

Eigene Arbeiten

Modell und Methoden

Tiermodell der Pneumokokken-Meningitis

Das eingesetzte Tiermodell der Pneumokokken-Meningitis untersucht die sehr frühe Phase der Erkrankung. Im Vergleich zu dem in der Literatur beschriebenen Modell [23] wurde es gering modifiziert und vereinfacht. Es ist gut charakterisiert [23, 70, 71]. In allen dargestellten tierexperimentellen Untersuchungen wurde die Meningitis mit chemisch definierten Zellwandbestandteilen von Pneumokokken [72, 73] ausgelöst. Diese Meningitis unterscheidet sich nicht wesentlich von der durch lebende Bakterien [74]. Der Vorteil der Verwendung von Zellwandbestandteilen ist, dass bakterielle Faktoren wie Pneumolysin und H₂O₂ keine Rolle spielen. Also erlaubt das Modell, die Rolle der Körperabwehr bei den pathophysiologischen Veränderungen zu studieren. Außerdem ähnelt die Gabe von PCW der klinischen Situation, in der die Bakterien innerhalb weniger Stunden abgetötet sind und ihre Zellwandbestandteile freigesetzt werden.

Alle Tierversuche wurden in Vollnarkose durchgeführt. Nach Einleitung der Narkose mit Halothan wurden die 280 – 330 g schweren Wistar-Ratten mit Thiopental (100 mg/kg) narkotisiert. In Narkose wurden die Tiere tracheotomiert und kontrolliert beatmet (AP-10, K. Effenberg, Pfaffing, Deutschland). A. und V. femoralis wurden für Blutdruckmessung und arterielle Blutgasanalysen sowie für intravenöse Applikation von Substanzen kannüliert. Entsprechend der Blutgasanalyse wurde die Beatmung angepasst und ggf. Sauerstoff der Atemluft beigemischt (Ziel: pH 7,40, pO₂ > 100 mmHg). Für die Messung des intrakraniellen Drucks (ICP) und die intrazisternale Applikation von Substanzen wurde am Okzipitalpol ein Loch gebohrt und ein Katheter in der Cisterna magna fixiert. Parietal wurde auf einer Fläche von 2 x 3 mm der Knochen soweit ausgedünnt, dass mit Laser-Doppler der regionale zerebrale Blutfluss (rCBF, PeriFlux 4001 Master, Perimed, Schweden) im Kapillarbett

gemessen werden konnte.

Während jedes Experimentes wurden kontinuierlich gemessen: endexpiratorischer $p\text{CO}_2$ (ARTEMA MM 204, Heyer, Bad Ems, Deutschland), arterieller und intrazisternaler Druck (Statham P10 EZ Drucksonden, Spectramed, USA) und rCBF. In Intervallen von höchstens zwei Stunden wurden Blutgasanalysen (COMPACT 1, AVL List, Graz, Österreich) durchgeführt. Zu Beginn und am Ende jedes Versuchs wurden Leukozytenzahl in Blut und Liquor bestimmt. Nach sechs Stunden wurden die Tiere durch intravenöse Injektion einer kardioplegischen KCl-Lösung getötet, das Gehirn entnommen und der Wassergehalt des Gehirnes als Maß des Hirnödems mit der Feucht-Trocken-Methode [23] bestimmt.

Abbildung 4. Typischer Anstieg des regionalen zerebralen Blutflusses (rCBF; Kreise) und des intrakraniellen Druckes (ICP; Dreiecke) nach intrazisternaler Injektion von PCW (Äquivalent 10^8 CFU). Nach 6 Stunden Liquorzellzahl $1840/\mu\text{l}$ (Norm $<5/\mu\text{l}$).

Eine unbehandelte Meningitis durch PCW ist in diesem Modell durch einen langsamen Anstieg von rCBF und ICP, durch Liquorpleozytose und erhöhten Wassergehalt des Gehirns charakterisiert. Diese stabilen Veränderungen änderten sich im Laufe der Jahre, in denen wir mit diesem Modell arbeiteten, nicht wesentlich. Exemplarisch zeigt Abb. 4 einen typischen

Verlauf der ICP- und rCBF-Entwicklung bei einer Wistar-Ratte mit PCW-induzierter Meningitis.

Präparation der Pneumokokken-Zellwandbestandteile (PCW)

Die PCW wurden in Analogie zu einem publizierten Protokoll [74] in Zusammenarbeit mit dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité hergestellt (herzlichen Dank an PD Dr. W. Bürger und Prof. Dr. R. Schumann).

