer. nat., Ruhr-Universität Bochum, hat den Ruf auf die C4-Professur für Neuroinformatik/Bioinformatik an der Medizinischen Universität zu Lübeck erhalten. [Technisch-Naturwissenschaftliche Fakultät; 1998-09-09]

P e t e r s e n, Dirk, Privatdozent Dr. med., Abteilung für Neuroradiologie der Universität Tübingen, hat den Ruf auf die C3-Professur für den radiologischen Schwerpunkt Neuroradiologie am Institut für Radiologie der Medizinischen Universität zu Lübeck angenommen. [Medizinische Fakultät; 1998-09-09]

Ehrendoktor

K ü h n e l, Wolfgang, Professor Dr. med., Direktor des Instituts für Anatomie und Rektor der Medizinischen Universität zu Lübeck, wurde mit dem Ehrendokortitel der Medizinischen Universität Sofia, Bulgarien, ausgezeichnet. Die Ehrung erfolgte in Anerkennung seiner Beiträge für die bulgarische morphologische Wissenschaft und seiner Unterstützung bei der Reform der Medizinischen Universität Sofia. [Medizinische Fakultät; 1998-09-15]

Fachgesellschaften, Fachzeitschriften

D i e d r i c h, Klaus, Professor Dr. med., Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Medizinischen Universität zu Lübeck, wurde zu einem der drei Herausgeber des „Journals Archives of Gynaecology“ (Springer Verlag) gewählt. [Medizinische Fakultät; 1998-10-01]

H a l s b a n d, Heinrich, Professor Dr. med., Direktor der Klinik für Kinderchirurgie der Medizinischen Universität zu Lübeck, wurde zum geschäftsführenden Präsidenten der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie e. V. gewählt. In die-

ser Aufgabe richtet Herr Professor Halsband auch die 37. Jahrestagung der Gesellschaft (Berlin 7. - 9. Oktober 1999) aus. [Medizinische Fakultät; 1998-10-13]

R i n k, Lothar, Dr. rer. nat., Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Medizinischen Universität zu Lübeck, wurde auf der diesjährigen internationalen Mycoplasmen-Tagung der „International Organization for Mycoplasmaology (IOM)“ in das wissenschaftliche Komitee für den nächsten Mycoplasmenkongreß im Jahre 2000 in Japan berufen. Des weiteren hat Dr. Rink eine Einladung als Sprecher zur Konferenz „Inc and Health: Current Status and Future Directions“ an das National Institute of Health in den USA. Diese Konferenzen dienen der Festlegung der Forschungsschwerpunkte und Forschungsgelder in den USA für einen gesundheitspolitisch bedeutsamen Bereich. Dr. Rink ist der einzige deutsche Sprecher und nach dem jetzigen Stand der Sprecherliste wahrscheinlich sogar der einzige Europäer, der eingeladen wurde, um über seine Arbeiten zur Immunbiologie von Zink zu berichten. [Medizinische Fakultät; 1998-08-31]

R o b, Peter Maria, Privatdozent Dr. med., Medizinische Klinik I der Medizinischen Universität zu Lübeck, wurde in den Herausgeber-Beirat der Zeitschrift „Magnesium-Bulletin - Offizielles Organ der Gesellschaft für Magnesiumforschung e.V.“ aufgenommen. [Medizinische Fakultät; 1998-07-20]

S t a n g e, Eduard Friedrich, Professor Dr. med., Leiter des Bereichs Gastroenterologie der Medizinischen Klinik I der Medizinischen Universität zu Lübeck, ist bei der letzten Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten in deren Bereit gewählt worden. Die Amtszeit beläuft sich auf 6 Jahre. [Medizinische Universität; 1998-10-29]

