

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss des von *Streptococcus pneumoniae* produzierten
H₂O₂ auf die zerebrale Hyperämie in der Frühphase der
experimentellen Pneumokokkenmeningitis**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Doreen Voigtsberger
aus Gera

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. O. Hoffmann

2. Prof. Dr. J. Lünemann

3. Prof. Dr. med. R. R. Schumann

Datum der Promotion: 03.06.2012

Abstract

Bacterial meningitis is a life-threatening disease associated with a high frequency of neurological sequelae in survivors. A large proportion of acute neurological complications are linked to alterations of cerebral blood flow. The most common pathogen, *Streptococcus pneumoniae*, releases vasoactive hydrogen peroxide (H₂O₂) due to the lack of a functional catalase. The aim of this study was to determine the impact of bacterial H₂O₂ on regional cerebral blood flow (rCBF) and intracranial pressure (ICP) in a 6 h rat model of pneumococcal meningitis. Following infection with H₂O₂-producing wildtype pneumococci (strain D39), rCBF increased to 217 ± 23 % of baseline. The rCBF increase was significantly smaller following challenge with the H₂O₂-deficient mutant *SpxB*⁻ (135 ± 17 %) or purified pneumococcal cell walls (PCW; 192 ± 5 %). The rCBF increase was strongly attenuated also when D39-induced meningitis was treated with H₂O₂-degrading catalase or with tetraethylammonium (TEA), a blocker of calcium sensitive potassium channels, which mediate H₂O₂-induced vasodilation. Catalase did not significantly reduce the rCBF increase caused by *SpxB*⁻ or PCW. These findings identify bacterial H₂O₂ as an equally potent vasodilator compared to host-derived mediators. Conversely, host-derived H₂O₂ does not appear to mediate cerebral vasodilation in early meningitis. Bacterial H₂O₂ mediated only a small proportion of meningitis-associated ICP increase. Direct modulation of vascular tone by bacterial H₂O₂ represents a novel pathophysiological concept with possible relevance in other invasive streptococcal infections, e.g. pneumonia and sepsis.

Key Words: Bacterial Meningitis, Hydrogen Peroxide, *Streptococcus pneumoniae*, Vasodilation, Intracranial Pressure

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
Inhaltsverzeichnis	2
1 Einleitung	5
1.1 Bakterielle Meningitis	5
1.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	5
1.3 Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis	7
1.4 H ₂ O ₂ -Bildung durch Pneumokokken	8
1.5 Fragestellung	9
2 Materialien und Methoden.....	11
2.1 Bakteriologische Arbeiten.....	11
2.1.1 Verwendete Bakterienstämme.....	11
2.1.2 Anzucht der Pneumokokken.....	11
2.1.3 Präparation von Pneumokokkenzellwänden.....	14
2.2 Rattenmodell der bakteriellen Meningitis.....	14
2.2.1 Allgemeines.....	14
2.2.2 Narkose und allgemeine Präparation	15
2.2.3 Kranielle Präparation und Meningitisinduktion.....	16
2.3 Pharmakologische Interventionen	18
2.4 Statistische Methoden	19

3	Ergebnisse	20
3.1	Allgemeine Ergebnisse	20
3.1.1	Auswertbare Versuche	20
3.1.2	Physiologische Basisparameter.....	21
3.1.3	Leukozyten- und Bakterienkonzentrationen im Liquor.....	25
3.2	Regionaler zerebraler Blutfluss	26
3.2.1	Regionaler zerebraler Blutfluss in der D39-induzierten Meningitis	26
3.2.2	Regionaler zerebraler Blutfluss in der <i>SpxB</i> ⁻ -induzierten Meningitis.....	27
3.2.3	Regionaler zerebraler Blutfluss in der PCW-induzierten Meningitis.....	27
3.2.4	Effekt von Catalase und Tetraethylammonium auf den regionalen zerebralen Blutfluss in der D39-induzierten Meningitis.....	28
3.2.5	Effekt von Catalase und Tetraethylammonium auf den regionalen zerebralen Blutfluss in der <i>SpxB</i> ⁻ -induzierten Meningitis.....	29
3.2.6	Effekt von Catalase auf den regionalen zerebralen Blutfluss in der PCW-induzierten Meningitis.....	30
3.3	Intrakranieller Druck	32
3.3.1	Intrakranieller Druck in der D39-induzierten Meningitis	32
3.3.2	Intrakranieller Druck in der <i>SpxB</i> ⁻ -induzierten Meningitis	33
3.3.3	Intrakranieller Druck in der PCW-induzierten Meningitis	33
3.3.4	Effekt von Catalase und Tetraethylammonium auf den intrakraniellen Druck in der D39-induzierten Meningitis.....	34

3.3.5	Effekt von Catalase und Tetraethylammonium auf den intrakraniellen Druck in der <i>SpxB</i> -induzierten Meningitis	35
3.3.6	Effekt von Catalase auf den intrakraniellen Druck in der PCW-induzierten Meningitis.....	36
4	Diskussion.....	38
4.1	Zusammenfassung der Befunde	38
4.2	Regulation des regionalen zerebralen Blutflusses	39
4.2.1	Intrakranielle Hyperämie durch bakterielles Wasserstoffperoxid	39
4.2.2	Hyperämie im Rahmen der Entzündungsreaktion	40
4.2.3	Inflammation durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems.....	41
4.2.4	Komplementäre Mechanismen der frühen Hyperämie	43
4.3	Entwicklung des intrakraniellen Druckes (ICP).....	44
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	46
	Literaturverzeichnis	47
	Tabellenverzeichnis	55
	Abbildungsverzeichnis.....	56
	Abkürzungsverzeichnis.....	58
	Lebenslauf.....	60
	Publikationen	61
	Erklärung	62
	Danksagung	63

1 Einleitung

1.1 Bakterielle Meningitis

Die akute bakterielle Meningitis ist eine der gefährlichsten Infektionskrankheiten des Menschen (Kim 2003). Die Inzidenz liegt in Industrieländern zwischen 2,5 und 4,5 je 100.000 Einwohner und Jahr (Faustini 2000, Ross 2001). Klinisch handelt es sich um schwerstkranke Patienten mit Fieber, Kopfschmerzen und meningealen Zeichen wie Nackensteifigkeit, Photophobie, Phonophobie und Erbrechen. Häufig besteht bereits zum Zeitpunkt der Präsentation in der Rettungsstelle eine Bewusstseinsstörung. Während die Erkrankung unbehandelt in fast allen Fällen tödlich verläuft, erreicht die Letalität auch bei wirksamer antibiotischer und intensivmedizinischer Behandlung 10 % - 30 % (Durand 1993, Aronin 1998). Neurologische und insbesondere neuropsychologische Folgeschäden sind bei den Überlebenden sehr häufig, so dass etwa 50 % der Erwachsenen nicht in den Beruf zurückkehren können (Bohr 1983, de Gans 2002). Die Hälfte der betroffenen Kinder erreicht keinen adäquaten Schulabschluss mehr (de Louvois 2007).

Der häufigste und zugleich aggressivste Erreger der bakteriellen Meningitis im Kindes- und Erwachsenenalter ist *Streptococcus pneumoniae*. Im Vergleich zu anderen Erregern – einschließlich der in der Öffentlichkeit viel stärker gefürchteten Meningokokken – sind Pneumokokken mit der höchsten Letalität (28 % - 34 %) und der höchsten Rate neurologischer Komplikationen (54 %) verbunden (Schuchat 1997, Aronin 1998, de Gans 2002). Die Gründe hierfür sind nur teilweise bekannt.

1.2 *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae gehört zu den grampositiven Streptokokken. In Kultur zeigt sich häufig eine charakteristische Lanzettform. Die Bakterien wachsen als 0,5 – 3 µm große Diplokokken oder in kurzen gewundenen Ketten. Auf Blutagarplatten können Pneumokokken über den Nachweis von alpha-Hämolyse und Sensitivität gegenüber Optochin identifiziert werden. Es handelt sich um fakultativ pathogene Erreger, deren einziger bekannter Wirt und somit alleiniges natürliches Reservoir der Mensch ist. In Prävalenzuntersuchungen kann bei bis zu 30 % asymptomatischer Personen eine

vorübergehende Kolonisation des Nasen-Rachenraumes nachgewiesen werden (Bridy-Pappas 2005). Kinder und ältere Menschen sind bevorzugt betroffen. So werden in Kinderbetreuungseinrichtungen punktuell sogar Besiedlungsraten bis zu 60 % nachgewiesen (de Lencastre 1999, Masuda 2002). In den asymptomatischen Trägern verhalten Pneumokokken sich als Kommensalen, von denen im Sinne eines Mutualismus sogar schützende Effekte gegenüber anderen Krankheitserregern ausgehen können (Bogaert 2004, Lysenko 2005).

Als Krankheitserreger verursachen Pneumokokken durch Ausbreitung *per continuitatem* lokale Entzündungen im Bereich des Mittelohrs (Otitis media) oder der Nasennebenhöhlen (Sinusitis). Pneumokokken spielen außerdem eine wichtige Rolle als Ursache invasiver Infektionen wie Pneumonie, Bakteriämie und Meningitis. Für die Genese invasiver Infektionen spielen einerseits wirtsseitige Faktoren eine wichtige Rolle. Ein erhöhtes Risiko findet sich bei pulmonalen Grunderkrankungen oder allgemeiner Abwehrschwäche, zum Beispiel bei Immunsuppression, Neoplasien, Herzinsuffizienz, Diabetes mellitus und Alkoholabusus (Bruyn 1991, Turett 2001). Begünstigend für eine Bakteriämie wirken auch Dysfunktion oder Fehlen der Milz. Zudem verfügen Pneumokokken über eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, die die Kolonisation der Schleimhaut des oberen Respirationstraktes, das Überwinden von Barrierestrukturen und das Überleben im Blutstrom fördern (Hava 2003).

Wichtigster Virulenzfaktor ist eine Polysaccharidkapsel, die die Komplementbindung hemmt und die Erreger vor Phagozytose schützt (Morona 2000). 80 – 90 % der in Europa und den USA vorkommenden Pneumokokken weisen eine Kapsel auf. Unbekapselte Formen sind praktisch apathogen. Weitere wichtige Virulenzfaktoren sind in Tabelle 1 aufgelistet. Veränderungen des Milieus im Respirationstrakt, zum Beispiel im Rahmen anderweitiger Infektionen, können zu einer Veränderung des Expressionsprofils der Virulenzfaktoren und damit zur Ausbildung eines invasiven Phänotyps führen (Hava 2003, McCullers 2006, Paterson 2006).

Tabelle 1: Einige Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae*

Virulenzfaktor	Funktion
Autolysin A	Autolyse
Cholin-bindendes Protein A	Adhäsion
Hyaluronidase	Abbau der extrazellulären Matrix
IgA-Protease	Spaltet IgA1
Neuraminidase	Adhäsion, Hemmung anderer Bakterien
Phosphorylcholin	Adhäsion
Pneumolysin	Zytolysin, Exotoxin

1.3 Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis

Die bakterielle Meningitis resultiert aus dem Eindringen der Krankheitserreger in den Liquorraum. Dies kann selten durch direkte Einbringung im Rahmen von Operationen, Punktionen oder Verletzungen oder auch gelegentlich *per continuitatem* aus lokal destruierenden Entzündungsherden (z.B. Otitis media) geschehen. Bei den ambulant erworbenen Meningitiden wird dagegen in der Regel von einem hämatogenen Infektionsmodus ausgegangen (Scheld 1979), dessen Voraussetzungen die Kolonisation des Wirts, das Durchbrechen physiologischer Barrierestrukturen und die Entwicklung einer Bakteriämie sind. Die genauen Mechanismen der Invasion des Liquorraumes sind nicht bekannt. Nach gängiger Ansicht überwinden im Blutstrom zirkulierende Bakterien die Blut-Liquor-Schranke in erster Linie im Bereich des Plexus choroideus (Engel 1944, Tuomanen 1996, Leib 1999). Daneben wurde für Pneumokokken auch ein aktiver transzellulärer Transport in den Endothelien der Bluthirnschranke nachgewiesen, der auf einer Interaktion von Phosphorylcholin mit dem PAF-Rezeptor beruht (Ring 1998).

Im Liquor können sich Bakterien zunächst ungehemmt vermehren, da hier optimale Nährstoffkonzentrationen vorliegen und zelluläre wie humorale Bestandteile des Immunsystems weitestgehend fehlen. Durch Aktivierung des bakterieneigenen Autolysins LytA, einer N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase (Lopez 1992), insbe-

sondere aber bei der Anwendung von bakteriziden Antibiotika, wie sie zur Behandlung der bakteriellen Meningitis empfohlen werden, kommt es zu einer Lyse der Bakterien (Nau 2002). Hierdurch werden bakterielle Bestandteile freigesetzt, welche als sogenannte pathogen-associated molecular patterns (PAMP) von pattern-recognition Rezeptoren (PRRs) des angeborenen Immunsystems konstitutiv erkannt werden (Akira 2006). Die Aktivierung der PRRs von perivaskulären und meningealen Makrophagen sowie von Endothelzellen führt über intrazelluläre proinflammatorische Signalkaskaden zur Freisetzung chemotaktischer Faktoren (Täuber 1999, Zwijnenburg 2006) und zur Hochregulation endothelialer Adhäsionsmoleküle (Quagliarello 1992, Freyer 1999, Turowski 2005).

Als Folge werden zirkulierende Granulozyten und Monozyten aus dem Blutstrom massenhaft über die Blut-Liquor-Schranke rekrutiert, es resultiert eine Liquorpleozytose. Diese aktivierten Leukozyten verstärken kaskadenartig die Inflammation durch Bildung proinflammatorischer Zytokine (Zysk 1997) und setzen Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO), Kinine und Neuropeptide frei (Pfister 1995, Lorenzl 1996, Paul 1997), die an den zerebralen Gefäßen vasodilatierende und permeabilisierende Wirkungen entfalten. Die resultierende Zunahme des intrakraniellen Blutvolumens und das vasogene Hirnödem bewirken einen Anstieg des intrakraniellen Druckes (Quagliarello 1992, Leib 1999, Koedel 2002), der im Verlauf durch Störungen der Liquorresorption und Liquorzirkulation weiter verstärkt wird (Scheld 1980, Pfister 1993). Diese und andere intrakranielle Komplikationen stellen wesentliche Ursachen der frühen Mortalität in der bakteriellen Meningitis dar. Sie werden bei Pneumokokkenmeningitis im Vergleich zu anderen Erregern deutlich häufiger angetroffen (de Gans 2004) und tragen somit zur besonderen Gefährlichkeit dieses Erregers bei.

1.4 H₂O₂-Bildung durch Pneumokokken

Gemeinsam mit anderen Streptokokken, jedoch im Unterschied zu den übrigen häufigen Meningitiserregern (*Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) zeichnen sich Pneumokokken durch das Fehlen einer Catalase aus. Catalase (EC 1.11.1.6) katalysiert als Peroxidase die Reaktion $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ und dient der Detoxifikation von Wasserstoffperoxid,

welches in allen Zellen im Rahmen des oxidativen Stoffwechsels entsteht. Als Folge dieser Defizienz setzen Pneumokokken erhebliche Mengen von Wasserstoffperoxid in ihre Umgebung frei. Dabei können Konzentrationen erreicht werden, die mit dem von aktivierten Phagozyten produzierten H_2O_2 vergleichbar sind (Pericone 2000, Braun 2002). H_2O_2 hemmt das Wachstum anderer Bakterien und kann als ein weiterer Virulenzfaktor von *S. pneumoniae* betrachtet werden (Spellerberg 1996, Pericone 2000). Zudem stellt H_2O_2 ein wichtiges Exotoxin von Pneumokokken dar, das im Wirtsorganismus neurotoxische Wirkungen vermittelt (Braun 2002, Bermpohl 2005, Hoffmann 2006). Im Wirtsorganismus spielt H_2O_2 eine Rolle als ein antiinfektiv wirksames Oxidans, welches durch die NADPH-Oxidase aktivierter Phagozyten aktiv synthetisiert wird. Wasserstoffperoxid wirkt zudem vasodilatierend (Wei 1990) über die Öffnung calciumabhängiger Kaliumkanäle und Aktivierung der Guanylatcyclase der glatten Gefäßmuskulatur (Sobey 1998, Iida 2000, Liu 2002).

