

# Zivilschutz- Forschung

Schriftenreihe der Schutzkommission beim Bundesminister des Innern

Herausgegeben vom Bundesamt für Zivilschutz Neue Folge Band 20

## **Arbeiten aus dem Fachausschuß V**

*Dietrich Henschler*

**Langzeitwirkungen phosphororganischer  
Verbindungen**

*Hermann Becht*

**Die zellvermittelte typübergreifende  
Immunantwort nach Infektion mit dem  
Influenzavirus**

*Frank Hoffmann, Friedrich Vetterlein, Gerhard  
Schmidt*

**Die Bedeutung vasculärer Reaktionen  
beim akuten Nierenversagen nach großen  
Weichteilverletzungen (Crush-Niere)**

ISSN 0343-5164



# Zivilschutz- Forschung

Schriftenreihe der Schutzkommission beim Bundesminister des Innern

Herausgegeben vom Bundesamt für Zivilschutz    Neue Folge Band 20

## Arbeiten aus dem Fachausschuß V

*Dietrich Henschler*

Langzeitwirkungen phosphororganischer  
Verbindungen

*Hermann Becht*

Die zellvermittelte typübergreifende  
Immunantwort nach Infektion mit dem  
Influenzavirus

*Frank Hoffmann, Friedrich Vetterlein, Gerhard  
Schmidt*

Die Bedeutung vasculärer Reaktionen  
beim akuten Nierenversagen nach großen  
Weichteilverletzungen (Crush-Niere)

ISSN 0343-5164

Herausgeber: Bundesamt für Zivilschutz,  
Deutschherrenstraße 93-95, 53177 Bonn

Schriftleitung und Redaktion: Carl Maier, Detlef Stentenbach

Die Beiträge geben die Meinungen der Autoren wieder. Sie stellen keine Äußerung des Herausgebers dar und können auch nicht als solche ausgelegt werden.

# Inhalt

## I. Langzeitwirkungen phosphororganischer Verbindungen

*Dietrich Henschler*

Aufgabenstellung .....	9
Ergebnisse .....	12
1. Mutagene Wirkungen phosphororganischer Verbindungen . . . . .	12
2. Entwicklung eines in vitro-Prüfsystems auf verzögert- neurotoxische Wirksamkeit phosphororganischer Verbindungen .....	12
3. Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der mutagenen Wirksamkeit von Triarylphosphaten .....	14
4. Voraussichtlicher Nutzen der erzielten Ergebnisse .....	17
5. Veröffentlichungen .....	18
6. Erfolgskontrollbericht .....	18
7. Kurzfassung .....	19
8. Tabellen .....	20

## II Die zellvermittelte typübergreifende Immunantwort nach Infektion mit dem Influenzavirus

*Hermann Becht*

Aufgabenstellung .....	27
Voraussetzung, Planung und Ablauf des Vorhabens .....	28
Wissenschaftlicher und technischer Stand, Zusammenarbeit mit anderen Stellen .....	28
Ergebnisse .....	30
A. Herstellung des NP und seine immunogene Bedeutung . . . . .	30
B. Schutzversuche mit dem NP .....	31
C. Die Herstellung von ISCOMs mit dem wasserlöslichen NP. . . . .	32
D. Perorale Immunisation mit NP-ISCOM .....	33
E. Versuche zur Zerstörung virusinfizierter Zellen mit Hilfe von Immunotoxinen .....	34
F. Ein in die Zellmembran eingelagertes verkürztes Hämagglutinin als Angriffspunkt von Antikörpern für die Ausschleusungshemmung .....	35
Erfolgskontrollbericht .....	36
Kurzfassung .....	38
Anhang .....	40
Tabellen .....	40
Abbildungen .....	40

### III. Die Bedeutung vasculärer Reaktionen beim akuten Nierenversagen nach großen Weichteilverletzungen (Crush-Niere)

*Frank Hoffmann, Friedrich Vetterlein, Gerhard Schmidt*

1.	Einleitung.....	43
2.	Materialien und Methoden.....	44
2.1	Versuchsaufbau und -ablauf.....	44
2.2	Materialien.....	47
2.3	Versuchsgruppen.....	47
2.4	Ermittelte Nierenfunktionsparameter.....	50
2.5	Histologische Auswertung.....	50
2.6	Auswertung der intravasalen Farbstoff-Verteilung.....	51
3.	Ergebnisse.....	52
3.1	Versuchsreihe A: Myoglobingabe oder/und hämorrhagische Hypotension ohne Vorbehandlung.....	52
3.1.1	Myoglobingabe ohne Vorbehandlung.....	52
3.1.2	Hämorrhagische Hypotension ohne Vorbehandlung.....	55
3.1.3	Hämorrhagische Hypotension unter Myoglobinzufuhr ohne Vorbehandlung.....	57
3.1.4	Tabellarische Zusammenfassung der Versuchsreihe A.....	59
3.1.5	Histologische Ergebnisse der Versuchsgruppen A1, A2 und A3.....	62
3.2	Versuchsreihe B: Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz vor Myoglobingabe oder/und hämorrhagischer Hypotension... ..	62
3.2.1	Myoglobingabe nach Nahrungskarenz und Dehydratation.....	63
3.2.2	Hämorrhagische Hypotension nach Nahrungskarenz und Dehydratation.....	65
3.2.3	Hämorrhagische Hypotension unter Myoglobinzufuhr nach Nahrungskarenz und Dehydratation.....	68
3.2.4	Tabellarische Zusammenfassung der Versuchsreihe B.....	71
3.2.5	Ergebnisse der Mikroperfusionsuntersuchungen der Versuchsgruppen B1, B2 und B3.....	73
3.3	Versuchsreihe C: Untersuchung der renalen Zirkulationsverhältnisse unter Myoglobininfusion und/oder hämorrhagischer Hypotension.....	73
3.3.1	Durchblutungsverhältnisse unter Myoglobin-Infusion.....	76
3.3.2	Durchblutungsverhältnisse unter hämorrhagischer Hypotension.....	76
3.3.3	Durchblutungsverhältnisse unter Myoglobingabe und hämorrhagischer Hypotension.....	76

3.3.4	Tabellarische Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse.....	83
4.	Diskussion.....	84
4.1	Diskussion des Versuchsaufbaus und der allgemeinen Nierenfunktionsparameter.....	84
4.2	Diskussion der Versuchsergebnisse.....	86
4.2.1	Diskussion der Ergebnisse der Versuchsreihe A.....	86
4.2.2	Diskussion der Ergebnisse der Versuchsreihe B.....	89
4.2.3	Diskussion der Ergebnisse der Versuchsreihe C.....	92
4.3	Vergleich Myoglobininfusion – Glycerolmodell.....	95
4.4	Pathologische Konzepte (1): Hämodynamik.....	95
4.4.1	Einschätzung der Bedeutung der Vasokonstriktion für das Entstehen des Myoglobininduzierten Nierenversagens aufgrund unserer Versuchsergebnisse.....	97
4.4.2	Die Verstärkung des Myoglobininduzierten Nierenschadens durch hämorrhagische Hypotension.....	98
4.4.3	Bedeutung der zeitlichen Abfolge von Myoglobingabe und hämorrhagischer Hypotension.....	100
4.5	Pathophysiologische Konzepte (2): Zellphysiologische Ansätze.....	103
4.6	Therapeutische Ansätze.....	109
5.	Zusammenfassung.....	113
6.	Literatur.....	115
<b>IV.</b>	<b>Die Autoren.....</b>	<b>121</b>



# I. Langzeitwirkungen phosphororganischer Verbindungen

*Dietrich Henschler*

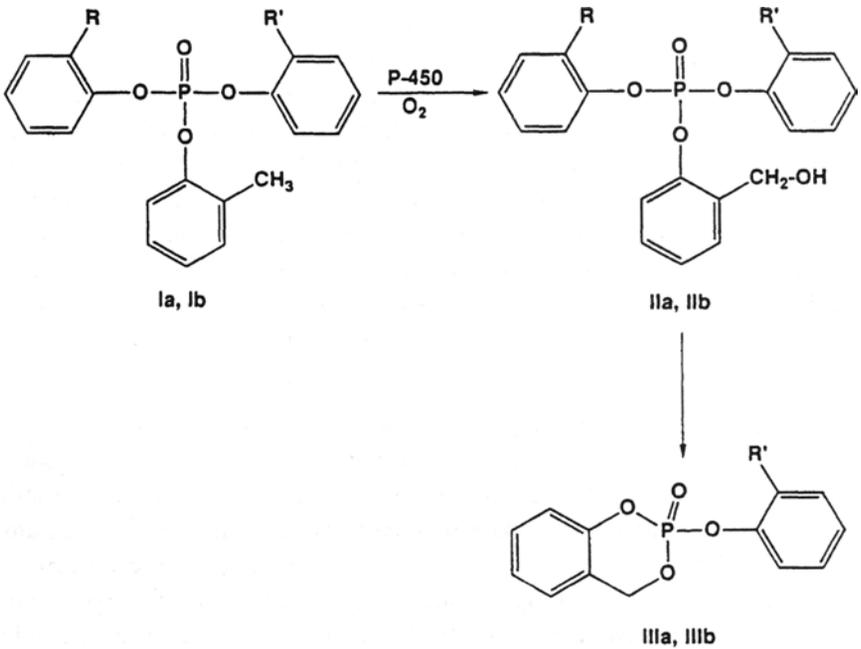
## **Aufgabenstellung**

Bestimmte phosphororganische Verbindungen, die eine „leichte Abgangsgruppe“ aufweisen, erzeugen in allen animalischen Lebewesen akute Vergiftungserscheinungen. Diese sind gekennzeichnet durch eine Hemmung von Cholinesterasen, insbesondere Acetylcholinesterase, mit der Folge übersteigerter Effekte des natürlichen, unter diesen Bedingungen sich anhäufenden Transmitterstoffes Acetylcholin. Diese toxische Wirkung, deren Mechanismus seit langem detailliert aufgeklärt ist, macht man sich z.B. bei der Insektenbekämpfung zunutze. Bei der Anwendung dieser insektiziden Mittel kam es – und kommt es noch immer – zu akuten Vergiftungen der Anwender im Felde sowie auch bei der Verwendung als homizides und suizides Gift. Einzelne Vertreter dieser Stoffklasse, deren Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für verschiedene Organismen extensiv bearbeitet worden sind, wurden auch als Kampfstoffe vorgesehen und produziert.

Neben der akuten Giftwirkung kommt einer Reihe von Verbindungen dieser Klasse auch eine verzögert auftretende neurodegenerative Wirksamkeit zu, sofern das akute Stadium überlebt wird. Auch hier sind die dafür erforderlichen chemischen Strukturmerkmale erarbeitet. Bei der Entwicklung von Pestiziden aus dieser Stoffklasse ist daher seit langem die tierexperimentelle Prüfung auf verzögert auftretende Neurotoxizität vorgeschrieben. Wegen ihrer besonderen Empfindlichkeit für diesen toxischen Effekt werden Hühner eingesetzt; die sonst üblichen Nagerarten Maus und Ratte sind als Versuchstiere ungeeignet, weil weitgehend resistent. Der Wirkungsmechanismus der verzögert auftretenden Neurotoxizität ist nur in Teilen aufgeklärt. Bekannt ist, daß eine bestimmte, membranständige „neurotoxische Esterase“ durch die toxischen Verbindungen weitgehend gehemmt werden muß, um zur (verzögert auftretenden) neuronalen Degeneration zu führen.

Eine besonders prominente Stoffklasse für diese neurotoxische Wirksamkeit stellen Triarylphosphate dar. Seit langem war aus beobachteten Massenvergiftungen und weiterer Überprüfung der erforderlichen chemischen

Strukturmerkmale bekannt, daß mindestens an einem der in Esterform an Orthophosphorsäure gebundenen Arylreste eine orthoständige Alkylgruppe vorhanden sein muß; daher dient für experimentelle Zwecke Tri(-o-kresyl-)phosphat meist als Modellverbindung. Sie bedarf erst der metabolischen Aktivierung im Warmblüterorganismus, um neurotoxisch wirksam zu werden. Die ultimale neurotoxische chemische Spezies sind Derivate des zyklischen Esters Saligeninphosphat (Abb. 1). Aus der theoretischen Betrachtung des Phosphorylierungsmechanismus solcher Saligeninphosphate haben wir den Schluß gezogen, daß neben der phosphorylierenden Wirksamkeit auch eine alkylierende Aktivität im Spiele sein könnte (Abb. 2).



**Abb.1:**

**Metabolische Aktivierung o-Alkyl-substituierter Triarylphosphate (Ia, Ib), unter Bildung cyclischer Saligeninphosphate (IIIa, IIIb) als ultimale phosphorylierende und alkylierende Metabolite. 1. Stufe: o-Alkyl-Hydroxylierung (IIa, IIb).**

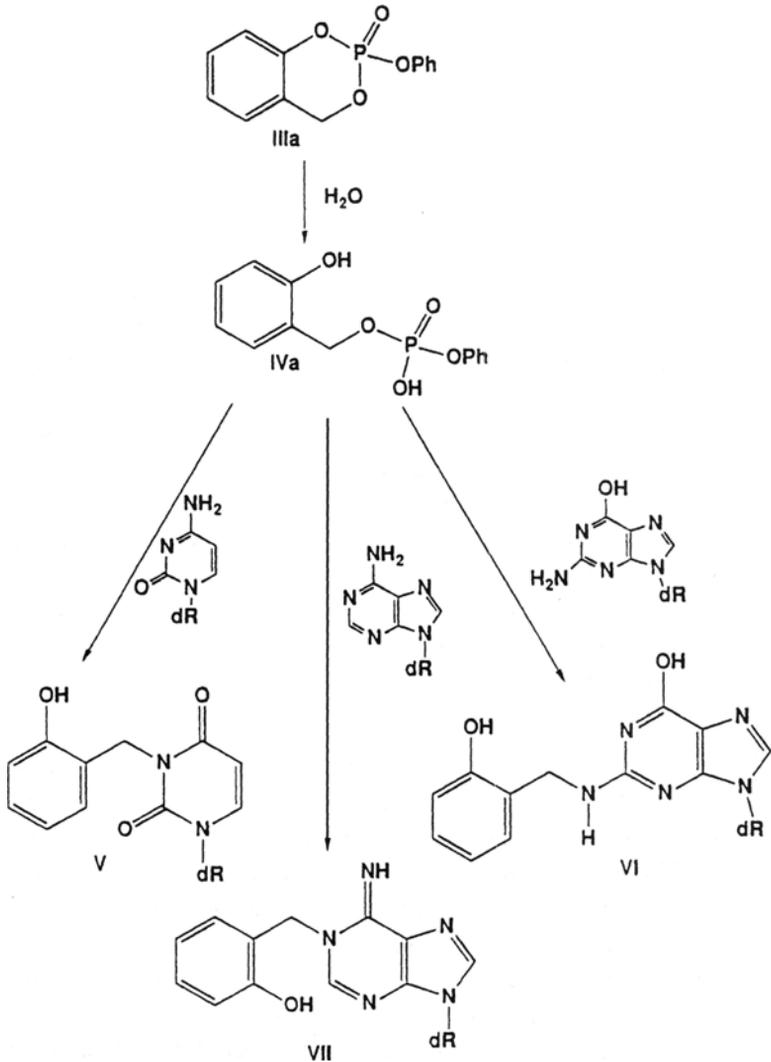


Abb. 2:

Alkylierungsmechanismus von Phenylsaligeninphosphat (IIIa) über die Bildung eines aktivierten Hydroxybenzylesters (IVa). Bildung hydroxybenzylierter Addukte von Cytosin (V), Adenosin (VI) und Guanosen (VII).

Das Forschungsvorhaben hat sich zwei Aufgaben gestellt.

1. Überprüfung repräsentativer Gruppen phosphororganischer Verbindungen auf gentoxische Wirksamkeit in geeigneten Mutagenitätstestsystemen.

2. Entwicklung eines geeigneten Kurzzeit-Zellkultursystems zur Überprüfung phosphororganischer Verbindungen auf verzögert auftretende neurotoxische Aktivität.

## **Ergebnisse**

### ***1. Mutagene Wirkungen phosphororganischer Verbindungen***

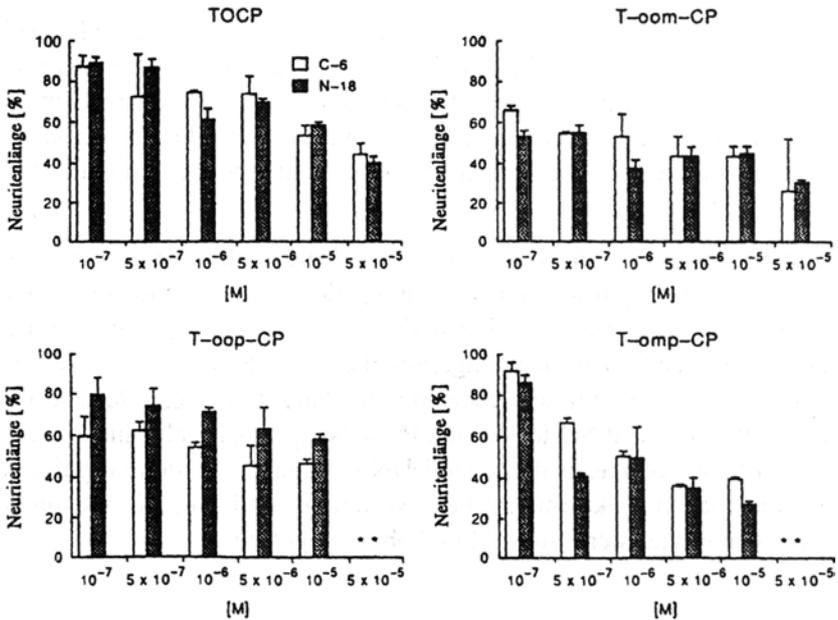
Ausgewählt wurden repräsentative Vertreter aus der Gruppe der Triarylphosphate und zwei seiner aktiven Metaboliten (Saligeninphosphate), Insektizide Verbindungen mit bekannter verzögerter neurotoxischer Aktivität, nicht neurotoxische Organophosphatverbindungen, aufgeteilt nach den gleichen Kriterien und einige Verbindungen, bei denen eine neurotoxische Wirksamkeit fraglich war. Zur Prüfung auf Genotoxizität wurde der mikrobielle Mutationstest an *Salmonella typhimurium* (Stamm TA100, Arnes-Test) und der Mikronukleustest an Syrischen Hamsterembryofibroblastenlinien ausgewählt. Parallel liefen Untersuchungen an zwei Permanentlinien neuronaler Zellen (Neuroblastoma- und Gliomazellen), bei denen die Aussprossung von Neuronen unter bestimmten Kulturbedingungen sowie deren Hemmung durch die Prüfsubstanzen messend verfolgt werden kann.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Danach sind die als neurotoxisch bekannten Triarylphosphate und deren Metaboliten eindeutig mutagen, die untersuchten Pestizide nur ausnahmsweise (Leptophos, Haloxon). Zwischen Arnes-Test und Mikronukleustest besteht keine durchgängige Korrelation. Dagegen wurde praktische vollständige Übereinstimmung zwischen neurotoxischer Wirksamkeit am Ganztier (Hühner) und Hemmwirkung auf die Neuritenproliferation in den Permanentzelllinien gefunden. Damit war eine wichtige Grundlage gelegt für die Ausarbeitung eines *in vitro*-Testsystems zur Überprüfung bekannter und neuer Substanzen auf neurotoxische Aktivität.

### ***2. Entwicklung eines in vitro-Prüfsystems auf verzögert-neurotoxische Wirksamkeit phosphororganischer Verbindungen***

Es mußten geeignete Zellkultursysteme gefunden werden, an denen sich die neurotoxische Wirksamkeit der Verbindungen nachweisen läßt. Die Neurotoxizität beruht auf einer Degeneration der Fortsätze von Nervenzellen (Neurone). Aus einer Reihe von Permanentzelllinien, die von tierexperimentellen Tumoren gewonnen worden sind, haben wir zwei ausgewählt: C-6, eine Gliazelllinie von einem Hirntumor aus Ratten, induziert

durch Nitrosoharnstoff; und N-18, eine Neuroblastomalinie, gewonnen aus einem spontanen Mäusehirntumor. In langwierigen Untersuchungen wurden die Bedingungen für Wachstum und Wachstumshemmung dieser Neuronenaussprossungen sowie ein Meßsystem für die Länge und die Aufspaltungshäufigkeit dieser auswachsenden Neuronen erarbeitet. Abb. 3 zeigt die Resultate eines Modellversuches mit vier neurotoxischen Triarylphosphaten, in denen die konzentrationsabhängige Hemmbarkeit der Neuritenaussprossung in beiden Zelllinien demonstriert wird.



**Abb. 3:**  
**Prüfung von Triorthokresylphosphat (TOCP) und dreier o-kresolhaltiger Mischester (oom, oop, omp) auf Hemmung der Neuritenaussprossung einer Gliomazelllinie (C-6) und einer Neuroblastomazelllinie (N-18). Neuritenlänge als % der Kontrollansätze. Mittelwerte  $\pm$  S.D. von 4 Parallelbestimmungen.**

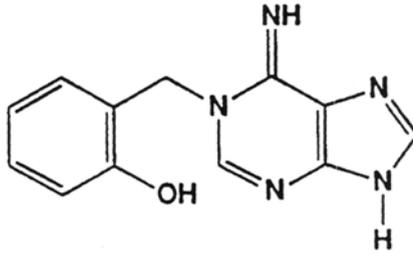
In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der systematischen Überprüfung von 32 phosphororganischen Verbindungen dargestellt. Deren Auswahl erfolgte nach den gleichen Kriterien wie bei der Prüfung auf Mutagenität: repräsentative Vertreter aus den Gruppen der Triarylphosphate, der neurotoxischen und nicht-neurotoxischen Pestizide und einiger Strukturanaloga.

Das Ergebnis ist: Es besteht komplette Übereinstimmung zwischen neurotoxischer Aktivität im Ganztierversuch an Hühnern und Hemmung des Neuritenwachstums in den Zellkultursystemen. Damit ist der prädiktive Wert dieses in vitro-Kurzzeittests ausgewiesen. Er kann als geeignete Methode von hohem Aussagewert zur Prüfung bekannter und neuentwickelter phosphororganischer Verbindungen vorgeschlagen und eingesetzt werden.

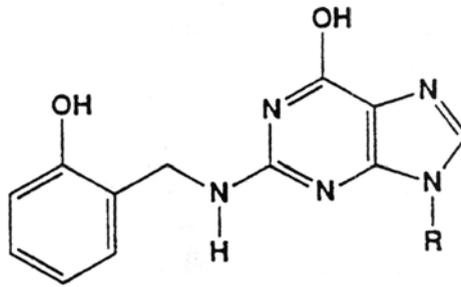
### ***3. Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der mutagenen Wirksamkeit von Triarylphosphaten***

Es wurden weitere Versuche unternommen, den molekularen Mechanismus der neurotoxischen Wirksamkeit von Triarylphosphaten einerseits und ihrer genotoxischen Wirksamkeit andererseits durchzuführen mit dem Ziel, die erforderlichen Strukturelemente zu erkennen und daraus Verbindungen abzuleiten, denen die mutagene und vermutliche kanzerogene Wirksamkeit fehlt.

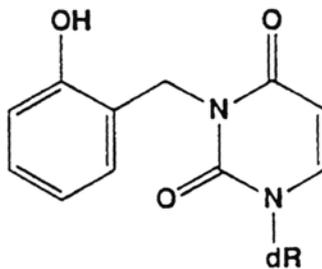
Die theoretische Grundlage der mutagenen Wirksamkeit ist in Abb. 2 aufgezeigt: Bei der hydrolytischen Spaltung des Saligeninphosphates wird der Hydroxybenzyl-Rest aktiviert und gewinnt damit alkylierende Eigenschaften. Es galt also, Bindungsprodukte von Saligeninphosphat mit DNA-Basen zu isolieren und chemisch zu charakterisieren. Dazu wurden Modellnukleotide und Nukleoside mit Phenylsaligeninphosphat inkubiert und die Reaktionsprodukte isoliert. Drei DNA-Addukte wurden aufgefunden und mit massenspektrometrischen Verfahren und mit Kernresonanzspektren charakterisiert. Sie sind in Abb. 4 aufgeführt.



N-1(o-hydroxybenzyl)adenin



N-2(o-hydroxybenzyl)guanosin

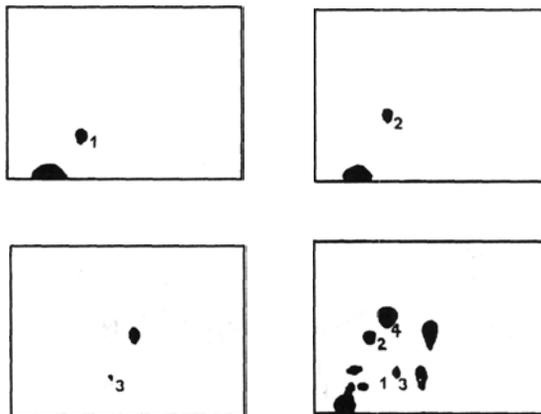


N-3(o-hydroxybenzyl)deoxyuridin

Abb. 4:

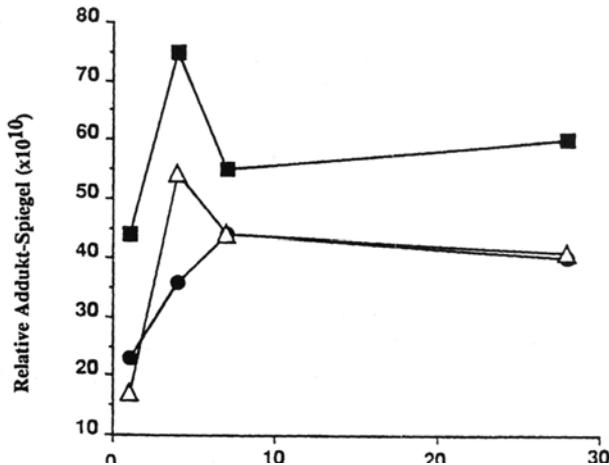
Strukturen dreier Nukleinbasenaddukte nach Einwirkung von Phenylsaligeninphosphat  
Strukturaufklärung durch Massen- und NMR-Spektroskopie.

Danach galt es, solche DNA-Addukte in biologischen Systemen nachzuweisen. In einem ersten Ansatz wurden die im Arnes-Test benutzten Mikroben (*Salmonella typhimurium* Stamm TA100) mit Phenylsaligeninphosphat inkubiert und mit der  $^{32}\text{P}$ -postlabelling-Methode nach Randerrath aufgearbeitet. Die vorher identifizierten und durch Synthese bestätigten DNA-Addukte dienten hier als Vergleichssubstanzen. Das Ergebnis ist in Abb. 5 dargestellt. Danach konnten in *Salmonellen*-DNA 2 der vermuteten Addukte bestätigt werden.



**Abb. 5:**  
32p-Postlabelling-Diagramme zum Nachweis von Nukleinbasen-Addukten aus Mikroben (*Salmonella typhimurium* Stamm TA100) nach Einwirkung von Phenylsaligeninphosphat. Referenzsubstanzen wie in Abb. 4.

In einer dritten Stufe schloß sich der Nachweis von DNA-Addukten in Warmblütierzellen an. Benutzt wurde eine Permanentzelllinie eines Lebertumors (HepG2). Von den vermuteten Addukten konnten hier ebenfalls 2 Vertreter mit der Postlabelling-Methode aufgefunden werden.



**Abb. 6:**  
Persistenz dreier Nukleinbasenaddukte aus Lungengewebe der Ratte nach Verabfolgung von Tri-(orthokresyl-)phosphat.