Kurz zusammengefasst wurde ein unbekapselter Stamm von *Streptococcus pneumoniae* (PnR-527, Jena, Deutschland) in chemisch definiertem Medium kultiviert, hitzeinaktiviert und mit 0,1 µm großen Partikeln desintegriert. Die Suspension wurde mit DNase und RNase (Promega, Mannheim, Deutschland) und RNase (USB, Cleveland, Ohio, USA) verdaut und mit Trypsin (Sigma-Aldrich, Chemie, Deutschland) behandelt. Nach Zentrifugation (23000 g für 20 min) wurden die PCW in SDS (Serva, Heidelberg, Deutschland) aufgenommen und mehrfach gewaschen. Die gereinigten PCW wurden in PBS resuspendiert, bei OD 620 nm=1 entsprechend einem Äquivalent von 10^8 kolonieformenden Einheiten eingestellt und bei -20 °C bis zur Verwendung im Experiment tiefgefroren. Die Zusammensetzung der auf diese Weise erhaltenen PCW sind chemisch charakterisiert [72, 73].

Pathophysiologie der ambulant erworbenen Pneumokokken-Meningitis

Signalkaskade

Tyrphostin AG 126 reduziert die Entzündung im akuten Stadium der experimentellen Pneumokokken-Meningitis [75].

Das Tyrphostin AG126 ist ein selektiver Hemmer von Protein-Tyrosin-Kinasen. In einem Tiermodell der Multiplen Sklerose reduziert es den Einstrom von Leukozyten in das Gehirn [76, 77]. In einem Sepsismodell schützt es Mäuse gegen die Endotoxinwirkung, wahrscheinlich über eine verminderte TNF- α - und NO-Produktion [78].