1.5 Fragestellung

Für die Pneumokokkenmeningitis ist die besondere Häufigkeit intrakranieller Komplikationen prognosebestimmend. Hyperämie, Ödembildung und Hirndruckanstieg stellen frühe pathophysiologische Veränderungen dar, die bei diesem Erreger besonders ausgeprägt sind. Pneumokokken unterscheiden sich von anderen Meningitiserregern durch eine erhebliche Freisetzung von Wasserstoffperoxid. H_2O_2 verursacht oxidative Schäden an wirtseigenen Zellen und ist ein bekannter Vasodilatator. In der vorliegenden Arbeit war daher zu prüfen, ob die Produktion von H_2O_2 durch Pneumokokken in der Meningitis einen eigenständigen, von endogenen Vasodilatoren abgrenzbaren Beitrag zur frühen Hyperämie leistet und wie sich dieser auf den frühen Anstieg des Hirndruckes auswirkt.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Untersuchungen in einem 6-Stunden-Zeitraum an narkotisierten und künstlich beatmeten Ratten durchgeführt, bei denen durch intrathekale Infektion eine Pneumokokkenmeningitis ausgelöst wurde. Die physiologischen Basisparameter, der regionale zerebrale Blutfluss und der intrakranielle Druck wurden kontinuierlich gemessen. Nach Ende des Experimentes wurden die Leukozyten- und Bakterienkonzentrationen im Liquor quantifiziert. Dabei wurden einerseits H_2O_2 -produzierende Wildtyp-Pneumokokken mit einer H_2O_2 -defizienten

Mutante sowie mit inaktivierten Bakterienbestandteilen verglichen. Andererseits wurden pharmakologische Interventionen genutzt, um H_2O_2 enzymatisch abzubauen oder seine vasodilatatorische Wirkung zu blockieren. Um Veränderungen klar auf die Anwesenheit oder das Fehlen von bakteriellem H_2O_2 zurückführen zu können, mussten die Untersuchungen auch etwaige Effekte der Interventionen auf allgemeine physiologische Parameter, auf das bakterielle Wachstum und den Entzündungsverlauf berücksichtigen. Im Einzelnen wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

1. Im Vergleich zu Wildtyp-Pneumokokken findet sich ein geringerer Anstieg des regionalen zerebralen Blutflusses
 - a) bei Infektion mit H_2O_2 -defizienten Pneumokokken
 - b) bei Inflammationsauslösung mit inaktivierten Bakterien
 - c) bei enzymatischer Degradation von H_2O_2
 - d) bei pharmakologischer Blockade der H_2O_2 -abhängigen Vasodilatation

2. Im Vergleich zu Wildtyp-Pneumokokken findet sich ein geringerer Anstieg des intrakraniellen Druckes
 - a) bei Infektion mit H_2O_2 -defizienten Pneumokokken
 - b) bei Inflammationsauslösung mit inaktivierten Bakterien
 - c) bei enzymatischer Degradation von H_2O_2
 - d) bei pharmakologischer Blockade der H_2O_2 -abhängigen Vasodilatation

3. Wildtyp- und H_2O_2 -defiziente Pneumokokken zeigen keinen Unterschied
 - a) in ihrem Wachstum *in vivo*
 - b) hinsichtlich der inflammationsauslösenden Potenz gemessen an der Leukozytenzahl im Liquor
 - c) hinsichtlich der systemischen physiologischen Parameter im Wirtsorganismus

2 Materialien und Methoden

2.1 Bakteriologische Arbeiten

2.1.1 Verwendete Bakterienstämme

In einem Teil der Experimente wurden lebende Pneumokokken der Stämme D39 bzw. *SpxB* zur Meningitisinduktion verwendet. In anderen Experimenten wurden bakterielle Zellwandpräparationen eingesetzt, die aus dem unbekapselten Laborstamm R6 hergestellt wurden. Eine Übersicht der verwendeten Stämme findet sich in der folgenden Tabelle.

Tabelle 2: Verwendete Pneumokokkenstämme

Stamm	Erläuterung	Resistenzkassette	Quelle
D39	Bekapselte Wildtyp-Pneumokokken (Kapseltyp 2), ursprünglich aus einem klinischen Isolat.		Rockefeller University, New York, USA; Prof. Tuomanen
<i>SpxB</i>	Pyruvatoxidase-defiziente Mutante von D39 mit 95 %iger Reduktion der H ₂ O ₂ -Produktion.	Erythromycin	Spellerberg et al. 1996
R6	Unbekapselte, nicht virulente Variante von D39 (Laborstamm) zur Herstellung von Bakterienzellwandpräparationen (PCW).		Rockefeller University, New York, USA

2.1.2 Anzucht der Pneumokokken

Zur Anzucht der Pneumokokken wurde ausschließlich Casein-Yeast-Flüssigmedium (C+Y; Lacks 1960) verwendet. Das Medium wurde aus Einzelkomponenten eigenhändig hergestellt. Die Rezeptur findet sich in Tabelle 3.

Tabelle 3: Medien und Lösungen zur Pneumokokkenanzucht

Medium/ Lösung	Inhaltsstoffe
Casein + Yeast (C+Y) -Medium	400 ml Prä C Medium 13 ml Ergänzungsmedium 5 ml Pyruvat-Lösung (2 %) 15 ml Kaliumphosphatpuffer (1M) 10 ml Adams III Lösung 10 ml Hefe (5 %) 10 ml Glutamin (1 mg/ml)
Prä C Medium (pH 7.4)	1,45 g Natriumacetat 6 mg L-Tryptophan 60 mg L-Cystein 6 g Casaminosäuren 1,2 l H ₂ O
Ergänzungsmedium	60 ml 3-fach Salzlösung 120 ml Glucose 20 % 6 ml Sucrose 50 % 120 ml Adenosin (2 mg/ml) 120 ml Uridin (2 mg/ml) 14 mg Riboflavin
Adams II Lösung	64 ml Adams I Lösung 16 ml Adams III Lösung 800 mg Asparagin 80 mg Cholin 0,64 ml CaCl ₂ 1 % 400 ml H ₂ O
3-fach-Salzlösung	10 g MgCl ₂ 50 mg CaCl ₂ 20 µl MnSO ₄ 100 ml H ₂ O

Adams I Lösung	60 µl Biotin (0,5 mg/ml) 30 mg Nikotinsäure 35 mg Pyridoxin 120 mg Ca-Pentitotat 32 mg Thiamin
Adams III Lösung	50 mg FeSO ₄ 50 mg CuSO ₄ 50 mg ZnSO ₄ 20 mg MgCl ₂ 1 ml HCl 100 ml H ₂ O

Die Pneumokokkenstämme wurden in sterilem C+Y-Flüssigmedium mit 15 % Glycerol bei -80 °C gelagert. Zur Anzucht wurde eine kleine Menge des jeweiligen tiefgefrorenen Bakterienstammes in 5 ml C+Y resuspendiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Selektion der Mutante *SpxB*⁻ wurde Erythromycin in einer Endkonzentration von 1 µg/ml hinzugegeben.

Das bakterielle Wachstum wurde anhand der zunehmenden optischen Dichte (OD) der Suspension mit einem Photometer (Wellenlänge 620 nm; Helios Sigma, Thermo Scientific, Waltham, USA) überprüft, wobei eine zuvor im Labor etablierte Eichkurve zur Anwendung kam. Während der exponentiellen Wachstumsphase (OD 0,4 bis 0,6) wurden die Bakterien in frischem Medium rückverdünnt und erneut bis zu einem exponentiellen Wachstum inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 10.000 g zentrifugiert und in pyrogenfreiem 0,1 molarem Phosphatpuffer (PBS) resuspendiert. Die optische Dichte wurde auf OD 0,2 eingestellt. Zur Inokulation von Versuchstieren wurden jeweils 100 µl dieser Suspension verwendet, entsprechend 2×10^7 koloniebildenden Einheiten (CFU). Zur Überprüfung der CFU-Bestimmung und zum Ausschluss von Kontaminationen wurden die Bakteriensuspensionen in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (10^{-5} - 10^{-8}) auf Blutagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.1.3 Präparation von Pneumokokkenzellwänden

Die Präparation von Pneumokokkenzellwänden (PCW) erfolgte nach etablierten Protokollen (Tuomanen 1985, Weber 2003). Ausgangsmaterial waren unbekapselte Pneumokokken vom Stamm R6, die analog zum oben Beschriebenen in C+Y-Medium vermehrt wurden. Die Pneumokokken wurden durch Zentrifugation angereichert und hitzeinaktiviert. Anschließend wurden die Bakterien in einem Bead Beater unter Verwendung von 0,1 mm Glasperlen mechanisch desintegriert (2 x 7 min). Anschließend folgte ein Verdauungsschritt mit 10 µg/ml DNase (Promega, Mannheim, Deutschland) und 50 µg/ml RNase (USB Corp., Cleveland, OH) für 1 Stunde bei 37 °C im Wasserbad. Ein zweiter Verdauungsschritt erfolgte mit 0,01 % Trypsin und 10 mM CaCl (beide von Sigma) bei 37 °C für 2 Stunden.

Im Anschluss wurde die Kultur über 20 Minuten bei 23.000 g zentrifugiert, in 2 % SDS (Serva, Heidelberg, Deutschland) resuspendiert und für 20 Minuten bei 90 °C inkubiert. Anschließend erfolgten acht Waschzyklen in PBS. Mittels Standardkurve wurde die optische Dichte der Lösung äquivalent zu einer Konzentration von 10^8 koloniebildenden Einheiten (CFU) in 100 µl eingestellt. Die Zusammensetzung dieser Zellwandpräparation ist bekannt (Garcia-Bustos 1987).

2.2 Rattenmodell der bakteriellen Meningitis

2.2.1 Allgemeines

Die Tierexperimente wurden in einem etablierten Rattenmodell der bakteriellen Meningitis (Hoffmann 2002) durchgeführt. Hierzu wurden Ratten in Vollnarkose intrathekal mit den genannten Pneumokokkenstämmen infiziert bzw. mit desintegrierten Bakterienzellwänden (PCW) stimuliert. Für die Versuche lag eine Genehmigung des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin vor (Genehmigungsnummer G003/04 vom 19.03.2004).

2.2.2 Narkose und allgemeine Präparation

Die insgesamt 51 Experimente wurden an männlichen, etwa 280 bis 330 Gramm schweren Wistar-Ratten durchgeführt. Die Tiere wurden initial mittels Inhalation von Isofluran und anschließend durch intraperitoneale Applikation von 100 mg/kg Thiopental (Trapanal, Byk Gulden, Konstanz, Deutschland) anästhesiert. Anschließend wurde die Narkose mit weiteren intrathekalen Applikationen (20 mg/kg) von Thiopental in zweistündigem Abstand oder bei Nachlassen der Narkose aufrechterhalten. Als Hinweis auf eine unzureichende Narkosetiefe wurde eine Erhöhung des arteriellen Mitteldruckes um mehr als 10 mmHg auf einen Schmerzreiz am Schwanz oder Gegenatmen gegen die mechanische Ventilation bewertet.

Zur Durchführung der mechanischen Beatmung wurde eine Tracheotomie vorgenommen. Dazu wurde die Haut im Bereich des Halses median längs inzidiert. Anschließend wurde die prätracheale Muskulatur stumpf auseinandergedrängt und die Trachea unter Schonung der paratrachealen Gefäße und Nerven dargestellt. Nach Querinzision unterhalb des Larynx wurde ein Polyethylenschlauch etwa 1 cm in Richtung Carina vorgeschoben und mit Ligaturen an der Trachea befestigt. Einzelknopfnähte dienten als Verschluss der Halswunde. Zur Ventilation wurde der PE-Schlauch mit einem Kleintierbeatmungsgerät (AP-10; K. Effenberger, Paffing, Germany) verbunden. Sauerstoffangereicherte Raumluft wurde in einer Frequenz von 60 - 80 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 3 - 4,5 cm³ pro Hub ventiliert. Zur Kontrolle der Ventilationsparameter wurde der endexpiratorische CO₂-Gehalt der Atemluft über ein CO₂-Meßgerät (Heyer Artema MM204, Bad Ems, Deutschland) kontinuierlich gemessen. Außerdem erfolgten einstündliche arterielle Blutgasanalysen. Der Ziel-paCO₂ lag dabei zwischen 35 mmHg und 45 mmHg. Atemfrequenz und Atemzugvolumen wurden bedarfsgerecht adaptiert, Sekretansammlungen im Tracheostoma wurden regelmäßig abgesaugt.

Zur kontinuierlichen Blutdruckmessung, Bestimmung der arteriellen Blutgase und für Infusionszwecke wurden Gefäßkatheter in die linke Arteria und Vena femoralis eingelegt. Dazu wurde die Haut in der Leistenregion im Verlauf des Leistenbandes inzidiert und das darunter liegende Gewebe stumpf präpariert. Die Femoralgefäße wurden dargestellt und im distalen Verlauf ligiert. Unter proximaler Blutsperre wurden die Gefäße quer inzidiert und mit Polyethylenschläuchen kanüliert, die mit isotoner

Kochsalzlösung vorbefüllt waren. Der arterielle Katheter wurde mit einem Spülsystem und einem Druckaufnehmer (Statham P109 EZ, Spectramed, Oxnard, CA, U.S.A.) verbunden. Über den venösen Katheter erfolgten eine kontinuierliche Flüssigkeitssubstitution mit pyrogenfreier isotoner Kochsalzlösung (3 ml/h) sowie die Applikation von Pharmazeutika. Die Körpertemperatur wurde dauerhaft mittels Rektalsonde gemessen und durch Verwendung einer regelbaren Heizplatte konstant bei $37,8 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten.

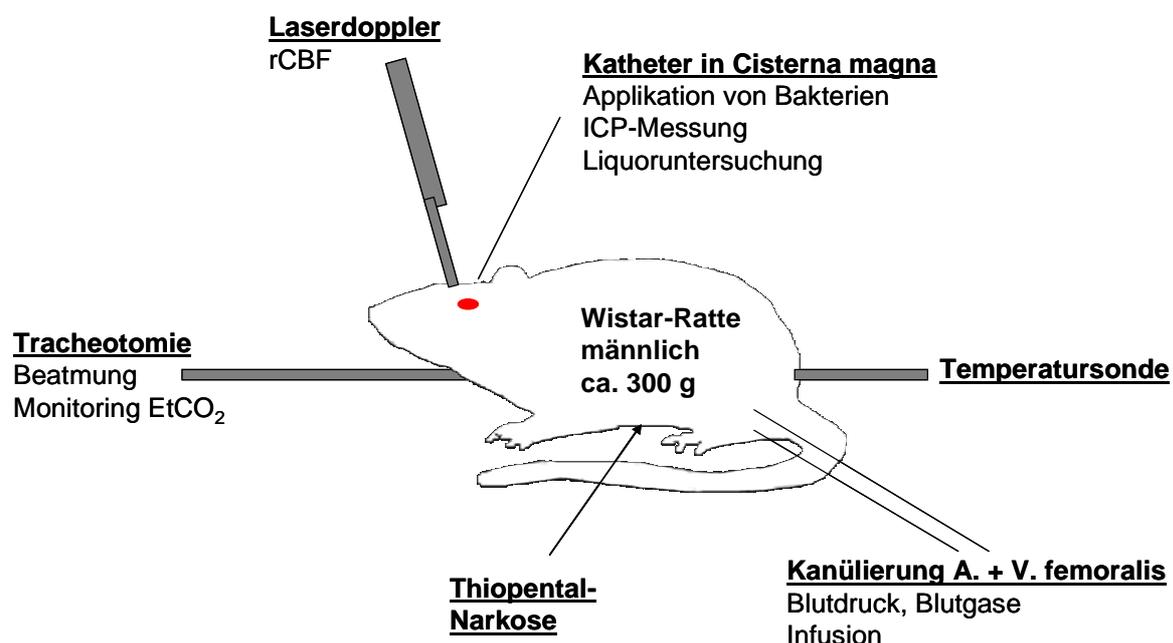


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Rattenmodells der Meningitis.

2.2.3 Kraniale Präparation und Meningitisinduktion

Die Versuchstiere wurden in einem Stereotaxierahmen für Ratten (Stoelting) fixiert. Über einen medianen Hautschnitt wurde die Kalotte freigelegt und vom Periost befreit. Für Blutflussmessungen mittels Laserdoppler (Periflux 4001 Master, Järfälla, Schweden) (Lindauer 1993, Hoffmann 2002) wurde unter kontinuierlicher Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung ein 3 x 3 mm großes Areal im Bereich des parietalen Schädelknochens mit einer Fräse ausgedünnt, bis nur noch eine durchscheinende Knochenlamelle übrig blieb. Mittels eines Mikromanipulators wurde die Laser-Doppler-

Sonde in minimalem Abstand senkrecht zum Kortex platziert. Um eine Messung im ungerichteten Fluss der Mikrozirkulation zu erreichen, wurde unter dem Präparationsmikroskop ein von größeren pialen Blutgefäßen freies Areal aufgesucht. Um Messungengenauigkeiten durch Lichtbrechung an der Knochen-Luft-Grenze zu verringern, wurde Ultraschallgel auf das ausgefräste Gebiet aufgetragen. Eine korrekte Messposition zeichnete sich durch Flussgeschwindigkeiten zwischen 100 und 140 arbiträren Einheiten aus. Vor Meningitisinduktion wurde für 30 Minuten eine Grundlinie aufgezeichnet. Änderungen des mikrovaskulären Blutflusses wurden als prozentuale Abweichung von diesem Ausgangswert ausgedrückt. Diese Laser-Doppler-Methode ist sowohl für allgemeine Blutflussmessungen als auch für die Blutflussmessungen an regionalen, zerebralen Gefäßen mit unterschiedlichen Standardverfahren hinreichend validiert worden (Skarphedisson 1988, Dirnagl 1989, Haberl 1989).

Über ein median okzipital angelegtes Bohrloch wurde ein Kunststoffschlauch in die Cisterna magna eingeführt und mit Methacrylat (Paladur, Heraeus Kulzer, Wehrheim) abgedichtet und fixiert. Anschließend wurde der PE-Schlauch mit einem Druckaufnehmer (Statham P109 EZ, Spectramed, Oxnard, CA, U.S.A.) verbunden, um so den Liquordruck, der dem intrakraniellen Druck entspricht, kontinuierlich zu messen. Vor Beginn der Experimente wurde der angezeigte Wert auf Null zurückgesetzt, um so den Anstieg des intrakraniellen Druckes genau bestimmen zu können. Außerdem wurden über diesen Katheter zu Beginn der Experimente Bakterien oder Bakterienbestandteile inokuliert. In den Kontrollversuchen wurde den Ratten PBS appliziert.