In einer letzten Stufe wurden wiederum 2 Addukte in verschiedenen Organen von mit der Ausgangsverbindung des Saligeninphosphats, Tri(-o-kresyl-)phosphat, behandelten Ratten nachgewiesen. Bei Überprüfung in vorgegebenen Zeitintervallen (1, 4, 7 und 28 Tage) wurde die Persistenz dieser Addukte überprüft. Überraschenderweise bleiben die Addukte nur im Lungengewebe über 30 Tage weitgehend persistent (vgl. Abb. 6), in anderen Organen werden sie in wenigen Tagen eliminiert.

#### 4. Voraussichtlicher Nutzen der erzielten Ergebnisse

Der Nutzen der erzielten Resultate liegt auf zwei Ebenen:

- Erstmals gelang der Nachweis, daß bestimmte phosphororganische Verbindungen gentoxische Effekte entfalten können. Damit besitzen sie mutagene und kanzerogene Wirkpotenzen, die die Risikobewertung auf eine neue Basis stellen; denn Krebs und Erbgutschäden haben als Langzeitwirkungen einen weit höheren gesundheitspolitischen Stellenwert als akute Vergiftungen, zu deren Beherrschung hinreichende Behandlungsstrategien entwickelt worden sind. Mit der Kenntnis der erforderlichen Strukturelemente, ermittelt aus der systematischen Prüfung einer großen Reihe von Verbindun-

- gen, ist auch eine Voraussage möglich, welche Pestizide und chemische Kampfstoffe diese Wirkungskomponente aufweisen, welche nicht.
- Es wurde eine in vitro-Kurzzeitmethode zur verlässlichen Feststellung verzögert neurotoxischer Wirksamkeit von phosphororganischen Verbindungen erstellt, die einen nicht nur aufwendigen, sondern mit hohem Leidensdruck für die Versuchstiere befrachteten Routinetest an Hühnern ersetzen kann.

## 5. Veröffentlichungen

Die erzielten Resultate sind zum Teil veröffentlicht, zum anderen Teil in Manuskripten niedergelegt und in international anerkannten Zeitschriften zur Publikation eingereicht.

1. *Schmuck, G.*: Beziehungen zwischen neurotoxischer, mutagener und kanzerogener Wirkung organischer Phosphorverbindungen. Entwicklung und Validierung eines Zellkulturverfahrens zur Voraussage neurotoxischer Effekte. – Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Würzburg, 1989.
2. *Henschler, D., Schmuck, G., van Aerssen, M., Schiffmann, D.*: The inhibitory effect of neuropathic organophosphate esters on neurite outgrowth in cell cultures: a basis for Screening for delayed neurotoxicity. – Toxicology, submitted (1993).
3. *Dekant, W., Mentzschel, A., Henschler, D.*: Structures of DNA-adducts of saligenin phosphates. – IARC Scientific Publication Series, in press (1993).
4. *Mentzschel, A., Vamvakas, S., Dekant, W., Henschler, D.*: DNA-adduct formation in *S. typhimurium*, cultured liver cells and in Fischer 344 rats treated with o-tolyl phosphates and their metabolites. – Carcinogenesis, submitted (1993).
5. *Mentzschel, A., Schmuck, G., Dekant, W., Henschler, D.*: Genotoxicity of neurotoxic triaryl phosphates: identification of DNA-adducts of the ultimate metabolites, saligeninphosphates. – Chemical Research in Toxicology, submitted (1993).

## 6. Erfolgskontrollbericht

Die Ergebnisse sind mit den förderpolitischen Zielen der Schutzkommission beim Bundesminister des Innern in Einklang: Erforschung der Schädigungsmöglichkeiten durch Kampfstoffe und ökologisch bedeutsame Schadprinzipien. Die gestellte Aufgabe ist mit dem abgeschlossenen Vorhaben voll erfüllt, damit ist der technische Erfolg erreicht. Darüber hinaus haben

die Resultate wissenschaftliche Bedeutung für die Erforschung genotoxischer und neurotoxischer Effekte von Umweltgiften und Kampfstoffen.

Der Finanzierungs- und Zeitplan ist voll eingehalten worden. Einmal erfolgte eine zusätzliche Bezuschussung aus Restmitteln der Schutzkommission beim Bundesminister des Innern.

Die Ergebnisse sind verwertbar für aktuelle Prüfstrategien toxischer Stoffe im Rahmen gesetzlicher Auflagen, insbesondere Chemikaliengesetz und Pflanzenschutzmittelgesetz.

Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben, waren mit dem Forschungsvorhaben nicht verbunden.

### *7. Kurzfassung*

Phosphororganische Verbindungen haben praktische Bedeutung als Schädlingsbekämpfungsmittel, Umweltgifte und Kampfstoffe. Im vorliegenden Forschungsvorhaben wurden zwei Langzeitwirkungen dieser Stoffe untersucht: Genotoxizität (Mutagenität und mögliche Kanzerogenität), und verzögert auftretende neurodegenerative Wirksamkeit. In systematisch ausgewählten Verbindungsgruppen wurden mutagene Wirkungen aufgedeckt und die dafür verantwortlichen Strukturelemente identifiziert. Zwischen genotoxischer und verzögert neurotoxischer Wirksamkeit besteht nur bei den Triarylphosphaten eine unmittelbare, strukturchemisch definierbare Beziehung. Die für eine kanzerogene Primärläsion verantwortlichen chemisch definierten Schädigungen an Nukleinsäuren wurden durch die Identifikation von vier verschiedenen DNA-Addukten aufgedeckt und strukturchemisch aufgeklärt. Sie wurden zum Teil auch in biologischen Systemen nachgewiesen: in Bakterien-DNA aus *Salmonella typhimurium* TA100; in einer permanenten Leberzelllinie (HepG2), und in der intakten Ratte. In der Lunge haben zwei DNA-Addukte eine hohe Persistenz.

Die Prüfung auf verzögert eintretende neurotoxische Wirksamkeit wurde bisher nach gesetzlicher Vorschrift an Hühnern durchgeführt. Als Ersatzmethode von hohem prädiktiven Wert im Sinne des Schutzes von Versuchstieren wurde eine Zellkulturmethode ausgearbeitet und an einer großen Zahl von Verbindungen praktisch erprobt. Sie bedient sich einer Gliomazelllinie (C-6) und einer Neuroblastomazelllinie (N-18). Zwischen am Ganztier festgestellter Neurotoxizität und Hemmung der Neuritenausprossung in den Zellkulturen besteht an 32 überprüften, repräsentativ ausgewählten Verbindungen komplette Übereinstimmung. Damit hat diese Methode einen hohen prädikativen Wert und kann für die Routineprüfung bekannter und neuer entwickelter phosphororganischer Verbindungen eingesetzt werden.

## 8. Tabellen

Tab. 1: Vergleich von Neurotoxizität und Gentoxizität im Ames-test (AT), Mikronukleustest (MN) und Hemmung der Neuritenbildung in Neuroblastoma- (N-18) und Gliomapermanenzelllinien (C-6) (HN). – N.E.K. = Niedrigste Effektive Konzentration.

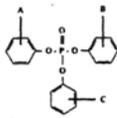
Substanz	Formel	AT (N.E.K.)	MN (N.E.K.)	HN (N.E.K.) N-18 C-6
<b>A) neurotoxische Organophosphatverbindungen</b>				
Triarylphosphate				
	A B C			
TOCP	o-Me o-Me o-Me	3x10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	5x10 <sup>-7</sup> 5x10 <sup>-7</sup>
ToomCP	o-Me o-Me m-Me	3x10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup> 10 <sup>-7</sup>
ToopCP	o-Me o-Me p-Me	10 <sup>-7</sup>	5x10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup> 10 <sup>-7</sup>
TompCP	o-Me m-Me p-Me	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-7</sup> 5x10 <sup>-7</sup>
TPEPP	p-Et p-Et p-Et	-	-	10 <sup>-6</sup> 10 <sup>-6</sup>
TPAcPP	p-Ac p-Ac p-Ac	-	10 <sup>-5</sup>	5x10 <sup>-7</sup> 5x10 <sup>-7</sup>
oCdPEPP	o-Me p-Et p-Et	-	-	5x10 <sup>-7</sup> 10 <sup>-7</sup>
Saligeninphosphat				
2(o-Kresyl)-4-1:3:2-benzodioxaphosphoran-2-on	R:O-Ph-o-CH <sub>3</sub>	10 <sup>-7</sup>	5x10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup> 10 <sup>-8</sup>
2(Phenyl)-4-1:3:2-benzodioxaphosphoran-2-on	R:O-Ph	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup> 10 <sup>-9</sup>
EPN		-	5x10 <sup>-6</sup>	5x10 <sup>-6</sup> 10 <sup>-6</sup>
Leptophos		3x10 <sup>-7</sup>	5x10 <sup>-6</sup>	5x10 <sup>-7</sup> 5x10 <sup>-7</sup>
Haloxon		3x10 <sup>-7</sup>	5x10 <sup>-7</sup>	5x10 <sup>-7</sup> 5x10 <sup>-7</sup>
Mipafos		-	-	5x10 <sup>-7</sup> 5x10 <sup>-7</sup>
Chlorpyrifos		-	-	10 <sup>-6</sup> 10 <sup>-6</sup>

Tab. 2: Organophosphatverbindungen (Struktur, Quelle), die in den Untersuchungen benutzt wurden, und Vergleich der Ergebnisse in vivo (oral verabreicht, oder intraperitoneal – i.p., oder intramuskulär – i.m. in Hühnern) und in vitro. C-6 = Gliomalinie der Ratte, N-18 = Neuroblastomalinie der Maus.

Substanz	Formel	AT	MN	HN
		(N.E.K.)	(N.E.K.)	(N.E.K.)

N-18 C-6

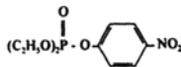
**B) nicht neurotoxische Organophosphatverbindungen**

Triarylphosphat					
	A B C				
TPCP	p-Me	p-Me	p-Me	-	-
TMCP	m-Me	m-Me	m-Me	-	-
TPhP	Ph	Ph	Ph	-	10 <sup>4</sup>

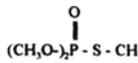


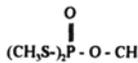
2-(o-Kresyl)-4-1:3:2-dioxaphosphoran-2-on	R:O-Ph-o-CH <sub>3</sub>	-	-	-	-
---	--------------------------	---	---	---	---

TMP	(CH <sub>3</sub> O) <sub>3</sub> P=O	7x10 <sup>3</sup>	-	-	-
-----	--------------------------------------	-------------------	---	---	---

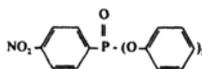
Paraoxon		-	-	-	-
----------	---	---	---	---	---

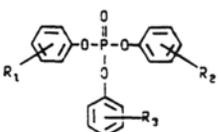
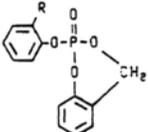
**C) fragliche neurotoxische Organophosphatverbindungen**

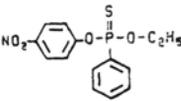
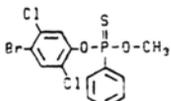
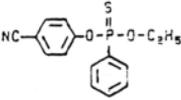
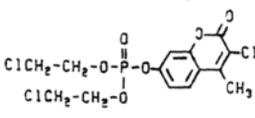
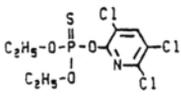
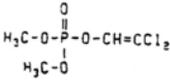
O, O, S-TMP		6.6x10 <sup>4</sup>	-	-	-
-------------	---	---------------------	---	---	---

O, S, S-TMP		2.9x10 <sup>3</sup>	-	-	10 <sup>3</sup>
-------------	---	---------------------	---	---	-----------------

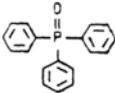
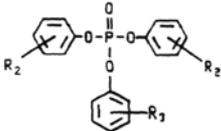
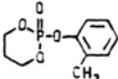
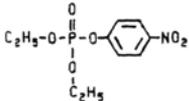
TMTP	(CH <sub>3</sub> O) <sub>2</sub> P=S	4.5x10 <sup>3</sup>	-	-	-
------	--------------------------------------	---------------------	---	---	---

MPhdPhP		-	-	5x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>4</sup>
---------	---	---	---	-------------------	-------------------

Verbindung	Kurzname	Quelle *)	Wirkungs- dosis an Hühnern (mg/kg)	Iso (M) C-6	Iso (M) N-18
<b>I. Neurotoxische Verbindungen</b>					
<b>1) Triarylphosphate</b>					
					
Tri-o-kresylphosphat (R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =R <sub>3</sub> =o-Me)	TOCP	a)	250 or	3,84 · 10 <sup>-5</sup>	3,1 · 10 <sup>-5</sup>
Tri-oom-kresylphosphat (R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =o-Me, R <sub>3</sub> =m-Me)	T-oom-CP	a)	125 or	6,6 · 10 <sup>-6</sup>	6,6 · 10 <sup>-6</sup>
Tri-oop-kresylphosphat (R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =o-Me, R <sub>3</sub> =m-Me)	T-oop-CP	a)	100 or	4,8 · 10 <sup>-6</sup>	1,2 · 10 <sup>-5</sup>
Tri-omp-kresylphosphat (R <sub>1</sub> =o-Me, R <sub>2</sub> =m-Me, R <sub>3</sub> =p-Me)	T-omp-CP	a)	50 or	3,0 · 10 <sup>-6</sup>	2,5 · 10 <sup>-6</sup>
o-kresyl-di-p-ethylphenyl- phosphat (R <sub>1</sub> =o-Me, R <sub>2</sub> =p-Et, R <sub>3</sub> =p-Et)	OCDPEPP	b)	+ or	4,7 · 10 <sup>-5</sup>	2,1 · 10 <sup>-5</sup>
Tri-p-ethylphenylphosphat (R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =R <sub>3</sub> =p-Et)	TPEPP	b)	200 or	6,89 · 10 <sup>-5</sup>	7,0 · 10 <sup>-6</sup>
Tri-p-acetylphenylphosphat (R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =R <sub>3</sub> =p-Ac)	TPAcPP	b)	50 or	7,89 · 10 <sup>-5</sup>	2,3 · 10 <sup>-5</sup>
Triphenylphosphat (R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =R <sub>3</sub> =H)	TPhP	c)	(+) or	1,52 · 10 <sup>-5</sup>	7,7 · 10 <sup>-5</sup>
4-Nitrophenyldiphenylphosphat (R <sub>1</sub> =4-nitro, R <sub>2</sub> =R <sub>3</sub> =H)	4-NPDPP	e)	1000 or	9,05 · 10 <sup>-5</sup>	1,0 · 10 <sup>-5</sup>
<b>2) Saligeninphosphate</b>					
					
(2-o-kresyl)-4-1:3:2-benzodi- oxaphosphoran-2-on (R=Me)	C-Saligenin-P	f)	5 ip	6,9 · 10 <sup>-6</sup>	3,0 · 10 <sup>-6</sup>
Phenyl-4-1:3:2-benzodioxaphosphoran-2-on (R=H)	Ph-Saligenin-P	f)	2 ip	2,7 · 10 <sup>-6</sup>	1,2 · 10 <sup>-5</sup>

<b>3) Pestizide</b>					
<b>a. Phosphonate</b>					
O-Ethyl-O-4-nitrophenyl-phosphonothioat 	EPN	f)	22,5 or	$4,43 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$
(4-Bromo-2,5-dichlorophenyl)-Methylphenylphosphonothioat 	Leptophos	b)	200 or	$6,37 \cdot 10^{-5}$	$2,3 \cdot 10^{-3}$
(O-4-Zyanphenyl)-O-ethyl-phenylphosphonothioat 	Cyanofenphos	h)	100 or	$7,95 \cdot 10^{-6}$	$8,0 \cdot 10^{-6}$
<b>b. Phosphate</b>					
Bis(2-chlorethyl)-3-chlor-4-methylkumarin-7-yl-phosphat 	Haloxon	g)	100 or	$9,79 \cdot 10^{-5}$	$8,5 \cdot 10^{-5}$
Diethyl-3,5,6-trichlor-2-pyridyl-phosphothioat 	Chlorpyrifos	g)	300 or	$6,41 \cdot 10^{-5}$	$4,4 \cdot 10^{-5}$
O,O-Dimethyl-O-(2,2-dichlor-vinyl)-Phosphat 	Dichlorvos	h)	100 (?)o	$4,53 \cdot 10^{-5}$	$4,6 \cdot 10^{-5}$

<p><b>Di-(n-propyl)-2,2-dichlorvinyl-phosphat</b></p> $\begin{array}{c} \text{U} \\ \parallel \\ \text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}=\text{CCl}_2 \\   \\ \text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O} \end{array}$	Dienprop	h)	+ or	$4,92 \cdot 10^{-5}$	$3,3 \cdot 10^{-5}$
<p><b>O-O-Diethyl-O-(2-chlorethyl)-phosphat</b></p> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}_2\text{H}_5-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl} \\   \\ \text{C}_2\text{H}_5-\text{O} \end{array}$	PDE	h)	+ or	$7,87 \cdot 10^{-6}$	$1,4 \cdot 10^{-5}$
<p><b>SSS-Tributylphosphotriothoat</b></p> $(\text{C}_4\text{H}_9-\text{S})_3-\text{P}=\text{O}$	DEF	h)	250 or	$1,12 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$
<p><b>Dimethyl-(2,4,5-trichlor)-phenylthiophosphat (ähnl. Ronnel)</b></p> $\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{CH}_3-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_2(\text{Cl})_3 \\   \\ \text{CH}_3-\text{O} \end{array}$	DMTTP	h)	+ or	$1,86 \cdot 10^{-5}$	$8,8 \cdot 10^{-6}$
<b>c. Phosphorfluoride</b>					
<p><b>N,N-Diisopropylphosphordiamin-fluorid</b></p> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{NH}-\text{P}-\text{F} \\   \\ \text{NH} \end{array}$	Mipafox	i)	25 im	$3,01 \cdot 10^{-3}$	$6,8 \cdot 10^{-5}$
<p><b>Diisopropylphosphorfluorid</b></p> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}-\text{P}-\text{F} \\   \\ \text{O} \end{array}$	DFP	i)	1 or	$3,25 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$
<b>d. Nebenprodukte der Malathion-Synthese</b>					
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3-\text{O}-\text{P}-\text{S}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{O}(\text{S}) \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	OOS-TMP	g)	-	$2,69 \cdot 10^{-4}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$
	OSS-TMP	g)	-	$5,32 \cdot 10^{-5}$	$3,9 \cdot 10^{-5}$

<p><b>4) Phosphit</b></p> <p>Triphenylphosphit</p> 	Triphen	c) r	200	5,43 · 10 <sup>-6</sup>	4,9 · 10 <sup>-6</sup>
<p><b>II) Nicht-neurotoxische Verbindungen</b></p>					
<p><b>1) Triarylphosphate</b></p>					
 <p>Tri-p-kresylphosphat (R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = p-Me)</p> <p>Tri-m-kresylphosphat (R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = p-Me)</p>	<p>TPCP</p> <p>TMPC</p>	<p>d)</p> <p>a)</p>	-	-	-
<p><b>2) Saligeninphosphat</b></p> <p>(2-o-Kresyl)-4-1:3:2-Dioxaphosphoran-2-on</p> 	Dioxa-phosphoran	f)	-	-	-
<p><b>3) Pestizid</b></p>					
<p><b>a. Phosphat</b></p>					
<p>O,O-Diethyl-O-(4-nitrophenyl)-phosphat</p> 	Paraoxon	g)	- or	-	-
<p><b>4) Phosphit</b></p> <p>Tributylphosphit</p> <p><math>\text{O} = \text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_3</math></p>	Tribut	h)	- or	-	-

<p>5) Trialkylphosphate</p> $\begin{array}{c} \text{O}(\text{S}) \\    \\ \text{CH}_3\text{-O-P-O-CH}_3 \\   \\ \text{O} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Trimethylphosphat</p> <p>Trimethylthiophosphat</p>	<p>TMP</p> <p>TMTP</p>	<p>d)</p> <p>g)</p>	<p>- or</p> <p>- or</p>	<p>-</p> <p>-</p>	<p>-</p> <p>-</p>
<p>6) Sulfonat</p> <p>Phenylmethylsulfonylfluorid</p> $\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-S-F} \\    \\ \text{O} \end{array}$	<p>PMSF</p>	<p>k)</p>	<p>- or</p>	<p>-</p>	<p>-</p>

1) according to Johnson, 1975

- x) a) = synthesized by H. Bayer; b) = M. van Aerssen; e), h) = by A. Mentzschel; f) = by W. Kütt, all Institute of Toxicology, University of Würzburg
- c) purchased by Aldridge Chemicals, Steinheim
- d) by E. Merck, Darmstadt
- g) by Bayer Chemicals, Wuppertal
- k) by Serva Chemicals, Heidelberg
- i) kindly supplied by M. Zech, University of Göttingen

## II. Die zellvermittelte typübergreifende Immunantwort nach Infektion mit dem Influenzavirus

*Hermann Becht*

### **Aufgabenstellung**

Influenza A Viren sind ständige Ursachen von Epidemien; die Möglichkeit einer pandemischen Ausbreitung ist nicht selten. Der typische Krankheitsverlauf, mit dem ständig im Rahmen des Zivil- und Katastrophenschutzes gerechnet werden muß, sind Fieber, Allgemeinsymptome, respiratorische Erscheinungen, welche die betroffenen Patienten während 1-2 Wochen in die Arbeitsunfähigkeit zwingen und dem Einsatz für den Katastrophenschutz entziehen. Bei der schnellen Ausbreitung der Krankheit muß mit dem Ausfall zahlreicher im Zivil- und Katastrophenschutz engagierter Personen gerechnet werden, selbst wenn im günstigsten Falle die Krankheit einen komplikationslosen Verlauf ohne Sekundärinfektionen nimmt.

Die Schutzimpfung mit den heute zur Verfügung stehenden Impfstoffen leidet darunter, daß Influenzaviren sehr schnell ihre Antigenstruktur ändern („antigenic drift“ und „antigenic shift“) und damit von den für die Schutzimpfung verwendeten Impfstoffen nicht unbedingt abgedeckt werden. Die Induktion einer breiten Immunantwort, die möglichst viele antigene Variabilitäten erfaßt, wäre daher von großem Vorteil und ist somit eines der Anliegen dieses Projektes.

Diese Variabilität in der Antigenstruktur liegt im Hämagglutinin begründet, einem Glykoprotein der Virushülle, das für die Induktion von neutralisierenden Antikörpern und damit für die Ausbildung einer schützenden Immunität verantwortlich ist. Die Neutralisation durch das sIgA des sekretorischen Immunsystems stellt die erste Immunbarriere für das über die Schleimhäute in den Organismus eindringende Virus dar. Zirkulierende Antikörper verhindern die weitere Ausbreitung des Virus. Hat das Virus eine empfängliche Wirtszelle erreicht, erscheinen virale Glykoproteine an der Zelloberfläche, die diese infizierte Zelle dem Immunsystem als fremd erkennen geben. Dies geschieht über die auf der Oberfläche der Plasmamembran erscheinenden nativen Glykoproteine gegenüber Antikörpern und durch die viralen Peptide, die durch die Histokompatibilitätsantigene

(MHC) auf der Zelloberfläche den T-Zellen präsentiert werden. Die Zerstörung der relativ früh während des viralen Replikationszyklus als körperfremd erscheinenden Wirtszellen durch cytotoxische Reaktionen und damit der Elimination der Quelle für weitere Virusproduktion war ein weiteres Anliegen dieses Projekts.

### **Voraussetzung, Planung und Ablauf des Vorhabens**

Das Institut für Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen beschäftigt sich seit vielen Jahren mit Influenzaviren, deren strukturellen Eigenschaften, den molekularbiologischen Grundlagen der Replikation und der Definition ihrer pathogenen Eigenschaften. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 47 der DFG (Pathogenitätsmechanismen von Viren) und seit 1990 in der Forschergruppe gleichen Namens durchgeführt. Das vom Bundesamt für Zivilschutz geförderte Projekt befaßte sich als Ergänzung hierzu mit Aspekten der Immunantwort mit der Zielsetzung, zur Verbesserung der gebräuchlichen Impfstoffe im oben erwähnten Sinne beizutragen. Dabei konnte für die Beschaffung von Ausgangsmaterial für die Herstellung der interessierenden viralen Antigene auf die routinemäßige Wusproduktion des Instituts und die Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen zurückgegriffen werden. Drei Dissertationen wurden hierbei mit Erfolg abgeschlossen. Nachdem die in Aussicht gestellte Auslauffinanzierung im laufenden Jahr nicht mehr realisiert werden konnte, wurde in dem beschränkt möglichen Maße im Rahmen der Forschergruppe versucht, wenigstens die wichtigsten noch anstehenden Fragen zu klären.

### **Wissenschaftlicher und technischer Stand, Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Das Hämagglutinin von Influenzaviren, jenes Glykoprotein, das die Bildung neutralisierender Antikörper induziert, gehört zu den am besten untersuchten biologischen Strukturen. Über die antigene Variabilität existiert ebenfalls eine umfangreiche Literatur. Nach einem im Jahre 1977 in der Zeitschrift „Nature“ erschienenen Bericht ließ sich auch das im Innern des Viruspartikels gelegene Nukleoprotein (NP) mit Hilfe spezifischer Antikörper auf der Zelloberfläche nachweisen. Sollte sich dieser unerwartete Befund bestätigen, wäre eine typübergreifende Erkennung der virusinfizierten Wirtszelle möglich. Weiterhin wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen berichtet, daß sich aus Influenza Virus-infizierten Mäusen T-Zellen isolieren ließen, die typübergreifend reagierten. Bei Beginn des Projekts wurden sogar Untersuchungen publiziert, die von einer Schutz-

Wirkung des typ-spezifischen NP berichteten. Diese Veröffentlichungen bedeuteten einen zusätzlichen Stimulus und eine unmittelbare Herausforderung für die geplanten Versuche.

Frühere eigene Untersuchungen über die Exposition viraler Antigene, vor allem der beiden Peptidketten des Hämagglutinins auf der Oberfläche der infizierten Wirtszelle hatten gezeigt, daß über große Bereiche der Zellmembran nur die schwere Kette, das HA<sub>1</sub>, nachzuweisen ist, während HA<sub>2</sub>-spezifische Antikörper nicht gebunden wurden. Es blieb die Frage, ob isoliertes HA<sub>1</sub> diesen Befund bewirkte, oder ob das membranophile HA<sub>2</sub> lediglich durch das HA<sub>1</sub> abgedeckt wurde und damit nicht für die Antikörper zugänglich war. In jedem Fall war damit das zellständige HA<sub>1</sub> als Angriffsort für Immunreaktionen an der Zellmembran interessant geworden. Nähere Informationen über dieses zellassozierte HA<sub>1</sub> ließen sich nur über die Isolierung und Reindarstellung dieser Komponenten erzielen.

Für die Zerstörung der infizierten Wirtszelle über diese auf der Zelloberfläche exponierten viralen Antigene erschienen auch Immunotoxine prüfenswert. Dabei würde die Cytolyse durch einen völlig anderen cytotoxischen Mechanismus vermittelt als bei der immunologischen Cytolyse. Dieses für die Elimination von Tumorzellen entwickelte Prinzip war für die Zerstörung von virusinfizierten Zellen noch nicht eingesetzt worden. Dabei sollten Toxin-Antikörperkonjugate durch die spezifischen Antikörper an die Zelloberfläche herangeführt werden, um nur von antigenträgenden Zellen internalisiert im Zellinnern ihre toxische Wirkung zu entfalten.

Weitere Bemühungen um die Verbesserung der Impfstoffe richteten sich darauf, die Immunantwort unspezifisch zu verstärken. Derartige Versuche haben als Adjuvansforschung die Vaccineherstellung seit langer Zeit begleitet. Berichte über eine außergewöhnliche Erhöhung der Immunantwort durch das Saponin Quil A in Form von ISCOM (Immunostimulating Complex) erschienen so vielversprechend, daß eine Weiterentwicklung auf diesem Gebiet als lohnend erschien. Da die ISCOMs bis dahin nur mit membranständigen Glykoproteinen hergestellt worden waren, galt es, zunächst ein Verfahren zu entwickeln, mit dem auch wasserlösliche Antigene, die keine hydrophoben Membrananker besitzen, in die Partikel inkorporiert werden konnten.