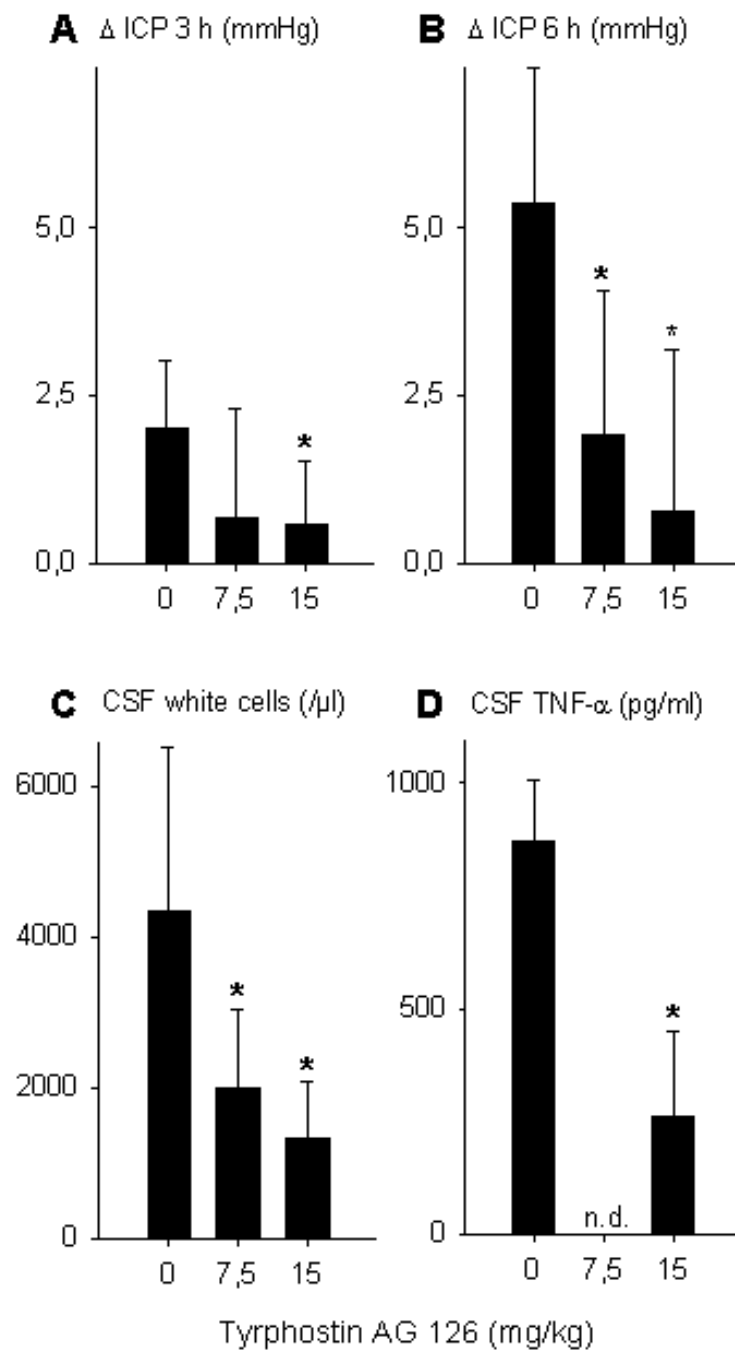


Abbildung 5. Tyrphostin AG126 reduziert dosisabhängig die Meningitis-bedingte Erhöhung des intrakraniellen Druckes nach 3 (**A**) und 6 Stunden (**B**), der Zellzahl im Liquor (**C**) und der TNF- α -Konzentration im Liquor (**D**). Die Behandlung erfolgte zwei Stunden vor Meningitis-Induktion.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese getestet, dass AG126 die Kennzeichen der bakteriellen Meningitis, nämlich den Leukozyteneinstrom, die Steigerung des zerebralen

Blutflusses und des intrakraniellen Druckes und die TNF- α -Produktion, reduziert.

Eine Vorbehandlung zwei Stunden vor Meningitis-Induktion durch PCW führte zu einer Dosis-abhängigen Reduktion aller Parameter (Abb. 5), ohne die entzündlichen Veränderungen komplett zu blockieren (lineare Korrelationen: Liquorzellzahl: $r^2 = 0,4182$, $p < 0,05$; rCBF: $r^2 = 0,5260$, $p < 0,001$; ICP: $r^2 = 0,4394$, $p < 0,01$). Auch die TNF- α -Konzentration im Liquor war reduziert (261 ± 188 pg/ml vs. 873 ± 135 , $p < 0,05$, Student's-t-Test). Bei Behandlung eine Stunde nach Meningitis-Induktion waren alle Parameter ebenso dosisabhängig reduzierbar, dann wurden höhere Dosierungen benötigt.

Diese Arbeit zeigt, dass auch *in vivo* AG126-sensitive Protein-Tyrosin-Kinasen in der Frühphase der bakteriellen Meningitis eine wichtige Rolle spielen. Daraus könnte sich ein neuer adjuvanter Therapieansatz der Behandlung der bakteriellen Meningitis ergeben.

Zytokine

TNF- α führt nur zu geringen entzündlichen Veränderungen im ZNS, verstärkt aber die experimentelle Meningitis [79].

Ausgehend von der Hypothese, dass TNF- α im Zentrum der Pathophysiologie der bakteriellen Meningitis steht, wurde dieses proinflammatorische Zytokin *in vivo* untersucht.

Überraschenderweise bewirkte intrazisternal applizierter, speziesspezifischer TNF- α im Tiermodell – auch in deutlich höheren Konzentrationen als denen, die bei Mensch und Tier bei Meningitis gemessen werden – über sechs Stunden eine nur geringe Entzündung. TNF- α führte zwar dosisabhängig in ähnlicher Weise zu einer Steigerung des zerebralen Blutflusses wie PCW, aber die Liquorpleozytose war deutlich geringer (höchste Dosis TNF- α : $438/\mu\text{l} \pm 85$ vs. PCW: $1835/\mu\text{l} \pm 889$, $p < 0,05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls), in keiner Dosierung verursachte TNF- α ein Hirnödem oder einen Anstieg des ICP. Der TNF- α -induzierte Blutflussanstieg war mit der Hemmung der induzierbaren NO-Synthetase durch Aminoguanidin zu vermindern.