Nach Abschluss der Experimente wurden Liquorproben zur Bestimmung der Leukozyten- und Bakterienkonzentration gewonnen. Die Tiere wurden anschließend in Narkose durch Applikation hochmolarer Kaliumchloridlösung (KCl) über den femoralen Venenkatheter getötet. In den gewonnenen Liquores wurden die Leukozyten in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer (Poly-Optik, Bad Blankenburg, Deutschland) ausgezählt. Die Bakterienkonzentration im Liquor wurde durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe (10^{-5} bis 10^{-8}) auf Blutagarplatten (Merckoplate, Merck; Deutschland), die dann bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $5\text{ }\%$ CO_2 inkubiert wurden, ermittelt. Durch Auszählen der Kolonienzahl nach circa 24 Stunden wurden die CFU je ml Liquor bestimmt.

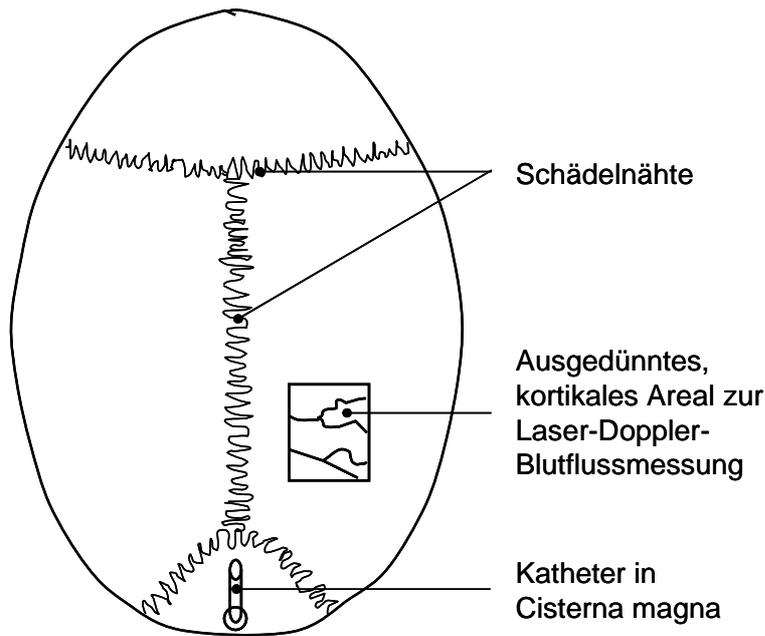


Abbildung 2: Schematische Darstellung der präparierten Kalotte.

2.3 Pharmakologische Interventionen

Zusätzlich zum Vergleich von Wildtyp- und H_2O_2 -defizienten Pneumokokken wurden pharmakologische Experimente durchgeführt, die die Wirkungen des H_2O_2 aufheben sollten. In einem Teil der Ratten wurden unmittelbar vor Meningitisinduktion 15.000 iE des H_2O_2 -abbauenden Enzyms Catalase (Sigma) in 50 μ l pyrogenfreiem PBS intrathekal appliziert, gefolgt von einer kontinuierlichen Applikation von 50.000 iE/kg KG/h über den in der Vena femoralis liegenden Katheter. Um das intrathekal applizierte Volumen konstant zu halten, wurde in diesen Experimenten die identische Bakterienmenge in einem geringeren Volumen von nur 50 μ l resuspendiert.

Weitere Ratten wurden mit Tetraethylammonium (TEA, Sigma) behandelt, um so eine Blockade calciumabhängiger Kaliumkanäle zu erreichen, die als Vermittler der H_2O_2 -induzierten Vasodilatation angesehen werden (Acheson 1946). Dazu wurde ein Bolus von 1 mg pro Tier 15 Minuten vor der Meningitisinduktion über den Katheter in der Vena femoralis appliziert.

2.4 Statistische Methoden

Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Eine statistische Auswertung des während des gesamten Experimentes kontinuierlich gemessenen Laser-Doppler-Flusses (LDF) und des intrazerebralen Druckes (ICP) erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 2, 4 und 6 Stunden. Um die Messwerte zweier Testgruppen miteinander vergleichen zu können, erfolgte eine Normalisierung des LDF, indem die individuellen Grundwerte jeweils als 100 % definiert wurden. Der ICP wurde jeweils in den ICP-Anstieg gegenüber den individuellen Grundwerten überführt.

Für den Vergleich von jeweils genau zwei Versuchsgruppen wurde bei nachgewiesener Normalverteilung und Varianzhomogenität der Daten ein t-Test durchgeführt, ansonsten ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für Mehrfachvergleiche wurde im Fall von Normalverteilung und Varianzhomogenität der Daten eine parametrische One-Way-ANOVA mit anschließenden parametrischen *post-hoc* Tests (Student-Newman-Keuls) angewendet. Konnten Normalverteilung und Varianzhomogenität nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, erfolgte der Einsatz einer nicht-parametrischen Kruskal-Wallis ANOVA gefolgt von nicht-parametrischen *post-hoc* Tests nach Dunn.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Ergebnisse

3.1.1 Auswertbare Versuche

Insgesamt wurden 51 Tierversuche durchgeführt. Davon waren 40 Experimente vollständig auswertbar. Neun Tiere verstarben während des Versuchs aufgrund von Kreislaufstörungen. Zwei Experimente waren wegen eines defekten Druckaufnehmers nicht auswertbar. In zwei Experimenten mit TEA-Behandlung bestand zum Zeitpunkt 6 Stunden eine so ausgeprägte Hypotonie, dass der zerebrale Perfusionsdruck unterhalb der Autoregulationsschwelle lag. In diesen beiden Experimenten wurden daher die betroffenen Messungen zum Zeitpunkt 6 Stunden zensiert.

Tabelle 4: Übersicht über die durchgeführten auswertbaren und nicht auswertbaren Versuche

Inokulat	Intervention	Anzahl der Versuche		
		gesamt	auswertbar	nicht auswertbar
D39	---	13	9	4: Tod durch Kreislaufstörungen
	Catalase	3	3	---
	TEA	3	3	--- (6h-Werte bei einem Versuchstier aufgrund Hypotonie zensiert.)
<i>SpxB</i>	---	8	8	---
	Catalase	4	4	---
	TEA	5	2	2: Druckaufnehmer defekt 1: Tod durch Kreislaufstörungen (6h-Werte bei einem Versuchstier aufgrund Hypotonie zensiert.)
PCW	---	7	5	2: Tod durch Kreislaufstörungen
	Catalase	5	3	2: Tod durch Kreislaufstörungen
PBS	---	3	3	---

3.1.2 Physiologische Basisparameter

Grundlegende physiologische Parameter mit möglichem Einfluss auf Hirndruck und zerebrale Perfusion wurden während des gesamten Versuchsverlaufs kontrolliert. Dies umfasste die kontinuierliche Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) und des intrakraniellen Druckes (ICP), aus deren Differenz der zerebrale Perfusionsdruck (CPP) errechnet wurde, sowie der Körperkerntemperatur und des endexpiratorischen $p\text{CO}_2$. Außerdem erfolgte stündlich eine arterielle Blutgasanalyse mit Erfassung von pH, Standardbicarbonat, Base Excess, CO_2 - und O_2 -Partialdruck sowie der Sauerstoffsättigung (SaO_2). In diesen Messungen fanden sich hinsichtlich der Blutgasanalysen keine biologisch relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen, da alle Einzelmessungen in einem für Ratten physiologischen Bereich lagen. Die Werte für systemischen Blutdruck (Abbildung 3) und CPP wiesen keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Art der Meningitisauslösung auf.

Die Applikation des Kanalblockers TEA führte allerdings zu einer signifikanten Senkung des mittleren arteriellen Blutdruckes (Abbildung 4). Bereits 15 Minuten nach intravenöser Injektion von TEA zum Zeitpunkt der Meningitisinduktion fiel der MAP bei allen Ratten auf 78 ± 11 mmHg; bei den nicht behandelten Tieren lag der mittlere arterielle Blutdruck zum gleichen Zeitpunkt bei 92 ± 7 mmHg ($p < 0,01$ versus MAP bei den mit TEA behandelten Tieren, Mann-Whitney-U-Test). Die Hypotension bestand im Verlauf der Experimente fort. Zum Zeitpunkt 6 Stunden lagen die mittleren Blutdruckwerte aller TEA-behandelten Tiere bei 75 ± 11 mmHg; bei den nicht mit TEA behandelten Tieren bei 89 ± 14 mmHg ($p = 0,03$ versus MAP bei den mit TEA behandelten Tieren, Mann-Whitney-U-Test). Dieser Effekt trat sowohl bei mit Wildtyp-Pneumokokken (D39) als auch bei den mit mutierten Erregern (*SpxB*⁻) infizierten Tieren auf.

Bei zwei mit TEA behandelten Versuchstieren sank der MAP am Ende des Experimentes unter 60 mmHg (je ein mit D39 bzw. mit *SpxB* infiziertes Tier), so dass der CPP die untere Grenze des allgemein akzeptierten Autoregulationsbereiches unterschritt. Um hierdurch hervorgerufene Verfälschungen des Blutflusses und des ICP auszuschließen, wurden die 6-Stunden-Werte dieser beiden Experimente in der Auswertung sowie in der Tabelle 5 nicht berücksichtigt.

Tabelle 5: Effekt von TEA auf den mittleren arteriellen Blutdruck

Inokulat	Intervention	n	MAP [mmHg]	
			0 h	6 h
Alle Experimente	---	25	92 ± 7	89 ± 14
	TEA	5	78 ± 11	75 ± 11
D39	---	9	91 ± 4	87 ± 11
	TEA	3	79 ± 11	79 ± 16
<i>SpxB</i>	---	8	94 ± 10	88 ± 8
	TEA	2	77 ± 16	66 ± 10

Tabelle 6 fasst die physiologischen Parameter der Versuchstiere zusammen. In dieser Aufstellung wurden nur die auswertbaren Experimente berücksichtigt.

Tabelle 6: Physiologische Basisparameter

Erreger	Intervention		MAP [mmHg]	CPP [mmHg]	pH	paCO ₂ [mmHg]	paO ₂ [mmHg]
D39	---	0 h	91 ± 4	87 ± 4	7.42 ± 0.03	38 ± 5	132 ± 28
		2 h	92 ± 12	86 ± 10	7.39 ± 0.04	39 ± 4	117 ± 20
		4 h	86 ± 10	77 ± 5	7.37 ± 0.03	40 ± 3	111 ± 8
		6 h	87 ± 11	75 ± 11	7.38 ± 0.04	38 ± 4	119 ± 13
	Catalase	0 h	92 ± 3	89 ± 4	7.36 ± 0.10	43 ± 4	161 ± 50
		2 h	97 ± 4	91 ± 5	7.37 ± 0.04	42 ± 4	146 ± 6
		4 h	95 ± 6	86 ± 6	7.36 ± 0.05	40 ± 1	117 ± 39
		6 h	98 ± 5	85 ± 4	7.37 ± 0.07	36 ± 1	118 ± 34
	TEA	0 h	79 ± 11	77 ± 12	7.46 ± 0.09	32 ± 1	150 ± 50
		2 h	80 ± 6	76 ± 6	7.41 ± 0.07	33 ± 3	124 ± 13
		4 h	82 ± 4	74 ± 3	7.39 ± 0.03	36 ± 3	119 ± 9
		6 h	79 ± 16	67 ± 15*	7.30 ± 0.03	38 ± 5	97 ± 3

<i>SpxB</i>	---	0 h	94 ± 10	91 ± 10	7.42 ± 0.05	37 ± 7	136 ± 36	
		2 h	87 ± 8	82 ± 7	7.39 ± 0.04	39 ± 5	137 ± 31	
		4 h	90 ± 4	81 ± 5	7.36 ± 0.05	39 ± 4	130 ± 37	
		6 h	88 ± 8	77 ± 8	7.34 ± 0.03	38 ± 3	140 ± 48	
	Catalase	0 h	95 ± 7	93 ± 7	7.43 ± 0.05	37 ± 4	173 ± 38	
		2 h	95 ± 6	90 ± 6	7.39 ± 0.05	38 ± 3	146 ± 29	
		4 h	97 ± 8	87 ± 8	7.37 ± 0.07	36 ± 3	133 ± 34	
		6 h	89 ± 9	80 ± 8	7.34 ± 0.10	39 ± 5	111 ± 10	
	TEA	0 h	77 ± 16	76 ± 15	7.40 ± 0.03	32 ± 6	109 ± 14	
		2 h	76 ± 3	73 ± 2	7.39 ± 0.02	33 ± 4	95 ± 22	
		4 h	70 ± 4	65 ± 5	7.28 ± 0.02	38 ± 2	93 ± 4	
		6 h	66 ± 10	60 ± 9 *	7.34 ± 0.04	41 ± 8	102 ± 5	
PCW	---	0 h	92 ± 8	89 ± 8	7.40 ± 0.02	35 ± 8	114 ± 15	
		2 h	93 ± 6	89 ± 7	7.37 ± 0.01	37 ± 6	111 ± 17	
		4 h	84 ± 15	78 ± 14	7.37 ± 0.02	36 ± 3	119 ± 17	
		6 h	87 ± 30	76 ± 29	7.34 ± 0.04	37 ± 7	137 ± 21	
	Catalase	0 h	88 ± 0	85 ± 0	7.38 ± 0.03	36 ± 2	118 ± 4	
		2 h	89 ± 9	84 ± 10	7.29 ± 0.04	41 ± 8	101 ± 30	
		4 h	90 ± 7	83 ± 7	7.36 ± 0.06	33 ± 0	111 ± 29	
		6 h	86 ± 13	75 ± 12	7.32 ± 0.00	40 ± 0	106 ± 22	
	PBS	---	0 h	84 ± 9	82 ± 8	7.41 ± 0.01	42 ± 2	114 ± 6
			2 h	86 ± 2	84 ± 3	7.39 ± 0.03	39 ± 3	99 ± 9
4 h			79 ± 9	76 ± 10	7.40 ± 0.02	39 ± 1	96 ± 19	
6 h			84 ± 9	81 ± 9	7.40 ± 0.04	39 ± 1	115 ± 11	

MAP: mittlerer arterieller Blutdruck; CPP: zerebraler Perfusionsdruck. * Die LDF- und ICP-Messwerte zum Zeitpunkt 6 Stunden wurden bei 2 mit TEA behandelten Versuchstieren (D39 n = 1, *SpxB* n = 1) aufgrund eines CPP unter 60 mmHg von der Auswertung ausgeschlossen.

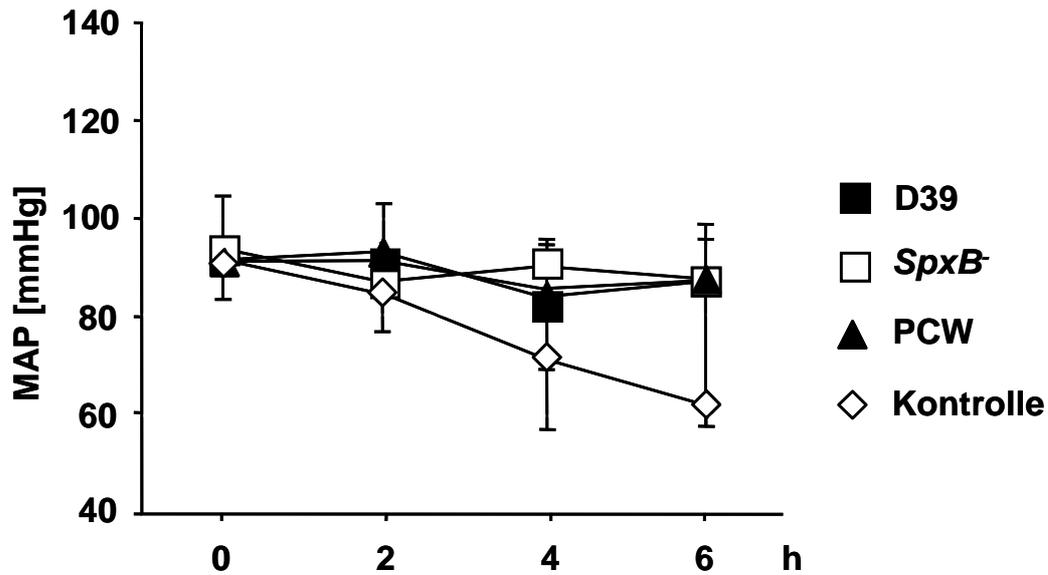


Abbildung 3: Mittlerer arterieller Blutdruck der mit D39, *SpxB* und PCW behandelten Versuchstiere sowie der mit PBS behandelten Kontrollgruppe.

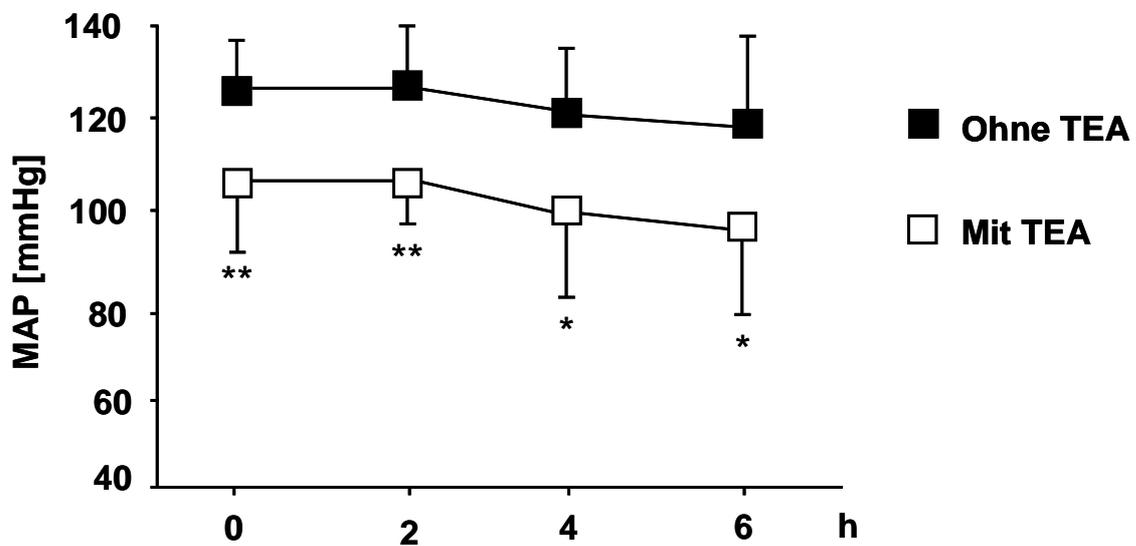


Abbildung 4: Vergleich des mittleren arteriellen Blutdruckes aller Versuchstiere ohne TEA-Behandlung und aller mit TEA behandelten Versuchstiere (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test).