Mit dem Setzen dieser Schwerpunkte wurde versucht, wenigstens in beschränktem Maße dieses Projekt an moderne Entwicklungen anzupassen, die sich auf dem Gebiet der Vaccineproduktion und der Elimination von virusinfizierten Zellen durch Zellysis abzeichneten.

Eine ständige und unmittelbare Zusammenarbeit ergab sich automatisch mit Arbeitsgruppen aus dem Sonderforschungsbereich bzw. der Forschergruppe an diesem Institut, zumal sich einige Themenstellungen über die Pathogenese der Influenzainfektion mit diesem Projekt streckenweise berührten und ergänzten. Eine sehr willkommene Zusammenarbeit ergab sich mit Professor Zinkernagel von der Universität Zürich, der die Histokompatibilitätsrestriktion der mit Influenzavirus infizierten Zellen prüfte. Dabei wurde die Synthese des NP in der Zelle mit dem Vacciniavirus als Genvektor veranlaßt, ein Versuchsansatz, der an diesem Institut durch die Beschränkungen des Gentechnologiegesetzes nicht möglich war. Mit Professor Morein, Stockholm, der auch die erste Probe des Quil A zur Verfügung stellte, wurden die Möglichkeiten der ISCOM-Herstellung mit einem hydrophilen Antigen diskutiert. Sein Vorschlag erwies sich allerdings als untauglich. Erst vor wenigen Wochen zeichnete sich die Möglichkeit eines Erfahrungsaustausches mit Dr. von Keutz ab, dem Leiter des Instituts für Toxikologie der Bayer AG, Leverkusen, über die Möglichkeiten der Herstellung und des Wirkungsmechanismus von Immunotoxinen.

## **Ergebnisse**

### ***A. Herstellung des NP und seine immunogene Bedeutung***

Für Untersuchungen über die Innenkomponente NP, das bei allen Influenzavirusstämmen des Typs A eine gleichartige Antigenstruktur besitzt, mußte zunächst die Reindarstellung des Antigens in genügender Menge sichergestellt werden. Dazu wurde auf das früher ausgearbeitete Reinigungsverfahren der Immunaффinitätschromatographie zurückgegriffen. Die für dieses Verfahren nötige größere Menge von Antikörpern wurde ohne Belastung von Versuchstieren aus Eidotter gewonnen. Dazu wurde eine Legehennen mit einem apathogenen, einem anderen Subtyp (H3/N2) angehörenden Virusstamm infiziert; die Eier wurden gesammelt und die aus dem Dotter isolierten, in beliebiger Menge zur Verfügung stehenden Antikörper an Sepharose konjugiert. Chorioallantoismembranen aus embryonierten Hühnereiern, die bei der routinemäßigen Produktion des KP-Virus (H7/N1) anfielen, wurden als Ausgangsmaterial für die Antigenproduktion benutzt. Aus dem Extrakt aus diesen Membranen ließ sich durch Immunaффinitätschromatographie reichlich Antigen gewinnen. Ein weiterer Reinigungsschritt, eine präparative isoelektrische Focussierung war allerdings nötig, um das NP schließlich in reiner Form darzustellen. An seinem isoelektrischen Punkt von etwa pH 5 fiel das Antigen aus, ließ sich

jedoch in Phosphatpuffer mit einem Zusatz von 2.5 M Harnstoff eluieren. Nach Dialyse des Harnstoffs blieb das Antigen in Lösung.

Mit diesem Antigen wurden zunächst monoklonale Antikörper hergestellt, mit denen in einem Zell-ELISA bestätigt werden konnte, daß NP auf der Oberfläche von infizierten Zellen exponiert ist, obwohl es keine hydrophoben Aminosäuresequenzen besitzt, die als Membrananker dienen könnten. Allerdings wurden nicht alle Antikörper gebunden, was darauf hindeutet, daß nicht alle Epitope des NP auf der Zelloberfläche für Antikörper zugänglich sind. Weiterhin erwies sich das Reaktionsmuster nicht als einheitlich für Zellen, die mit verschiedenen Subtypen infiziert worden waren. Beim Zusatz der reaktiven Antikörper in das Kulturmedium wurde die Menge von freigesetztem Virus nur geringgradig reduziert. Weiterhin bewirkten alleine diese reaktiven Antikörper in Anwesenheit von Komplement eine Zellysis, die allerdings keine maximalen Werte erreichte. Diese *in vitro*-Versuche zeigten, daß das NP wohl auf der Oberfläche der infizierten Wirtszelle exponiert ist, wahrscheinlich aber durch das Fehlen einer hydrophoben Ankersequenz nicht einheitlich ausgerichtet ist. Weiterhin erbrachten Versuche, eine über das exponierte NP laufende antikörpervermittelte zelluläre Cytotoxizität (ADCC) nachzuweisen, keine eindeutigen Ergebnisse.

### ***B. Schutzversuche mit dem NP***

Die Immunisation von Mäusen mit dem NP ergab keine Schutzwirkung gegen eine Belastungsinfektion mit einem pathogenen Influenzavirus. Allerdings ließen sich bei diesen Mäusen cytotoxische T-Zellen (CTL) nachweisen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Diese CTL waren vom Typ CD8+, obwohl das Antigen extrazellulär appliziert worden war. Um eine der Antigenpräsentation von CD8+-Zellen eher entsprechende intrazelluläre Synthese des Antigens zu gewährleisten, wurde in der Arbeitsgruppe von R. Zinkernagel, Zürich, das NP durch Infektion der Mäuse mit einem rekombinanten Vacciniavirus appliziert. Auch durch diese Versuchsanordnung ließ sich keine Schutzwirkung erzielen gegen die Infektion mit einem Influenzavirus eines fremden oder des homologen Subtyps, obwohl auch hier CTL nachweisbar waren. In einem analogen Versuchsansatz wurden kürzlich Hühner mit einer NP-Rekombinanten des Geflügelpockenvirus immunisiert (Webster et al., Vaccine 9, 303, 1991). Auch in diesem System, in dem die Infektion mit einem pathogenen Virus eine bei Hühnern tödlich verlaufende Allgemeinerkrankung auslöst, ließ sich keine Schutzwirkung durch die Immunisation mit dem

NP nachweisen. Damit wurden unsere Ergebnisse neuerdings auch von anderer Seite abgesichert.

Die zu Beginn dieser Untersuchungen publizierten Vorschläge und Hoffnungen (z.B. Wraith et al., J. Gen. Virol. 68, 433, 1987), daß von der Immunisation mit dem NP ein auf zellulären Reaktionen basierender Impfschutz zu erwarten sei, ließ sich durch unsere Arbeiten nicht erhärten. Damit konnte für die Impfstoffhersteller die naheliegende Empfehlung nicht unterstützt werden, die gebräuchliche Subunit-Vaccine mit dem NP anzureichern.

### ***C. Die Herstellung von ISCOMs mit dem wasserlöslichen NP***

Neben dem Bemühen, die ISCOMs als vielversprechende Verstärker der Immunantwort auch für wasserlösliche Antigene zu nutzen, stand als weiterer Grund für diese Versuchsreihe die Vermutung, daß die von anderer Seite behauptete Schutzwirkung durch das NP in Wahrheit auf eine unspezifische Stimulation der Immunreaktion zurückzuführen ist, die durch eine Kontamination der verwendeten NP-Präparate mit Lipiden, Glykoproteinen, vielleicht sogar durch Membranfetzen der Virushülle bewirkt wird.

Die ersten Versuche, NP-ISCOMs auf die bisher bekannte Weise herzustellen, waren erfolglos. Beim Fehlen von hydrophoben Regionen auf diesem Antigen war dieser Fehlschlag zu erwarten. Es wurde daher versucht, einen hydrophoben Anker in das Antigen einzuführen. Hierzu wurde das Lipid A ausgewählt, das die Verankerung von Kohlehydratketten in die äußere Membran gramnegativer Bakterien gewährleistet. Das hierzu notwendige Lipopolysaccharid (LPS) ist zu geringen Kosten im Handel erhältlich. Zur Konjugation an das Protein wurden die Kohlehydratketten oxidiert und damit das Lipid A über den Kohlehydratanteil an das NP gebunden. Diese Bindung ließ sich durch Analyse im Polyacrylamidgel durch den Nachweis des NP im Immunoblot und einer kohlehydratspezifischen Färbung dieser Bande bestätigen. Dieses Lipid A tragende NP wurde dem Quil A enthaltenden Reaktionsgemisch zugesetzt. Die daraus entstehenden ISCOMs enthielten NP, das sich durch Immunoblot des gereinigten ISCOM-Präparats darstellen ließ. Die von anderer Seite vorgeschlagene Acylierung mit Palmitinsäure war in unseren Händen nicht befriedigend.

Bei der Immunisierung von Mäusen waren zunächst in einigen Fällen Nebenwirkungen zu beobachten, die durch toxische Beiprodukte des Quil A verursacht wurden. Diese toxischen Effekte sind neuerdings nicht mehr zu

beobachten, nachdem ein gut gereinigtes Quil A zur Verfügung steht. Bei allen Versuchsmäusen setzte die Antikörperproduktion früh ein und erreichte sehr schnell hohe Titer. Bei Belastungsinfektionen erwies sich ein Teil der Mäuse als geschützt. Die Schutzrate lag etwa in der Mitte zwischen dem optimalen mit dem Hämagglutinin erreichbaren Impfschutz und den nicht immunisierten Kontrollen. Bei diesen mit NP-ISCOM immunisierten Tieren waren allerdings keine NP-spezifischen CTL nachweisbar.

Damit ergibt sich aus den Versuchsreihen das erstaunliche Ergebnis, daß die Anwesenheit von CTL nicht notwendigerweise einen Impfschutz anzeigt, während sich zumindest ein gewisser protektiver Effekt eingestellt hatte ohne daß CTL nachweisbar waren.

Diese Ergebnisse rücken eine Auffassung in den Vordergrund, die der Cytolyse von virusinfizierten Zellen durch die CTL eine sekundäre Rolle zuweist (Ramsay et al., Immunology Today 14, 155, 1993). Elegante Versuche mit Vacciniavirus, das Gene von Cytokinen trägt, haben gezeigt, daß selbst T-Zell-defekte Nacktmäuse eine Infektion mit diesem rekombinanten Vacciniavirus überstehen, während Kontrollen eine Infektion mit dem bloßen Vacciniavirus nicht überleben. Die Schutzwirkung käme demnach der direkten antiviralen Wirkung der unmittelbar bei der Virusreplikation synthetisierten Cytokine, vor allem dem Gammainterferon zu.

Eine solche Cytokinausschüttung ist von der unspezifischen Stimulation durch das Quil A zu erwarten. Eine spezifische NP-Reaktion würde lediglich dazu dienen, die Cytokine produzierenden Zellen an den Infektionsort zu dirigieren. Mit einer solchen Auffassung über die Rolle der zellulären Reaktionen sind unsere Ergebnisse sehr gut in Einklang zu bringen. Bei der Interpretation unserer Versuchsergebnisse wäre also nicht die Zerstörung der infizierten Zelle entscheidend, sondern die CTL und andere immunreaktiven Zellen hätten ihre Bedeutung als Produzenten von Interferon.

### ***D. Perorale Immunisation mit NP-ISCOM***

Im Verlauf der letzten Jahre wurden zahlreiche Versuche unternommen, apathogene Darmbakterien ein Immunogen verschiedenster Erreger exprimieren zu lassen, um auf diese Weise eine perorale Vaccination zu erzielen. Auch Gensegmente aus dem Hämagglutinin des Influenzavirus wurden in das Gen für das Flagellin von Salmonellen eingesetzt (siehe McEwen et al., Vaccine 10, 405, 1992). Alternativ zu diesem Ansatz wurde berichtet, daß durch Strahlenbehandlung inaktiviertes Influenzavirus, das an

Erythrocytenmembranen adsorbiert peroral an Mäuse verabreicht wurde, in der Lunge die Bildung von IgA stimulierte und sogar einen Subtyp übergreifenden Schutz vermittelte (Pang et al., J. Virol. 66, 1162, 1992). Dieser Bericht legte nahe, auch das in die ISCOMs integrierte NP peroral zu applizieren.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind noch nicht veröffentlicht und wurden daher in Tabelle 1 (Anhang S. 40) anhand repräsentativer Beispiele zusammengefaßt. Es wurde zunächst die Immunantwort als Stimulation der Antikörperproduktion in der Zirkulation und in der Waschflüssigkeit aus der Lunge gemessen. Aus der Tabelle geht hervor, daß die alleinige perorale Verabreichung von NP erwartungsgemäß so gut wie keine Antikörperproduktion stimulierte. Die perorale Applikation des in die ISCOMs integrierten NP stimulierte hohe Antikörpertiter im Serum und in der Lunge. Die aus dem Trachealbaum ausgewaschenen Sekrete enthielten relativ hohe Titer von IgA. Wurde das Material jedoch sehr sorgfältig mit der Magensonde eingeführt, so war weder im Serum noch in der Lunge ein nennenswerter Antikörpergehalt nachzuweisen. Diese Art der Verabreichung von NP-ISCOM unterschied sich also nicht von der einfachen peroralen Gabe von NP. Die beachtlichen Antikörpertiter im Blutserum und in der Lunge kamen erst zustande, wenn das Impfmateriale in die Mundhöhle eingegeben wurde. Demnach handelt es sich hier offenbar um eine Stimulation der Immunantwort über das lymphoretikuläre System des Rachenrings und nicht über die Peyerschen Platten, wie dies von anderen Untersuchern für die perorale Applikation angenommen wurde. Der Nachweis von beträchtlichen Titerwerten an IgA in der Lunge weist sogar darauf hin, daß stimulierte B-Zellen aus dem Rachenring in die Lunge eingewandert sind. Eine entsprechende Migration ist auch für T-Zellen zu erwarten.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß sich mit ISCOM-Präparaten sehr einfach, auf angenehme und gut verträgliche Weise eine Vaccination ermöglichen könnte.

### ***E. Versuche zur Zerstörung virusinfizierter Zellen mit Hilfe von Immunotoxinen***

Um die Bedeutung der Zellysis durch die CTL bei der Abwehr und der Überwindung von Influenzavirusinfektionen besser einschätzen zu können, sollte die Möglichkeit der gezielten Zerstörung infizierter Zellen mit Hilfe von Immunotoxinen geprüft werden. Bei positivem Ausfall wäre an eine therapeutische Beeinflussung des Krankheitsverlaufs mit einem solchen Präparat zu denken.

Für diese Versuche wurde Gelonin an einen monoklonalen hämagglutinin-spezifischen Antikörper konjugiert, der das Toxin an die Zelle binden sollte, damit nach der Internalisierung des Toxins die Proteinsynthese gestört würde. Gegen das Hämagglutinin gerichtete Antikörper wurden in dieser ersten Versuchsreihe benutzt, um die Bindung des Toxins an ein membranständiges Glykoprotein zu garantieren. Die Behandlung von infizierten Zellen mit dem Konjugat zeigte jedoch keinen toxischen Effekt auf die infizierten Zellen. Diese zeigten sich unverändert, bis auch in Kontrollzellen ohne Konjugat ein CPE eintrat. Die Virusausbeute war nicht beeinflusst; allerdings konnte durch die Anwesenheit von Hämagglutination und Infektiosität hemmenden Antikörpern im Medium die Wirkung von hohen Antikörperkonzentrationen nicht endgültig beurteilt werden. Der entsprechende Versuch mit einem nicht neutralisierenden hämagglutinin-spezifischen monoklonalen Antikörper (siehe Abschnitt F) kann hier endgültig Klarheit schaffen. Die Auswertung dieser Versuchsreihe legte die Vermutung nahe, daß die durch die eingelagerten viralen Glykoproteine und die Ausschleusungsvorgänge veränderte Zellmembran über ein als Rezeptor dienendes virales Glykoprotein nicht mehr genügend auf die Antikörperbindung anspricht, um den Toxin-Antikörperkomplex zu internalisieren. Diese Versuchsreihe wurde daher nicht fortgesetzt.

### ***K Ein in die Zellmembran eingelagertes verkürztes Hämagglutinin als Angriffspunkt von Antikörpern für die Ausschleusungshemmung***

Bei der Aufarbeitung der CAM für die Herstellung des NP wurde die Membranfraktion auszentrifugiert. Als die aus dieser Fraktion extrahierten Antigene untersucht wurden, ergab sich als interessanter Befund eine Reaktion mit Antiserum, das gegen die schwere Kette des Hämagglutinins (HA<sub>1</sub>) gerichtet war, während eine Reaktion mit einem HA<sub>2</sub>-spezifischen Antiserum nicht erfolgte. Es folgten nun Versuche, mit Hilfe der Immunitätschromatographie dieses Antigen zu reinigen. Für die Herstellung des Immunabsorbens wurden ebenfalls aus dem Eidotter gewonnene Antikörper benutzt. Das aus der Membranfraktion stammende NP, das ebenfalls an das Immunabsorbens gebunden wurde, konnte durch Chromatographie über Red A abgetrennt werden. In weiteren Versuchen wurden für die Herstellung des Immunabsorbens HA<sub>1</sub>-spezifische monoklonale Antikörper verwendet, die den Reinigungsschritt über Red A überflüssig machten. Zur Elimination von kontaminierendem Material wurde die isoelektrische Focussierung eingesetzt. Das mit HA<sub>1</sub>-spezifischen monoklonalen Antikörpern reagierende Antigen wurde bei einem isoelektrischen Punkt von pH 8,9 identifiziert. Bei der PAGE erwies sich dieses Präparat als eine

Bande, die geringgradig schneller wanderte als das HA<sub>1</sub> des Viruspartikels. Nachdem die aminoternale Aminosäuresequenz dieses Peptids festgestellt und mit der bekannten Sequenz des Hämagglutinins in Übereinstimmung gebracht worden war, zeigte sich, daß dieses Peptid zwischen den Positionen 19 und 20 gespalten wurde. Damit erklärt sich neben der Verkürzung des Peptids die Elimination der Disulfidbrücke (Cystein der Position 4), die das HA<sub>2</sub> mit dem HA<sub>1</sub> verbindet.

Dieses zeilassozierte HA<sub>1</sub> konnte auch in der Allantoisflüssigkeit nachgewiesen werden, die nach der Gewinnung der Viruspartikel durch Filtration über eine Membran mit einer Ausschlußgrenze von MG 300000 anfiel. Aus diesem Filtrat wurde ein HA<sub>1</sub> über die Affinitätsäule und durch anschließende isoelektrische Focussierung gewonnen, das offensichtlich die gleichen Struktureigenschaften wie das zeilassozierte HA<sub>1</sub> besitzt. Wurden Antikörper gegen dieses Antigen hergestellt und der Agarschicht eines Plaque-Tests zugesetzt, kam es zu einer starken Reduktion der Plaquegröße. Diese Antikörper waren nicht imstande, die Hämagglutination zu hemmen oder die Infektiosität zu neutralisieren. Als Angriffspunkt für diese Antikörper dient wahrscheinlich das von uns in früheren Untersuchungen diffus auf der Oberfläche der infizierten Zelle verteilte HA<sub>1</sub>. Hier handelt es sich um einen Effekt, der in Zusammenhang mit der Ausschleusungshemmung durch anti-Neuraminidase Antikörper als „infection-permissive immunization“ (Johannson & Kilbourne, Vaccine 9, 330, 1991) bezeichnet wurde. Man kann davon ausgehen, daß dieses Peptid durch gentechnologische Methoden in beliebiger Menge herstellbar ist und in ISCOMs eingebaut, vielleicht eine Infektion nicht verhindert, ihre Ausbreitung jedoch einschränkt. Ein solches Produkt wäre ein möglicher Zusatz zu herkömmlichen Influenzaimpfstoffen.

Diese Ergebnisse haben praktischen Bezug für die Verbesserung und Weiterentwicklung von Impfstoffen. Dies gilt insbesondere für die Klarstellung des Weites des NP für die gegenwärtig gebräuchliche Subunit-Vaccine. Weiterhin ergaben sich neue Perspektiven für die „infection-permissive immunization“, und schließlich wurden Möglichkeiten für die Weiterentwicklung und Anwendung der ISCOM-Technologie mit ihrer hervorragenden Adjuvanswirkung aufgezeigt.

### **Erfolgskontrollbericht**

Diese Untersuchungen haben klargelegt, daß durch das NP typübergreifend cytotoxische T-Zellen stimuliert werden. Die daraus abgeleitete Schutzwirkung gegen eine Infektion mit dem Influenzavirus ließ sich jedoch

nicht bestätigen. Die von einer Vaccine auf NP-Basis erhoffte Verminderung der ständigen Bedrohung des im Zivil- und Katastrophenschutz tätigen Personals durch die Influenza fand damit keine Unterstützung. Überhaupt wurde klargestellt, daß eine Empfehlung an die Impfstoffhersteller, dem marktüblichen Impfstoff gezielt das NP zuzusetzen, nicht gerechtfertigt ist. Andererseits haben die Erweiterungen der ISCOM-Technologie Möglichkeiten der Potenzierung von Antigenen eröffnet, um das NP und mit großer Wahrscheinlichkeit auch auf gentechnologischem Weg produzierte Antigene als Impfstoffe einzusetzen, deren Schutzwirkung gerade dem im Zivil- und Katastrophenschutz tätigen Personal zugute kommen kann.

Die vorgesehenen Arbeiten wurden im Rahmen der vorgegebenen Zeit durchgeführt. Da die in Aussicht gestellte Auslauffinanzierung nicht gewährt werden konnte, wurden wenigstens die wichtigsten restlichen Arbeiten zur „infection-permissive immunization“ durch das zellassozierte HA<sub>1</sub> sowie die peroralen Immunisationsversuche mit ISCOM-Präparaten aus Mitteln der Forschergruppe zu einem vorläufigen Abschluß gebracht.

Die Untersuchungen über die Möglichkeit der Zerstörung der virusinfizierten Zelle durch Immunotoxine haben zu keinem Ergebnis geführt und wurden nicht weiter verfolgt.

Die Ergebnisse wurden in den nachstehend genannten Arbeiten publiziert. Eine übersichtliche Darstellung der meisten in diesem Projekt erzielten Ergebnisse wurde in den Behring Institute Mitteilungen veröffentlicht.

*Stitz et al (1990):* Characterization and immunological properties of influenza A virus nucleoprotein (NP): cell-associated NP isolated from infected cells or viral NP expressed by vaccinica recombinant virus do not confer protection. *Journal of General Virology* 71, 1169-1179.

*Weiss et al (1990):* Immunogenic properties of ISCOM prepared with influenza virus nucleoprotein. *Archives of Virology* 114, 109-120.

*Weber et al (1993):* Isolation and immunogenic properties of a monomeric form of the HA<sub>1</sub> subunit of the influenza virus haemagglutinin from infected cells. *Journal of General Virology*, im Druck.

*Becht, K und Weiss, K-R (1991):* The influenza virus-infected host cell, a target for the immune response. *Behring Institute Mitteilungen* 89, 1-11.

## **Kurzfassung**

1. Mit Hilfe einer Immunaффinitätschromatographie konnte aus Chorioallantoismembranen von virusinfizierten Hühnerembryonen in genügender Menge Nukleoprotein (NP) eines Influenza A Virus bereitgestellt werden. Das Reaktionsmuster von NP-spezifischen monoklonalen Antikörpern machte deutlich, daß das NP wohl auf der Zelloberfläche in einer für Antikörper erkennbaren Form exponiert ist, daß es aber als ein Molekül ohne hydrophobe Regionen nicht regelmäßig ausgerichtet und erkennbar ist. NP-spezifische Epitope werden in Verbindung mit MHC der Klasse I auf der Zelloberfläche exponiert, so daß sie von cytotoxischen T-Zellen (CTL) erkannt werden. Das Auftreten von CTL nach der Immunisation von Mäusen mit NP war jedoch nicht begleitet von einem Immunschutz. Analoge Resultate ergaben sich nach Immunisation mit einer NP-Vaccinia Rekombinanten.

2. Das NP konnte durch Konjugation an ein bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) in ein Molekül mit amphipatischen Eigenschaften überführt werden, das mit dem potenten Adjuvans Quil A in ISCOMs (Immunostimulating Complex) eingebaut werden konnte. Die Immunisation mit NP-ISCOMs erzielte einen partiellen Schutz, ohne daß NP-spezifische CTL nachweisbar waren. Es erhebt sich damit die Frage, ob überhaupt die Zellyse durch CTL den für eine zelluläre Immunität entscheidenden Mechanismus darstellt. Weiterhin erfolgte nach peroraler Verabreichung der NP-ISCOMs eine schnelle und starke Antikörperproduktion im Serum und in der Lunge, so daß diese Verabreichung einen einfachen und komplikationslosen Immunisationsweg darstellen könnte. Der Antigenreiz erfolgte nicht über die Peyerschen Platten der Darmschleimhaut, sondern über das lymphatische System des Rachenraums.

3. Mit einem Immunotoxin (anti-Hämagglutinin Antikörper konjugiert an Gelonin) sollte auf grundsätzlich anderem Weg eine Zellysis erreicht werden, um damit die Wirkung der CTL zu imitieren und deren Bedeutung abzuschätzen. Die Lysis virusinfizierter Zellen ist auf diesem Weg nicht gelungen.

4. Für das Prinzip der „infection-permissive immunization“ wurde neben der Neuraminidase, für die dieser Begriff geprägt worden ist, ein weiteres Antigen identifiziert. Es handelt sich hier um ein wasserlösliches verkürztes HA1, das mit der Membranfraktion der Zelle assoziiert ist und auch in die Allantoisflüssigkeit sezerniert wird. Durch eine zusätzliche proteolytische Spaltung nach der Überführung des Vorläufermoleküls in die Untereinheiten HA1 und HA2 wird dieses Stück durch eine Spaltung zwischen den

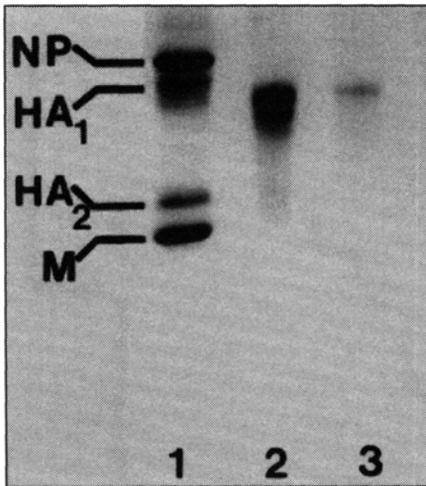
Aminosäuren 19 und 20 der Peptidkette aus dem Hämagglutinin herausgelöst, wahrscheinlich zur Zelloberfläche transportiert und auch sezerniert. Antikörper, die gegen dieses verkürzte HA1 gerichtet sind, haben keine neutralisierende Wirkung; ihre Anwesenheit im Kulturmedium verhindert jedoch die Freisetzung der neu gebildeten Viruspartikel. Da ein solches Antigen ohne Schwierigkeiten auf gentechnologischem Weg herstellbar ist, könnte dieses Präparat ein wertvoller Zusatz zum marktüblichen Impfstoff darstellen, um eine Immunitätslage aufzubauen oder zu verstärken, die eine Infektion nicht verhindert, aber die Ausbreitung neu gebildeter Viren im Organismus unterbindet.