Ethik-Kommissionen

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Medizinischen Universität zu Lübeck besteht aus folgenden Mitgliedern: Professor Dr. med. Manfred O e h m i c h e n (Vorsitzender der Kommission, Dekan, Direktor des Instituts für Rechtsmedizin der MUL), Professor Dr. med. Dr. med. dent. Helmut v o n D o m a r u s (stellvertretender Vorsitzender der Kommission, Direktor der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie der MUL), Professor Dr. med. Peter D o m i n i a k (Direktor des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der MUL), Professor Dr. phil. Dietrich v. E n g e l h a r d t (Direktor des Instituts für Medizin- und Wissenschaftsgeschichte der MUL), Dr. jur. Horst G r e b (Vizepräsident des Landgerichts Lübeck), Professor Dr. med. Klaus K r u s e (Direktor der Klinik für Pädiatrie der MUL), Hei d r u n M ü l l e r (Medizinische Klinik I der MUL) und Dirk S t o j a n (Präsident des Amtsgerichts Lübeck). [Medizinische Fakultät; 1998-12-02]

E n g e l h a r d t, Dietrich v., Professor Dr. phil., Direktor des Instituts für Medizin- und Wissenschaftsgeschichte der Medizinischen Universität zu Lübeck, Präsident der Akademie für Ethik in der Medizin, wurde in das International Advisory Board des Regional Program on Bioethics der Pan American Health Organization (PAHO/WHO) berufen. Das Regional Program on Bioethics ist eine gemeinsame Initiative der PAHO, der chilenischen Regierung und der University of Chile und hat die Vernetzung von Experten sowie die Entwicklung von Aus- und Weiterbildungsprogrammen auf dem Gebiet der Bioethik zum Ziel. [Technisch-Naturwissenschaftliche Fakultät; 1999-01-06]

R a s p e, Hans-Heinrich, Professor Dr. med. Dr. phil., Direktor des Instituts für Sozialmedizin der Medizinischen Universität zu Lübeck, wurde vom Vorstand der Bundesärztekammer erneut in die Zentrale Ethik-Kommission berufen. [Medizinische Fakultät; 1998-07-06]

Forschungsförderung

V e r l e g e r, Rolf, Professor Dr. rer. soc. Dipl.-Psych., und Dr. med. Bernd W a u s c h k u h n, Klinik für Neurologie der Medizinischen Universität zu Lübeck, wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für das Projekt „Ereignisbezogene EEG-Lateralisierungen zur Untersuchung des ventralen und dorsalen Pfads am Menschen“ eine Verlängerung auf zwei Jahre gewährt. Mitarbeiter werden Dr. psych. Rob v a n d e r L u b e und Privatdozent Dr. rer. nat. Piotr J a s k o w s k i. Das Projekt erforscht am gesunden Menschen Zeitverlauf und Struktur der höheren Verarbeitung visueller Information; wesentliche Erkenntnisse liegen dazu bislang nur aus invasiven Experimenten an Primaten vor. [Medizinische Fakultät; 1998-08-20]

Gastwissenschaftler

A u n a p u u, Marina, Anatomisches Institut der Universität Tartu, Estland, hielt sich vom 1. bis 31. August 1998 als Gastwissenschaftlerin im Institut für Anatomie der Medizinischen Universität zu Lübeck auf. Frau Aunapuu ist studierte Veterinär-Medizinerin und befaßt sich derzeit mit der Ultrastruktur der Niere bei entzündlichen Erkrankungen dieses Organs. [Medizinische Fakultät; 1998-08-04]

R u s a n o v, Ventsislav, Professor, Institut für Atom-Physik der Universität Sofia, Bulgarien, und Dr. Veaceslav C o r o p c e a n u, Department für Theoretische Physik der Moldavischen Staats-Universität Kishinev, Moldavien, haben Forschungsstipendien der Alexander von Humboldt-Stiftung für einen Aufenthalt als Gastwissenschaftler am Institut für Physik der Medizinischen Universität zu Lübeck erhalten. Professor Rusanov beschäftigt sich seit August 1998 für sieben Monaten mit dem Thema „Thermal and optical swit-

ches of molecular spin states“, Dr. Coropceanu wird ab Februar 1999 für zwölf Monate Untersuchungen zum Thema „Spectroscopic and magnetic properties of polynuclear mixed-valence clusters“ durchführen. [Gastwissenschaftler; Technisch-Naturwissenschaftliche Fakultät; 1998-08-31]