3.1.3 Leukozyten- und Bakterienkonzentrationen im Liquor

Alle mit Bakterien oder desintegrierten Bakterienzellwänden inokulierten Ratten entwickelten im Rahmen der Meningitis eine intrathekale Inflammation, die durch den Einstrom von Leukozyten in den Liquor nachweisbar waren (Abbildungen 5 und 6). Zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Meningitisinduktion wurden 3435 ± 2001 Leukozyten/ μl bei D39, 5771 ± 196 Leukozyten/ μl bei *SpxB*⁻ und 5125 ± 391 Leukozyten/ μl bei PCW gezählt.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bestanden nicht. Die mit PBS intrathekal stimulierten Kontrolltiere entwickelten keine relevante Pleozytose (19 ± 11 Leukozyten/ μl).

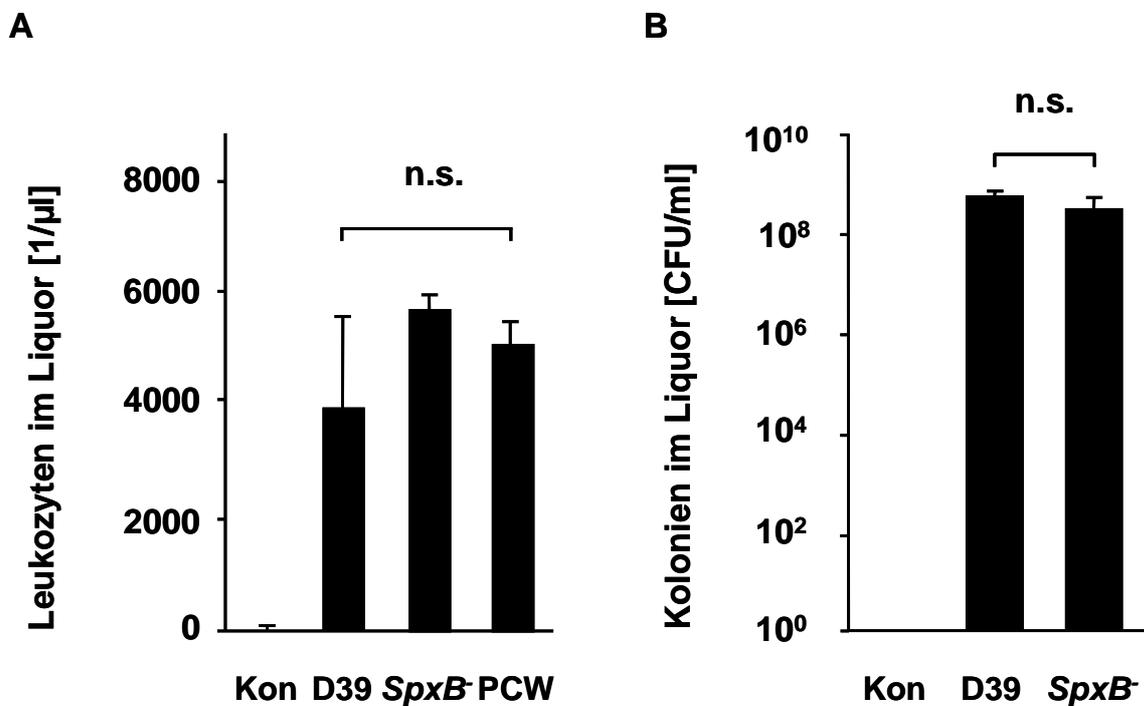


Abbildung 5: Konzentration von Leukozyten [$1/\mu\text{l}$] (A) und Bakterien [CFU/ml] (B) im Liquor 6 Stunden nach intrathekaler Infektion. ($p = \text{n.s.}$; A: Kruskal-Wallis ANOVA; B: Mann-Whitney-U-Test).

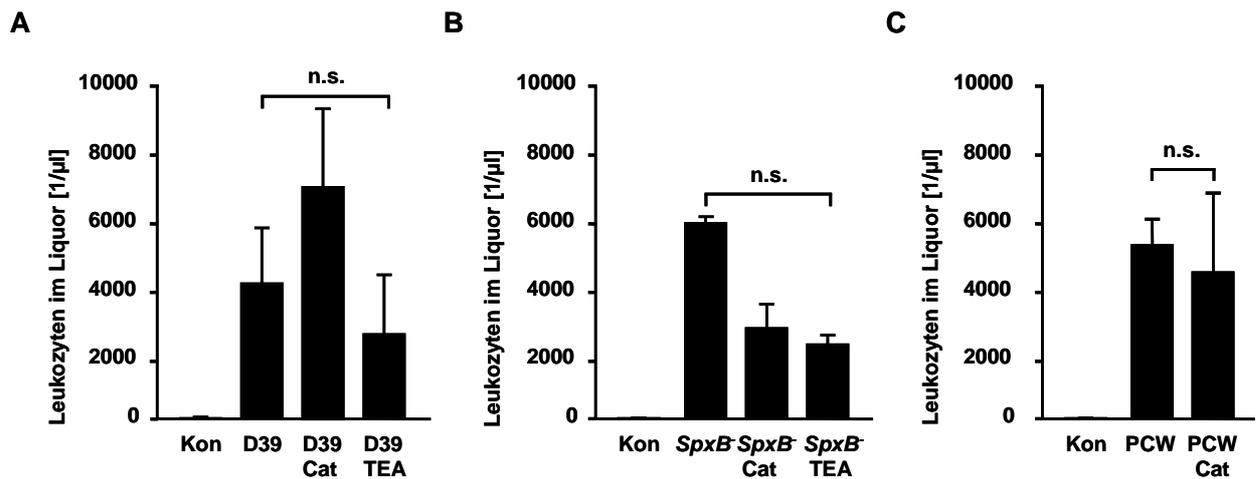


Abbildung 6: Leukozytenkonzentration im Liquor in Abhängigkeit von auslösendem Agens und pharmakologischer Intervention nach 6-stündigem Experiment bei A: D39, B: *SpxB*, C: PCW und den Kontrollversuchen ($p = n.s.$; A u. B: Kruskal-Wallis ANOVA; C: Mann-Whitney-U-Test).

3.2 Regionaler zerebraler Blutfluss

3.2.1 Regionaler zerebraler Blutfluss in der D39-induzierten Meningitis

Eine Synopsis der rCBF-Kurven nach Infektion mit D39 und *SpxB*, Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterienzellwänden sowie in Kontrollen ist in Abbildung 7 dargestellt.

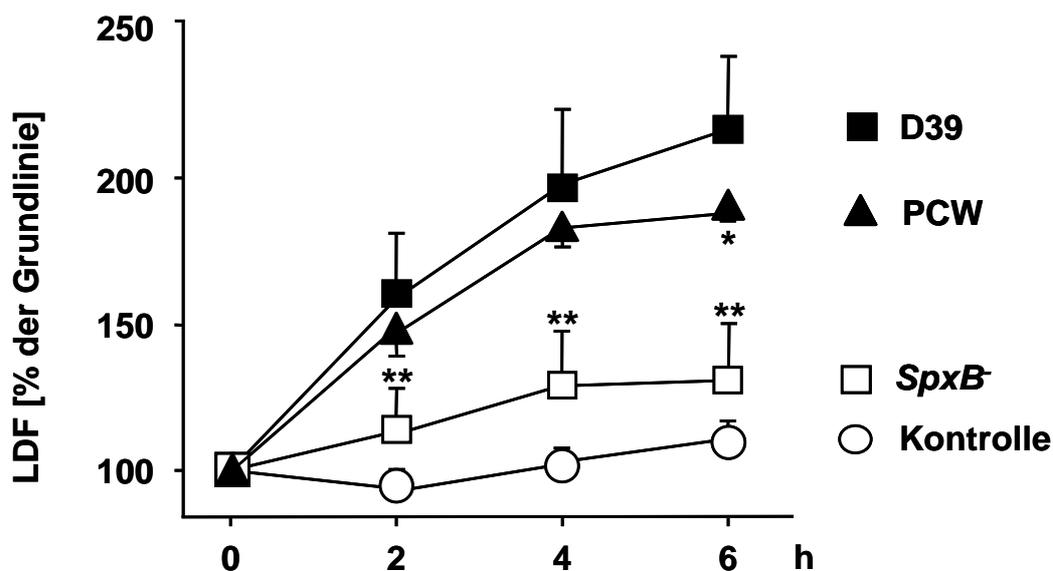


Abbildung 7: Anstieg des rCBF in der D39-, *SpxB*- und PCW-induzierten Meningitis sowie in den Kontrollversuchen (* $p < 0,05$ versus D39 allein, ** $p < 0,01$ versus D39 allein (parametrische ANOVA; Student-Newman-Keuls *post-hoc* Tests).

In den mit PBS behandelten Kontrolltieren kam es mit maximal 105 ± 7 % des Ausgangswertes nicht zu einem signifikanten Anstieg des rCBF ($p = 0,25$). Dagegen stieg in den mit D39 inokulierten Versuchstieren der mittels Laserdoppler gemessene Blutfluss kontinuierlich auf ein Maximum von 217 ± 23 % der Grundlinie an ($p < 0,01$ versus Grundlinie; $p < 0,01$ versus PBS-Kontrolle; Abbildung 7). Der LDF-Anstieg begann bereits innerhalb der ersten 30 Minuten und setzte sich bis zum Zeitpunkt 3 Stunden nahezu linear fort. Seinen Höchstwert erreichte der LDF etwa 5 Stunden nach der intrathekalen Injektion der Wildtyp-Pneumokokken und blieb anschließend bis zum Ende der Experimente annähernd stabil.

3.2.2 Regionaler zerebraler Blutfluss in der *SpxB*-induzierten Meningitis

Bei den intrathekal mit *SpxB* infizierten Ratten wurde ein LDF-Anstieg auf maximal 135 ± 17 % der Grundlinie beobachtet ($p < 0,01$ versus Grundlinie; $p = 0,03$ versus PBS-Kontrolle; Abbildung 7). Im Vergleich mit der durch D39 ausgelösten Meningitis zeigte sich ein verzögerter und erheblich schwächerer Anstieg des rCBF. Erst nach etwa 2 Stunden war eine Zunahme des rCBF erkennbar. Diese blieb zu allen Messzeiten deutlich unter den Werten der D39-Meningitis ($p < 0,01$ versus D39 zu den Zeitpunkten 2, 4 und 6 Stunden nach Meningitisinduktion).

3.2.3 Regionaler zerebraler Blutfluss in der PCW-induzierten Meningitis

In den mit aufgereinigten Pneumokokkenzellwandbestandteilen (PCW) stimulierten Ratten zeigte der Laser-Doppler-Blutfluss (LDF) eine deutliche Zunahme auf einen Höchstwert von 192 ± 5 % ($p < 0,01$ versus Grundlinie; $p < 0,01$ versus PBS-Kontrollen; Abbildung 7). Der maximale Anstieg zum Zeitpunkt 6 Stunden war insgesamt signifikant geringer als in der D39-induzierten Meningitis ($p = 0,04$ versus maximaler LDF-Anstieg von 217 ± 23 % der Grundlinie bei D39 allein). Jedoch ließ sich für die Zeitpunkte 2 und 4 Stunden kein signifikanter Unterschied zum LDF-Anstieg in der D39-induzierten Meningitis feststellen ($p = 0,17$ bei 2 Stunden bzw. $p = 0,34$ bei 4 Stunden).

3.2.4 Effekt von Catalase und Tetraethylammonium auf den regionalen zerebralen Blutfluss in der D39-induzierten Meningitis

Nach der Infektion der Wistar-Ratten mit dem H₂O₂-defizienten Pneumokokkenstamm *SpxB* veränderte sich der zerebrale Blutfluss während der frühen Meningitisphase nicht relevant. Wurden die Versuchstiere jedoch mit dem wasserstoffproduzierenden Wildtyp-Pneumokokkenstamm D39 inokuliert, stieg der rCBF bereits nach einer halben Stunde rasant an. Diese Beobachtung legt nahe, dass das von D39 produzierte H₂O₂ maßgeblich an der Zunahme der Durchblutung im Gehirn beteiligt ist. Um die Blutflusseffekte eindeutig dem bakteriellen H₂O₂ zuordnen zu können, wurden weitere Experimente durchgeführt. In diesen Versuchen wurden zusätzlich zur Infektion mit Bakterien pharmakologische Interventionen zur Hemmung H₂O₂-abhängiger Effekte eingesetzt (Abbildung 8).

Die kombinierte intrathekale und intravenöse Behandlung mit Catalase reduzierte den zerebralen Blutflussanstieg in der D39-induzierten Meningitis erheblich. Der maximale LDF zum Zeitpunkt 6 Stunden betrug $142 \pm 4 \%$ ($p < 0,01$ versus Grundlinie; $p < 0,01$ versus PBS-Kontrolle) und lag somit deutlich unter dem bei alleiniger Infektion mit D39 gemessenen Höchstwert von $217 \pm 23 \%$ der Grundlinie ($p < 0,01$). Auch zu den Zeitpunkten 2 und 4 Stunden zeigten die mit Catalase behandelten Versuchstiere einen signifikant geringeren LDF-Anstieg ($p < 0,01$).

Nach intravenöser Behandlung mit TEA führte die Infektion mit D39 zu einer nur geringen Zunahme des rCBF auf $128 \pm 6 \%$ ($p = 0,02$ versus Grundlinie; $p < 0,01$ versus PBS-Kontrolle). Dies stellte ebenfalls einen signifikant geringeren Anstieg des zerebralen Blutflusses als bei der alleinigen D39-Infektion dar ($p < 0,01$ versus Höchstwert von 217 ± 23 bei D39 allein). Diese Effekte konnten zu jedem Messzeitpunkt beobachtet werden ($p = 0,012$ bei 2 Stunden bzw. $p < 0,01$ bei 4 Stunden).

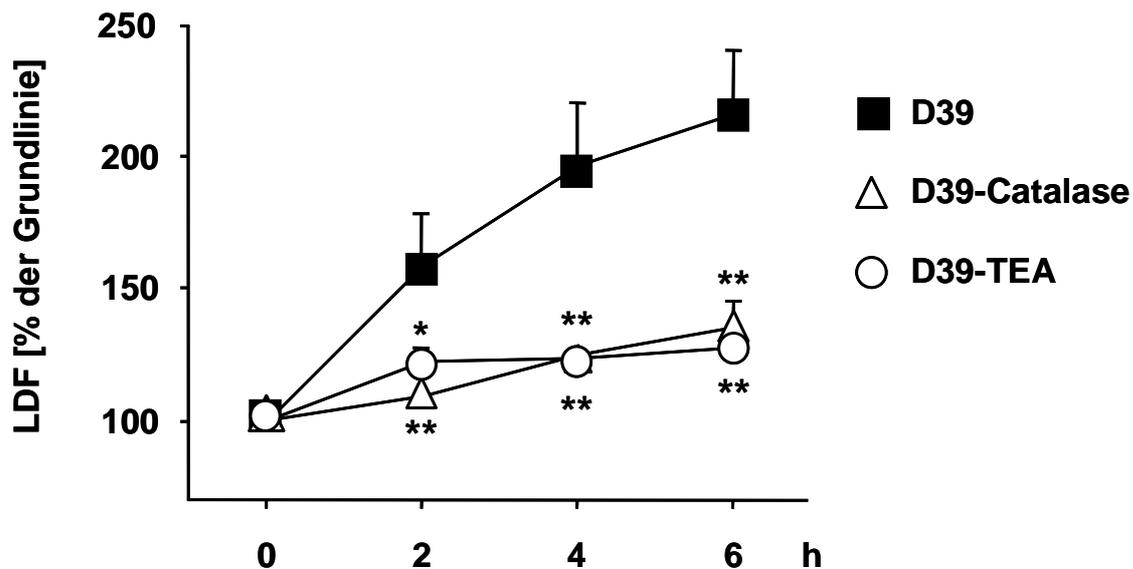


Abbildung 8: Anstieg des LDF in der D39-induzierten Meningitis sowie bei Behandlung mit Catalase oder TEA. (* $p = 0,012$; ** $p < 0,01$ versus D39 allein; parametrische ANOVA; Student-Neuman-Keuls *post-hoc* Tests).