## Anhang: Tabellen und Abbildungen

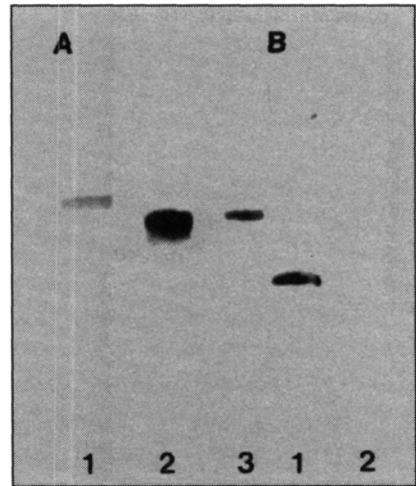
Tabelle 1

Antigen	Imm.-weg	IgG		IgA	
		Serum	Lunge	Serum	Lunge
NP	Magens.	$5 \times 10^{-1}$	neg.	neg.	neg.
NP	oro-phar.	$6 \times 10^{-3}$	$3 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-2}$	neg.
NP-ISCOM	Magens.	$4 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-1}$	neg.	neg.
NP-ISCOM	oro-phar.	$4 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-3}$	$3 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-3}$
NP-ISCOM	subkutan	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-3}$	neg.

Titration der anti-NP Antikörper in Blutserum und Lungenlavage durch ELISA. Applikation des Antigens erfolgte durch Magensonde (Magens.) in die Mundhöhle (oro-phar.) und subkutan.

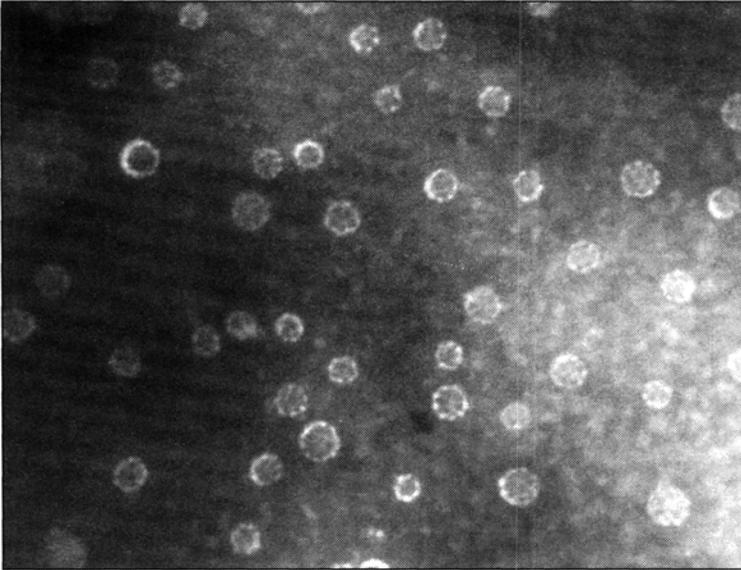


**Abb. 1:**  
Polyacrylamidgel-Elektrophorese des KP-Virus (1), des verkürzten aus infizierten Chorioallantoismembranen gereinigten  $HA_1$  (2), des aus der Allantoisflüssigkeit isolierten  $HA_1$  (3). Das 12,5%ige Gel wurde mit Coomassie brilliant blue gefärbt.



**Abb. 2:**  
Immunoblot des KP-Virus (1), des aus Chorioallantoismembranen (2) oder aus Allantoisflüssigkeit (3) gereinigten  $HA_1$ . Bildteil A wurde mit einem  $HA_1$ -spezifischen, B mit einem  $HA_2$ -spezifischen monoklonalen Antikörper dargestellt.





**Abb. 5:**  
**Elektronenmikroskopische Darstellung der NP enthaltenden ISCOMs.**  
**Der Durchmesser der Partikel beträgt etwa 35 nm.**

# III. Die Bedeutung vasculärer Reaktionen beim akuten Nierenversagen nach großen Weichteilverletzungen (Crush-Niere)

E Hoffmann, E Vetterlein, G. Schmidt

## 1. Einleitung

Von den Auslöseformen, die zu einem akuten Nierenversagen (ARF) führen können, stellt das pigmentinduzierte oder hämo-myoglobinurische akute Nierenversagen mit 7-10% aller akut auftretenden Niereninsuffizienzen eine relativ häufige Form dar.

Ätiologisch kommen für die Auslösung dieser Form des Nierenversagens grundsätzlich alle Zustände in Betracht, die eine Hämolyse oder Rhabdomyolyse zur Folge haben können (DUBROW und FLAUMENBAUM [1988], GABOW et al. [1982]). Das Auftreten eines ARF bei massiver Hämoglobin- bzw. Myoglobinämie wird hierbei klinisch durch weitere Faktoren, wie z.B. eine ausgeprägte Hypotension, begünstigt (z.B. ROTH et al. [1988], WARD [1988]).

Einen besonders wichtigen Auslösemodus dieses Krankheitsbildes stellt das *Polytrauma* mit gleichzeitig bestehender Schocksymptomatik dar. Infolge traumatischer, schwerer Muskelzerstörungen kommt es hier relativ häufig zu einer starken Myoglobinämie mit nachfolgendem ARF (z.B. BETTER [1990], HACKL et al. [1990]).

Erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Freisetzung von Myoglobin bzw. Hämoglobin und der Entstehung eines akuten Nierenversagens haben schon sehr frühe Untersuchungen gegeben (PONFICK [1875], MINAMI [1923], zitiert nach BUCHBORN und EDEL [1968]). Seit der Wiederentdeckung dieses Auslösemodus einer Nierenschädigung und seiner Benennung als *Crushniere* durch BYWATERS und BEALL (1941) hat man sich mit dieser Form des ARF intensiv beschäftigt.

Als tierexperimentelles Modell für dieses Krankheitsbild ist vorwiegend das durch *Glycerol* induzierte akute Nierenversagen eingesetzt worden. Der Grund liegt darin, daß sich durch Injektion einer 50-100 prozentigen Glycerollösung (5-10 ml/kg KG) sehr zuverlässig ein reproduzierbarer akuter Nierenschaden auslösen läßt. Als charakteristische Veränderung kommt es dabei nach Injektion der hyperosmolaren Glycerollösung – neben

einem massiven Gewebsödem mit entsprechenden hypovolämischen Folgen – bereits in  
fen beim glycerolinduzierten Nierenversagen neben der Myoglobin- und  
Hämoglobinfreisetzung wie beim Crushsyndrom jedoch noch eine Viel-  
zahl anderer Mechanismen, wie z.B. die Freisetzung von Zellabbaupro-  
dukten aus dem Purinstoffwechsel, ab (z.B. BLACHAR et al. [1981],  
ANDREUCCI [1984], ODEH [1991]).

In der vorliegenden Arbeit sollte zur näheren Analyse des Crush-Syndroms eine gezielte Auslösung einer Myoglobinämie erfolgen und so dieser,  
für das Crush-Syndrom vermutlich wichtigste Faktor isoliert in seiner  
Wirkung sowohl auf Nierenfunktion als auch auf die renale Mikrozirkula-  
tion analysiert werden. Derartige systematische Untersuchungen, in denen  
ein akutes Nierenversagen durch alleinige Gabe von Myoglobin oder  
Hämoglobin ausgelöst und der Einfluß weiterer Faktoren auf deren  
nephrotoxischen Effekt untersucht wurde, sind nur vereinzelt angestellt  
worden.

Da bekannt ist, daß sowohl bei dem durch direkte Myoglobingabe erzeug-  
ten ARF als auch beim Glycerolmodell bestimmte Zusatzbedingungen  
wie eine Harnansäuerung sowie Salz- oder Volumendepletion (z.B.  
LALICH [1947], LALICH und SCHWARTZ [1950]) die Auslösung des  
akuten Nierenschadens begünstigen, sollten diese Faktoren auf die Auslö-  
sung des Myoglobin – induzierten Nierenversagens geklärt werden.

Weiterhin sollte als besonders wichtiger Faktor der Einfluß einer zusätzlichen  
hämorrhagischen Hypotension untersucht werden. In früheren Versuchs-  
anordnungen ist zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen myo-  
globinurischer Nierenschädigung und renaler Ischämie diese vorwiegend  
durch Erzeugung einer totalen Nierenarterienokklusion herbeigeführt  
worden (PALLER [1988], MANDEL et al. [1989]). Im Gegensatz zur  
vollständigen Nierenarterienokklusion läßt eine hämorrhagische Hypoten-  
sion prinzipiell eine Restperfusion des Nierengewebes zu. Sie entspricht  
daher eher den tatsächlich bei der Crushniere ablaufenden pathophysiolo-  
gischen Vorgängen.

## **2. Materialien und Methoden**

### ***2.1 Versuchsaufbau und-ablauf***

Die Versuche wurden an männlichen Wistar Ratten mit einem Gewicht  
von 235-255 Gramm durchgeführt. Alle Tiere hatten bis 18 Stunden vor Ver-  
suchsbeginn freien Zugang zu einer standardisierten Rattendiät und Wasser.

In einem Teil der Versuche wurden nach dieser Zeit Wasser und Futter abgesetzt.

Die Versuchstiere wurden durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital-Na (50 mg/kg KG) narkotisiert und anschließend in Rückenlage auf eine Wärmeplatte gelagert. Unter Zuhilfenahme einer Wärmelampe und durch einen rektal eingeführten Temperaturfühler (Telethermometer Model 73, Yellow Springs Instrument Co. Inc.) wurde die Körpertemperatur konstant auf 36-37° Celsius gehalten. Unter dem Operationsmikroskop (OpMi-I, Fa. Carl Zeiss) schlossen sich folgende Präparationsschritte an:

- Einbringen eines Polyäthylenkatheters in die linke Vena femoralis zur bedarfsweisen Nachinjektion von Pentobarbital sowie zur Dauerinfusion einer Inulinlösung über eine Infusionspumpe (Precidor Typ 5003, InforsAG, Basel).
- Legen einer Trachealkanüle zur Zuführung eines Lachgas-Sauerstoffgemisches (70%/30%) und – bedarfsweise – Trachealtoilette.
- Einführen eines Arterienkatheters in die linke Arteria femoralis zur kontinuierlichen Puls- und Blutdruckmessung über ein Statham-Element (Gould Statham P23Db). Die Werte wurden an einer Meßbrücke (Statham blood pressure monitor SP 1400) sowie einem Pulsfrequenzzähler analog angezeigt.
- Katheterisierung der Arteria femoralis rechts zur Blutentnahme bzw. Durchführung der hämorrhagischen Hypotension sowie der Vena femoralis rechts zur Infusion von Myoglobin- bzw. der Farbstofflösungen.
- Eröffnung des Abdomens durch einen Paramedianschnitt links unter Zuhilfenahme eines Elektroauters (Kaustikgerät K II, Fa. Effner, Berlin).
- Harnblasenpunktion zur Bestimmung der primären Urin-Osmolalität und des Urin-pHs.
- Aufsuchen der Harnleiter und ihre Katheterisierung mit einem Polyäthylenschlauch (ID: 0.28 mm; OD: 0.61 mm) zum Sammeln der Harnproben. Die Katheter wurden nach lockerer Adaptation der Bauchdecken mit Gefäßklemmen aus dem Bauchraum in die Sammelgefäße geleitet.

Harnsammeiperioden zur Bestimmung der renalen Funktionsparameter

Noch während der Präparation wurde zur Bestimmung der Inulin-clearance mit einer Inulindauerinfusion (0,022 ml/min) begonnen. Nach Beendigung der Präparation und einstündiger Inulininfusion konnte von einem konstanten Plasmaspiegel ausgegangen werden. Es schloß sich eine erste dreißigminütige Harnsammeiperiode zur Bestimmung der basalen glomerulären Filtrationsrate (GFR) an. Jeweils nach der Hälfte der Sammeperioden wurde zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Inulin,

Natrium und Kalium eine arterielle Blutprobe (0.2 ml) entnommen und das Volumen durch Ringerlösung ersetzt.

Anschließend wurde je nach Versuchsgruppe folgendermaßen vorgegangen:

#### Myoglobinzufuhr

Myoglobin wurde in einer Dosis von 250 mg/kg KG über die rechte Femoralvene über einen Infusomaten über etwa eine Stunde i. v. infundiert. Nach Austausch des Harns im Urinkatheter – angezeigt durch eine leichte Braunfärbung des Harns am Katheterende ca. zwei Minuten nach Infusionsbeginn – wurde m und im weiteren über halbstündige Zeitintervalle der Harn gesammelt.

#### Hämorrhagische Hypotension

Eine hämorrhagische Hypotension (HH) wurde über 30 Minuten auf einen arteriellen Blutdruck von 50 mmHg eingestellt. Das Vorgehen erfolgte modifiziert nach einer von SANDOZ et al. (1974) angewandten Methode, indem eine offene Verbindung zwischen einem heparinisierten Steigrohr mit aufsitzendem Sammelbehälter und der rechten A. femoralis geschaffen wurde. Durch den permanenten hydrostatischen Abgleich zwischen der Blutsäule im Sammelbehälter und dem arteriellen Blutdruck konnte dieser innerhalb weniger Minuten sehr konstant auf den gewünschten Wert eingestellt werden. Da es unter Hypotension regelmäßig zum Sistieren der Harnausscheidung kam, wurde die zugeführte Inulinmenge in dieser Zeit halbiert und auf 0.011 ml/min eingestellt. Nach Ablauf der Hypotensionsphase erfolgte die Retransfusion über das gleiche System über eine Zeitspanne von etwa drei Minuten.

#### Kombination von Myoglobinzufuhr und Hämorrhagie

Beim Einsatz von Myoglobin und hämorrhagischer Hypotension wurde zunächst mit der Myoglobin-Infusion begonnen, um bei normalem Blutdruck und damit noch vorhandenem Filtrationsdruck eine Interaktion zwischen Niere und Myoglobin sicher zu ermöglichen. 15 Minuten nach Beginn der Myoglobinzufuhr wurde zusätzlich entsprechend der oben beschriebenen Methode eine halbstündige Hypotension durchgeführt.

Zehn bis fünfzehn Minuten nach Retransfusion wurde das Sammeln der Harnproben mit halbstündigen Intervallen fortgesetzt.

#### Farbstoffgabe

Die kapilläre Durchblutungsverteilung in der Niere wurde mittels Intravitalmarkierung der Blutplasmas durch Fluoreszenzfarbstoffe qualitativ bestimmt.

Eine bzw. drei Minuten vor Nephrektomie wurden an Globulin gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe RB-200 (Lissamin-Rhodamin) bzw. FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) in einer Dosis von 0,3 ml/100g KG über die Femoralvene als Bolus injiziert. Die Niere wurde zur vorgegebenen Zeit am Hilus abgeklemmt und innerhalb einer Sekunde in auf  $-80^{\circ}$  Celsius gekühltes Isopentan überführt. Das Versuchstier wurde anschließend durch eine Pentobarbitalüberdosis getötet.

## 2.2 *Materialien:*

Standardisierte

Rattendiät: Altromin

Pentobarbital: Pentobarbital-Natrium(Nembutal<sup>R</sup>), Fa. Abbott Laboratories; 10 mg/ml Ringerlösung, Dosis: 50 mg/kg KG

Inulin: Inulin reinst: Sigma Chemical Company; Dosis: 0,022 ml/min in einer Lösung mit 15 mg/ml

Heparin: Liquemin Fa. Hoffmann Ia Roche, 153,2 IE/mg, 10 g/l H<sub>2</sub>O; Dosis: 600 IE/kg KG

Myoglobin: Myoglobin aus Pferdemyocard, Fa. Serva; Dosis: 0,25 g/kg KG in 50 mg/ml Ringerlösung

RB-200: Lissamin-Rhodamin, Fa. Gurr, Umwandlung zum Sulfonsäurechlorid durch PCI<sub>5</sub> zur Konjugation mit Globulin (s. u.)

FTTC: Fluorescein-Isothiocyanat, Fa. Sigma; zur Konjugation mit Serum-Globulin (s. u.)

Globulin: Rinder-Gamma-Globulin, Fa. Serva; konjugiert mit den obengenannten Fluorochromen in 8-10 %-iger Lösung; Dosis: 0,3 ml/100g KG

Die Koppelung der Fluoreszenzfarbstoffe an das Globulin wurde nach der Methode von NAIRN (1976) durchgeführt.

## 2.3 *Versuchsgruppen*

Die folgenden Versuchsreihen wurden gebildet:

In der *ersten Versuchsreihe (A)* wurden die Tiere nicht vorbehandelt. Es wurden die Wirkungen von Myoglobin und hämorrhagischer Hypotension allein und kombiniert untersucht:

- Gruppe A1: Myoglobin über 60 Minuten iv.; 180 Minuten nach Infusionsstart Untersuchung der intrarenalen Durchblutungsverteilung
- Gruppe A2: Hämorrhagische Hypotension auf 50 mmHg über 30 Minuten, 120 Minuten nach Retransfusion Untersuchung der intrarenalen Durchblutungsverteilung
- Gruppe A3: Myoglobin über 60 Minuten iv.; 15 Minuten nach Beginn der Myoglobininfusion Start der hämorrhagischen Hypotension über 30 Minuten, nach 180 Minuten Untersuchung der intrarenalen Durchblutungsverteilung.

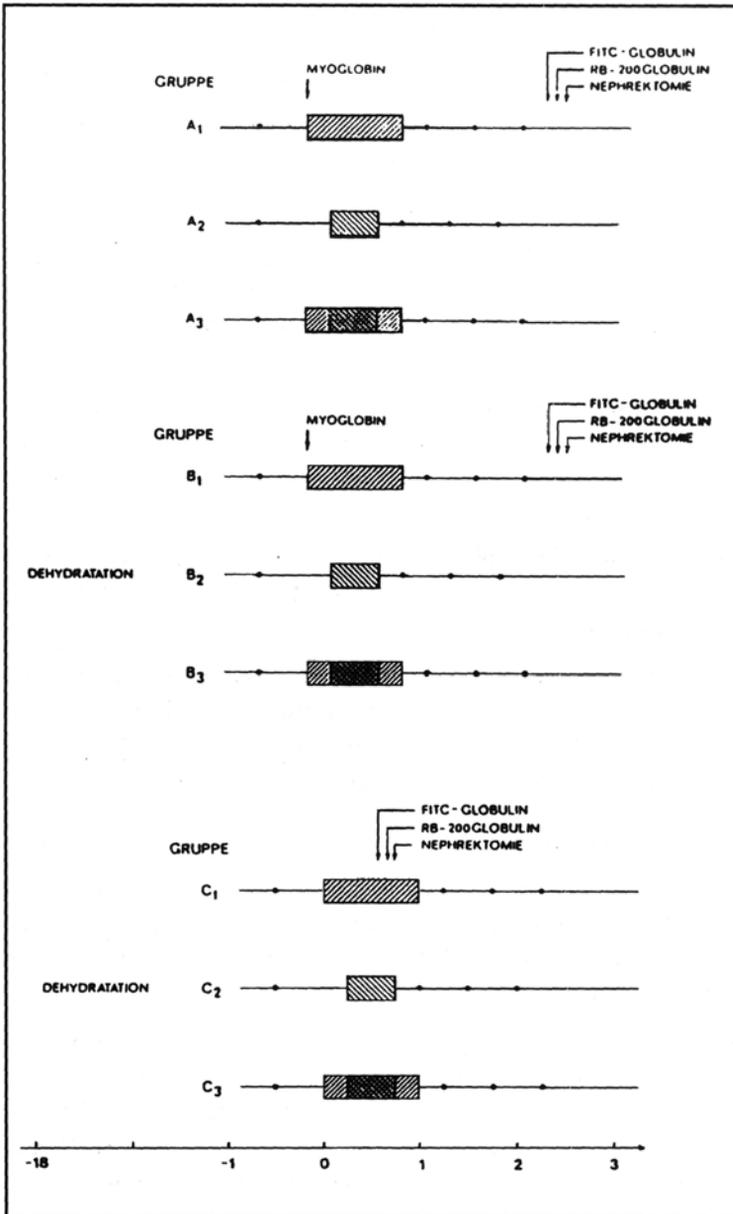
In einer *zweiten Versuchsreihe (B)* wurden die Tiere vorbehandelt, indem für 18 Stunden Nahrung und Wasser entzogen wurde. Hierdurch wurde bei den Versuchstieren eine Exsikkose mit endogener Harnansäuerung erzeugt. Am Ende dieser Phase erfolgte die Narkotisierung und in:

- Gruppe B1: Myoglobinzufuhr und Vorgehen wie in Gruppe A 1
- Gruppe B2: Auslösung einer hämorrhagischer Hypotension mit weiterem Vorgehen wie in Gruppe A 2
- Gruppe B3: Myoglobinzufuhr und hämorrhagische Hypotension wie bei Gruppe A 3 beschrieben.

In einer *dritten Versuchsreihe (C)* entsprach das Vorgehen dem der Versuchsreihe B, die intrarenalen Perfusionsverhältnisse wurden hier jedoch noch während der Myoglobinzufuhr bzw. noch während der hämorrhagischen Hypotension untersucht. Hierzu wurde folgendermaßen vorgegangen:

Nach Wasser und Nahrungsentzug am Vortag wurden die Tiere wiederum narkotisiert und es erfolgte in:

- Gruppe C1: 45 Minuten nach Beginn der Myoglobininfusion die Untersuchung der intrarenalen Durchblutungsverteilung
- Gruppe C2: am Ende der dreißigminütigen hämorrhagischen Hypotension die Untersuchung der intrarenalen Durchblutungsverteilung
- Gruppe C3: am Ende einer 45-minütigen Myoglobininfusion bzw. Ende einer 30-minütigen hämorrhagischen Hypotension die Untersuchung der intrarenalen Durchblutungsverteilung.



- 
- 

Abb.1:  
Schematische Darstellung des Versuchsablaufes in den einzelnen Versuchsgruppen.

## **2.4. Ermittelte Nierenfunktionsparameter**

Aus den in den Versuchen gewonnenen Harnproben wurden folgende Parameter ermittelt:

1. Harnvolumen zur Bestimmung des Harnflusses (HF)
  2. Harnosmolalität (Osm)
  3. Inulin-clearance (GFR)
  4. fraktionierte Natrium- und Kaliumexkretion im Urin (FeNa, FeK)
- Zu 1: Der Harnfluß (HF) wurde aus Sammelzeit und Harnvolumen über die Gewichtsbestimmung mit einer elektronischen Analysenwaage (Fa. Sartorius, Göttingen) ermittelt.

Zu 2: Die Harnosmolalität wurde mit Hilfe eines Gefrierpunktsmometers (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin) bestimmt. Bei Vorliegen sehr kleiner Harnvolumina erfolgte diese nach einer bis zu 10-fachen Verdünnung mit destilliertem Wasser.

Zu 3: Zur Errechnung der glomerulären Filtrationsrate wurde die Bestimmung der Inulinkonzentration nach der Methode von DAVIDSON und SACKNER (1963) durchgeführt.

Zu 4: Die fraktionierten Natrium- und Kaliumexkretionen wurden nach flammenphotometrischer Bestimmung der Natrium- und Kaliumkonzentrationen in Plasma und Urin (Flammenphotometer IL 543, Fa. Instrumentation Laboratory, Kirchheim) errechnet.

## **2.5 Histologische Auswertung**

Die gefrorenen Nieren wurden bei einer Temperatur von -20 Grad Celsius in einem Gefriermikrotom (Frigocut Modell 2700, Fa. Reichert-Jung) parallel zur Nierenlängsachse von der dem Nierenhilus gegenüberliegenden Seite her aufgeschnitten.

Das Gewebe wurde soweit abgetragen, bis neben Cortex und Außenstreifen des Nierenmarkes die Vasa recta des Innenstreifens makroskopisch als rote Punkte erkennbar wurden. Von dieser festgesetzten Ebene wurden Schnitte mit einer Schichtdicke von 7  $\mu\text{m}$  angefertigt und nach der von VETTERLEIN et al. (1982) beschriebenen Methode aufgearbeitet. Die Schnitte wurden anschließend hinsichtlich der Perfusionsverteilung der intravital injizierten Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Fluoreszenzauflichtmikroskop (Fa. Carl Zeiss) ausgewertet. Dabei wurden folgende Filter verwendet:

Zur Messung der Verteilung des intravasalen FITC-Globulins im Nierengewebe wurde ein Primärfilter mit einer Wellenlänge von 470 nm, ein Interferenzspiegel von 510 nm und ein Sekundärfilter von 528 nm eingesetzt.

Die Wellenlängen zur Beurteilung der RB-200-Verteilung betragen für das Primärfilter 546 nm, den Interferenzspiegel 580 nm und für das Sekundärfilter 590 nm.

### *2.6 Auswertung der intravasalen Farbstoff-Verteilung*

Zur Auswertung der Farbstoffverteilung im Kapillarsystem der Niere wurde ein von LOATS et al. (1978) beschriebenes Verfahren angewandt.

Bei diesem Verfahren wird die Entfernung eines zufällig ausgewählten Gewebepunktes zu der ihm am nächsten liegenden (durchbluteten) Kapillare bestimmt.

Die Durchführung einer großen Zahl von Abstandsmessungen erlaubt es hierbei, eine Häufigkeitsverteilung der bestehenden Diffusionsstrecken für den jeweiligen Gewebeschnitt zu ermitteln. Die Strecken werden zur Vereinfachung des Verfahrens in Größenklassen unterteilt.

Dieses Verfahren gestattet, die Verteilung der gemessenen Diffusionsstrecken zwischen willkürlich ausgewählten Gewebepunkten und den jeweils für ihre Versorgung zuständigen nächsten perfundierten Kapillaren quantitativ zu bestimmen.

Das Verfahren basiert auf der Überlegung, daß gleichmäßig verteilte Kapillaren zu zufällig ausgewählten Meßpunkten einen Abstand haben, der zwischen Null und der halben Interkapillardistanz schwankt. Treten Perfusionsausfälle ein, werden diese Distanzen entsprechend größer.

Die Auswertung unserer Versuche erfolgte leicht modifiziert durch rechnerunterstützte Automatisierung der Auswahl der Gewebepunkte. Zur Automatisierung und Randomisierung dieses Verfahrens wurden von einem Rechner festgelegte Rasterpunkte regelmäßig im Abstand von 300 µm auf das Gewebe projiziert bzw. über xy-Schrittmotoren eines Scanningtisches automatisch angefahren.

Zuvor mußten die zu untersuchenden Gewebestrukturen Nierenrinde, Außenstreifen und Innenstreifen vorgegeben werden. Hierzu wurde zunächst der Außenrand des Nierenschnittes mit Hilfe eines Joysticks angefahren und dann unter dem Mikroskop mit Hilfe eines Fadenkreuzes der Rand umfahren. Die Umfahrlinie wurde durch ein entsprechendes EDV-Programm gespeichert. Analog erfolgte die Speicherung der Grenzen zwischen Rinde und Außenstreifen (charakterisiert durch eine gedachte Linie, die gerade keine Glomeruli mehr aufweist) sowie zwischen Außenstreifen und Innenstreifen des Markes (charakterisiert durch eine Linie jenseits der die ersten Gefäßbündel auftreten).

An jedem vorgegebenen Meßpunkt wurden dann über eine Laterna magica in das mit 250-fachen Vergrößerung eingesehene Gesichtsfeld vier Kreise mit je fünf konzentrischen Ringen projiziert. Ausgehend vom Radius von 12  $\mu\text{m}$  des innersten Kreises vergrößerten sich die Radien der umgebenen konzentrischen Ringe um jeweils weitere 12  $\mu\text{m}$ , so daß der äußerste Ring einen Radius von 60  $\mu\text{m}$  umschloß.

Bei der Auswertung wurde nun bestimmt, in welchem dem Mittelpunkt an nächsten liegenden Kreis zuerst eine FITC bzw. RB-200 markierte Kapillare auftauchte. Nach Auswertung aller vier Kreise eines Gesichtsfeldes sowie der Abspeicherung der Befunde wurde automatisch der nächste Rasterpunkt angefahren. Hierbei schloß sich das nächste Gesichtsfeld dem vorherigen unmittelbar an.