Im zweiten Teil der Studie wurde die zuvor charakterisierte Wirkung von alleine intrazisternal appliziertem TNF- α mit der Wirkung in Kombination mit PCW verglichen. Die Dosierung beider Substanzen wurde so gewählt, dass sie alleine kaum Veränderungen auslösten. Zusammen aber führten sie zu einem Bild, das in diesem Modell dem Vollbild der unbehandelten Meningitis entspricht, alle Parameter stiegen signifikant an: Zellzahl (bei sechs Stunden: TNF- α allein: $108 \pm 24/\mu\text{l}$; PCW allein: $563 \pm 284/\mu\text{l}$; TNF- α plus PCW: $2138 \pm 1668/\mu\text{l}$; $p < 0,05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls), rCBF (bei sechs Stunden: TNF- α allein: $112 \pm 11 \%$; PCW allein: $109 \pm 16 \%$; TNF- α plus PCW: $155 \pm 23 \%$; $p < 0,05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls), ICP (bei sechs Stunden: TNF- α allein: $7,6 \pm 2,1 \text{ mmHg}$; PCW allein: $7,4 \pm 1,5 \text{ mmHg}$; TNF- α plus PCW: $14,7 \pm 3,2 \text{ mmHg}$; $p < 0,05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls) und Wassergehalt des Gehirns (bei sechs Stunden: TNF- α allein: $78,26 \pm 0,29 \%$; PCW allein: $78,37 \pm 0,43 \%$; TNF- α plus PCW: $79,01 \pm 0,32 \%$; $p < 0,05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls).

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass weder die Bakterien, noch die Immunreaktion allein das Vollbild der Meningitis verursachen, sondern dass vielmehr das Zusammenspiel von Erreger und Abwehr für die Schädigung verantwortlich sind.

Leukozyten-Endothel-Interaktion

Fucoidin, ein Polysaccharid, das die Leukozytenrollen behindert, schwächt die Entzündungsantwort der experimentellen Pneumokokken-Meningitis ab [71].

Fucoidin, ein sulphatiertes und fucosyliertes Polysaccharid aus Meeralgen, ist dem klinisch oft verwendeten Heparin strukturell ähnlich. Neben der Wirkung auf die Blutgerinnung binden beide Substanzen P- und L-Selektine. Über diesen pharmakologischen Ansatz kann das Rollen der Leukozyten gehemmt werden.

Die intravenöse Behandlung mit Fucoidin erfolgte ab dem Zeitpunkt der Meningitis-Induktion. Sie führte in Kontrolltieren zu einer leichten, systemischen Leukozytose ($7520 \pm$

1820/ μ l vs. $5210 \pm 1320/\mu$ l vor Behandlung, $p < 0,05$). Die übrigen physiologischen Parameter (mittlerer arterieller Blutdruck, Blutgase) unterschieden sich nicht. In Tieren ohne Meningitis hatte Fucoidin keinen Effekt auf zerebralen Blutfluss, intrakraniellen Druck und Liquorzellzahl. Im Vergleich zu den nicht behandelten Meningitis-Tieren reduzierte Fucoidin den Leukozyten-Einstrom in den Liquor ($34/\mu$ l ± 15 vs. $1913/\mu$ l ± 671 , $p < 0,05$) und möglicherweise als Folge davon alle anderen Meningitis-Parameter (rCBF: 113 ± 6 % vs. 246 ± 54 %, $p < 0,05$; ICP: $3,9 \pm 1,7$ mmHg vs. $12,5 \pm 3,6$ mmHg, $p < 0,05$; Hirnwassergehalt $78,28 \pm 0,20$ % vs. $79,64 \pm 0,45$ %, $p < 0,05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Mit dieser Arbeit wurde die Grundlage zu einer weiteren gelegt, in der die Hemmung des Leukozytenrollens durch Heparin mit bildgebenden Verfahren nachgewiesen wurde [43]. Heparin war in dieser Studie ähnlich wirksam wie Fucoidin.

Adjuvante Therapie bei etablierter Entzündung

Induzierte Hypothermie bei experimenteller Pneumokokken-Meningitis [80].

Die induzierte Hypothermie ist ein Verfahren, das bei verschiedensten Erkrankungen eingesetzt wird. Im Bereich des zentralen Nervensystems ist sie am besten bei schwerem Schädel-Hirn-Trauma und bei Hirnischämien untersucht und wird hier auch klinisch angewendet, unter anderem zur Verbesserung der Hypoxietoleranz während Operationen mit Herz-Lunge-Maschine. Die Wirkung der Hypothermie ist vielfältig. Es ließe sich für jeden einzelnen Schritt der Pathophysiologie der Pneumokokken-Meningitis zeigen, dass er unter Hypothermie verändert ist. Sie vermindert den zerebralen Metabolismus und den Sauerstoffverbrauch und senkt bei Schädel-Hirn-Trauma den erhöhten Hirndruck.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Meningitis unter verschiedenen Graden einer milden Hypothermie induziert. Als Referenz wurde die epidurale Temperatur verwendet, da sie am besten mit der intrazerebralen Temperatur übereinstimmt. Die physiologischen Parameter unterschieden sich in den Gruppen nicht, wobei der Blutdruck erwartungsgemäß

unter Hypothermie tendenziell niedriger war.