3.2.5 Effekt von Catalase und Tetraethylammonium auf den regionalen zerebralen Blutfluss in der *SpxB*⁻-induzierten Meningitis

Auch in einem Teil der mit *SpxB*⁻ inokulierten Ratten wurde zusätzlich Catalase oder TEA appliziert (Abbildung 9). Im Vergleich zu dem in der unbehandelten *SpxB*⁻-Meningitis gemessenen maximalen Wert von 135 ± 17 % der Grundlinie bewirkten beide Pharmaka keine zusätzliche Reduktion des LDF-Anstiegs. Bei Behandlung der *SpxB*⁻-induzierten Meningitis mit Catalase betrug der maximale rCBF zum Zeitpunkt 6 Stunden 135 ± 14 % ($p = 0,96$ versus maximaler LDF-Anstieg bei *SpxB*⁻ allein). Nach vorangegangener Applikation von TEA wurde ein maximaler Anstieg auf 130 ± 2 % der Grundlinie beobachtet ($p = 0,69$ versus *SpxB*⁻ allein). Auch zu den Zeitpunkten 2 und 4 Stunden konnten keine signifikanten Unterschiede zu *SpxB*⁻ allein nachgewiesen werden ($p = 0,63$ bei 2 Stunden bzw. $p = 0,99$ bei 4 Stunden).

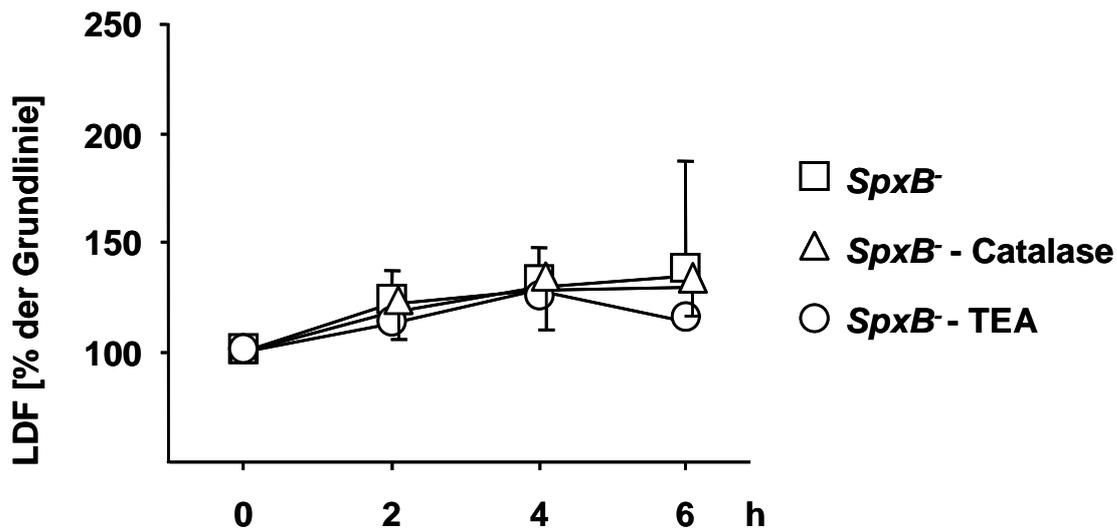


Abbildung 9: Effekte von Catalase und TEA auf die Zunahme des rCBF in der durch *SpxB* ausgelösten Meningitis ($p = n.s.$; parametrische ANOVA).

3.2.6 Effekt von Catalase auf den regionalen zerebralen Blutfluss in der PCW-induzierten Meningitis

Ebenso wie bei D39 und *SpxB* wurde auch in der mittels PCW induzierten Meningitis Catalase eingesetzt (Abbildung 10). Der maximale rCBF zum Zeitpunkt 6 Stunden erreichte in dieser Gruppe $181 \pm 22\%$ ($p < 0,01$ versus Grundlinie) und unterschied sich damit nicht von dem maximal erreichten Blutflusswerten von $192 \pm 5\%$ der Grundlinie bei alleiniger Stimulation mit PCW ($p = 0,27$).

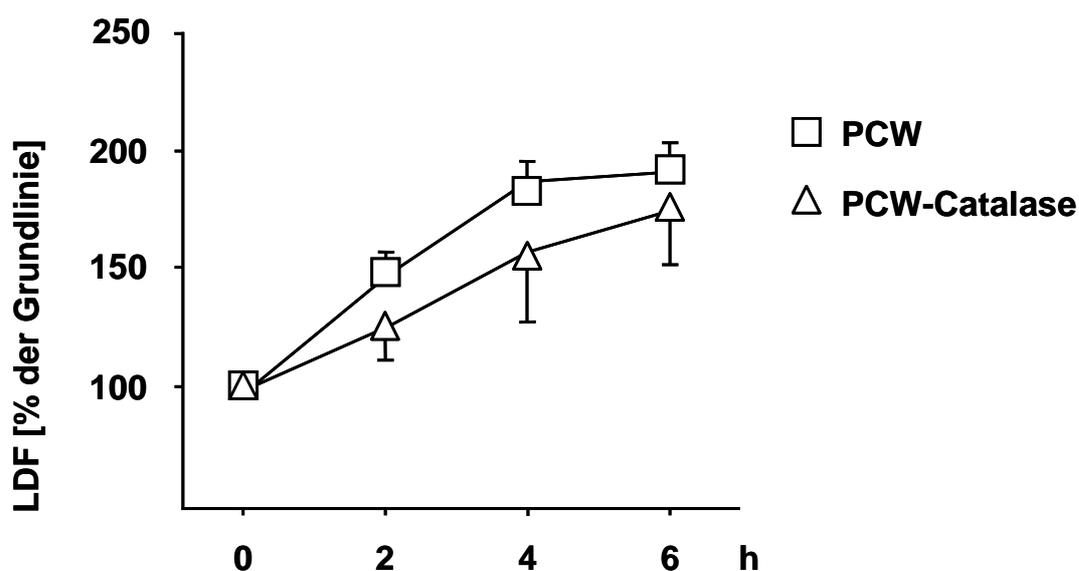


Abbildung 10: Anstieg des Laser-Doppler-Flusses in der durch PCW ausgelösten Meningitis und Effekt der zusätzlichen Behandlung mit Catalase. ($p = n.s.$; t-Tests).

Auch zu den Zeitpunkten 2 und 4 Stunden zeigten sich keine signifikanten Unterschiede versus PCW allein ($p = 0,49$ bei 2 Stunden bzw. $p = 0,92$ bei 4 Stunden). In Abbildung 11 ist die maximale Zunahme des rCBF in den mit PBS behandelten Kontrolltieren sowie nach Meningitisinduktion mit D39, *SpxB*⁻ und PCW zusammenfassend dargestellt. Abbildung 12 zeigt zusätzlich den jeweiligen Effekt der Behandlung mit Catalase bzw. TEA.

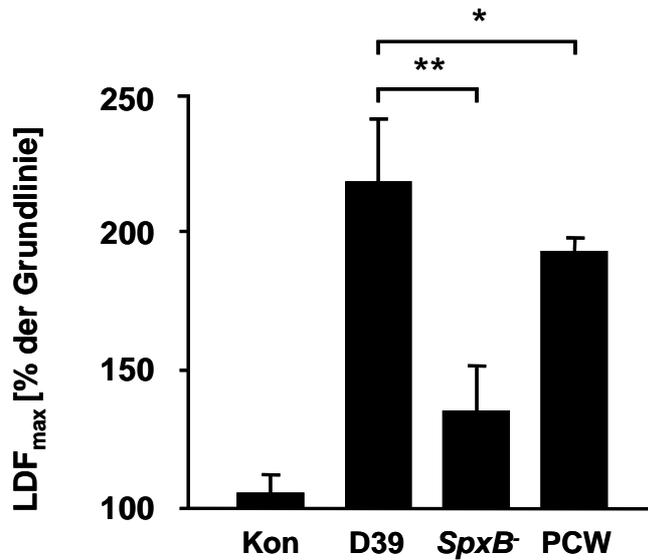


Abbildung 11: Maximale Zunahme des rCBF in Kontrollen sowie nach Meningitisinduktion mit D39, *SpxB*⁻ und PCW. (* $p < 0,05$ versus D39 allein, ** $p < 0,01$ versus D39 allein (parametrische ANOVA; Student-Newman-Keuls *post-hoc* Tests).

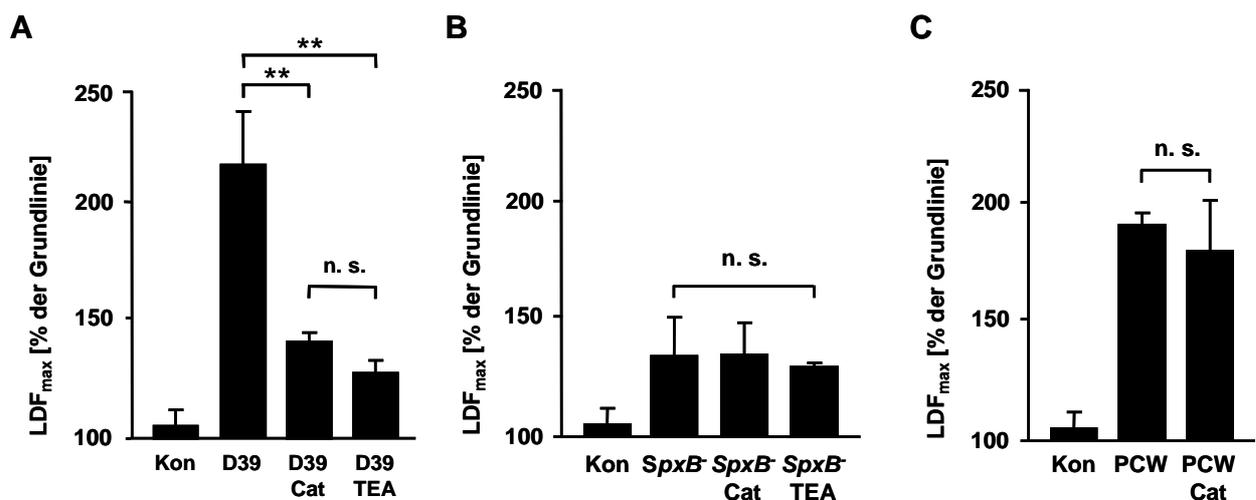


Abbildung 12: Maximale Zunahme des rCBF in Abhängigkeit von auslösendem Agens und zusätzlicher Behandlung mit Catalase bzw. TEA bei A: D39, B: *SpxB*⁻, C: PCW (** $p < 0,01$ versus D39 allein; A und B: parametrische ANOVA, Student-Newman-Keuls *post-hoc* Tests; C: t-Test).

3.3 Intrakranieller Druck

3.3.1 Intrakranieller Druck in der D39-induzierten Meningitis

Abbildung 13 fasst den ICP-Verlauf in den Kontrollen, nach intrathekaler Infektion mit D39 bzw. *SpxB* sowie nach Stimulation mit PCW zusammen.

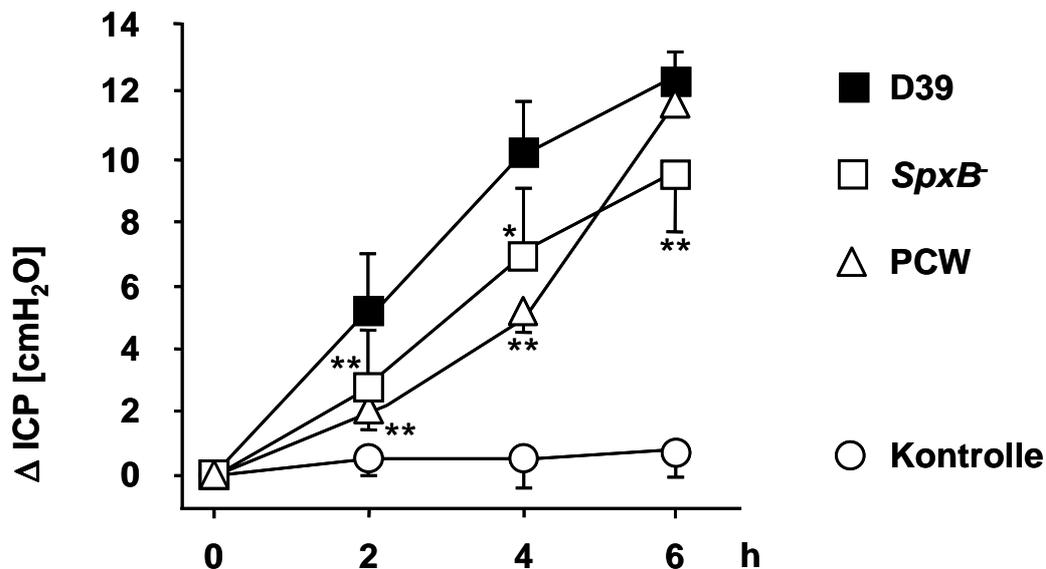


Abbildung 13: Anstieg des intrakraniellen Druckes (ICP) in PBS-behandelten Kontrollen sowie nach Meningitisauslösung mit D39, *SpxB* oder PCW (* $p = 0,02$ versus D39 allein; ** $p < 0,01$ versus D39 allein; parametrische ANOVA, Student-Newman-Keuls *post-hoc* Tests).

In den mit PBS behandelten Kontrolltieren wurden keine statistisch signifikanten Änderungen des Hirndruckes (ICP) beobachtet. Der Höchstwert des ICP während der gesamten Versuchsdauer lag $0,8 \pm 0,5$ cmH₂O oberhalb des individuellen Ausgangswertes ($p = 0,14$ versus Grundlinie).

Dagegen kam es nach Infektion mit D39 zu einem deutlichen ICP-Anstieg um maximal $12,5 \pm 0,7$ cmH₂O zum Zeitpunkt 6 Stunden ($p < 0,01$ versus Grundlinie; $p < 0,01$ versus PBS-Kontrolle; Abbildung 13). Die Zunahme des ICP setzte bereits 30 Minuten nach Inokulation ein und hielt während der gesamten Versuchsdauer an, wobei sich der steilste Anstieg während der ersten 4 Stunden mit einer nahezu linearen Änderung um etwa 2,5 cmH₂O je Stunde zeigte.

3.3.2 Intrakranieller Druck in der *SpxB*-induzierten Meningitis

Im Gegensatz zur Infektion mit D39 führte die intrathekale Inokulation mit der H₂O₂-defizienten Pneumokokkenmutante *SpxB* zu einem erheblich schwächeren Anstieg des intrakraniellen Druckes (Abbildung 13). In diesen Experimenten wurde eine maximale Zunahme des ICP um $9,8 \pm 2,0$ cmH₂O zum Zeitpunkt 6 Stunden beobachtet ($p < 0,01$ versus Grundlinie; $p < 0,01$ versus PBS-Kontrolle). Die durch die *SpxB*-Infektion ausgelösten ICP-Maxima lagen damit signifikant unter den bei D39 beobachteten Maximalwerten von $12,5 \pm 0,7$ cmH₂O ($p < 0,01$). Der ICP-Anstieg war dabei während der gesamten Versuchsdauer geringer ausgeprägt als in der durch D39 ausgelösten Meningitis ($p < 0,01$ versus D39 zu den Zeitpunkten 2 und 6 Stunden; $p = 0,02$ versus D39 zum Zeitpunkt 4 Stunden). Im Vergleich zu D39 wurde ein verzögerter Anstieg des ICP beobachtet, wobei eine deutliche Zunahme erst zwei Stunden nach Inokulation festzustellen war.

3.3.3 Intrakranieller Druck in der PCW-induzierten Meningitis

Bei Meningitisinduktion mit aufgereinigten Pneumokokkenzellwänden stieg der ICP maximal um $11,9 \pm 0,1$ cmH₂O zum Zeitpunkt 6 Stunden an ($p < 0,01$ versus Grundlinie; $p < 0,01$ versus PBS-Kontrollen; Abbildung 13). Dieser Wert unterschied sich nicht signifikant von dem nach Inokulation mit D39 beobachteten maximalen ICP-Anstieg von $12,5 \pm 0,7$ cmH₂O ($p = 0,49$).

Ähnlich wie bei D39 zeigte sich auch nach Stimulation mit PCW ein rascher Anstieg des ICP ab der ersten Stunde. Allerdings fiel die ICP-Zunahme zu den Zeitpunkten 2 und 4 Stunden in den mit PCW stimulierten Tieren versus den mit D39 infizierten Versuchstieren deutlich niedriger aus (2 h: $2,26 \pm 0,09$ cmH₂O bei PCW versus $5,03 \pm 2,03$ cmH₂O bei D39; $p < 0,01$; 4 h: $5,0 \pm 0,07$ cmH₂O bei PCW versus $10,03 \pm 2,17$ cmH₂O bei D39; $p < 0,01$). Zudem ereignete sich der steilste ICP-Anstieg nicht wie bei D39 in den ersten 4 Stunden, sondern trat verzögert in den letzten 2 Stunden der Versuchsdauer auf. In Abbildung 14 sind die während des gesamten Versuchszeitraumes beobachteten Maxima des ICP-Anstiegs dargestellt.

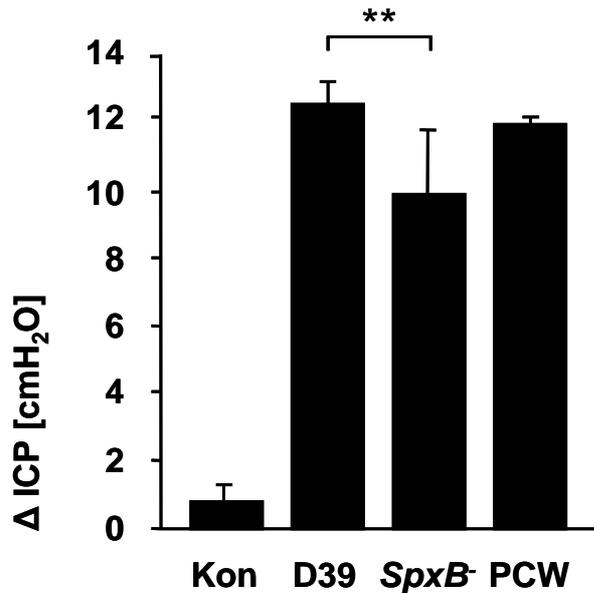


Abbildung 14: Maximaler Hirndruckanstieg in den Kontrollen sowie in der durch D39, *SpxB⁻* bzw. PCW ausgelösten Meningitis (** $p < 0,01$ versus D39; parametrische ANOVA, Student-Newman-Keuls *post-hoc* Tests).