Tagung

5th EULAR Postgraduate Course in Rheumatology, Bad Bramstedt, 21.-30. August 1998

Vom **21. bis 30.8.1998** trafen sich 120 junge Ärzte aus 28 Ländern zum 5. Postgraduiertenkurs in Rheumatologie der **EULAR** (European League against Rheumatism) in der Rheumaklinik Bad Bramstedt. Durch die Kombination einer großen Rheumaklinik mit einer universitären Rheumatologie, wie sie in Bad Bramstedt/Medizinische Universität Lübeck mit Direktor Prof. Dr. W. L. Gross vorhanden ist, fanden sich ideale Voraussetzungen für einen solchen Kurs. Das wissenschaftliche Programm und die Durchführung wurden durch Prof. Dr. W. L. Gross unterstützt, durch Prof. Dr. H. Zeidler, Hannover, Dr. A. Wolf, Royal Cornwall Hospital, Truro, UK, und Frau PD Dr. A. Gause, Bad

Bramstedt/Lübeck organisiert. Anmeldung und Verwaltung erfolgte zum großem Teil durch das EULAR-Sekretariat in Zürich. Der Großteil der Teilnehmer konnte in der Rheumaklinik Bad Bramstedt untergebracht werden. Auch die volle Verpflegung und die Tagungsräume wurden von der Rheumaklinik Bad Bramstedt zur Verfügung gestellt. Das Tagungsprogramm enthielt Vorträge und Workshops von 80 international bekannten Referenten aus 12 Ländern. Es begann mit einem 3-tägigen Kurs der wissenschaftlichen Grundlagen, an dem sich u.a. auch Mitglieder des SFB 376 beteiligten. Der anschließende 7-tägige klinische Teil umfaßte die rheumatologischen Krankheitsbilder in Klinik und Praxis, Bildgebung und Therapie. Ein besonders geschätzter Kursteil war die klinische Visite bei Vaskulitis-Patienten der Stationen, bei der es zu lebhaften Diskussionen der Teilnehmer mit den Referenten kam. Zum Schluß des Kurses absolvierten die Teilnehmer eine Multiple-Choice-Prüfung, die 5 besten wurden mit Buchpreisen ausgezeichnet. Die EULAR-Kurse finden seit 1994 jährlich statt und sollen zu einer standardisierten Rheumatologie-Ausbildung in Europa führen. Die Unkosten für diesen Kurs betragen für die Teilnehmer 1700,- DM inklusive Unterkunft und Verpflegung. Für einige Teilnehmer gab es Stipendien der EULAR. Ferner erfolgte Unterstützung des Kurses durch die Industrie und den SFB 367.

KONGRESS

ORGANISATION

- Anmietung geeigneter Räumlichkeiten
- Hotelbuchungen
- Tagungsbüro
- Industrieausstellung
- Teilnehmerverwaltung
- Referentenbetreuung

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!

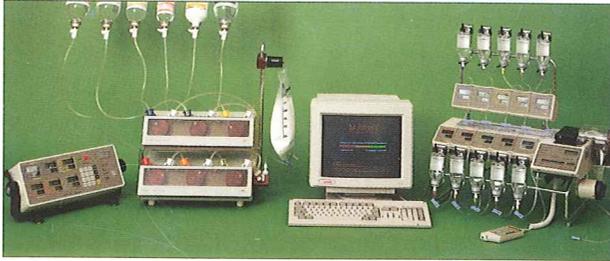


Hansisches Verlagskontor
Mengstraße 16
23552 Lübeck
Tel. 04 51 / 70 31-205
Fax. 04 51 / 70 31-281

- Bereitstellen modernster Technik und Kommunikationssysteme
- Drucksachen, Herstellung und Versand
- Rahmenprogramm
- Finanzplanung/ Abrechnung
- PR unterstützende Aktivitäten

All-In-One - Lösungen von **Clintec**[®] : 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