Diese Arbeitsweise erlaubt, die Farbstoffverteilung eines gesamten Nierenschnittes quantitativ und flächendeckend abzurastern (s. a. VETTERLEIN et al. 1982, 1986). Die ermittelten Werte wurden in Form von Häufigkeitsverteilungen erfaßt.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Versuchsreihe A:**

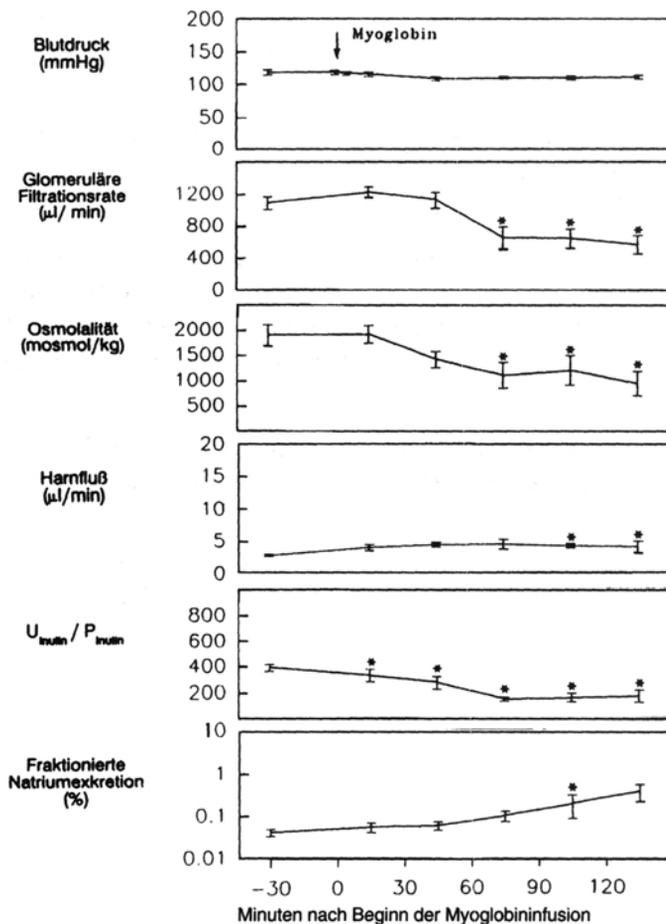
##### ***Myoglobingabe oder/und hämorrhagische Hypotension ohne Vorbehandlung***

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluß von Myoglobin, einer hämorrhagischen Hypotension bzw. der Kombination beider ohne eine Vorbehandlung der Tiere untersucht.

Einen vergleichenden Überblick über die Ergebnisse dieser Versuchsreihe geben die Tabellen 1, 2 und 3 am Ende dieses Abschnitts.

##### **3.1.1 Alleinige Myoglobingabe ohne Vorbehandlung (Versuchsgruppe A 7, n=6)**

**Blutdruck:** In dieser Versuchsgruppe wurde der systemische Druck nicht verändert. Die Myoglobinfusion hatte – wie in allen anderen Gruppen mit Myoglobingabe – keine Auswirkungen auf den Blutdruck. Insbesondere eine Unverträglichkeitsreaktion durch die Gabe des Fremdeiweißes konnte daher praktisch ausgeschlossen werden. Während des Versuchsverlaufes kam es infolge der Blutentnahmen zu einem leichten Abfall des systemischen Blutdruckes. Dieser Abfall trat in etwa gleichem Ausmaß in allen Versuchsgruppen auf. (Ausgangswert  $116,8 \pm 2,9$  mmHg,  $115,8 \pm 2,9$  mmHg 5 Minuten nach Myoglobingabe,  $109,8 \pm 3,0$  mmHg 165 Minuten nach Myoglobingabe).



**Abb. 2:**  
Nierenfunktionsparameter nach Beginn einer einstündigen Myoglobininfusion (250 mg/kg KG). (Gruppe A1)

Verlauf von Blutdruck, glomerulärer Filtrationsrate, Osmolalität, Harnfluß, dem Quotient der Konzentration von Inulin im Urin zu Inulin im Plasma (U/P) und fraktionierter Natriumexkretion.

(Mittelwerte  $\pm$  SEM; \* P < 0.05 gegenüber Kontrollwert [ t-Test])

*GFR:* Die alleinige Myoglobingabe führte zu einer mäßigen Reduktion der glomerulären Filtrationsrate. Bei einem Ausgangswert von  $1081 \pm 83$   $\mu\text{l}/\text{min}$  kam es 75 Minuten nach Beginn der Infusion zu einem signifikanten Abfall auf  $646 \pm 133$   $\mu\text{l}/\text{min}$ . Nach 105 und 135 Minuten blieb die GFR mit  $636 \pm 116$   $\mu\text{l}/\text{min}$  und  $559 \pm 117$   $\mu\text{l}/\text{min}$  praktisch konstant erniedrigt.

*Harnfluß:* Im Versuchsverlauf kam es zu einem leichten Anstieg des Harnflusses. (Ausgangswert  $2,79 \pm 0,15$   $\mu\text{l}/\text{min}$ , Wert nach 75 Minuten  $4,38 \pm 0,36$   $\mu\text{l}/\text{min}$ ).

*Urinosmolalität:* Die Urinosmolalität fiel leicht ab. (Ausgangswert  $1890 \pm 210$  mosmol/kg, nach 105 Minuten  $1184 \pm 295$  mosmol/kg und nach 135 Minuten  $918 \pm 245$  mosmol/kg).

*Fraktionierte Natriumexkretion:* Die alleinige Myoglobingabe führte außerdem zu einem leichten, langsam einsetzenden Anstieg der fraktionierten Natriumexkretion (Ausgangswert  $0,09 \pm 0,05$  %; nach 75 Minuten  $0,10 \pm 0,02$  %, nach 105 Minuten  $0,19 \pm 0,08$  %, nach 135 Minuten  $0,38 \pm 0,18$  %).

*Zusammenfassend* läßt sich sagen, daß die Myoglobininfusion zu einer langsam einsetzenden, nur mäßigen Nierenfunktionsstörung führte.

3.1.2 Hämorrhagische Hypotension ohne Vorbehandlung  
(Versuchsgruppe A2, n = 6)

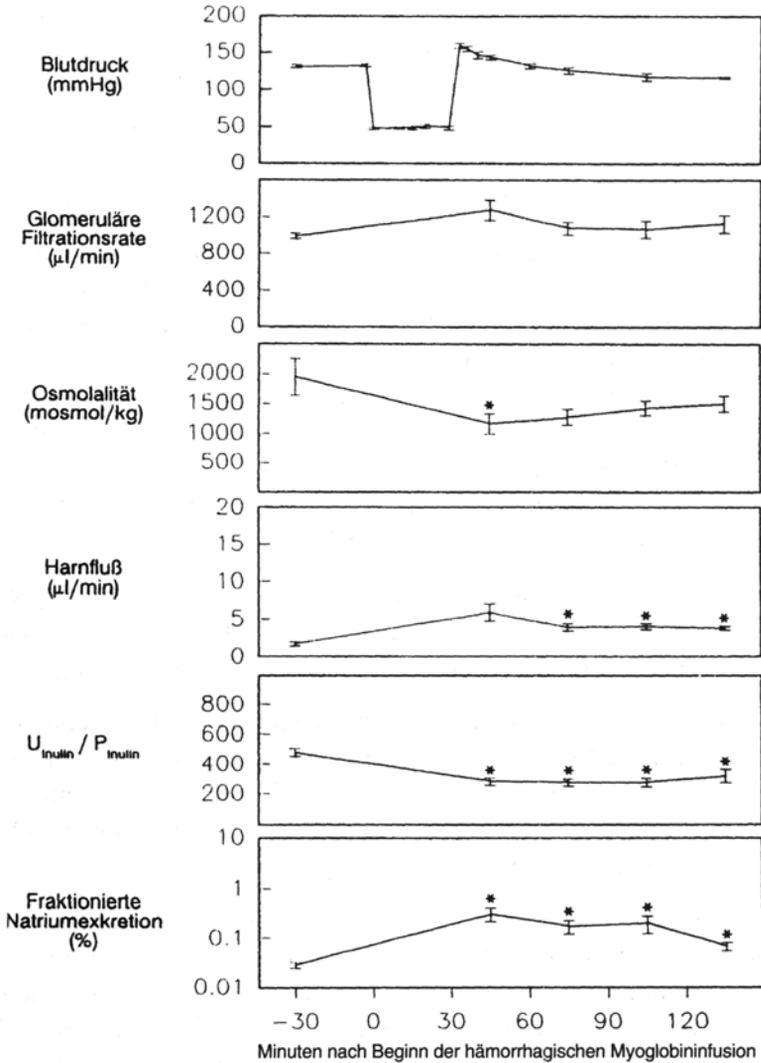


Abb. 3:

Nierenfunktionsparameter nach einer hämorrhagischen Hypotension (50 mmHg über 30 Minuten). (Gruppe A2)

Verlauf von Blutdruck, glomerulärer Filtrationsrate, Osmolalität, Harnfluß, dem Quotient der Konzentration von Inulin im Urin zu Inulin im Plasma (U/P) und fraktionierter Natriumexkretion.

(Mittelwerte ± SEM; \* P < 0.05 gegenüber Kontrollwert [t-Test])

*Blutdruck:* Der Blutdruck lag außerhalb der Hypotensionsphase im normotonen Bereich. Unmittelbar nach Beendigung der halbstündigen Hämorrhagie durch Retransfusion war er über 10-15 Minuten vorübergehend erhöht. (Ausgangswert:  $132 \pm 5,4$  mmHg,  $49,6 \pm 0,7$  mmHg unter HH;  $151 \pm 1,7$  mmHg 6 Minuten nach HH;  $137 \pm 1,7$  mmHg 15 Minuten nach HH;  $121 \pm 4,4$  mmHg 45 Minuten nach HH). Zum Erreichen (5 Minuten) des Zielblutdruckes von 50 mmHg mußten  $2,38 \pm 0,66$  ml Blut entzogen werden. Nach 25 minütiger Hämorrhagie hatte sich der erforderliche Blutvolumenzug auf eine Gesamtmenge von  $4,49 \pm 0,31$  ml Blut erhöht.

*GFR:* Gegenüber dem Ausgangswert kam es nach Retransfusion zu keiner Abnahme, sondern vielmehr kurzfristig zu einer signifikanten Zunahme der GFR. Als mögliche Erklärung hierfür kommt die vorhergehende kurzzeitige Erhöhung des systemischen Blutdruckes oder eine reaktive renale Hyperämie mit erhöhtem Plasmafluß in Frage. Im weiteren Verlauf blieb die glomeruläre Filtrationsrate annähernd konstant in der Größenordnung des Ausgangs-GFR (Ausgangswert:  $1171 \pm 165$  µl/min; 15 Minuten nach Retransfusion und Normalisierung des Blutdruckes:  $1500 \pm 191$  µl/min, 105 Minuten nach Retransfusion:  $1037 \pm 87$  µl/min).

*Harnfluß:* Nach Hypotension kam es zu einem mäßigen Anstieg des Harnflusses (Ausgangswert  $1,72 \pm 1,29$ ,  $5,94 \pm 1,16$  µl/min 15 Minuten nach Beendigung der Hypotension,  $3,84 \pm 0,22$  µl/min nach 135 Minuten).

*Urinomolalität:* Die Urinomolalität war nach Beendigung der Hypotension zunächst leicht erniedrigt. Sie näherte sich im weiteren Verlauf wieder der Ausgangsmolalität an (Ausgangswert  $1942 \pm 311$  mosmol/kg, unmittelbar nach Retransfusion  $1158 \pm 170$  mosmol/kg, nach 135 Minuten  $1495 \pm 133$  mosmol/kg mit steigender Tendenz).

*Fraktionierte Natriumexkretion:* Auch die fraktionierte Natriumexkretion erreichte in dieser Versuchsreihe unmittelbar nach Retransfusion die höchsten Exkretionswerte, bevor sich erneut das Ausgangsniveau einstellte (Ausgangswert  $0,02 \pm 0,01$  %; unmittelbar nach Retransfusion  $0,29 \pm 0,10$  %; nach 135 Minuten mit  $0,07 \pm 0,02$  % wieder weitgehende Normalisierung).

*Zusammenfassend* ergab sich nach halbstündiger hämorrhagischer Hypotension auf 50 mmHg nur eine vorübergehende, allenfalls leichte Nierenfunktionsstörung.

3.1.3 Hämorrhagische Hypotension unter Myoglobinzufuhr ohne Vorbehandlung (Versuchsgruppe A3, n = 8)

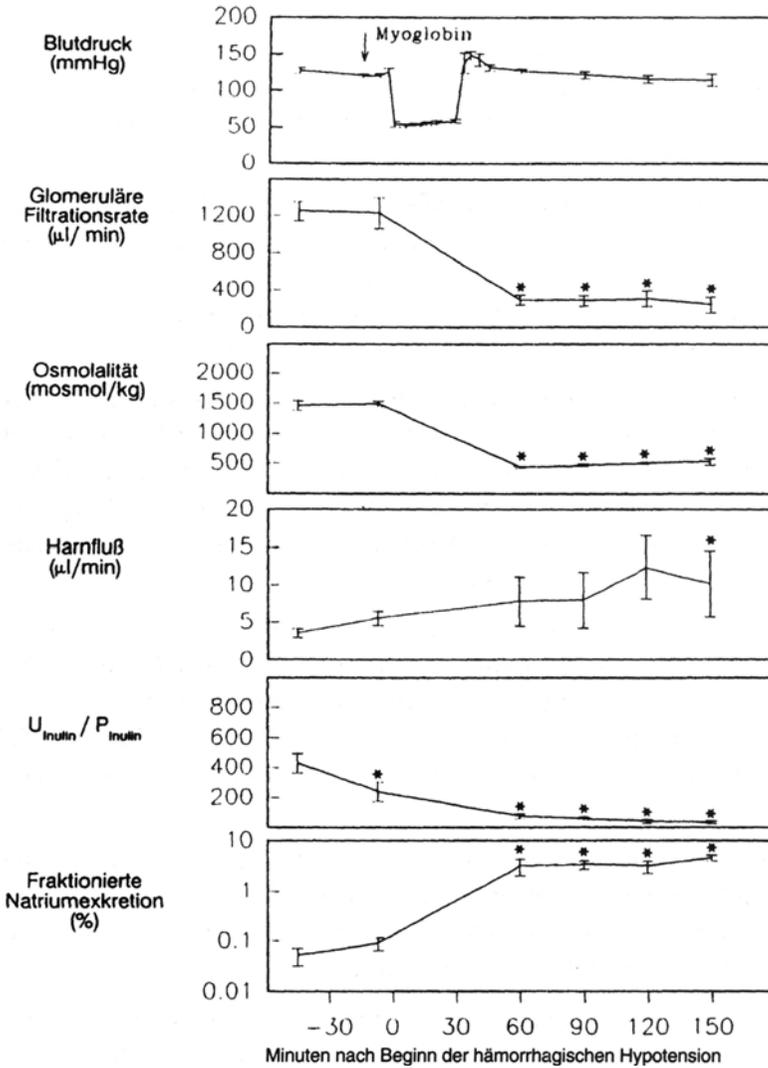


Abb. 4: Nierenfunktionsparameter nach einer hämorrhagischen Hypotension (50 mmHg über 30 Minuten) bei 15 Minuten zuvor begonnener Myoglobinzufuhr (250 mg/kg KG). (Gruppe A3)

Verlauf von Blutdruck, glomerulärer Filtrationsrate, Osmolalität, Harnfluß, dem Quotient der Konzentration von Inulin im Urin zu Inulin im Plasma (U/P) und fraktionierter Natriumexkretion.

(Mittelwerte ± SEM; \*P < 0.05 gegenüber Kontrollwert [t-Test])

*Blutdruck:* In dieser Versuchsgruppe betrug der Ausgangs-Blutdruck  $124,8 \pm 2,8$  mmHg. Nach halbstündiger Hypotension ( $54,0 \pm 2,1$  mmHg) stieg der Blutdruck 6 Minuten nach Retransfusion vorübergehend auf  $157,8 \pm 3,3$  mmHg an, bevor er sich 15 Minuten nach Retransfusion auf  $129,5 \pm 4,6$  mmHg wieder normalisierte. Zum Erreichen und Halten des Zielblutdruckes mußten  $2,58 \pm 0,25$  bzw.  $6,61 \pm 0,43$  ml Blut entzogen werden. Der hier erforderliche Volumenentzug war signifikant größer als in Gruppe A2 (t-Test mit  $p < 0,05$ ).

*GFR:* Es entwickelte sich nach Myoglobininfusion und hämorrhagischer Hypotension eine signifikante (t-Test mit  $p < 0,05$ ), sehr viel stärkere Erniedrigung der Inulin-clearance als durch die alleinige Myoglobininfusion (Ausgangswert  $1249 \pm 84$   $\mu$ l/min,  $298 \pm 54$   $\mu$ l/min und  $244 \pm 85$   $\mu$ l/min nach 60 und 150 Minuten nach Start der Myoglobininfusion).

*Harnfluß:* Insgesamt kam es zu einer Erhöhung des Harnflusses (Ausgangswert  $3,67 \pm 0,63$ ;  $9,36 \pm 4,25$   $\mu$ l/min und  $10,13 \pm 4,45$   $\mu$ l/min 90 min und 150 Minuten nach Beginn der Myoglobininfusion). Hierbei traten zwei Verlaufsformen auf: eine oligo-normurische ( $n = 4$  mit  $2,07 \pm 0,50$   $\mu$ l/min) und eine polyurische ( $n = 4$  mit  $26,4 \pm 9,5$   $\mu$ l/min-Werte jeweils 90 Minuten nach Beginn der Myoglobininfusion).

*U/P:* Im Gegensatz hierzu fand sich der Quotient der Konzentration von Inulin im Urin zu Inulin im Plasma sehr gleichförmig in allen Versuchen dieser Versuchsgruppe deutlich herabgesetzt (Ausgangswert:  $427,2 \pm 63,2$ ; 15 Minuten nach Retransfusion  $74,4 \pm 15,9$ ; im weiteren Verlauf  $55,3 \pm 10,3$ ;  $40,1 \pm 11,3$  und  $33,1 \pm 9,0$  nach 45, 75 und 105 Minuten nach Retransfusion).

*Urinomolalität:* Ebenso kam es zu einer gleichbleibenden und deutlichen Erniedrigung der Urinomolalität (von basal  $1590 \pm 96$  mosmol/kg in der Vorperiode auf  $461 \pm 64$  mosmol/kg 15 Minuten nach Retransfusion mit im weiteren Verlauf gleichbleibenden Werten).

*Fraktionierte Natriumexkretion:* Die kombinierte Behandlung erhöhte die fraktionierte Natriumexkretion deutlich. Sie stieg von  $0,05 \pm 0,02$  % auf  $2,15 \pm 0,52$  % bzw.  $2,94 \pm 0,90$  % nach 15 bzw. 75 Minuten nach Retransfusion.

*Zusammenfassend* läßt sich feststellen, daß bei Kombination von Myoglobingabe und Hämorrhagie eine deutliche Nierenfunktionsstörung auftrat.

### 3.1.4 Tabellarische Zusammenfassung der ermittelten Nierenfunktionsparameter der Versuchsreihe A

Tabelle 1-3: Verhalten von Inulinclearance ( $\mu\text{l}/\text{min}$ ), Harnfluß ( $\mu\text{l}/\text{min}$ ), des Urin zu Plasma-Quotienten der Inulinkonzentration (U/P), Urinosmolalität (mosmol/kg) und fraktionierter Natriumexkretion (FeNa, %) bei narotisierten Ratten nach:

- alleiniger Myoglobininfusion (Gruppe A1)
- alleiniger hämorrhagischer Hypotension (Gruppe A2) und bei
- Kombination beider Schädigungsmechanismen (Gruppe A3)  
(Mittelwerte  $\pm$  SEM; \* = signifikant (t-Test,  $p < 0.05$ ))

Tab. 1: Myoglobin 250 mg/kg KG i.V., keine Vorbehandlung (Gruppe A1, n = 6)

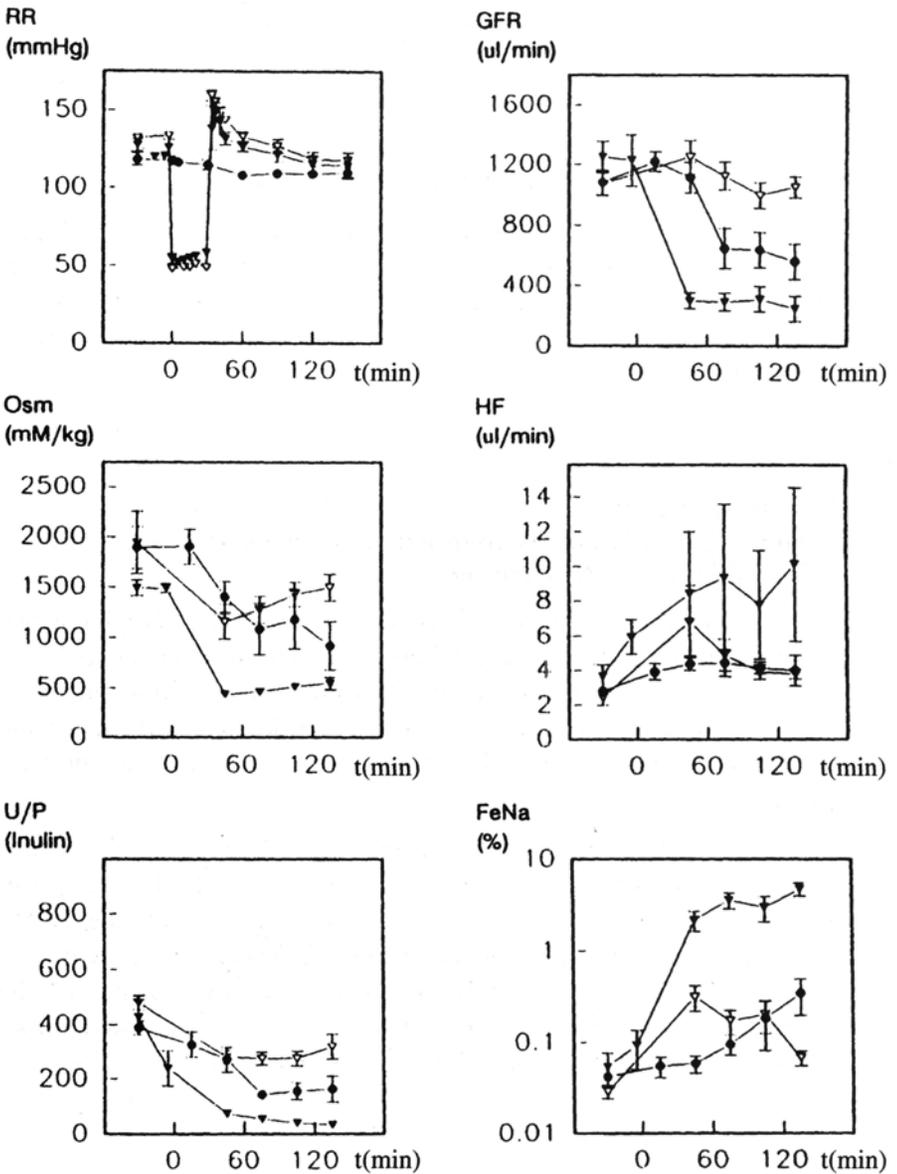
		Minuten nach Beginn einer Myoglobininfusion				
Zeit (min)	basal	15	45	75	105	135
GFR	1081 $\pm$ 83	1218 $\pm$ 65	1113 $\pm$ 101	646 $\pm$ 133*	636 $\pm$ 116*	559 $\pm$ 117*
Harnfluß	2,79 $\pm$ 0,15	3,93 $\pm$ 0,47	4,38 $\pm$ 0,36	4,43 $\pm$ 0,77	4,16 $\pm$ 0,32*	4,01 $\pm$ 0,88*
U/P	388 $\pm$ 25	326 $\pm$ 47	270 $\pm$ 47*	144 $\pm$ 14*	155 $\pm$ 30*	163 $\pm$ 46*
Osmolarität	1890 $\pm$ 210	1900 $\pm$ 177	1398 $\pm$ 155	1084 $\pm$ 254*	1184 $\pm$ 295*	918 $\pm$ 245*
FeNa	0,04 $\pm$ 0,05	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,08*	0,38 $\pm$ 0,18

Tab. 2: Hämorrhagische Hypotension (50 mmHg über 30 Minuten), keine Vorbehandlung (Gruppe A2, n = 6)

		Minuten nach Beginn der 30-minütigen hämorrhagischen Hypotension				
Zeit (min)	basal	15	45	75	105	135
GFR	990 $\pm$ 33	—	1274 $\pm$ 108	1077 $\pm$ 69	1066 $\pm$ 98	1127 $\pm$ 92
Harnfluß	1,72 $\pm$ 1,29	—	5,94 $\pm$ 1,16	3,96 $\pm$ 0,47*	4,06 $\pm$ 0,37*	3,84 $\pm$ 0,22*
U/P	480 $\pm$ 78	—	280 $\pm$ 25*	273 $\pm$ 24*	275 $\pm$ 28*	319 $\pm$ 47*
Osmolarität	1942 $\pm$ 311	—	1158 $\pm$ 170*	1273 $\pm$ 131	1426 $\pm$ 121	1495 $\pm$ 133
FeNa	0,03 $\pm$ 0,00	—	0,32 $\pm$ 0,10*	0,17 $\pm$ 0,05*	0,20 $\pm$ 0,08*	0,07 $\pm$ 0,01*

Tab. 3: Myoglobin (250 mg/kg KG i.v.) und hämorrhagische Hypotension (50 mmHg über 30 min), keine Vorbehandlung (Gruppe A3, n = 8)

		Minuten nach Beginn der hämorrhagischen Hypotension unter fortlaufender Myoglobininfusion				
Zeit (min)	basal	15	45	75	105	135
GFR	1249±105	—	298±54*	290±59*	309±85*	244±85*
Harnfluß	3,67±0,63	—	8,43±3,47	9,36±4,25	7,79±3,13	10,13±4,45*
U/P	427±63	—	74±16*	55±10*	40±11*	33±9*
Osmolarität	1488±78	—	437±19*	462±18*	512±21*	546±62*
FeNa	0,05±0,02	—	2,15±0,52*	3,51±0,70*	2,94±0,90*	4,66±0,76*



**Abb. 5:**  
**Vergleichende Darstellung der Nierenfunktionsparameter der Versuchsreihe A.**

- alleinige Myoglobingabe (Gruppe A1)
- ∇ hämorrhagische Hypotension (Gruppe A2)
- ▼ Myoglobingabe und hämorrhagische Hypotension (Gruppe A3)

### *3.1.5 Histologische Ergebnisse der Versuchsgruppen A1, A2 und A3*

In allen Versuchsgruppen ohne Vorbehandlung (A1, A2, A3) zeigte sich bei Beobachtung der Nierendurchblutungsverteilung 120-150 Minuten nach Myoglobingabe, Hypotension bzw. deren Kombination keine von der Norm abweichende Verteilung der Indikatorfarbstoffe:

Alle Glomerula und extraglomerulären Kapillaren im Rinden- wie Markbereich fanden sich sowohl nach einer Zirkulationszeit von drei Minuten (FITC-Globulin) als auch von einer Minute (RB-200-Globulin) bereits vollständig mit diesen Farbstoffen gefüllt. Auf eine quantitative Auswertung konnte daher verzichtet werden.

### **3.2 Versuchsreihe B:**

#### ***Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz vor Myoglobingabe oder/und hämorrhagischer Hypotension***

Da sich in der Versuchsreihe A insbesondere bei alleiniger Myoglobingabe im GFR-Verlauf bei den einzelnen Versuchstieren nur eine leichte GFR-Erniedrigung zeigte und außerdem die Werte im Einzelfall erheblich schwankten, wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, in der die Tiere durch Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz exsikkiert und ihr Urin angesäuert wurden.