3.3.4 Effekt von Catalase und Tetraethylammonium auf den intrakraniellen Druck in der D39-induzierten Meningitis

Verglichen mit dem maximalen ICP-Anstieg um $12,5 \pm 0,7$ cmH₂O in der unbehandelten D39-induzierten Meningitis hatte die zusätzliche Behandlung mit Catalase keinen nachweisbaren Effekt auf das ICP-Maximum (Abbildung 15). Das ICP-Maximum zum Zeitpunkt 6 Stunden lag in den so behandelten Tieren bei $11,7 \pm 0,1$ cmH₂O oberhalb der Grundlinie ($p = 0,20$ versus D39 allein). Auch zu den Zeitpunkten 2 und 4 Stunden zeigte sich kein signifikant geringerer ICP-Anstieg versus D39 allein. Hingegen fiel der maximale ICP-Anstieg nach Inokulation mit D39 bei vorangegangener Applikation von TEA mit $7,8 \pm 0$ cmH₂O deutlich geringer aus ($p < 0,01$ versus D39 allein). Auch zum Zeitpunkt 2 Stunden zeigte sich bereits ein signifikant geringerer ICP-Anstieg bei TEA-Applikation ($p < 0,01$ versus D39 allein).

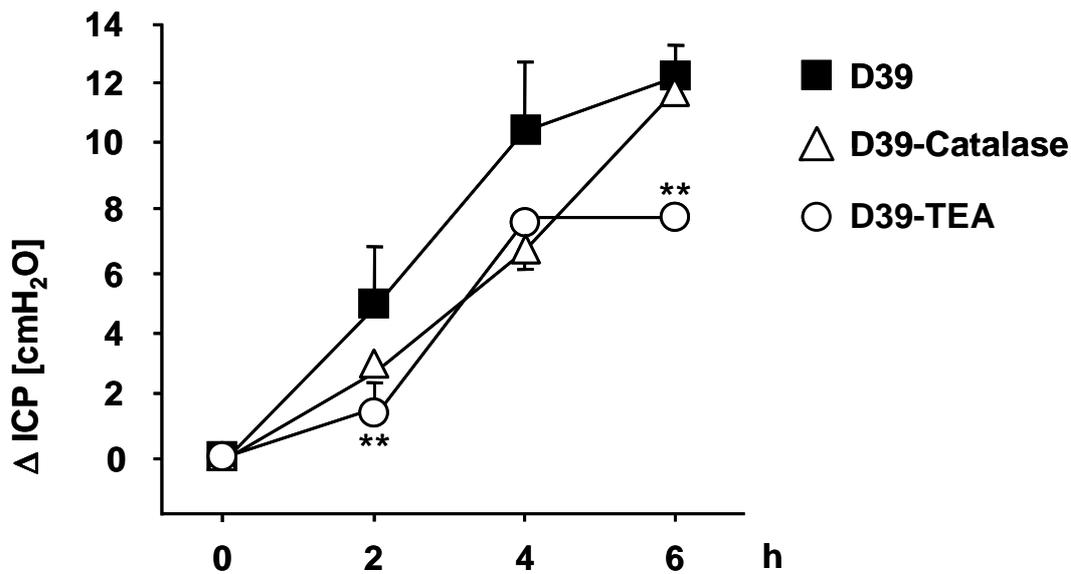


Abbildung 15: Effekt von Catalase und TEA auf den ICP-Anstieg in der D39-induzierten Meningitis (** $p < 0,01$ versus D39 allein; parametrische ANOVA, Student-Newman-Keuls *post-hoc* Tests).

3.3.5 Effekt von Catalase und Tetraethylammonium auf den intrakraniellen Druck in der *SpxB*-induzierten Meningitis

In den intrathekal mit *SpxB* infizierten Tieren hatte der zusätzliche Einsatz von Catalase keinen deutlichen Effekt auf den Anstieg des intrakraniellen Druckes (Abbildung 16). Der maximal erreichte Anstieg des ICP betrug $8,2 \pm 0,3$ cmH₂O ($p = 0,13$ versus Maximum von $9,8 \pm 2,0$ cmH₂O bei unbehandelter *SpxB*-Infektion). Auch zu den Zeitpunkten 2 und 4 Stunden zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu *SpxB* allein ($p = 0,57$ bzw. $p = 0,07$).

Dagegen war der maximale ICP-Anstieg in den zusätzlich mit TEA behandelten Tieren mit maximal $6,2 \pm 0,3$ cmH₂O oberhalb der Grundlinie deutlich geringer ($p < 0,05$ versus *SpxB* allein). Dieser Effekt konnte zu den Zeitpunkten 2 und 4 Stunden nicht nachgewiesen werden ($p = 0,57$ bzw. $p = 0,07$).

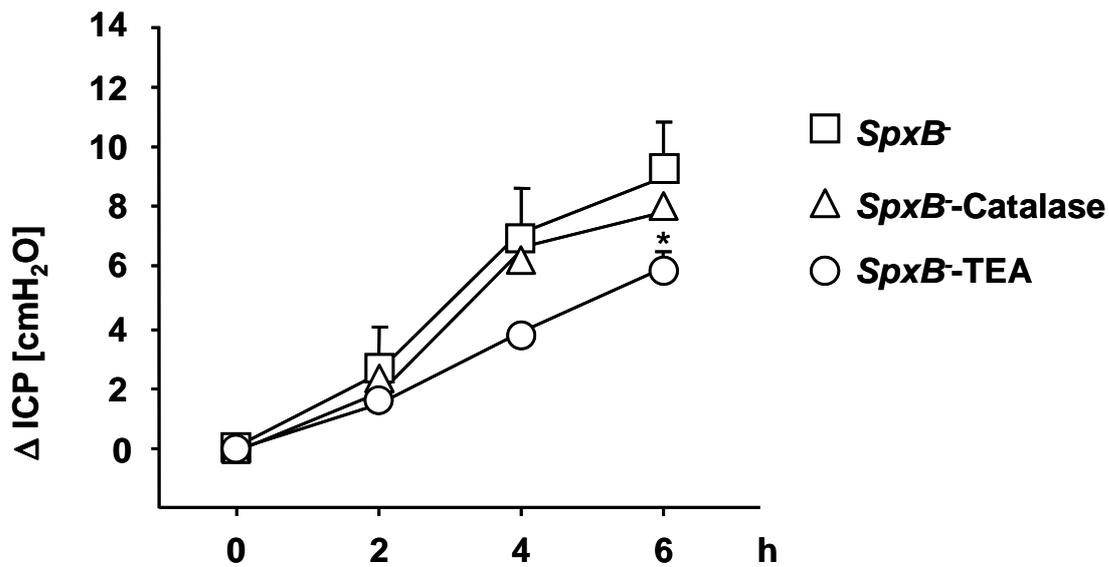


Abbildung 16: Effekt von Catalase und TEA auf den ICP-Anstieg in der durch *SpxB* induzierten Meningitis (* $p < 0,05$ versus D39 allein; Kruskal-Wallis ANOVA, Dunn's *post-hoc* Tests).

3.3.6 Effekt von Catalase auf den intrakraniellen Druck in der PCW-induzierten Meningitis

Die Behandlung mit Catalase hatte keinen deutlichen Effekt auf die ICP-Entwicklung nach Meningitisauslösung mit PCW (Abbildung 17).

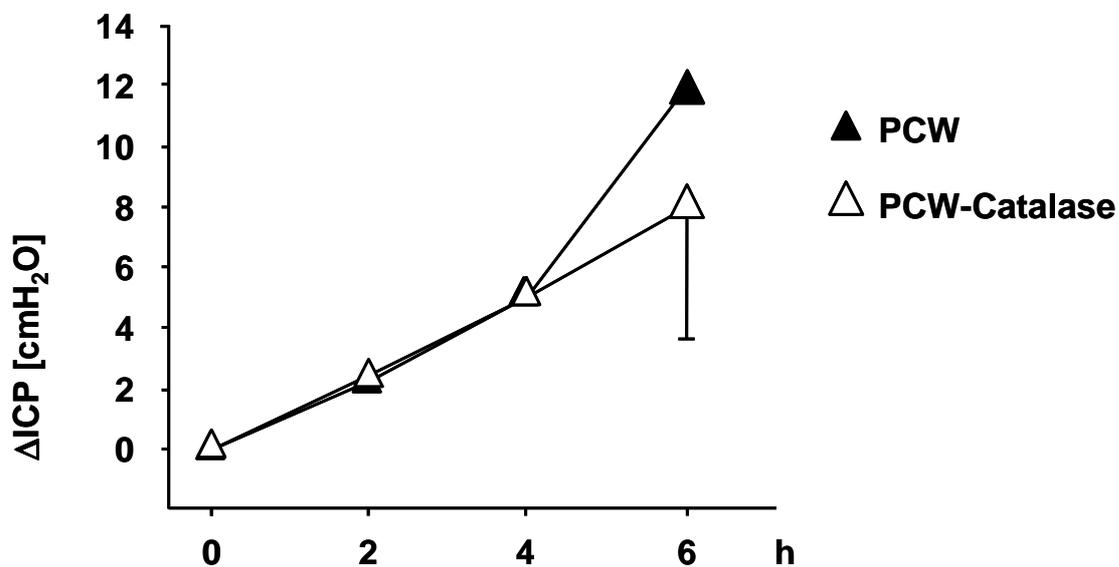


Abbildung 17: Effekt von Catalase auf den ICP-Anstieg in der durch PCW induzierten Meningitis ($p = n.s.$; Mann-Whitney-U-Tests).

Im Vergleich zum maximalen Anstieg des ICP um $12,5 \pm 0,7$ cmH₂O bei alleiniger Applikation von PCW lag der Höchstwert bei zusätzlicher Behandlung mit Catalase bei $10,0 \pm 1,2$ cmH₂O ($p = 0,10$). Auch die zeitliche Entwicklung des ICP-Anstiegs war in beiden Gruppen nahezu identisch. Abbildung 18 fasst die Maximalwerte des ICP-Anstiegs während der gesamten Versuchsdauer in Abhängigkeit von auslösendem Agens und den pharmakologischen Interventionen zusammen.

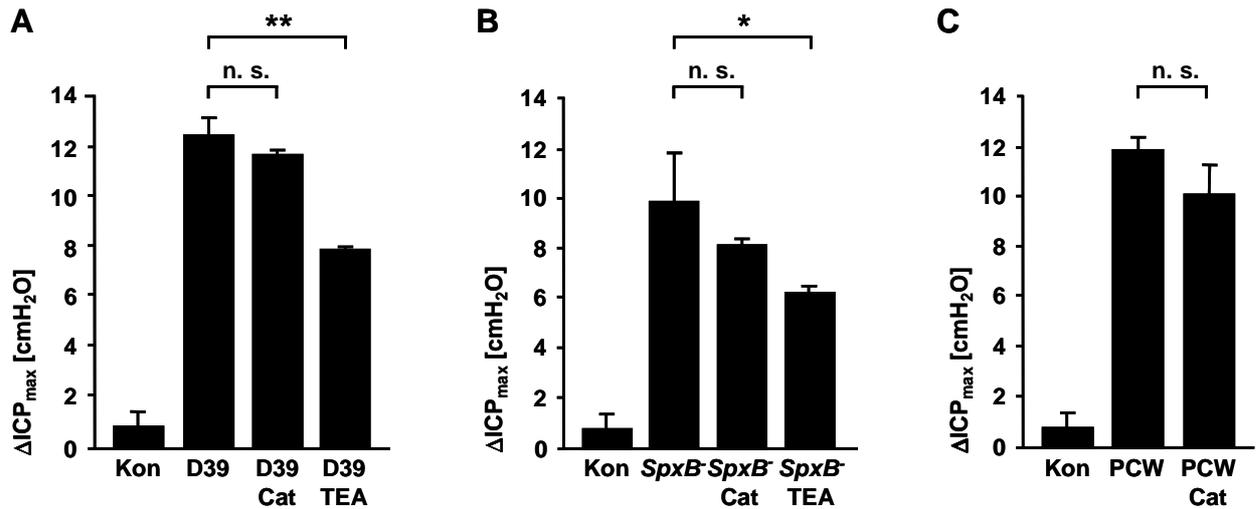


Abbildung 18: Synopsis der Effekte von Catalase bzw. TEA auf den ICP-Anstieg nach Infektion mit A: D39, B: *SpxB*, C: PCW (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ versus D39 allein; A: parametrische ANOVA, Student-Newman-Keuls *post hoc* Tests; B: Kruskal-Wallis ANOVA, Dunn's *post-hoc* Tests; C: Mann-Whitney-U-Test).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Befunde

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das von lebenden Pneumokokken produzierte Wasserstoffperoxid einen von endogenen Vasodilatoren eindeutig zu differenzierenden Einfluss auf die Regulation des zerebralen Blutflusses in der Frühphase der Pneumokokkenmeningitis ausübt und welchen Anteil dieser Mechanismus an der meningitisassoziierten Blutflusszunahme hat. Zudem sollte untersucht werden, inwieweit bakteriell gebildetes H_2O_2 zur Entstehung der intrakraniellen Hypertension beiträgt.

Zur Klärung dieser Fragen wurde in einem etablierten Rattenmodell einerseits die durch H_2O_2 produzierende Wildtyp-Pneumokokken (D39) ausgelöste Meningitis mit einer Inflammationsauslösung durch H_2O_2 -defiziente Pneumokokken (*SpxB*) sowie durch aufgereinigte Pneumokokkenzellwände verglichen. Andererseits wurden in Form von Catalase und TEA zwei pharmakologische Strategien eingesetzt, die die Wirkungen von H_2O_2 auf die zerebrale Zirkulation hemmen sollten. Nach Infektion mit *SpxB* waren im Vergleich zu D39 keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Bakteriendichte (CFU) oder der Konzentration der Leukozyten im Liquor festzustellen.

Wie aus früheren Untersuchungen bekannt, zeigte sich in den mit H_2O_2 -produzierenden Wildtyp-Pneumokokken infizierten Ratten ein erheblicher Anstieg des mittels Laserdoppler (LDF) gemessenen rCBF, der bereits nach etwa 30 Minuten einsetzte und innerhalb der Versuchsdauer zu einer Steigerung auf mehr als das Doppelte führte. Auch die H_2O_2 -defiziente Pneumokokkenmutante *SpxB* sowie die ebenfalls kein H_2O_2 produzierende Pneumokokkenzellwandpräparation (PCW) führten nach intrathekalen Applikation zu einem Anstieg des regionalen zerebralen Blutflusses, der jedoch signifikant geringer ausfiel als bei Verwendung der Wildtyp-Pneumokokken. Dabei bewirkten PCW eine deutlich stärkere Zunahme des rCBF als *SpxB* mit ähnlich frühem Beginn wie bei Infektion mit D39, während *SpxB* nur einen schwachen und verzögerten rCBF-Anstieg induzierte. Der Einsatz von Catalase zum enzymatischen Abbau von Wasserstoffperoxid führte lediglich bei Meningitisinduktion mit D39 zu einer deutlichen Reduktion des Blutflussanstiegs, während bei Verwendung von *SpxB* oder PCW kein

signifikanter Effekt beobachtet wurde. Ebenso verminderte die Blockade der calciumabhängigen Kaliumkanäle mittels TEA nur bei Infektion mit Wildtyp-Pneumokokken die Blutflusszunahme, nicht aber bei Infektion mit *SpxB*.

Weiterhin war nach Infektion mit D39 ein erheblicher Anstieg des intrakraniellen Druckes festzustellen. Im Vergleich hierzu führten die intrathekale Applikation von *SpxB* zu einem geringeren sowie die Applikation von PCW zu einem verzögerten Anstieg des ICP. Catalase zeigte unabhängig vom meningitisauslösenden Agens keinen signifikanten Effekt auf die ICP-Entwicklung. TEA verminderte den ICP-Anstieg nach Infektion mit D39, während bei Verwendung von *SpxB* keine weitere Reduktion des ICP-Anstiegs nachweisbar war.

4.2 Regulation des regionalen zerebralen Blutflusses

4.2.1 Intrakranielle Hyperämie durch bakterielles Wasserstoffperoxid

Wichtigstes Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass das von Wildtyp-Pneumokokken gebildete H_2O_2 einen direkten modulierenden Effekt auf den zerebralen Blutfluss hat. Dies ergibt sich einerseits aus dem erheblich reduzierten rCBF-Anstieg bei Infektion mit H_2O_2 -defizienten Pneumokokken im Vergleich zum Wildtyp, andererseits aus der diesbezüglich protektiven Wirkung von Catalase und TEA in der durch D39 ausgelösten Meningitis. Im direkten Vergleich mit den mit D39 infizierten Tieren war bei Meningitisinduktion der rCBF-Anstieg um etwa 70 % reduziert. Eine gegenüber D39 abgeschwächte Virulenz von *SpxB* (Spellerberg 1996) kann als Ursache hierfür ausgeschlossen werden, da beide Stämme zu äquivalenten Bakterien- und Leukozytenkonzentrationen im Liquor führten.