Schon die Senkung der epiduralen Temperatur um zwei Grad Celsius verhinderte – unabhängig von Veränderungen des Blutdruckes – den Anstieg des Blutflusses (bei sechs Stunden: $106 \pm 12 \%$ vs. $212 \pm 40 \%$, $p < 0,05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls). Der erhöhte intrakranielle Druck wurde pro Grad Celsius um 1,1 mmHg gesenkt ($r^2 = 0,4128$, $p < 0,0001$); in der Gruppe mit einer epiduralen Temperatur von $30,5 \text{ }^\circ\text{C}$ unterschied er sich nicht von den Tieren ohne Meningitis. Auch die Liquorpleozytose war in allen Hypothermie-Tieren reduziert, wobei sich keine sichere Korrelation mit der Temperatur fand ($r^2 = 0,2483$, $p < 0,05$). Die Liquor-Konzentration des proinflammatorischen Zytokins TNF- α war bei $30,5 \text{ }^\circ\text{C}$ im Vergleich zu der Gruppe mit normaler Körpertemperatur geringer ($273 \pm 256 \text{ pg/ml}$ vs. $927 \pm 439 \text{ pg/ml}$, $p < 0,05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls).

In einem zweiten Teil wurde die Hypothermie zwei Stunden nach der Meningitis-Induktion begonnen. Auch hier fand sich im Vergleich zu der Gruppe mit normaler Körpertemperatur ein signifikanter Effekt auf die Meningitis-typischen Veränderungen (nach sechs Stunden rCBF: $128 \pm 13 \%$ vs. $212 \pm 40 \%$; ΔICP : $1,6 \pm 1,84 \text{ mmHg}$ vs. $7,0 \pm 2,8 \text{ mmHg}$; Liquorzellzahl: $1588 \pm 1792/\mu\text{l}$ vs. $5636 \pm 1126/\mu\text{l}$; jeweils $p < 0,05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Der erste vorsichtige Schluss dieser Studie ist, dass auch bei Meningitis-Patienten die Normalisierung der erhöhten Körpertemperatur anzustreben ist. Ob eine gezielte Kühlung auch im klinischen Kontext erfolgreich ist, muss in einer klinischen Studie geklärt werden.

Meningitis in anderen klinischen Zusammenhängen

Isolierte bakterielle Meningitis als Schlüsselsyndrom der bakteriellen Endocarditis [81].

7 % aller Patienten mit infektiöser Endokarditis entwickeln eine bakterielle Meningitis. Damit ist sie nach dem embolischen Hirninfarkt die zweithäufigste neurologische

Komplikation der Endokarditis. Klinisch ist sie in über der Hälfte der Fälle das präsentierende Syndrom und in zwei Drittel der Fälle isoliert. Diese Fälle sind eine diagnostische Herausforderung. So wurden in einer kleinen Serien alle diese Fälle erst post mortem diagnostiziert (n=7) [82]. Ausgehend von der Fallserie der vorliegenden Arbeit, die fünf eigene und 161 Literaturpatienten umfasste, wurden Kriterien definiert, wann bei bakterieller Meningitis eine Endokarditis aktiv gesucht werden muss:

1. bei ungewöhnlichem Erreger. Dies ist vor allem *S. aureus*, der für die Mehrzahl der Meningitis-Fälle bei Endokarditis verantwortlich ist. Der zweithäufigste, in dieser Konstellation heute seltene Erreger ist *S. pneumoniae*, der das „Austrian-Syndrom“ mit Pneumokokken-Meningitis, Endokarditis und Aortenklappenauriss verursachen kann [83].
2. bei Isolierung des Erregers nur aus der Blutkultur und nicht aus dem Liquor. Bei Endokarditis-bedingter Meningitis ist nur in einen Viertel der Fälle die Liquorkultur positiv, wahrscheinlich als Folge der häufigen Vorbehandlung mit Antibiotika.
3. bei Vorliegen eines (neuen?) Herzgeräusches.

Die meningeale Beteiligung der Endokarditis – schon von William Osler als unterschätzt bezeichnet [84] – wurde mit dieser Arbeit aufgegriffen.