Als Folge dieser Vorbehandlung stellte sich bei den Versuchstieren ein mittlerer Gewichtsverlust von  $258 \pm 3,2$  g auf  $240 \pm 3,1$  g ein. Das entspricht einem durchschnittlichen Gewichtsverlust von 7,16 %. Durch das Fasten erniedrigte sich der Ausgangs-pH des Urins von  $7,05 \pm 0,11$  ohne Vorbehandlung auf  $5,93 \pm 0,11$ . Durch die Flüssigkeitsrestriktion erhöhte sich die Ausgangs-osmolalität des Urins von  $1910 \pm 130$  mosmol/kg ohne Vorbehandlung (Versuchsreihe A) auf  $2570 \pm 50$  mosmol/kg (Versuchsreihe B).

3.2.1 Myoglobingabe nach Nahrungskarenz und Dehydration  
(Gruppe Bl, n = 6)

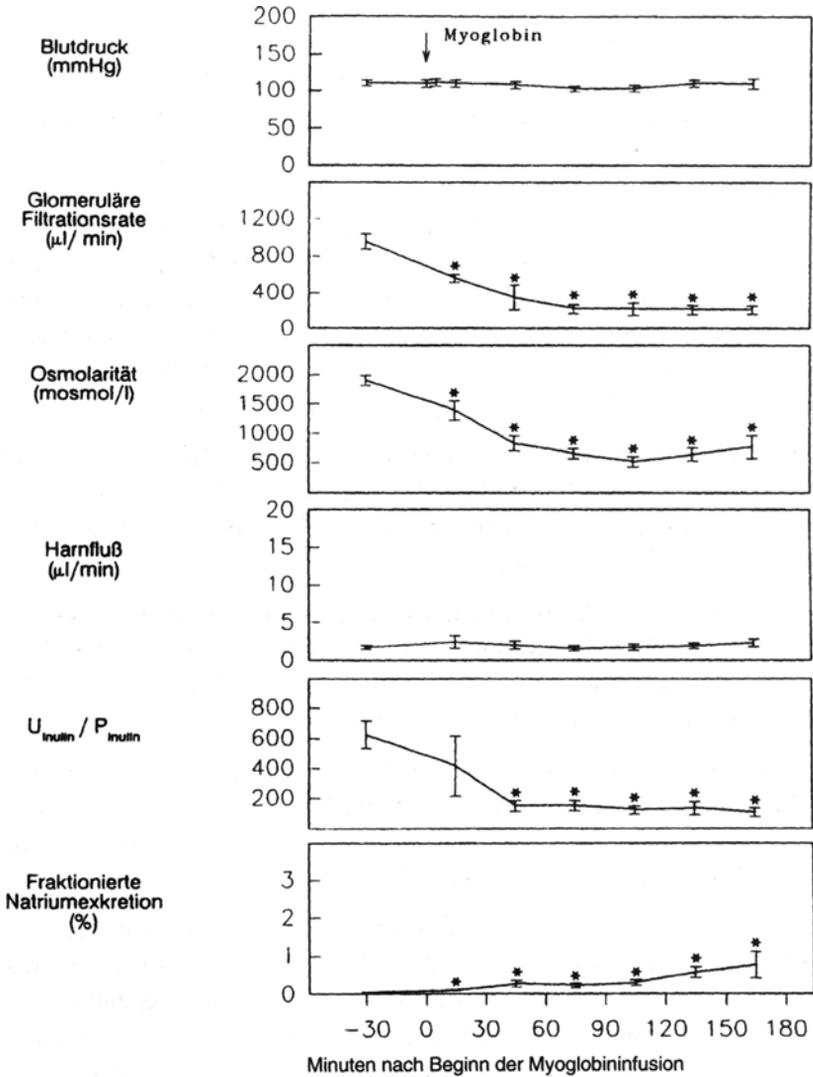


Abb. 6: Nierenfunktionsparameter nach einer einstündigen Myoglobininfusion (250 mg/kg KG) bei vorheriger 18 stündiger Dehydration.

Verlauf von Blutdruck, glomerulärer Filtrationsrate (GFR), Osmolarität, Harnfluß, dem Quotient der Konzentration von Inulin im Urin zu Inulin im Plasma, (U/P) und fraktionierter Natriumexkretion, (FeNa) (Mittelwerte ± SEM; \* P < 0.05 gegenüber Kontrollwert [t-Test]).

*Blutdruck:* Der Blutdruck blieb während des ganzen Versuchszeitraumes weitgehend konstant, insbesondere hatte die Myoglobingabe keine Blutdruckveränderungen zur Folge (Ausgangswert:  $109,9 \pm 3,4$  mmHg;  $109,9 \pm 4,1$  mmHg 15 Minuten nach Beginn der Myoglobininfusion;  $103,3 \pm 4,5$  mmHg 105 Minuten nach Beginn der Myoglobininfusion).

*GFR:* Die Inulin-clearance sank von  $951 \pm 81$   $\mu\text{l}/\text{min}$  vor Myoglobingabe nach Myoglobininfusion bereits in der ersten Harnsammeiperiode rasch auf  $560 \pm 44$   $\mu\text{l}/\text{min}$  und nach 45 Minuten auf  $346 \pm 141$   $\mu\text{l}/\text{min}$  ab. Nach 75 Minuten stellte sich mit  $220 \pm 51$   $\mu\text{l}/\text{min}$  ein Wert ein, der im weiteren Beobachtungszeitraum mit  $219 \pm 67$ ,  $210 \pm 51$  und  $211 \pm 45$   $\mu\text{l}/\text{min}$  nach 105, 135 und 165 Minuten praktisch konstant blieb. Die GFR-Erniedrigung war gegenüber Gruppe A1 signifikant verstärkt. Es fiel auf, daß die Inulin-clearance bereits 15 Minuten nach Beginn der Myoglobininfusion mit  $560 \pm 44$   $\mu\text{l}/\text{min}$  auf 58,9% des Ausgangswertes gefallen war.

*Harnfluß:* Der mittlere Harnfluß blieb über die gesamte Zeit bei restriktiver Flüssigkeitszufuhr im oligurischen Bereich (basal:  $1,73 \pm 0,25$   $\mu\text{l}/\text{min}$ ;  $2,70 \pm 1,07$   $\mu\text{l}/\text{min}$  15 Minuten nach Myoglobingabe;  $1,77 \pm 0,33$  135 Minuten nach Myoglobingabe).

*Urinomolalität:* Die Urinosmolalität sank trotz anhaltender Flüssigkeitsrestriktion von  $1905 \pm 92$  mosmol/kg vor Myoglobin auf  $834 \pm 342$  nach 45 Minuten, um sich im weiteren nach 75, 105 und 135 Minuten auf  $653 \pm 85$ ,  $520 \pm 85$  und  $645 \pm 111$  mosmol/kg einzustellen.

*U/P Quotient:* Der Quotient U/P erniedrigte sich von  $626,6 \pm 91$  vor auf  $150 \pm 92$  45 Minuten nach Beginn der Myoglobin-Infusion. Der weitere Verlauf des U/P Quotienten zeigte mit  $123 \pm 26$ ,  $134 \pm 44$  und  $107 \pm 29$  nach 75, 105 und 135 Minuten annähernd konstante Werte.

*Fraktionierte Natriumexkretion:* Die fraktionierte Natriumexkretion stieg nach Myoglobingabe nur mäßig an: von  $0,03 \pm 0,0\%$  vor Myoglobin auf  $0,46 \pm 0,17\%$  135 Minuten nach Start der Myoglobininfusion. Gegenüber der schon sehr früh einsetzenden pathologischen GFR-Erniedrigung manifestierte sich ein pathologischer Befund hier somit deutlich verzögert.

*Kaliumexkretion:* Die Kaliumexkretion erhöhte sich über die Harnsammezeit von  $7,3 \pm 1,7\%$  (Kontrollwert) auf  $22,6 \pm 8,7\%$  135 Minuten nach Myoglobingabe.

*Zusammenfassend* ergab sich, daß in den Versuchen mit dehydrierten Tieren nach Myoglobingabe regelmäßig schwere Nierenfunktionsstörungen im Sinne eines akuten Nierenversagens auftraten.

3.2.2 Hämorrhagische Hypotension nach Nahrungskarenz und Dehydration (Versuchsgruppe B2, n = 6)

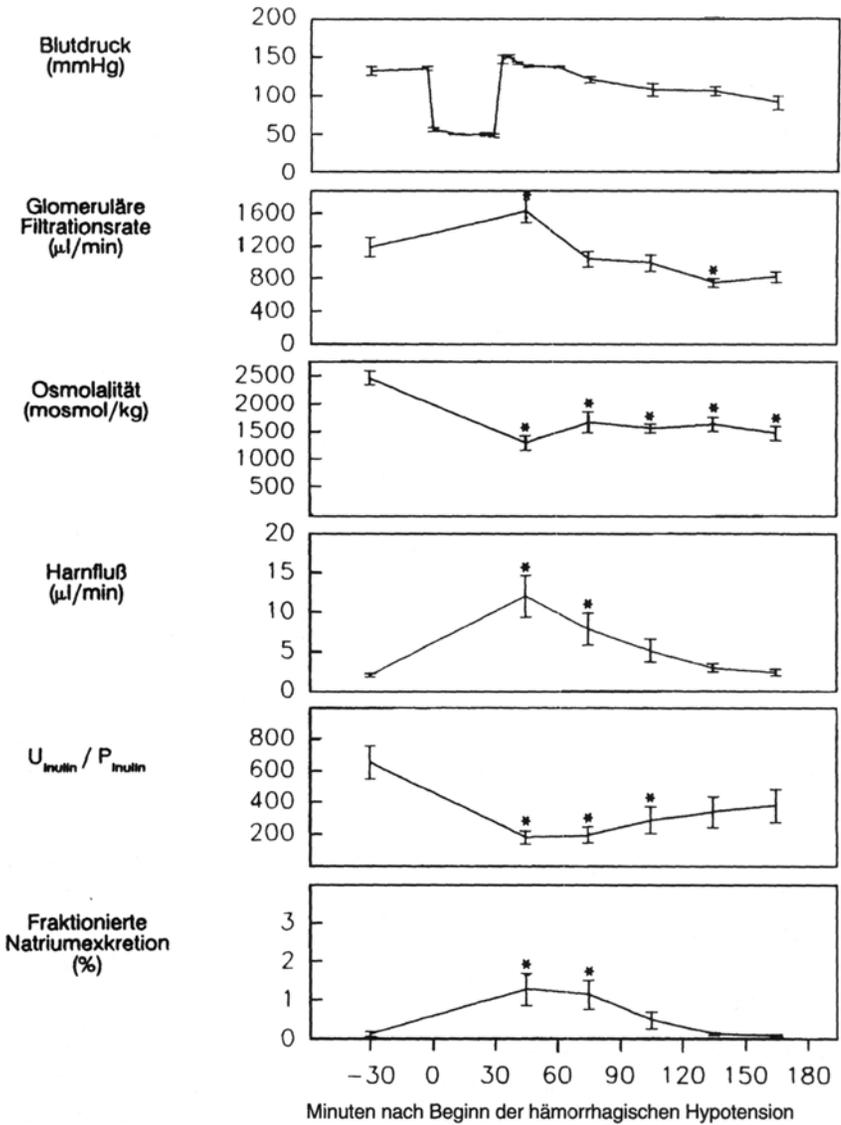


Abb. 7: Nierenfunktionsparameter nach einer hämorrhagischen Hypotension (50 mmHg über 30 Minuten) bei vorheriger 18-stündiger Dehydratation. (Gruppe B2)

Verlauf von Blutdruck, glomerulärer Filtrationsrate, Osmolalität, Harnfluß, dem Quotient der Konzentration von Inulin im Urin zu Inulin im Plasma (U/P) und fraktionierter Natriumexkretion. (Mittelwerte ± SEM; \* p < 0.05 gegenüber Kontrollwert [t-Test])

*Blutdruck:* Der Blutdruck fiel in der Posthypotensionsphase etwas stärker ab als in den übrigen Versuchsgruppen; er blieb aber auch hier im normotonen Bereich. Wie in Gruppe A2 stieg der Blutdruck auch hier unmittelbar nach Beendigung der halbstündigen Hämorrhagie über 10-15 Minuten vorübergehend über die prähypotensiven Werte an (Ausgangswert:  $131,6 \pm 5,4$  mmHg;  $49,6 \pm 0,7$  mmHg unter HH; anschließend  $151 \pm 1,7$ ;  $137 \pm 1,7$ ;  $121 \pm 4,4$ ;  $106,7 \pm 5,6$  und  $108,0 \pm 8,5$  mmHg 6, 15, 45, 75 und 105 Minuten nach Retransfusion). Zum Erreichen (5 Minuten) und Halten (25 Minuten) des Zielblutdruckes von 50 mmHg mußten  $2,40 \pm 0,20$  bzw.  $4,86 \pm 0,40$  ml Blut entzogen werden.

*GFR:* Die Inulin-clearance blieb – nach ihrer vorübergehenden Erhöhung in der ersten Harnsammeiperiode nach Retransfusion – zunächst weitgehend unbeeinträchtigt. Sie zeigte jedoch eine abfallende Tendenz mit einer signifikanten GFR-Erniedrigung in der Harnsammeiperiode 105 Minuten nach Retransfusion. Diese könnte durch den in dieser Versuchsgruppe relativ stärker aufgetretenen posttransfusionellen Blutdruckabfall mitverursacht sein (Ausgangswert:  $1178 \pm 125$   $\mu$ l/min;  $1629 \pm 139$   $\mu$ l/min,  $1042 \pm 92$   $\mu$ l/min,  $992 \pm 101$   $\mu$ l/min,  $754 \pm 56$   $\mu$ l/min und  $828 \pm 67$   $\mu$ l/min nach 15, 45, 75, 105 und 135 Minuten nach Retransfusion).

*Harnfluß:* Ausgehend von der exsikkosebedingten (physiologischen) Oligo-/Normurie der Kontrollphase steigerte sich der Harnfluß unmittelbar nach Hämorrhagie auf eine geringgradige Polyurie. Im weiteren Verlauf näherte er sich dann kontinuierlich wieder dem Ausgangswert an (Ausgangswert:  $1,98 \pm 0,24$   $\mu$ l/min,  $12,03 \pm 2,7$   $\mu$ l/min 15 Minuten nach Retransfusion,  $2,40 \pm 0,4$   $\mu$ l/min 105 Minuten nach Retransfusion).

*U/P:* Der U/P-Quotient zeigte sich in der ersten Harnsammeiperiode nach Hypotension mäßig abgefallen und näherte sich im weiteren kontinuierlich seinem Ausgangswert (Ausgangswert:  $647 \pm 104$ ;  $193 \pm 51$  unmittelbar nach Retransfusion,  $285 \pm 81$ ,  $338 \pm 97$  und  $377 \pm 104$  nach 45, 75, 105 und 135 Minuten nach Retransfusion).

*Urin-osmolalität:* Die Ausgangs-osmolalität des Urins lag in der Kontrollphase mit  $2453 \pm 121$  mosmol/kg (infolge der exsikkierenden Vorbehandlung) sehr hoch. Mit Osmolalitäten von  $1293 \pm 320$ ,  $1673 \pm 191$ ,  $1563 \pm 81$ ,  $1642 \pm 126$  und  $1482 \pm 129$  mosmol/kg nach 15, 45, 75 und 105 Minuten kam es hier zu keiner eindeutigen Einschränkung des Harnkonzentrationsvermögens.

*Fraktionierte Natriumexkretion:* Die fraktionierte Natriumexkretion stieg unmittelbar nach Ende der Hypotension auf ihre höchsten Werte an, bevor

sie im weiteren kontinuierlich wieder auf Normalwerte abfiel (Ausgangswert:  $0,11 \pm 0,06\%$ ;  $1,26 \pm 0,43\%$ ,  $1,12 \pm 0,38\%$ ,  $0,46 \pm 0,22\%$ ,  $0,12 \pm 0,04\%$  und  $0,07 \pm 0,03\%$  nach 15, 45, 75, 105 und 135 Minuten nach Retransfusion).

*Kaliumexkretion:* Die Kaliumexkretion stieg von  $12,2 \pm 2,8\%$  auf  $28,7 \pm 10\%$  135 Minuten nach hämorrhagischer Hypotension.

*Zusammenfassend* fanden sich bei dehydrierender Vorbehandlung und hämorrhagischer Hypotension nur leichte, sich spontan zurückbildende Nierenfunktionsstörungen.

3.2.3 Hämorrhagische Hypotension unter Myoglobinzufuhr nach Nahrungskarenz und Dehydratation (Gruppe B3, n = 8)

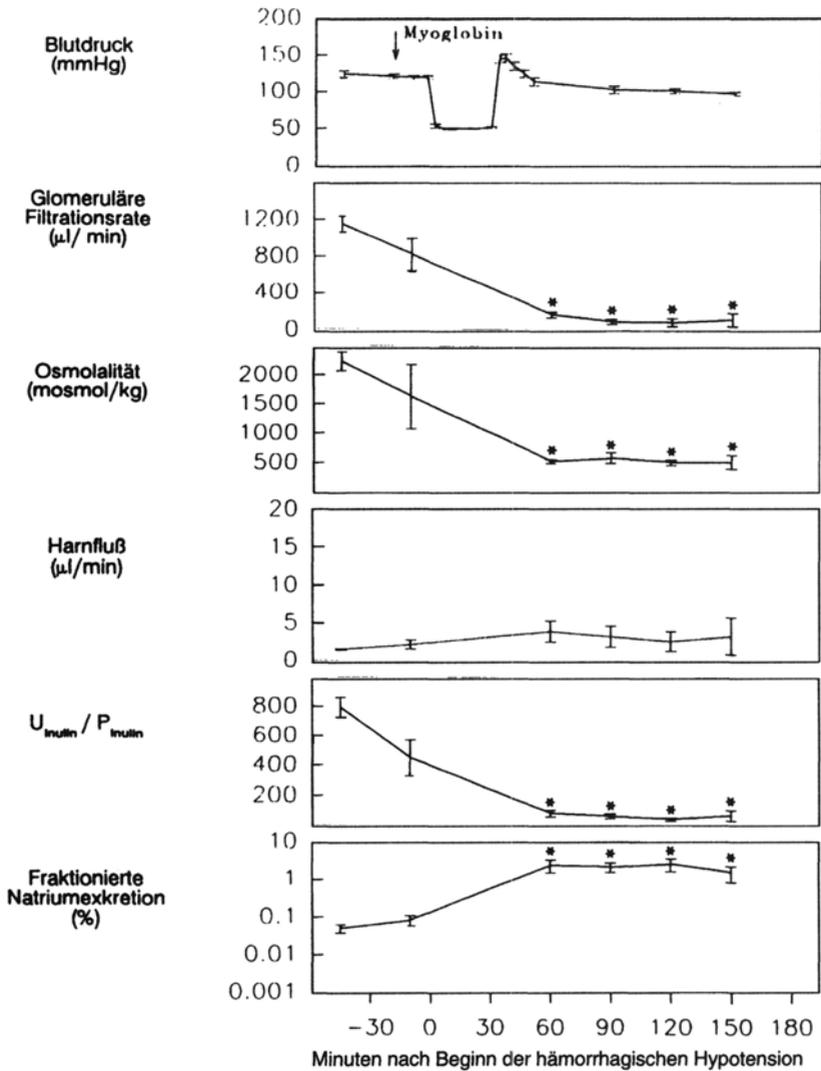


Abb. 8:

Nierenfunktionsparameter nach einer hämorrhagischen Hypotension (50 mmHg über 30 Minuten) bei 15 Minuten zuvor begonnener Myoglobininfusion (250 mg/kg KG) bei vorheriger 18-stündiger Dehydratation. (Gruppe B3)

Verlauf von Blutdruck, glomerulärer Filtrationsrate, Osmolalität, Harnfluß, dem Quotient der Konzentration von Inulin im Urin zu Inulin im Plasma (U/P) und fraktionierter Natriumexkretion. (Mittelwerte  $\pm$  SEM; \* p < 0.05 gegenüber Kontrollwert [t-Test])

*Blutdruck:* In dieser Versuchsgruppe betrug der Ausgangs-Blutdruck  $123,7 \pm 4,1$  mmHg. Nach halbstündiger Hypotension ( $50,3 \pm 0,9$  mmHg) stieg der Blutdruck 6 Minuten nach Retransfusion vorübergehend auf  $146,8 \pm 5,5$  mmHg an, bevor er sich 15 Minuten nach Retransfusion auf  $125,5 \pm 4,6$  mmHg wieder normalisierte und im weiteren Verlauf etwas abfiel ( $115,0 \pm 5,6$ ;  $104,2 \pm 5,1$ ;  $103,0 \pm 3,2$  mmHg 60, 90 und 120 Minuten nach Retransfusion). Zum Erreichen und Halten des Zielblutdruckes mußten  $2,44 \pm 0,20$  bzw.  $5,59 \pm 0,25$  ml Blut entzogen werden.

*GFR:* Gegenüber der in Gruppe A3 gefundenen GFR-Erniedrigung kam es bei zusätzlicher vorheriger Flüssigkeits- und Nahrungsrestriktion zu einer stärker ausgeprägten Senkung der glomerulären Filtrationsrate. Die verstärkende Wirkung der Hypotension auf das myoglobininduzierte akute Nierenversagen trat hier (bei der dehydrierenden Vorbehandlung) allerdings nicht mehr so deutlich in Erscheinung wie in der Versuchsreihe A. Die GFR reduzierte sich von  $1149 \pm 85$   $\mu$ l/min (Kontrollphase) auf  $167 \pm 31$   $\mu$ l/min nach 60 Minuten (=15 Minuten nach Ende der Hämorrhagie),  $100 \pm 27$   $\mu$ l/min nach 105 Minuten auf  $94 \pm 40$   $\mu$ l/min nach 135 Minuten.

*Harnfluß:* Ausgehend von einem Ausgangsharnfluß von  $1,44 \pm 0,12$   $\mu$ l/min traten vorwiegend oligurisch-normurische, aber vereinzelt auch normurisch-polyurische sowie anurische Formen eines akuten Nierenversagens auf.

*U/P-Quotient:* Der U/P-Quotient für Inulin fiel im Versuchsverlauf kontinuierlich auf sehr niedrige Werte ab. (Ausgangswert:  $783 \pm 82$ ;  $95 \pm 26$ ;  $66 \pm 20$ ;  $51 \pm 12$  und schließlich  $31 \pm 1$  nach 15, 45, 75 und 105 Minuten nach Ende der Hämorrhagie, das entspricht 150 Minuten nach Beginn der Myoglobingabe).

*Urinomolalität:* Es kam zu einem deutlichen und anhaltenden Abfall der Urinomolarität (Ausgangswert:  $2252 \pm 186$  mosmol/kg;  $527 \pm 38$  mosmol/kg 15 Minuten nach Ende der Hämorrhagie mit im folgenden annähernd konstanten Weiten).

*Fraktionierte Natriumexkretion:* Die fraktionierte Natriumexkretion blieb nach Abschluß der Myoglobin/Hypotensionsphase anhaltend erhöht. (Ausgangswert:  $0,05 \pm 0,02\%$ ;  $2,52 \pm 1,20\%$  15 Minuten nach Retransfusion;  $2,15 \pm 0,72\%$  45 Minuten nach Retransfusion;  $2,63 \pm 1,00\%$  75 Minuten nach Retransfusion [= 120 Minuten nach Start der Myoglobininfusion]).

*Kaliumexkretion:* Die Kaliumexkretion verstärkte sich von  $6,73 \pm 1,5\%$  (Kontrollphase) auf  $27,6 \pm 8,5\%$  135 Minuten nach Beginn der Myoglobininfusion.

Eine vergleichbare Erhöhung der renalen Kaliumexkretion trat unabhängig von der Ausbildung eines ARF in allen Versuchsgruppen auf. Sie dürfte daher relativ unspezifisch sein.

*Zusammenfassend* ergab sich durch das Zusammenwirken von Myoglobin und hämorrhagischer Hypotension abermals eine Verstärkung der Nierenschädigung gegenüber den Einzelwirkungen.

### 3.2.4 Tabellarische Zusammenfassung der ermittelten Nierenfunktionsparameter der Versuchsreihe B

Tabelle 4-6: Verhalten von Inulin-clearance (GFR, [ $\mu\text{l}/\text{min}$ ]), Harnfluß ( $\mu\text{l}/\text{min}$ ), des Urin zu Plasma-Quotienten (U/P), Urinosmolalität (mosmol/kg), fraktionierter Natriumexkretion (FeNa, [%]) sowie der Kaliumexkretion (K, [%]) bei narkotisierten Ratten nach:

- alleiniger Myoglobininfusion (Gruppe B1)
- alleiniger hämorrhagischer Hypotension (Gruppe B 2) und bei
- Kombination beider Schädigungsmechanismen (Gruppe B 3)

(Mittelwerte  $\pm$  SEM, \* signifikant für  $p < 0,05$  [t-Test])

Tab. 4: Myoglobininfusion nach 18-stündiger Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz (Gruppen B1, n = 8)

Zeit (min)	basal	Minuten nach Beginn der Myoglobininfusion				
		15	45	75	105	135
GFR	951 $\pm$ 81	560 $\pm$ 44*	346 $\pm$ 141*	220 $\pm$ 51*	219 $\pm$ 67*	210 $\pm$ 51*
Harnfluß	1,73 $\pm$ 0,25	2,70 $\pm$ 1,07	2,21 $\pm$ 0,64	1,64 $\pm$ 0,37	1,63 $\pm$ 0,33	1,77 $\pm$ 0,33
U/P	627 $\pm$ 91	416 $\pm$ 202	150 $\pm$ 35*	151 $\pm$ 34*	123 $\pm$ 26*	134 $\pm$ 44*
Osmolarität	1905 $\pm$ 92	1388 $\pm$ 165*	834 $\pm$ 129*	653 $\pm$ 85*	520 $\pm$ 85*	645 $\pm$ 111*
FeNa	0,03 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,03*	0,32 $\pm$ 0,11*	0,19 $\pm$ 0,06*	0,29 $\pm$ 0,08*	0,52 $\pm$ 0,17*
K	7,9 $\pm$ 1,7	13,8 $\pm$ 4,5	14,0 $\pm$ 3,2	11,3 $\pm$ 3,5	16,9 $\pm$ 6,8	22,6 $\pm$ 8,7

Tab. 5: Hämorrhagische Hypotension (50 mmHg übr 30 min) nach 18-stündiger Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz (Gruppe B2, n = 6)

Zeit (min)	basal	Minuten nach Beginn der 30-minütigen hämorrhagischen Hypotension				
		45	75	105	135	136
GFR	1178 $\pm$ 125	1629 $\pm$ 139*	1042 $\pm$ 92	992 $\pm$ 101	754 $\pm$ 56*	828 $\pm$ 67
Harnfluß	1,98 $\pm$ 0,24	12,03 $\pm$ 2,66*	7,86 $\pm$ 2,05*	5,15 $\pm$ 1,47	2,95 $\pm$ 0,67	2,50 $\pm$ 0,59
U/P	647 $\pm$ 104	177 $\pm$ 43*	193 $\pm$ 51*	285 $\pm$ 82*	338 $\pm$ 97	377 $\pm$ 104
Osmolarität	2453 $\pm$ 121	1293 $\pm$ 131*	1672 $\pm$ 191*	1563 $\pm$ 81*	1642 $\pm$ 126*	1482 $\pm$ 129*
FeNa	0,11 $\pm$ 0,06	1,26 $\pm$ 0,43*	1,12 $\pm$ 0,38*	0,46 $\pm$ 0,22	0,12 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,03
K	12,2 $\pm$ 2,8	21,0 $\pm$ 5,4	31,6 $\pm$ 6,5*	37,2 $\pm$ 7,7*	22,9 $\pm$ 1,8*	28,7 $\pm$ 10,1

Tab. 6: Hämorrhagische Hypotension (50 mm/Hg) unter Myoglobinfusion (250 mg/kg KG i.v.) nach 18-stündiger Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz (Gruppe B3, n = 8)

Minuten nach Beginn einer		Myoglobinfusion		hämorrhagischen Hypotension		
Zeit (min)	basal	8	45	75	105	135
GFR	1076±76	821±173	199±28*	105±31*	91±35*	152±55*
Harnfluß	1,44±0,12	2,18±0,58	4,61±1,69	3,55±1,56	2,70±1,31	3,40±2,48
U/P	783±82	450±123	95±26*	66±20*	51±12*	31±1*
Osmolarität	2252±186	1626±552	527±38*	631±95*	531±49*	535±115
FeNa	0,05±0,04	0,08±0,02	2,52±1,20*	2,15±0,72*	2,63±1,00*	1,56±0,72*
K	7,0±1,8	12,3±3,0	19,3±4,4*	29,7±9,4*	31,1±12,7*	32,8±17,0

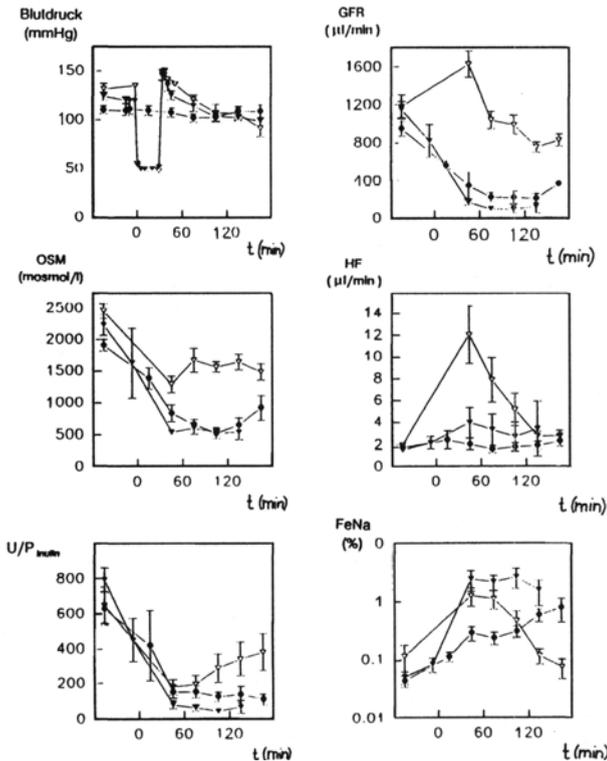


Abb. 9:

Vergleichende Darstellung der Nierenfunktionsparameter der Versuchsreihe B.