Die Behandlung mit Catalase reduzierte den Blutflussanstieg in der D39-induzierten Meningitis um etwa 64 %, während TEA eine Reduktion um etwa 76 % bewirkte. Während Catalase den Abbau von H_2O_2 katalysiert, blockiert TEA calciumabhängige Kaliumkanäle (K_{Ca}), welche durch H_2O_2 geöffnet werden und über eine Aktivierung der Guanylatcyclase in der glatten Gefäßmuskulatur die H_2O_2 -induzierte Vasodilatation vermitteln (Sobey 1997, Sobey 1998, Iida 2000, Liu 2002, Wei 1990).

Zusammen sprechen diese Befunde daher dafür, dass im verwendeten Modell der durch D39 ausgelösten Meningitis etwa zwei Drittel der Hyperämie in der frühen Phase auf bakteriell produziertes H_2O_2 zurückzuführen sind. Weiterhin unterstützt insbesondere der ausgeprägte Effekt von TEA - entsprechend dem geschilderten Wirkmechanismus - die Annahme, dass die Blutflusssteigerung durch eine direkte Wirkung des bakteriellen H_2O_2 an den Blutgefäßen vermittelt wird.

4.2.2 Hyperämie im Rahmen der Entzündungsreaktion

In den mit *SpxB* infizierten Tieren wie auch nach Behandlung der mit D39 infizierten Ratten mit Catalase oder TEA war der meningitisassoziierte rCBF-Anstieg nicht zur Gänze aufgehoben. Vielmehr blieb etwa ein Drittel der bei unbehandelter Infektion mit D39 beobachteten Blutflusszunahme nachweisbar. Als Ursache dieser verbleibenden, somit von bakterieller H_2O_2 -Produktion unabhängigen Hyperämie sind wirtsseitige vasodilatierende Mechanismen im Rahmen der Entzündungsreaktion zu vermuten. Vasoaktive Substanzen werden während der bakteriellen Meningitis u.a. von aktivierten Leukozyten, aber auch von aktivierten Endothelzellen (Freyer 1999) sezerniert. Hierunter befinden sich Stickstoffmonoxid, Neuropeptide und Kinine (Pfister 1995, Lorenzl 1996, Paul 1997), möglicherweise aber auch endogenes H_2O_2 (Pfister 1992).

Insbesondere die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) als Vasodilatator ist intensiv untersucht worden. Vermittelt durch die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) bewirkt NO eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Moncada 1997). Die Synthese von NO durch Umsetzung von Arginin zu Citrullin wird von einer Familie von NO-Synthasen katalysiert (Nathan, Xie 1994). Unter physiologischen Bedingungen werden niedrige Konzentrationen von NO von der konstitutiv exprimierten neuronalen und endothelialen Isoform (nNOS und eNOS) gebildet und tragen u.a. zur basalen Regulation des Gefäßtonus bei. Die Aktivität dieser Isoformen wird durch das Calcium/Calmodulin-System kontrolliert. Im Kontext der Inflammation kommt es zur Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) insbesondere in Entzündungszellen. iNOS bildet NO unabhängig von Calcium/Calmodulin in supraphysiologischer Konzentration, so dass es als zytotoxisches Radikal an der Bekämpfung von Krankheitserregern mitwirkt. In einem Rattenmodell der Pneumokokkenmeningitis wurde gezeigt, dass ein Teil der pialen

Vasodilatation durch iNOS-abhängig synthetisiertes NO vermittelt wird (Paul 1997). Andere experimentelle Befunde belegen, dass auch die Freisetzung der Neuropeptide Substanz P und Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) aus aktivierten Schmerzfasern in den Meningen relevant an der Entstehung der Hyperämie beteiligt ist (Hoffmann 2002).

Weiterhin wurde bereits vor längerer Zeit die Vermutung geäußert, dass von aktivierten Phagozyten gebildetes H₂O₂ einen erheblichen Beitrag zur Blutflusszunahme in der Meningitis leistet (Pfister 1992). Grundlage dieser Vermutung war die den hier vorgelegten Ergebnissen ähnliche Beobachtung, dass in einem Rattenmodell die Zunahme des zerebralen Blutflusses nach Meningitisinduktion mit Wildtyp-Pneumokokken durch Behandlung mit Catalase signifikant reduziert werden konnte. Eine Differenzierung von bakterieller und wirtsseitiger Herkunft des H₂O₂ war im Versuchsaufbau dieser früheren Experimente jedoch nicht möglich. Die in der vorliegenden Arbeit gemachte Beobachtung, dass durch Catalase oder TEA keine weitere Reduktion des rCBF-Anstiegs nach Infektion mit *SpxB* erzielt wurde, spricht gegen einen relevanten Beitrag von wirtsseitig produziertem H₂O₂ zur zerebralen Hyperämie in der Meningitis. Dennoch wurden weitere Experimente durchgeführt, die isoliert die wirtsseitige Inflammation betrachten und eindeutigen Aufschluss über einen möglichen Beitrag von wirtsseitig produziertem H₂O₂ geben sollten.

4.2.3 Inflammation durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems

Die Erkennung bakterieller Krankheitserreger durch das angeborene Immunsystem beruht auf der Bindung evolutionär konservierter molekularer Motive der Pathogene, sogenannter pathogen-associated molecular patterns (PAMP), an spezifische pattern recognition-Rezeptoren (PRR) auf immunkompetenten Zellen (Janeway 2002, Akira 2006). Anders als in der adaptiven Immunität ist ein früherer Antigenkontakt (Immunisierung) hierzu nicht erforderlich. Wie eingangs dargestellt sind im Falle der Pneumokokken wichtige PAMP Peptidoglykane, Lipoteichonsäuren und bakterielle Lipopeptide der inneren Bakterienzellwand, die durch den Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) erkannt werden (Takeda 2002, Schröder 2003, Weber 2003). Eigene Untersuchungen (Hoffmann, Becker 2007) belegen die außerordentliche Potenz des TLR2-abhängigen Signalweges zur Induktion einer akuten Meningitis. Die inflammationsauslösende

Wirkung der bakteriellen Zellwandkomponenten wurde in ergänzenden Experimenten genutzt, um isoliert die wirtsseitigen Aspekte der bakteriellen Meningitis zu untersuchen. Hierzu wurde nach einem standardisierten Protokoll eine Präparation aus aufgereinigten Zellwandbestandteilen hitzeinaktivierter Pneumokokken (PCW) hergestellt. Diese Präparation löst nach intrathekalen Injektion zuverlässig eine meningeale Inflammation aus (Tuomanen 1989), ist jedoch frei von H₂O₂-Bildung und sonstiger bakterieller Stoffwechselaktivität.

Erwartungsgemäß zeigten sich nach intrathekalen Applikation von PCW in den Ratten eine deutliche Liquorpleozytose sowie ein Anstieg von rCBF und ICP. Zur Klärung des Beitrages von endogenem H₂O₂ wurde auch in diesem Modell zusätzlich Catalase eingesetzt. Anders als bei der Infektion mit Wildtyp-Pneumokokken zeigte sich jedoch kein Effekt auf die PCW-induzierte Steigerung des rCBF. Diese Befunde sprechen erneut gegen einen relevanten Beitrag von wirtsseitig produziertem H₂O₂ zu der frühen Hyperämie in der bakteriellen Meningitis. Die von Pfister et al. (Pfister 1992) gegebene Interpretation des Catalase-Effekts auf den rCBF in der Pneumokokkenmeningitis muss daher revidiert werden.

Im Vergleich zur durch lebende Wildtyp-Pneumokokken induzierten Meningitis fiel der rCBF-Anstieg bei Verwendung von PCW zwar signifikant geringer aus, die Reduktion machte jedoch nur etwa 21 % der bei D39 beobachteten rCBF-Zunahme aus. Zudem war der rCBF-Anstieg deutlich ausgeprägter als bei Infektion mit *SpxB* oder nach Blockade der H₂O₂-vermittelten Effekte von D39 mittels Catalase bzw. TEA. Diese Beobachtungen sprechen für einen bei PCW im Vergleich zu lebenden Pneumokokken deutlich stärker ausgeprägten Beitrag wirtsseitiger Mediatoren.

Wie oben diskutiert basiert die Aktivierung des angeborenen Immunsystems während einer Infektion auf dem Kontakt der wirtsseitigen PRR mit den PAMP des Krankheitserregers. Im Falle der Pneumokokken befinden sich die teichonsäurehaltigen Peptidoglykane und bakteriellen Lipopeptide, die als wichtigste PAMP dieser Erreger angesehen werden (Weber 2003), an der Innenseite der Bakterienzellwand. Zwei weitere bekannte PAMP, nämlich das von TLR4 erkannte Pneumolysin (Malley 2003) und CpG-haltige DNA (Albiger 2007), befinden sich im Zellinneren. Hieraus ergibt sich, dass die PAMP lebender Pneumokokken, die im Falle von D39 und *SpxB* zudem noch von einer Polysaccharidkapsel umgeben sind, dem angeborenen Immunsystem

zunächst nicht zugänglich sind, sondern erst nach Lyse der Bakterien mit den PRR in Kontakt treten können. Im hier verwendeten Modell erfolgt keine antibiotische Behandlung, so dass die Pneumokokken erst nach Durchlaufen einer logarithmischen Wachstumsphase durch Aktivierung des endogenen Zytolysins LytA in Autolyse gehen. Während somit bei der Infektion mit lebenden D39 bzw. *SpxB* relevante PAMP-Konzentrationen erst verzögert erreicht werden können, liegen diese in der PCW-Präparation aufgereinigt in hoher Konzentration vor (Garcia-Bustos 1987).

Daher steht zu vermuten, dass der bei PCW im Vergleich zu *SpxB* ausgeprägtere und frühere Anstieg des rCBF auf einem stärkeren und unmittelbaren stimulierenden Effekt auf das Immunsystem beruht. Als unterstützendes Indiz hierfür kann die bei D39 mit 3435/ μ l im Vergleich zu 5125/ μ l bei PCW etwas geringere mittlere Leukozytenkonzentration im Liquor nach 6 Stunden angeführt werden. Der Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant. Eine weitere Übereinstimmung besteht mit der Beobachtung, dass die klinische Erkrankungsschwere bei bakterieller Meningitis mit der im Liquor nachweisbaren Konzentration wichtiger bakterieller Zellwandbestandteile korreliert (Schneider 1999).

4.2.4 Komplementäre Mechanismen der frühen Hyperämie

In der Konklusion beruht somit der etwa gleich ausgeprägte rCBF-Anstieg in den ersten 6 Stunden nach Stimulation mit D39 und PCW vermutlich auf komplementären Mechanismen. Bei den Wildtyp-Pneumokokken überwiegt in dieser Frühphase die Vasodilatation durch bakteriell produziertes H_2O_2 , während wirtsseitige Mediatoren erst mit der verzögert einsetzenden Inflammationsantwort wirksam werden. Hingegen ist der rCBF-Anstieg bei PCW auf eine unmittelbar einsetzende massive Aktivierung des Immunsystems zurückzuführen, während bakterielles H_2O_2 nicht vorhanden ist. Der deutlich schwächere Blutflusseffekt von *SpxB* wäre dagegen sowohl auf das Fehlen der bakteriellen, H_2O_2 -vermittelten Komponente als auch auf die erst verzögert eintretende Aktivierung wirtsseitiger Mechanismen zurückzuführen.

4.3 Entwicklung des intrakraniellen Druckes (ICP)

Die intrakranielle Hypertension mit dem Risiko der zerebralen Herniation stellt eine der häufigsten und schwerwiegendsten Komplikationen in der Akutphase der bakteriellen Meningitis im Allgemeinen und der Pneumokokkenmeningitis im Besonderen dar (Weisfelt 2006). Gemäß der Monro-Kellie-Doktrin wird der Hirndruck durch die intrakraniellen Volumina von Gewebe, Liquor und Blut bestimmt. In der bakteriellen Meningitis kommt es zu einer Volumenzunahme aller drei Kompartimente. Durch die aktive Öffnung der Blut-Hirn-Schranke im Rahmen der Entzündungsreaktion sowie die gefäßschädigenden Effekte bakterieller und wirtseigener Toxine entsteht ein vasogenes Hirnödem. Sekundäre Parenchymschäden, z.B. infolge von Vasospasmen, können zusätzlich ein zytotoxisches Hirnödem zur Folge haben. Die schwere Störung der Liquorschrankenfunktion führt regelhaft zu einem massiven Anstieg der Liquoreiweißkonzentration, der die Liquorrückresorption in den Pacchioni'schen Granulationen behindert. Entzündliche Veränderungen des Plexusependyms können zudem zu einer gesteigerten Liquorproduktion führen. Schließlich wird eine intrakranielle Hyperämie als ein wesentlicher hirndrucksteigernder Faktor angesehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde bakterielles H_2O_2 als ein Faktor identifiziert, der erheblich zu der akuten Steigerung der zerebralen Perfusion in den ersten Stunden einer durch Wildtyp-Pneumokokken ausgelösten Meningitis beiträgt. Diskrepanz zu der ausgeprägten Reduktion des rCBF-Anstiegs um etwa 70 % zeigte sich bei Verwendung von *SpxB* im Vergleich zu D39 lediglich eine um 21 % geringere Zunahme des intrakraniellen Druckes. Weiterhin verhinderte die Behandlung mit Catalase oder TEA in der D39-induzierten Meningitis jeweils etwa 2/3 des rCBF-Anstiegs. Catalase hatte jedoch keine signifikante Reduktion des Hirndruckanstiegs zur Folge, während TEA mit einer Abnahme von etwa 37 % eine nur bescheidene Wirkung zeigte.

Diese Beobachtungen legen nahe, dass bakterielles H_2O_2 im vorliegenden experimentellen Modell während der ersten 6 Stunden einen untergeordneten Beitrag zur Hirndruckentstehung leistet. Vielmehr ist von einer zentralen Bedeutung der wirtsseitigen Inflammationsreaktion für die Hirndruckentstehung in dieser Phase auszugehen (Tuomanen 1989, Weber 1995). Hierfür spricht auch der deutliche Anstieg des ICP in den mit PCW stimulierten Tieren. In den mit lebenden Bakterien infizierten Tieren sind zudem H_2O_2 -unabhängige Toxine zu bedenken, die zur Entwicklung eines

vasogenen oder zytotoxischen Hirnödems beitragen können. Hier ist in erster Linie das Exotoxin Pneumolysin zu nennen, welches als porenformendes Zytolysin Zellwandschäden induziert und nach Translokation an Mitochondrien zur AIF-abhängigen Apoptose der Zellen führt (Braun 2002, Braun 2007).

Neben der hier erstmals gezeigten vasoaktiven Wirkung gehen von bakteriellem H₂O₂ auch zytotoxische Effekte aus (Braun 2002). Die gewebeschädigende Wirkung wird dabei zumindest partiell durch Interaktion mit wirtsseitig gebildetem NO durch Bildung des gemeinsamen Reaktionsproduktes Peroxynitrit vermittelt (Hoffmann 2006). Analog zum bereits Diskutierten sprechen die geringe Wirksamkeit von Catalase bei Infektion mit Wildtyp-Pneumokokken sowie der gegenüber D39 nur gering reduzierte Hirndruckanstieg bei Meningitisinduktion mit *SpxB* dafür, dass auch eine mögliche Gewebsschädigung durch bakterielles H₂O₂ in den ersten 6 Stunden nur wenig zur Hirndruckentwicklung beiträgt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Mit den beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das von lebenden Pneumokokken gebildete H_2O_2 einen wesentlichen Anteil der in der Frühphase (6 Stunden) der experimentellen Meningitis beobachteten Zunahme des regionalen zerebralen Blutflusses verursacht. Die Antagonisierbarkeit durch den spezifischen Kanalblocker TEA spricht für einen direkten vasodilatierenden Effekt des bakteriellen H_2O_2 durch Aktivierung von calciumabhängigen Kaliumkanälen der glatten Gefäßmuskulatur. Hiermit wurde einerseits eine neuartige Funktion von bakteriell produziertem H_2O_2 beschrieben, das bislang als Pneumokokken-Exotoxin mit oxidativ zellschädigender Wirkung bekannt war. Zum anderen wurde ein neuartiger Mechanismus beschrieben, der gemeinsam mit wirtsseitig vermittelten Effekten zur intrakraniellen Hyperämie in der Pneumokokkenmeningitis beiträgt. Diese spezifische Regulation des Vasotonus durch ein bakterielles Stoffwechselprodukt stellt einen über die bakterielle Meningitis hinaus neuartigen Befund dar, der auch bei anderen invasiven Infektionen durch H_2O_2 -produzierende Streptokokken (Sepsis, Pneumonie) von pathophysiologischer Relevanz sein kann. Insbesondere in der Sepsis trägt die Vasodilatation bekanntermaßen zur Entstehung von Organdysfunktionen bei (Hotchkiss 2003).

Als weiterer Gesichtspunkt ist die auffällige Diskordanz zwischen der wichtigen Bedeutung von bakteriellem H_2O_2 für die Steigerung des regionalen zerebralen Blutflusses einerseits und seinem nur geringen Beitrag zur intrakraniellen Hypertension andererseits zu nennen. Hier ergeben sich weiterführende Fragen, da der Hyperämie abgesehen von der rein physikalisch durch Zunahme des intrakraniellen Blutvolumens bedingten Hirndrucksteigerung auch eine eigenständige proinflammatorische Rolle zukommt. Angesichts des artifiziellen Infektionsmodus und der beschleunigten Krankheitsentwicklung im verwendeten Modell ist ein direkter Rückschluss auf die ambulant erworbene Pneumokokkenmeningitis des Menschen problematisch. Zudem dürfte der Nutzen von Catalase zur Antagonisierung des bakteriellen H_2O_2 in Patienten begrenzt ausfallen, da die zugrunde liegenden bakteriellen Stoffwechselprozesse kurz nach Beginn einer üblichen bakteriolytischen Chemotherapie irrelevant werden. Ein Einsatz von TEA kann angesichts des ausgeprägten hypotensiven Effektes wegen der Gefahr einer kritischen Erniedrigung des CPP in der Meningitis ohnehin nicht empfohlen werden.

Literaturverzeichnis

- Acheson GH, Moe GK. The action of Tetraethylammonium ion on the mammalian circulation. *J Pharmacol Exp Therap* 1946;87:220-236.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
- Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, et al. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol* 2007;9:633-644.
- Aronin SI, Peduzzi P, Quagliarello VJ. Community-acquired bacterial meningitis: risk stratification for adverse clinical outcome and effect of antibiotic timing. *Ann Intern Med* 1998;129:862-869.
- Berpohl D, Halle A, Freyer D, et al. Bacterial programmed cell death of cerebral endothelial cells involves dual death pathways. *J Clin Invest* 2005;115:1607-1615.
- Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, et al. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet* 2004;363:1871-1872.
- Bohr V, Hansen B, Kjersem H, et al. Sequelae from bacterial meningitis and their relation to the clinical condition during acute illness, based on 667 questionnaire returns. Part II of a three part series. *J Infect* 1983;7:102-110.
- Braun JS, Sublett JE, Freyer D, et al. Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest* 2002;109:19-27.
- Braun JS, Hoffmann O, Schickhaus M, et al. Pneumolysin Causes Neuronal Cell Death through Mitochondrial Damage. *Infection and Immunity* 2007;75:4245-4254.
- Bridy-Pappas AE, Margolis MB, Center KJ, et al. *Streptococcus pneumoniae*: description of the pathogen, disease epidemiology, treatment, and prevention. *Pharmacotherapy* 2005;25:1193-1212.

-
- Bruyn GA und van Furth R. Pneumococcal polysaccharide vaccines: indications, efficiency and recommendations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:897-910.
- De Gans J, van de Beek D. European Dexamethasone in Adulthood Bacterial Meningitis Study Investigators. Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2002;347:1549-1556.
- Van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, et al. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2004;351:1849-1859.
- De Lencastre H, Brown AE, Chung M. Role of transposon Tn5482 in the epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in the paediatric oncology unit of a New York City Hospital. *Microb Drug Res* 1999;5:113-129.
- De Louvois J, Harvey D, Halket S. The effect of meningitis in infancy on school-leaving examination results. *Arch Dis Child* 2007;92:959-962.
- Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M, et al. Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by Laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:589-596.
- Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, et al. Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med* 1993;328:21-28.
- Engel S. The choroid plexus in the origin of tuberculous meningitis. *J Path Bacteriol* 1944;56:115-121.
- Faustini A, Fano V, Sangalli M, et al. Estimating incidence of bacterial meningitis with capture-recapture method, Lazio Region, Italy. *Eur J Epidemiol* 2000;16:843-848.
- Freyer D, Manz R, Ziegenhorn A, et al. Cerebral endothelial cells release TNF-alpha after stimulation with cell walls of *Streptococcus pneumoniae* and regulate inducible nitric oxide synthase and ICAM-1 expression via autocrine loops. *J Immunol* 1999;163:4308-4314.

-
- Garcia-Bustos JF, Chait BT, Tomasz A. Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. *J Biol Chem* 1987;262:15400-15405.
- Haberl RL, Heizer ML, Marmarou A, et al. Laser Doppler assessment of the brain circulation. *Am J Physiol* 1989;256:HH1247-1254.
- Hava DL, LeMieux J, Camilli A. From nose to lung: the regulation behind *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol* 2003;50:1103-1110.
- Hoffmann O, Keilwerth N, Bille MB, et al. Triptans reduce the inflammatory response in bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:988-996.
- Hoffmann O, Zweigner J, Smith SH, et al. Interplay of pneumococcal hydrogen peroxide and host-derived nitric oxide. *Infect Immun* 2006;74:5058-5066.
- Hoffmann OM, Becker D, Weber JR. Bacterial hydrogen peroxide contributes to cerebral hyperemia during early stages of experimental pneumococcal meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:1792–1797.
- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-150.
- Iida Y, Katusic ZS. Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen peroxide. *Stroke* 2000;31:2224-2230.
- Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
- Kim KS. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:376-385.
- Koedel U, Scheld WM, Pfister HW. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* 2002;2:721-736.

-
- Lacks S, Hotchkiss RD. A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. *Biochem Biophys Acta* 1960 Apr 22;39:508-518.
- Leib SL, Tauber MG. Pathogenesis of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am* 1999;13:527-548.
- Lindauer U, Villringer A, Dirnagl U. Characterization of CBF response to somatosensory stimulation: model and influence of anaesthetics. *Am J Physiol* 1993;264:H1223-1228.
- Liu Y, Gutterman DD. Oxidative stress and potassium channel function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29:305-311. Review.
- López R, Garcia JL, Garcia E. Structural analysis and biological significance of the cell wall lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophage. *FEMS Microbiology Letters* 1992;100:439-447.
- Lorenzl S, Koedel U, Frei K, et al. Effect of the bradykinin B2 receptor antagonist Hoe140 in experimental pneumococcal meningitis in the rat. *Eur J Pharmacol* 1996;308:335-341.
- Lysenko ES, Ratner AJ, Nelson AL, et al. The role of innate immune responses in the outcome of interspecies competition for colonization of mucosal surfaces. *PLoS Pathog* 2005;1:e1.
- Malley R, Henneke P, Morse SC, et al. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:1966-1971.
- Masuda K, Masuda R, Nishi J, et al. Incidences of nasopharyngeal colonization of respiratory bacterial pathogens in Japanese children attending day-care centers. *Pediatr Int* 2002;44:376-380.
- McCullers JA. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19:571-578.
-

-
- Moncada S. Nitric Oxide in the Vasculature: Physiology and Pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci* 1997;811:60-69.
- Morona JK, Paton JC, Miller DC, et al. Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in streptococcus pneumoniae. *Mol Microbiol* 2000;35:1431-1442.
- Nathan C, Xie Q. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994;269:13725–13728.
- Nau R, Bruck W. Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci* 2002;25:38-45.
- Paterson GK, Blue CE, Mitchell TJ. Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Med Microbiol* 2006;55:355-363.
- Paul R, Koedel U, Pfister HW. 7-Nitroindazole inhibits pial arteriolar vasodilation in a rat model of pneumococcal meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17:985-991.
- Pericone CD, Overweg K, Hermans PW, et al. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect Immun* 2000;68:3990-3997.
- Pfister HW, Koedel U, Dirnagl U, et al. Effect of catalase on regional cerebral blood flow and brain edema during the early phase of experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 1992;166:1442-1445.
- Pfister HW, Feiden W, Einhäupl KM. Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults. Results of a prospective clinical study. *Arch Neurol* 1993;50:575-581.
- Pfister HW, Kumpfel T, Koedel U. Involvement of substance P in pial arteriolar vasodilation during pneumococcal meningitis in the rat. *Neuroreport* 1995;6:1301-1305.

-
- Quagliarello VJ, Scheld WM. Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology and progress. *N Engl J Med* 1992;327:864-872.
- Ring A, Weisser JN, Tuomanen EI. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* 1998;102:347-360.
- Ross KL, Tyler KL. Bacterial Meningitis and other suppurative infections. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. *Harrison's principles of internal medicine*. New York: McGraw-Hill 2001:2462-2471.
- Scheld WM, Park TS, Dacey RG, et al. Clearance of bacteria from cerebrospinal fluid to blood in experimental meningitis. *Infect Immun* 1979;24:102-105.
- Scheld WM, Dacey RG, Winn HR, et al. Cerebrospinal fluid outflow resistance in rabbits with experimental meningitis. Alterations with penicillin and methylprednisolone. *J Clin Invest* 1980;66:243-253.
- Schneider O, Michel U, Zysk G, et al. Clinical outcome in pneumococcal meningitis correlates with CSF lipoteichoic acid concentrations. *Neurology* 1999;53:1584-1587.
- Schröder NW, Morath S, Alexander C, et al. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 2003;278:15587-15594.
- Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, et al. Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *N Engl J Med* 1997;337:970-976.
- Skarphedisson JO, Harding H, Thoren P. Repeated measurements of cerebral blood flow in rats. Comparisons between the hydrogen clearing method and laser Doppler flowmetry. *Acta Physiol Scand* 1988;134:133-142.

-
- Sobey CG, Heistad DD, Faraci FM. Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K⁺ channels. *Stroke* 1997;28:2290-2294.
- Sobey CG, Heistad DD, Faraci FM. Potassium channels mediate dilatation of cerebral arterioles in response to arachidonate. *Am J Physiol* 1998; 275:H1606-1612.
- Spellerberg B, Cundell DR, Sandros J, et al. Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1996;19:803-813.
- Takeda K, Takeuchi O, Akira S. Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2002;8:459-463.
- Täuber MG, Moser B. Cytokines and chemokines in meningeal inflammation: biology and clinical implications. *Clin Infect Dis* 1999;28:1-11.
- Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, et al. The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J Infect Dis* 1985;151:859-868.
- Tuomanen EI, Saukkonen K, Sande S, et al. Reduction of inflammation, tissue damage, and mortality in bacterial meningitis in rabbits treated with monoclonal antibodies against adhesion-promoting receptors of leukocytes. *J Exp Med* 1989;170:959-969.
- Tuomanen E. Entry of pathogens into the central nervous system. *FEMS Microbiol Rev.* 1996;18:289-299.
- Turett GS, Blum S, Telzak EE. Recurrent pneumococcal bacteremia: risk factors and outcomes. *Arch Intern Med* 2001;16:2141-2144.
- Turowski P, Adamson P, Greenwood J. Pharmacological targeting of ICAM-1 signaling in brain endothelial cells: potential for treating neuroinflammation. *Cell Mol Neurobiol* 2005;25:153-170.

-
- Weber JR, Angstwurm K, Bürger W, et al. Anti ICAM-1 (CD54) monoclonal antibody reduces inflammatory changes in experimental bacterial meningitis. *J Neuroimmunol* 1995;63:63-68.
- Weber JR, Moreillon P, Tuomanen EI. Innate sensors for Gram-positive bacteria. *Curr Opin Immunol* 2003;15:408-415.
- Wei EP, Kontos HA. H₂O₂ and endothelium-dependent cerebral arteriolar dilation. Implications for the identity of endothelium-derived relaxing factor generated by acetylcholine. *Hypertension* 1990;16:162-169.
- Weisfelt M, Hoogman M, van de Beek D, et al. Dexamethasone and long-term outcome in adults with bacterial meningitis. *Annals of Neurology* 2006;60:456-468.
- Zwijnenburg PJ, van der Poll T, Roord JJ, et al. Chemotactic factors in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis. *Infect Immun* 2006;74:1445-1451.
- Zysk G, Bruck W, Huitinga I, et al. Elimination of blood-derived macrophages inhibits the release of interleukin-1 and the entry of leukocytes into the cerebrospinal fluid in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuroimmunol* 1997;73:77-80.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einige Virulenzfaktoren von <i>S. pneumoniae</i>	7
Tabelle 2:	Verwendete Pneumokokkenstämme.....	11
Tabelle 3:	Medien und Lösungen zur Pneumokokkenanzucht.....	12
Tabelle 4:	Übersicht über die durchgeführten auswertbaren und nicht auswertbaren Versuche	20
Tabelle 5:	Effekt von TEA auf den mittleren arteriellen Blutdruck	22
Tabelle 6:	Physiologische Basisparameter	22

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Rattenmodells der Meningitis.	16
Abbildung 2: Schematische Darstellung der präparierten Kalotte.....	18
Abbildung 3: Mittlerer arterieller Blutdruck der mit D39, <i>SpxB</i> ⁻ und PCW behandelten Versuchstiere sowie der mit PBS behandelten Kontrollgruppe.....	24
Abbildung 4: Vergleich des mittleren arteriellen Blutdruckes aller Versuchstiere ohne TEA-Behandlung und aller mit TEA behandelten Versuchstiere.....	24
Abbildung 5: Konzentration von Leukozyten und Bakterien im Liquor 6 Stunden nach intrathekaler Infektion	25
Abbildung 6: Leukozytenkonzentration im Liquor in Abhängigkeit von auslösendem Agens und pharmakologischer Intervention nach 6-stündigem Experiment	26
Abbildung 7: Anstieg des rCBF während der Meningitis.....	26
Abbildung 8: Anstieg des LDF in der D39-induzierten Meningitis sowie bei Behandlung mit Catalase oder TEA.....	29
Abbildung 9: Effekte von Catalase und TEA auf die Zunahme des rCBF in der durch <i>SpxB</i> ⁻ ausgelösten Meningitis.....	30
Abbildung 10: Anstieg des Laser-Doppler-Flusses in der durch PCW ausgelösten Meningitis und Effekt der zusätzlichen Behandlung mit Catalase.....	30
Abbildung 11: Maximale Zunahme des rCBF in Kontrollen sowie nach Meningitisinduktion mit D39, <i>SpxB</i> ⁻ und PCW	31
Abbildung 12: Maximale Zunahme des rCBF in Abhängigkeit von auslösendem Agens und zusätzlicher Behandlung mit Catalase bzw. TEA	31
Abbildung 13: Anstieg des intrakraniellen Druckes nach Meningitisauslösung.....	32

Abbildung 14: Maximaler Hirndruckanstieg in den Kontrollen sowie in der durch D39, <i>SpxB</i> bzw. PCW ausgelösten Meningitis	34
Abbildung 15: Effekt von Catalase und TEA auf den ICP-Anstieg in der D39-induzierten Meningitis	35
Abbildung 16: Effekt von Catalase und TEA auf den ICP-Anstieg in der durch <i>SpxB</i> induzierten Meningitis.....	36
Abbildung 17: Effekt von Catalase auf den ICP-Anstieg in der durch PCW induzierten Meningitis	36
Abbildung 18: Synopsis der Effekte von Catalase bzw. TEA auf den ICP-Anstieg.....	37

Abkürzungsverzeichnis

A. femoralis	Arteria femoralis
AIF	Apoptosis-inducing factor
C+Y	Casein-Yeast-Flüssigmedium
CFU	Colony forming units (koloniebildende Einheiten)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptide
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CPP	Cerebral perfusion pressure (zerebraler Perfusionsdruck)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EtCO ₂	endexpiratorischer Kohlendioxidgehalt der Atemluft
ICP	Intracranial pressure (intrakranieller Druck)
iE	internationale Einheiten
IgA	Immunglobulin A
iNOS	induzierbare NO-Synthase
K _{Ca}	calciumabhängiger Kaliumkanal
KG	Körpergewicht
LDF	Laser-Doppler-Fluss
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
n. s.	nicht signifikant
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NOS	NO-Synthase
OD	optische Dichte
PAF	plättchenaktivierender Faktor

PAMP	pathogen-associated molecular patterns (pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck der Atemluft
paCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PCW	Pneumococcal cell walls (Pneumokokkenzellwandbestandteile)
PE	Polyethylen
paO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PRR	pattern-recognition receptors
rCBF	regional cerebral blood flow (regionaler zerebraler Blutfluss)
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SaO ₂	arterielle Sauerstoffsättigung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEA	Tetraethylammonium
TLR	Toll-like Rezeptor
V. femoralis	Vena femoralis

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Hoffmann OM, Becker D, Weber JR. Bacterial hydrogen peroxide contributes to cerebral hyperemia during early stages of experimental pneumococcal meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:1792–1797.

Hoffmann O, Braun JS, Becker D, Halle A, Freyer D, Dagand E, Lehnardt S, Weber JR. TLR2 Mediates Neuroinflammation and Neuronal Damage. *J Immunol* 2007;178:6476-6481.

Katchanov J, Lünemann J, Masuhr F, Becker D, Ahmadi M, Bösel J, Zschenderlein R, Bamborschke R, Klingebiel R. Acute combined central and peripheral inflammatory demyelination. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:1784–1786.

Erklärung

Ich, Doreen Voigtsberger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss des von *Streptococcus pneumoniae* produzierten H₂O₂ auf die zerebrale Hyperämie in der Frühphase der experimentellen Pneumokokkenmeningitis“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

15.09.2011

Doreen Voigtsberger

Danksagung

Ich danke meinem Betreuer PD Dr. med. Olaf M. Hoffmann für seine persönliche und fachliche Unterstützung, Hilfestellung und Motivation. Mit seiner stetigen Bereitschaft zu konstruktiven Gesprächen half er mir bei der Entstehung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. med. Jörg R. Weber danke ich für die Möglichkeit, in der Arbeitsgruppe „Meningitis“ der Experimentellen Neurologie forschen zu dürfen sowie für eine konstruktive und freundliche Zusammenarbeit.

Ich danke den Mitarbeitern des Labors für Experimentelle Neurologie dafür, dass sie mir bei allen Problemen stets hilfreich zur Seite standen und auch in schwierigen Phasen immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Mein innigster Dank gilt meinen Schwiegereltern Bärbel und Hans-Jürgen. Sie haben mir jederzeit den Rücken frei gehalten und sich in liebevoller Weise um unsere beiden Kinder gekümmert und gaben mir damit die Gelegenheit, meine Dissertation abzuschließen.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Johannes, der mich auch in den schwersten Phasen immer aufgefangen, ermutigt und unterstützt hat. Ohne seine Liebe und seinen Beistand wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Arbeit fertig zu stellen. Ihm widme ich diese Arbeit.