- alleinige Myoglobingabe (Gruppe B1)
- ∇ hämorrhagische Hypotension (Gruppe B2)
- ▼ Myoglobingabe und hämorrhagische Hypotension (Gruppe B3)

### 3.2.5 Ergebnisse der Mikroperforationsuntersuchungen in den Versuchsgruppen B1, B2 und B3

Auch in dieser Versuchsreihe (Ratten mit Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz) fand sich in den Nieren, die nach Myoglobininfiusion oder hämorrhagischer Hypotension entnommen waren, ein im wesentlichen normales Verteilungsmuster mit identischem Verteilungsbild für beide Fluoreszenzfarbstoffe. Bei vorheriger Myoglobingabe fiel qualitativ jedoch eine unterschiedliche, etwas fleckige Fluoreszenzintensität der Gewebeschnitte auf. Dieses könnte ein möglicher Hinweis auf eine Minderperfusion sein; diese wird jedoch mit der von uns gewählten Methode nicht erfaßt (s. Abb. 12a-d).

#### Transglomeruläre Durchlässigkeit für Globulin

Die injizierten Fluoreszenzfarbstoffe traten während der ein- bzw. dreiminütigen Zirkulationszeit in keiner der Versuchsreihen (B1-B3) in die Bowmanschen Kapselräume über. Hinweise für eine pathologisch gesteigerte glomeruläre Permeabilität für hochmolekulare Plasmaproteine bestanden daher nicht.

### 3.3 Versuchsreihe C:

#### *Untersuchungen der renalen Zirkulationsverhältnisse unter Myoglobininfiusion und/oder hämorrhagischer Hypotension*

Einen Überblick über die Ergebnisse geben die Tabellen 7, 8, 9 und 10 (Seite 83 f).

Die Beobachtung praktisch fehlender Veränderungen der Verteilung der intavasalen Indikatoren zwei Stunden nach Beendigung von Myoglobingabe und/oder hämorrhagischer Hypotension war insofern unerwartet, als man insbesondere bei vorheriger Dehydratation unter der Myoglobininfiusion bzw. unter kombinierter Myoglobingabe und Hypotension an der Niere makroskopisch Veränderungen beobachten konnte, die auf intrarenale Perfusionsstörungen schließen ließen: Es zeigten sich häufig neben einer punktförmigen Braunsprengelung auf der Rindenoberfläche eine Zyanose der gesamten Nierenoberfläche, manchmal auch eine lokale, fahle Abblassung motenfraßähnlich begrenzter Areale. Aus diesem Grunde trat die Frage auf, ob in den frühen Stadien kurz nach Beginn der Myoglobininfiusion bzw. unter der hämorrhagischen Hypotension Durchblutungsstörungen vorliegen, die vielleicht Anlaß für die Nierenfunktionsstörungen sein könnten.

Zur Aufdeckung solcher möglicherweise nur frühzeitig vorhandener Perfusionsstörungen wurden daher in einer weiteren Versuchsreihe die renalen Zirkulationsverhältnisse *unter* Myoglobin oder/und hämorrhagischer

Hypotension untersucht. Auch hier sollte die Einzelwirkung von alleiniger Myoglobingabe (Gruppe C1) und alleiniger Hypotension (Gruppe C2) mit der Kombinationswirkung beiden Schädigungsmechanismen (Gruppe C3) verglichen werden. Hierzu wurde die linke Niere 45 Minuten nach Beginn der Myoglobininfusion bzw. am Ende der Hypotensionsphase entnommen. Dieses Vorgehen hatte, bis auf geringfügig erhöhte Harnflüsse nach Farbstoffgabe und Nephrektomie, keine Änderungen der Kreislauf- und Nierenfunktionsparameter zur Folge. Die Ausgangsbedingungen und die Änderungen der Nierenfunktionsparameter unterschieden sich praktisch nicht von denen der Versuchsreihe B. Abbildung 10 zeigt die in der Gruppe C3 an der rechten Niere gewonnenen Nierenfunktionsparameter. Der Vergleich dieser Abbildung mit den Befunden der ihr entsprechenden Gruppe B3 (Abb. 8) veranschaulicht die weitgehende Deckungsgleichheit der erhobenen Ergebnisse.

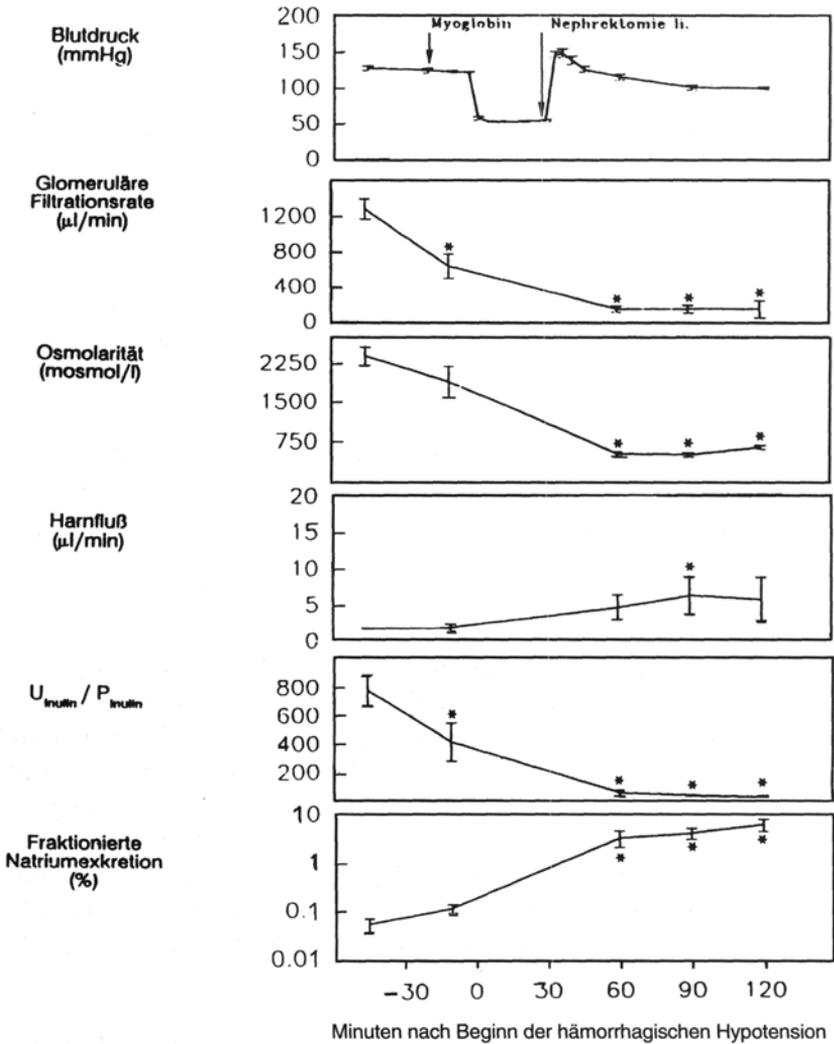


Abb. 10:

Nierenfunktionsparameter nach Farbstoffgabe und Nierenentnahme links am Ende einer hämorrhagischen Hypotension (50 mmHg über 30 Minuten) bei 15 Minuten zuvor begonnener Myoglobininfusion (250 mg/kg KG). (Gruppe C3)

Verlauf von Blutdruck, glomerulärer Filtrationsrate (GFR), Osmolarität, Harnfluß, dem Quotient der Konzentration von Inulin im Urin zu Inulin im Plasma, (U/P) und fraktionierter Natriumexkretion, (FeNa).

(Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$  gegenüber Kontrollwert [t-Test]).

### 3.3.1 Durchblutungsverhältnisse unter Myoglobin-Infusion (Gruppe C1, n = 5)

Bei Farbstoffgabe 45 Minuten nach Myoglobin allein fand sich ein unauffälliges Verteilungsmuster. Bereits nach einminütiger Zirkulationszeit von RB-200 waren praktisch alle Kapillaren markiert. In Abbildung 11 werden typische Mikroperfusionbefunde dieser Versuchsgruppe gezeigt; in Abbildung 14a ist die Auswertung eines exemplarischen Nierenschnittes dargestellt. Bei 83,6% der zufällig ausgewählten Meßpunkte betrug die Distanz zur nächstgelegenen RB-markierten Kapillare nicht mehr als 24 µm. Die Häufigkeitsverteilung der Abstände zufällig ausgewählter Gewebepunkte zu den nächstgelegenen perfundierten Kapillaren zeigt Abbildung 15.

Die dreiminütige Zirkulationszeit von FITC führte zu keiner Anfärbung weiterer Kapillaren. Auf eine quantitative Ausweitung der HTC-markierten Kapillaranfärbung konnte daher verzichtet werden.

### 3.3.2 Durchblutungsverhältnisse unter hämorrhagischer Hypotension (Gruppe C2, n = 6)

Auch die Bestimmung der Perfusionsverhältnisse unter hämorrhagischer Hypotension zeigten keine Beeinträchtigung der Zirkulation (s. Abbildung 12 und 14b). Bereits nach einminütiger Zirkulationszeit von RB-200 fand sich in 90,6% der willkürlich ausgewählten Gewebepunkte eine Entfernung zur nächsten RB-200 markierte Kapillare in einer Entfernung von maximal 24 µm. In Abbildung 16 sind die Häufigkeitsverteilungen getrennt nach Nierenregionen dargestellt. Auch hier führte eine dreiminütige Zirkulationszeit (FITC) zu keiner Anfärbung weiterer Kapillaren. Auf dieses nicht ohne weiteres zu erwartende Ergebnis soll in der Diskussion näher eingegangen werden.

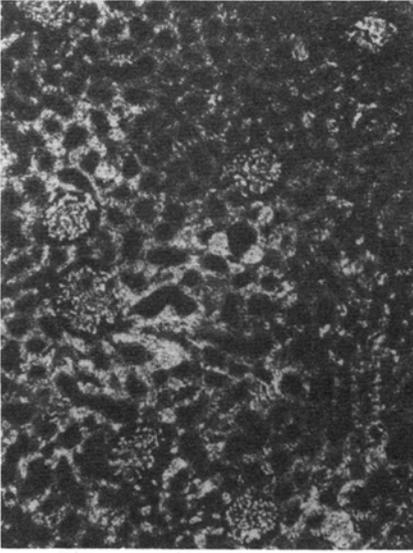
### 3.3.3 Durchblutungsverhältnisse unter Myoglobingabe und hämorrhagischer Hypotension (Gruppe C3, n = 8)

Im Gegensatz zu der weitgehend unveränderten realen Mikro-zirkulation bei alleiniger Myoglobingabe und hämorrhagischer Hypotension ergaben sich bei gleichzeitiger Einwirkung von Myoglobin und hämorrhagischer Hypotension *konstant massivste Perfusionsstörungen:*

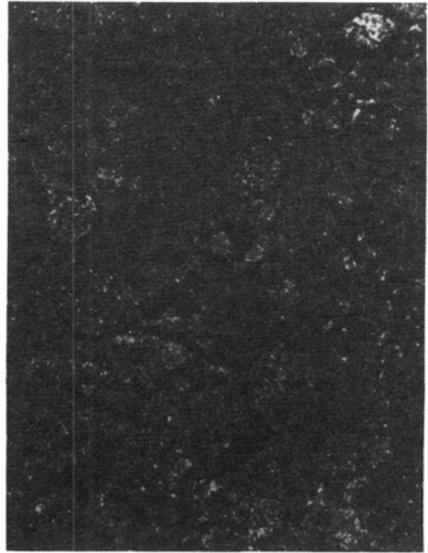
Nach *einminütiger Zirkulation* von RB-200-Globulin fanden sich im Nierenschnitt *nur vereinzelt, meist nestförmig ausgebildete Farbstoffmarkierungen* von Kapillaren, während weite Areale vollkommen ungefärbt blieben (s. Abbildung 13, 14c). Es fanden sich in 79,2% der zufällig aus-

gewählten Gewebepunkten in einer Distanz von über 60  $\mu\text{m}$  keine perfundierten Kapillaren (Abbildung 17).

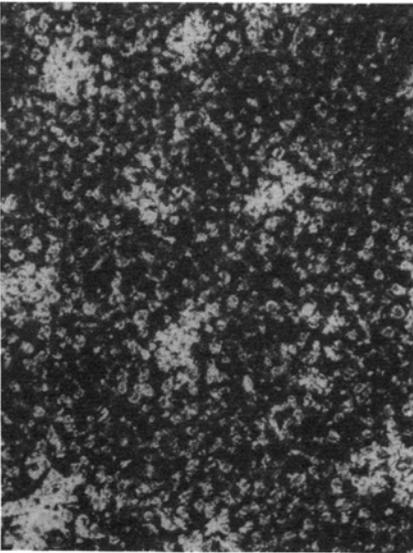
Auch nach *dreiminütiger Zirkulation* von FITC-Globulin kam es gegenüber der RB-200 Markierung nur zu einer leichten, vorwiegend randständigen Vergrößerung der fluoreszenzmarkierten Areale. Trotz dieser leichten Vergrößerung blieben weiterhin große Areale praktisch undurchblutet (s. Abb. 13, 14d): Bei 74,0% der ausgewerteten Punkte fand sich ein Abstand von über 60  $\mu\text{m}$  zur nächsten FITC-haltigen Kapillare (Abb. 18). Dieser Befund läßt vermuten, daß die Nierenrestperfusion vornehmlich durch einzelne Arteriolen erfolgt, während andere Gebiete offenbar für längere Zeit von der Zirkulation völlig ausgeschlossen bleiben.



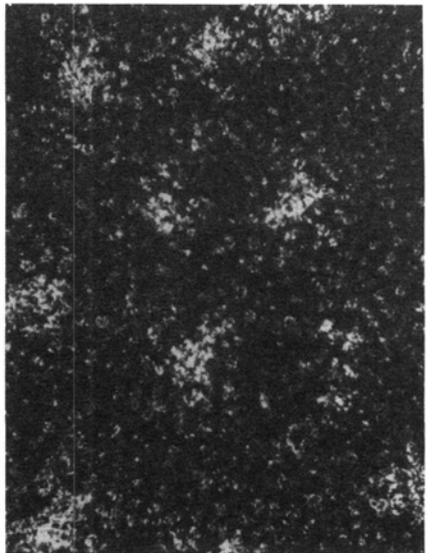
**Abb. 11a: Cortex, RB-200**



**Abb. 11b: Cortex, FITC**



**Abb. 11c: Nierenmark, RB-200**



**Abb. 11d: Nierenmark, FITC**

**Abb. 11 a-d:**

**Mikrozirkulationsverhältnisse 45 Minuten nach Beginn einer Myoglobininfusion (250 mg/kg KG) in Gruppe C1.**

**Dargestellt sind die angefärbten Kapillargefäße in Cortex (11a, 11b) und Nierenmark (Hc, Hd) nach einminütiger Farbstoffzirkulationszeit (RB-200, Abb. Ha, Hc) bzw. nach dreiminütiger Farbstoffzirkulationszeit (FITC, Abb. 11b, 11c).**

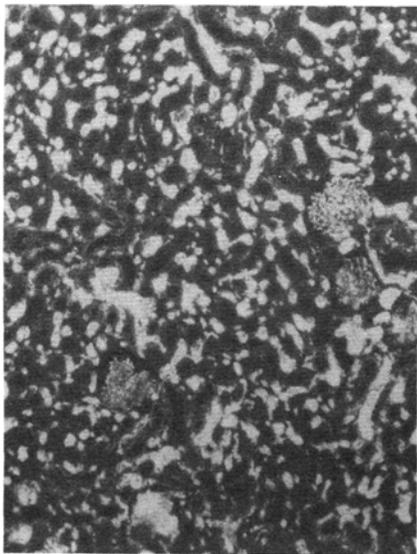


Abb. 12a: Cortex, RB-200

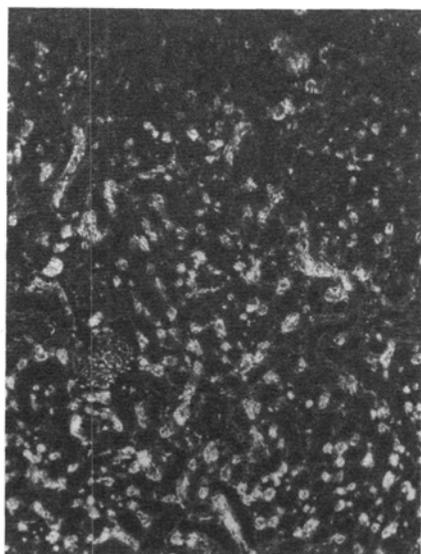


Abb. 12b: Cortex, FITC

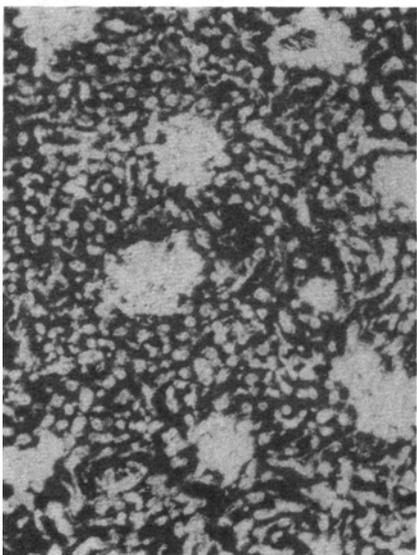


Abb. 12c: Nierenmark, RB-200

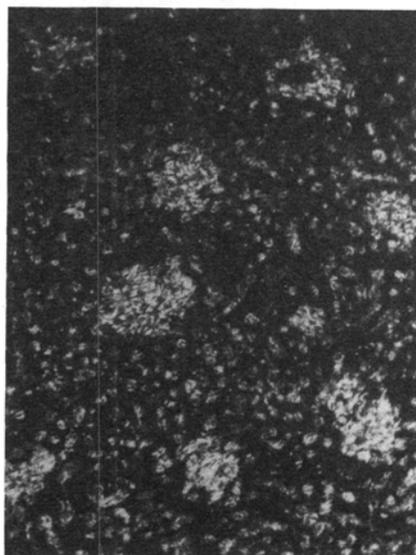


Abb. 12d: Nierenmark, FITC

Abb. 12a-d:

Mikrozirkulationsverhältnisse am Ende einer dreißigminütigen hämorrhagischen Hypotension auf 50 mmHg (Gruppe C2).

Trotz der Hämorrhagie stellen sich sowohl im Cortex (12a, 12b) als auch im Nierenmark (12c, 12d) praktisch alle Mikrogefäße bereits nach einer einminütigen Farbstoffzirkulationszeit dar (Abb. 12a, 12c: RB-200, einminütige Farbstoffzirkulationszeit; Abb. 12b, 12d: FITC, dreiminütige Farbstoffzirkulationszeit).



Abb. 13a: Cortex, RB-200

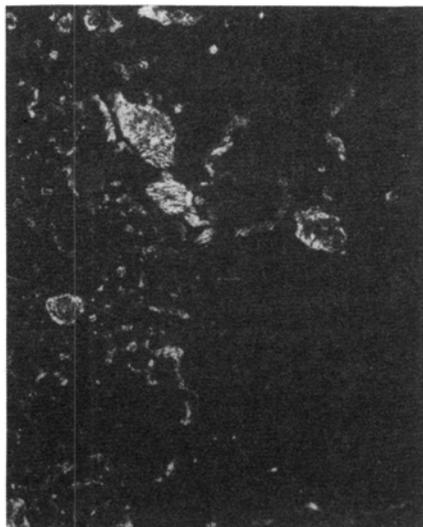


Abb. 13b: Cortex, FITC

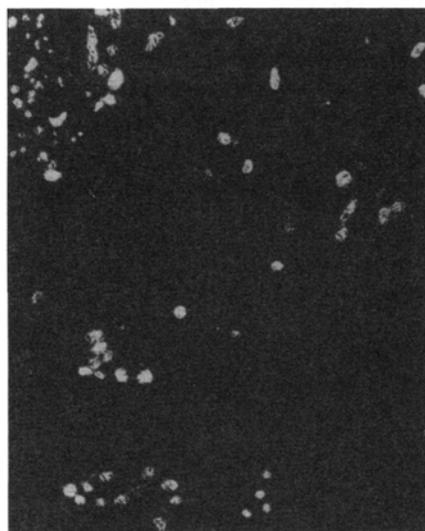


Abb. 13c: Nierenmark, RB-200



Abb. 13d: Nierenmark, FITC

**Abb. 13a-d:**

Mikrozirkulationsverhältnisse am Ende einer dreißigminütigen hämorrhagischen Hypotension (50 mmHg) unter einer zuvor begonnenen Myoglobininfusion (250 mg/kg KG) (Gruppe C3).

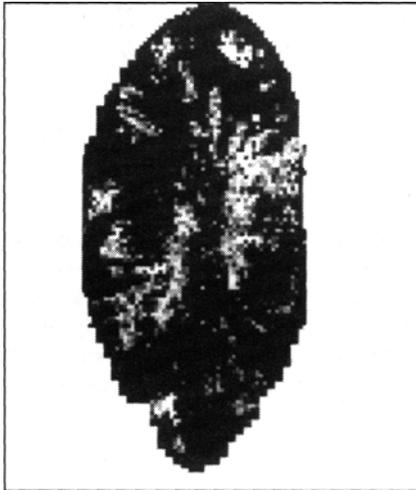
Das Ausbleiben der Fluoreszenzmarkierung eines Großteils der Kapillaren von Cortex (13a, 13b) und Nierenmark (13c, 13d) zeigt schwere Perfusionsstörungen an. Zu beachten ist der weitgehend stationäre Befund der Durchblutungsstörungen: Die dreiminütige Zirkulationszeit von FITC-Globulin (Abb. 13b, 13d) führt gegenüber der einminütigen RB-200-Zirkulationszeit (Abb. 13a, 13c) praktisch zu keiner Anfärbung weiterer Kapillaren.



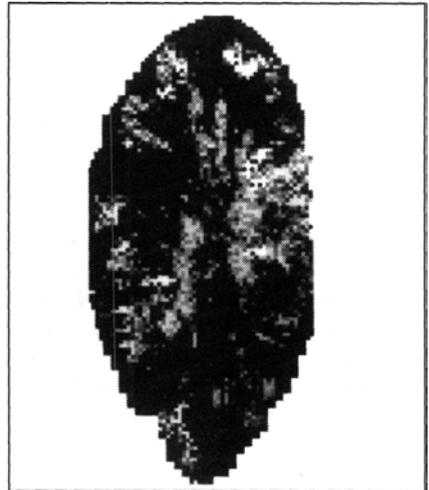
**Abb. 14a:**  
renaler Perfusionsbefund unter alleiniger Myoglobingabe (Gruppe C1) (RB-200, einminütige Zirkulationszeit)



**Abb. 14b:**  
renaler Perfusionsbefund unter hämorrhagischer Hypotension (Gruppe C2) (RB-200, einminütige Zirkulationszeit)



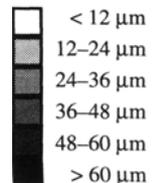
**Abb. 14c:**  
renaler Perfusionsbefund unter Myoglobin und Hypotension (Gruppe C3) (RB-200, einminütige Zirkulationszeit)



**Abb. 14d:**  
renaler Perfusionsbefund unter Myoglobin und Hypotension (Gruppe C3) (FITC, dreiminütige Zirkulationszeit)

**Abb. 14a-d:**

Darstellung typischer Perfusionsbefunde der gesamten Niere nach alleiniger Myoglobingabe (Gruppe C1), unter hämorrhagischer Hypotension (Gruppe C2) und unter kombinierter Myoglobin-Infusion und hämorrhagischer Hypotension (Gruppe C3). Die gemessenen Kapillarabstände werden schematisch in Form von Graustufen dargestellt:



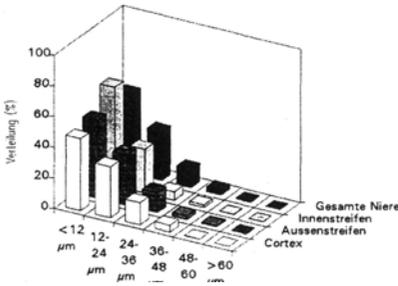


Abb. 15: Renale Perfusionsverhältnisse 45 Minuten nach Beginn einer Myoglobinfusion (250 mg/kg KG), Gruppe C1 (RB-200, einminütige Zirkulationszeit).

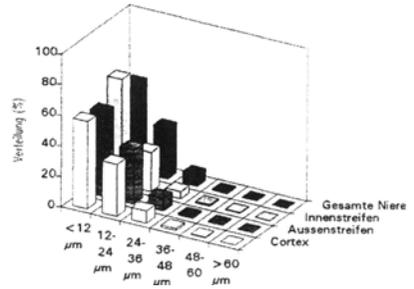


Abb. 16: Renale Perfusionsverhältnisse am Ende einer dreißigminütigen hämorrhagischen Hypotension (50 mmHg), Gruppe C2 (RB-200, einminütige Zirkulationszeit).

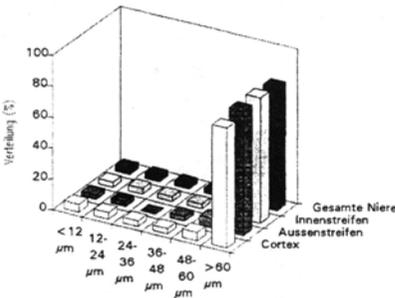


Abb. 17: Renale Perfusionsverhältnisse am Ende einer dreißigminütigen hämorrhagischen Hypotension (50 mmHg) und 45 Minuten nach Beginn einer Myoglobinfusion (250 mg/kg KG). Gruppe C3 (RB-200, einminütige Zirkulationszeit).

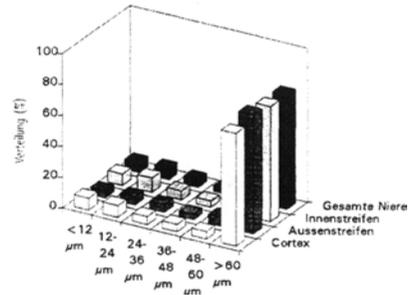


Abb. 18: Renale Perfusionsverhältnisse am Ende einer dreißigminütigen hämorrhagischen Hypotension (50 mmHg) und 45 Minuten nach Beginn einer Myoglobinfusion (250 mg/kg KG). Gruppe C3 (FITC, dreiminütige Zirkulationszeit).

**Abb. 15-18:**

Prozentuale Häufigkeit der Entfernungen zufällig ausgewählter Gewebepunkte zur nächstgelegenen farbstoffmarkierten Kapillare. Darstellung für Cortex, Außenstreifen und Innenstreifen des Nierenmarks.

### 3.3.4 Tabellarische Zusammenfassung der histologischen Meßergebnisse

Die Tabellen 7-10 zeigen die prozentuale Häufigkeit, mit der bestimmte Entfernungen von Meßpunkten zur nächstgelegenen markierten Kapillare gefunden wurden. Gezeigt werden die Ergebnisse getrennt für Cortex, Außenstreifen (OM) und Innenstreifen der Außenzone des Nierenmarks (IM) sowie der gesamten Niere (GN); Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Abstand	< 12 $\mu$ m	12–24 $\mu$ m	24–36 $\mu$ m	36–48 $\mu$ m	48–60 $\mu$ m	> 60 $\mu$ m
Cortex (%)	46,7 $\pm$ 4,4	33,3 $\pm$ 1,0	14,5 $\pm$ 2,3	4,3 $\pm$ 1,5	1,0 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,0
OM (%)	50,9 $\pm$ 3,7	32,7 $\pm$ 0,6	12,8 $\pm$ 2,4	2,7 $\pm$ 1,0	0,8 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,0
IM (%)	64,2 $\pm$ 6,9	28,3 $\pm$ 4,0	5,6 $\pm$ 2,1	1,8 $\pm$ 1,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0
GN (%)	51,7 $\pm$ 4,3	31,9 $\pm$ 1,1	12,2 $\pm$ 2,2	3,3 $\pm$ 1,21	0,9 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0

Tab. 7: Verteilung der Distanzen zur nächstgelegenen RB-200-markierten Kapillare 45 Minuten nach Beginn der Myoglobininfusion (Gruppe C1, n = 5) (einminütige Zirkulationszeit von RB-200).

Abstand	< 12 $\mu$ m	12–24 $\mu$ m	24–36 $\mu$ m	36–48 $\mu$ m	48–60 $\mu$ m	> 60 $\mu$ m
Cortex (%)	57,0 $\pm$ 3,1	33,8 $\pm$ 1,4	8,1 $\pm$ 1,5	1,2 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0
OM (%)	54,8 $\pm$ 3,5	34,9 $\pm$ 1,7	8,5 $\pm$ 1,6	1,2 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0
IM (%)	68,5 $\pm$ 3,5	25,2 $\pm$ 3,5	4,7 $\pm$ 1,8	0,9 $\pm$ 0,7	0,6 $\pm$ 0,5	0,0 $\pm$ 0,0
GN (%)	57,4 $\pm$ 3,4	33,2 $\pm$ 1,6	7,8 $\pm$ 1,5	1,1 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0

Tab. 8: Verteilung der Distanzen zur nächstgelegenen RB-200-markierten Kapillare am Ende einer dreißigminütigen hämorrhagischen Hypotension auf 50 mmHG (Gruppe C2 (n = 6), einminütige Zirkulationszeit von RB-200).

Abstand	< 12 $\mu$ m	12–24 $\mu$ m	24–36 $\mu$ m	36–48 $\mu$ m	48–60 $\mu$ m	> 60 $\mu$ m
Cortex (%)	4,9 $\pm$ 1,8	4,4 $\pm$ 1,3	3,6 $\pm$ 0,7	3,4 $\pm$ 0,5	5,6 $\pm$ 0,4	77,9 $\pm$ 4,3
OM (%)	3,1 $\pm$ 1,2	3,2 $\pm$ 1,0	3,7 $\pm$ 0,8	3,2 $\pm$ 0,6	6,1 $\pm$ 0,5	80,7 $\pm$ 3,7
IM (%)	3,3 $\pm$ 1,6	3,8 $\pm$ 1,4	3,3 $\pm$ 1,0	3,0 $\pm$ 0,8	5,2 $\pm$ 0,7	81,1 $\pm$ 5,2
GN (%)	4,0 $\pm$ 1,5	3,9 $\pm$ 1,2	3,5 $\pm$ 0,8	3,4 $\pm$ 0,5	5,8 $\pm$ 0,5	79,2 $\pm$ 4,1

Tab. 9: Verteilung der Distanzen zur nächstgelegenen RB-200-markierten Kapillare unter Myoglobininfusion und hämorrhagischer Hypotension (Gruppen C3, n = 8) (einminütige Zirkulationszeit von RB-200).

Abstand	< 12 $\mu\text{m}$	12–24 $\mu\text{m}$	24–36 $\mu\text{m}$	36–48 $\mu\text{m}$	48–60 $\mu\text{m}$	> 60 $\mu\text{m}$
Cortex (%)	7,7 $\pm$ 2,0	7,7 $\pm$ 2,1	5,2 $\pm$ 1,2	4,8 $\pm$ 0,9	5,0 $\pm$ 0,4	73,5 $\pm$ 4,0
OM (%)	4,7 $\pm$ 1,2	5,4 $\pm$ 1,5	4,9 $\pm$ 1,0	3,6 $\pm$ 0,6	6,0 $\pm$ 0,7	77,3 $\pm$ 3,6
IM (%)	7,3 $\pm$ 2,8	9,3 $\pm$ 3,6	5,6 $\pm$ 1,9	4,1 $\pm$ 1,4	5,5 $\pm$ 1,1	74,8 $\pm$ 5,6
GN (%)	6,9 $\pm$ 1,7	7,6 $\pm$ 2,0	5,4 $\pm$ 1,1	3,8 $\pm$ 1,0	5,5 $\pm$ 0,6	74,0 $\pm$ 3,5

Tab. 10: Verteilung der Distanzen zur nächstgelegenen FITC-markierten Kapillare unter Myoglobininfusion und hämorrhagischer Hypotension (Gruppe C3,  $\eta = 8$ ) (dreiminütige Zirkulationszeit von FITC).

## 4• Diskussion

### 4.1 *Diskussion des Versuchsaufbaus und der allgemeinen Nierenfunktionsparameter*

Bei der kritischen Bewertung der gewonnenen Ergebnisse soll zunächst auf mögliche methodische Fehlerquellen eingegangen werden.

#### Myoglobin

Das verwendete Myoglobin (Myoglobin reinst, Serva) liegt vorwiegend in Form von Ferrimyoglobin (Metmyoglobin), d. h. mit dreiwertigem Eisenion in der Hämgruppe vor. Intravital liegen in Abhängigkeit z. B. vom Urin-pH beide Myoglobin-Unterformen in wechselnden Anteilen vor (ZAGER [1989]). Da die oxidierten Häm pigmente gegenüber den reduzierten Formen eine größere nierenschädigende Wirkung besitzen sollen (MASON et al. [1963]), wurde zur Auslösung eines Chromoprotein-induzierten akuten Nierenversagens bei Verwendung von Hämoglobin vorwiegend die Methämoglobin-Form eingesetzt (z. B. RUIZ-GUINAZU et al. [1967], JAENIKE [1969]). Verschiedene Autoren fanden Anhaltspunkte dafür, daß eine in vivo stattfindende Umwandlung der Häm pigmente in ihre oxydierten Methämoglobin/-myoglobin-Formen ein wichtiger pathophysiologischer Schritt bei der Auslösung des Nierenschadens ist (z. B. ZAGER [1989]). Von anderen Untersuchern konnte eine unterschiedliche biologische Wirksamkeit zwischen diesen beiden Formen nicht festgestellt werden (PALLER [1988]). In neuerer Zeit wurde insbesondere die Bedeutung des (dreiwertigen) Eisenions für die Bildung von gewebschädigenden Radikalen hervorgehoben (PALLER [1988], SHAH und WALKER [1989]).

## Myoglobindosis

Die Myoglobindosis von 25 mg/100 g KG wurde in Anlehnung an ZAGER (1989) gewählt. Bei einem Myoglobingehalt des Skelettmuskels von etwa 1-2% seines Feuchtgewichtes entspricht die verabreichte Menge – bezogen auf von 2,5-5 g Muskelgewebe/100 g KG anfallenden Myoglobins.

Unter der heterologen Myoglobininfusion bestanden keine Anzeichen einer primären kardiovaskulären Unverträglichkeitsreaktion.

## Hämorrhagische Hypotension

Die hämorrhagische Hypotension von 50 mmHg wurde ausgewählt, da diese für sich alleine für die Niere einen unterschweligen Schädigungsgrad darstellt (s. a. RATCLIFFE et al. [1989]). Hierdurch können synergistische Effekte z. B. mit anderen Substanzen deutlicher ermittelt werden. Die Blutdrucksenkung wie deren Aufhebung erfolgte sehr schnell – innerhalb von 3-5 Minuten. Eine prolongierte Absenkung hätte einen Eingriff in den sich selbst regulierenden hydrostatischen Druckabgleich gefordert, auf diesen wurde zugunsten der guten Reproduzierbarkeit verzichtet.

Für die Durchführung der Hämorrhagie war eine Heparinisierung erforderlich. Eine hierdurch bedingte Beeinflussung des pathophysiologischen Geschehens, z. B. durch Verhinderung einer dissiminierten intravasalen Gerinnung oder Abschwächung einer Sludge-Bildung, deren mögliche Bedeutung beim Glycerolmodell diskutiert worden ist (WERDLE und WRIGHT [1973], LOPEZ-FARRE et al [1990], s. a. BLACHAR et al. [1981]) und klinisch bei manchen Formen eines Rhabdomyolyse induzierten ARF beschrieben wurde (ROTH et al. [1988], KNOCHEL [1990], kann deshalb nicht ausgeschlossen werden. Der während des Versuchsverlaufes durch wiederholte Blutentnahmen und deren Ersatz durch Ringer-Lösung auftretende leichte Blutdruckabfall könnte allenfalls geringgradig die Nierenfunktion eingeschränkt haben, jedoch blieb der Blutdruck während aller Harnsammeiperioden im Bereich der autoregulatorischen Nierendurchblutung. Auf homologe Bluttransfusionen wurde zur *Vermeidung von zusätzlichen Tieropfern* verzichtet.

## Flüssigkeitsrestriktion

In allen Versuchsgruppen wurde die intraexperimentelle Flüssigkeitszufuhr restriktiv gehandhabt. Dieses Vorgehen sollte die Ausbildung eines Nierenschadens unterstützen. Es ist bekannt, daß die Inulin-clearance bei der Ratte in stärkerem Maße von ihrem Volumenstatus abhängt (WILSON

et al. [1969]). Die zurückhaltende Flüssigkeitszufuhr kann eine Erklärung dafür sein, daß die in dieser Arbeit ermittelten basalen glomerulären Filtrationsraten etwas unter den üblicherweise in der Literatur angegebenen Werten liegen.

Die Flüssigkeitsrestriktion hatte, besonders bei den Tieren mit exsikkierender Vorbehandlung (Versuchsreihe B) sehr kleine Harnflüsse zur Folge. Diese geringen Volumina begünstigen die Bedeutung von Sammel-, Wäge- und Verdünnungsgenauigkeiten für die über den Harnfluß errechneten Funktionsparameter wie z. B. der Inulin-clearance. Durch die Verwendung von Harnleiterkathetern und deren Verschieben bis nahe an das Nierenbecken konnte der Totraum sehr klein gehalten werden. Hierdurch kann der Zeitverlauf des sich gerade in der Initialphase eines ARF rasch ändernden renalen Exkretionsverhaltens genauer erfaßt werden. Das Ausmaß der Flüssigkeitsrestriktion spiegelte sich besonders in den Ausgangswerten des Inulin-Konzentrationsquotienten zwischen Urin und Plasma (U/P) und der fraktionierten Natriumexkretion (FeNa) wider. Die tubuläre Wasserrückresorption – sie errechnet sich prozentual aus dem reziproken U/P Quotienten über die Formel  $(1-P/U) * 100$  – zeigte basal eine maximale Wasserrückgewinnung des Organismus; gleichzeitig bestand mit fraktionierten Natriumexkretionswerten zwischen 0,03 bis 0,11 % eine sehr weitreichende Natriumkonservierung.

#### Fluoreszenzfarbstoffmarkierung

Systematische Probleme bei der Beurteilung der Perfusionsverhältnisse durch Globulininjektionen wie z. B. der Bedeutung von Blutviskositätsänderungen, Nachweisgrenzen, Fragen zur Schnellgefrieretechnik sind bei VETTERLEIN et al. (1986) erörtert worden.

Ein mögliches Artefakt, das ausgeschlossen werden muß, ist die Stauung oder Spreizung von Gewebeschnitten: Um verfälschte Abstandsmessungen unter dem Mikroskop zu vermeiden, wurde auf die Übereinstimmung der Größe der Organschnittfläche und der Präparatschnittfläche auf dem Objektträger geachtet.

## 4.2 *Diskussion der Ergebnisse*

### 4.2.1 *Diskussion der Ergebnisse der Versuchsreihe A*

Die alleinige (Ferri-)Myoglobinfusion ohne exsikkierende Vorbehandlung (*Gruppe A1*) hatte im Beobachtungszeitraum eine nur leichte, aber signifikante GFR-Erniedrigung zur Folge.

Dieses Ergebnis entspricht Untersuchungen von GARZIA et al. (1981), die nach Myoglobingabe bei unvorbehandelten Ratten eine ähnlich gering-

fürige GFR-Einschränkung feststellten. Das von uns verwendete Ferri-Myoglobin scheint sich also in seiner nierenschädigenden Wirkung nicht wesentlich zu unterscheiden. Insbesondere finden sich keine Hinweise auf eine verstärkte Nephrotoxizität durch das primäre Vorliegen einer Hämatingruppe im Myoglobin. Hierfür spricht auch, daß bei Gabe von gereinigtem Metmyoglobin an isolierten Rattennieren von nicht vorbehandelten Tieren keine Nierenfunktionsstörungen beobachtet wurden (RATCLIFFE et al. [1986]). Die Hämatingruppe und deren Bildung scheint also nicht primär für die Ausbildung einer Nierenschädigung verantwortlich zu sein. Weiterhin könnte man aus der Tatsache, daß sich bei Myoglobingabe an der künstlich perfundierten, isolierten Niere keine Nierenfunktionsstörungen fanden, hypothetisch die Myoglobinwirkung auf physiologische Mechanismen, die in dieser Versuchsanordnung außer Kraft gesetzt sind, wie z. B. auf Kreislauf oder nervale Nierendurchblutungssteuerung zurückführen.

Die Versuche mit halbstündiger hämorrhagischer Hypotension und Retransfusion (*Gruppe A2*) blieben ohne Auswirkungen auf die Nierenfunktion. Einer der möglichen Gründe für das Ausbleiben eines Nierenschadens könnte sein, daß es bei hämorrhagischer Hypotension erst bei Blutdrücken unter 40-25 mmHg zu einer akut auftretenden Verschlechterung des renalen Energiestoffwechsels mit nachfolgendem Abfall der ATP-Gehaltes kommen soll (RATCLIFFE et al. [1989]). Diese wurde hypothetisch auf eine plötzlich auftretende renale Vasokonstriktion nach Unterschreitung eines Schwellenwertes zurückgeführt.

Bei Myoglobingabe mit zusätzlicher hämorrhagischer Hypotension (*Gruppe A3*) entwickelte sich in unseren Versuchen bei stark erniedrigter Inulin-clearance ein voll ausgeprägtes ARF. Myoglobin und renale Ischämie (herbeigeführt durch eine hämorrhagische Hypotension) scheinen sich also in ihrer nierenschädigenden Wirkung synergistisch zu verstärken. Auffällig waren hier ausgeprägte Schwankungen des Harnflusses zwischen Oligo-Normurie und Polyurie. Diese traten sogar innerhalb eines Versuches zwischen rechter und linker Niere auf, ohne daß sich hierfür eine plausible Erklärung finden ließ. Da die Herabsetzung des U/P Quotienten hiervon nicht berührt war, zeigten die polyurischen Nieren eine etwas weniger stark herabgesetzte Inulin-clearance. Im Gegensatz zu der Versuchsgruppe A1 (alleinige Myoglobingabe) trat in der Gruppe A3 eine pathologisch erhöhte fraktionierte Natriumexkretion auf. Diese Erhöhung kann man als Zeichen für einen Tubuluszellschaden interpretieren.

Eine Verstärkung des myoglobininduzierten ARF durch zusätzliche Nierenischämie (allerdings durch totale Nierenarterienokklusion) bei der

Ratte fand auch ZAGER (1989). MANDEL et al. (1989) konnten am Glycerolmodell bei Hunden nach zusätzlicher Okklusion der Nierenarterien (eine Schockniere durch hämorrhagische Hypotension läßt sich bei Hunden nur schwer auslösen) auch hier eine Verstärkung der Nierenschädigung bei Kombination beider Schädigungsmechanismen zeigen.

Als Ursache dieser Synergie kommen verschiedenste pathophysiologische Mechanismen in Betracht. Als ein denkbarer Mechanismus wurde in der vorliegenden Arbeit die Komponente der Nierendurchblutung näher untersucht.

Hinweise auf die Bedeutung von Änderungen der renalen Perfusion ergaben sich aus einer großen Zahl von Untersuchungen:

So findet man beim Glycerolmodell des akuten myoglobinurischen Nierenversagens allgemein unter der initialen Erniedrigung der GFR regelmäßig einen Abfall der Nierengesamtdurchblutung parallel mit einer Erhöhung des renalen Gefäßwiderstandes (z. B. AYER et al. [1971], CHEDRU et al. [1972], HSU et al. [1977, 1979], HOLLE [1959], HOFBAUER et al. [1977], REINBECK et al. [1980], SUZUKI und MOSTOFI [1970], VENKATA-CHALAM et al. [1976]). Diese Ergebnisse führten dazu, daß das Glycerol induzierte hämo-myoglobinurische ARF als ein Modell des ischämischen Nierenversagens eingestuft wurde. Die hierbei auftretende Widerstandserhöhung soll besonders durch eine Vasokonstriktion der afferenten Glomerulumgefäße zustande kommen. Zur Frage jedoch, ob diese Effekte durch Myoglobin- bzw. Hämoglobinfreisetzung ausgelöst werden, liegen nur relativ wenige Untersuchungen vor, in denen diese Substanzen direkt eingesetzt wurden:

RUIZ-GUINAZU et al (1967) beobachteten in vivo nach Methämoglobingabe eine Verlangsamung des peritubulären Kapillarflusses und eine Erniedrigung des vaskulären Druckes in den Vasa efferentia und schlossen hieraus auf einen erhöhten präglomerulären Widerstand mit konsekutiver GFR-Reduktion. Ebenso vermutet JAENIKE (1967) nach Methämoglobingabe anhand einer reduzierten Diodrasclearance einen initial reduzierten Blutfluß. Dagegen konnten ZAGER und GAMELIN (1989) weder nach Häm- bzw. Myoglobingabe allein, noch nach deren Kombination mit einer totalen Nierenarterienokklusion flowmetrisch eine Verminderung des Nierengesamtblutflusses feststellen (Allerdings wurden die Messungen hier nur an kleinen Versuchskollektiven durchgeführt.).

Wir untersuchten die renalen Zirkulationsverhältnisse nach alleiniger Myoglobingabe (A1, B1), nach alleiniger Hypotension (A2, B2) und auch nach deren Kombination (A3, B3) durch Farbstoffinjektionen.

In den Versuchen der Versuchsreihe A konnten 120-150 Minuten nach Beginn der jeweiligen Maßnahmen Mikrozirkulationsstörungen nicht nachgewiesen werden.

Bei weitgehend unauffälliger Kapillargebietsdarstellung konnte eine schwere Perfusionsstörung – wie z. B. nach einstündiger Nierenarterienokklusion vorliegt (VETTERLEIN et al. [1986]) – ausgeschlossen werden. Da jedoch intraexperimentell Hinweise auf eine gestörte Nierendurchblutung vorhanden waren (Organzyanose und Oedem), ist bei der Bewertung dieses Ergebnisses zu berücksichtigen, daß die unauffälligen Befunde der Farbstoffmethode Durchblutungsstörungen nicht unbedingt ausschließen. Daher sollen hier kurz einige Aspekte von Perfusionsuntersuchungen mittels Farbstoffinjektion diskutiert werden:

Die Bestimmung der Perfusionsverhältnisse mittels Farbstoffmarkierung beruht auf dem intravasalen Nachweis des Indikatorfarbstoffs in den Mikrogefäßen. Es läßt sich damit entscheiden, ob während der Farbstoffexpositionszeit das Mikrogefäß perfundiert war. Die Verschlechterung einer Gewebepfusion drückt sich in der Zunahme der zur Gesamtdarstellung des Kapillarnetzes erforderlichen Zirkulationszeit der injizierten Farbstoffe aus.

Die Niere benötigt – wie alle Organe mit kurzen Kreislaufzeiten und großen Strömungsgeschwindigkeiten – zur vollständigen Farbstoffdarstellung ihres Kapillarnetzes nur eine kurze Zirkulationszeit. Geringergradig erniedrigte Blutflüsse haben hier – bei homogener Gewebepfusion – nur eine kleine Verlängerung der Farbstoffanflutungszeit zur Folge. Diese kleine Differenz der Zirkulationszeiten erfordert zur Diskrimination zwischen normaler und pathologischer Perfusion ein Arbeiten mit den jeweiligen ‚Schwellenzirkulationszeiten‘.

Die in unserem Labor wegen der Vergleichbarkeit mit früheren Arbeiten (z. B. VETTERLEIN et al. [1986]) gewählten Farbstoffzirkulationszeiten von einer und drei Minuten sind relativ lang und würden geringergradige Perfusionsverzögerungen innerhalb dieser gewählten Zeitspannen nicht erfassen.

Als kurzes Resümee der Mikrozirkulationsuntersuchungen der Versuchsreihe A läßt sich sagen, daß weder nach alleiniger Myoglobingabe noch nach Kombination von Myoglobinämie und hämorrhagischer Hypotension Hinweise auf eine massive Störung der intrarenalen Mikrozirkulation gefunden werden konnten.

#### *4.2.2 Diskussion der Ergebnisse der Versuchsreihe B*

Da sich in der Versuchsreihe A insbesondere bei alleiniger Myoglobingabe im GFR-Verlauf bei den Versuchstieren nur eine leichte GFR-Erniedri-

gung zeigte und außerdem die Werte im Einzelfall erheblich schwankten, wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, in der die Tiere durch Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz exsikkiert und ihr Urin angesäuert wurde.

## Dehydratation

Das Crush-Syndrom geht klinisch mit einer Dehydratation infolge Flüssigkeitssequestration in das zerstörte Muskelgewebe einher (BETTER und STEIN [1990]). Experimentell konnte eine Verstärkung des myo-/hämoglobininduzierten Nierenversagens durch Dehydratation durch eine große Zahl von Untersuchungen bestätigt werden (Glycerolmodell: WILSON et al. [1969], HOFBAUER et al. [1977], BARANWOSKI et al. [1978], REINECK et al. [1980], CUSHNER et al. [1986]; ARF durch Myoglobininfusion: GARCIA et al. [1981]). Die eigentlichen Wirkungsmechanismen dieses manifestationsfördernden Faktors (z. B. über ADH/Antidiurese, das Renin-Angiotensin-System oder Änderungen der Löslichkeit der Chromoproteine) ist jedoch nicht vollständig aufgeklärt.

Wegen dieser Auswirkungen der Dehydratation auf die Reproduzierbarkeit des glycerolinduzierten Nierenversagens wird diese von den meisten Experimentatoren in Form eines 18(-24)-stündigen Wasserentzuges vor Glycerolgabe durchgeführt. Wir orientierten uns an dieser Vorgabe.

## Urin-pH

Die Bedeutung eines niedrigen Urin-pH für die Entstehung eines ferrochromoproteininduzierten Nierenschadens wurde früh hervorgehoben und wird von der Mehrzahl der Untersucher bestätigt (BYWATERS und STEAD [1944], LAUCH und SCHWARTZ [1950], PERRI und GORINI [1952]). Andere Autoren konnten nach exogener Harnansäuerung bzw. Harnalkalisierung keinen eindeutigen Effekt auf die Auslösung eines Nierenschadens finden (THIEL et al. [1967]). Die Wirkung der Harnansäuerung wurde auf eine hierdurch verstärkte intrarenale Methäm-Gruppenbildung der Ferrochromoproteine, die verstärkte Ausfällung der Proteine mit tubulärer Harnzylinderbildung und nachfolgender tubulärer Obstruktion (KANT et al. [1977], GARCIA et al. [1981], ZAGER und GAMELIN [1989]) oder auf eine verstärkte renale „Retention“ der Globine zurückgeführt (ZAGER et al. [1987]). Die Harnansäuerung erfolgte vorwiegend exogen durch Zufuhr saurer Valenzen ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ -,  $\text{HCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Lösungen p.o.). Hierdurch sind mögliche, unerwünschte Eigenwirkungen der zugeführten Substanzen auf die Nierenfunktion nicht auszuschließen (z. B. CAMARGO et al. [1984]). So könnte z. B. die bei THIEL et al. (1967) ausgebliebene Verstärkung des Nierenschadens nach Harnansäuerung durch Methionin hypothetisch auf

eine mögliche Eigenwirkung dieser Aminosäure oder ihrer Interaktion mit Myoglobin zurückzuführen sein.

Wir erzielten in unseren Versuchen durch 18-stündigen Futterentzug endogen einen sehr konstanten Urin-pH von  $5,93 \pm 0,11$ . Dagegen hatte sich in Vorversuchen ergeben, daß sich der Urin-pH mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung p. o. aufgrund unterschiedlicher Aufnahme der Ammoniumchloridlösung nicht hinreichend konstant senken ließ.

#### Myoglobingabe bei vorheriger Dehydratation (*Gruppe B1*)

Die Myoglobingabe führte bei den dehydrierten Tieren zu einem starken Abfall der Inulin-clearance. Bemerkenswert war hierbei die schnelle Entwicklung einer signifikanten GFR-Erniedrigung auf 58% des Ausgangswertes bereits fünfzehn Minuten nach Myoglobin-Infusionsbeginn (s. Tab. 4). Dieses Ergebnis stimmt mit Angaben von GARCIA et al. (1981) überein, die ebenfalls bei dehydrierten Ratten nach Myoglobingabe einen deutlichen GFR-Abfall innerhalb der ersten 30 Minuten fanden.

Es zeigten sich jedoch weiterhin (wie in Gruppe A1) nur leichte Zeichen einer tubulären Funktionsstörung: Die Harnosmolalität erniedrigte sich zwar deutlich, sie fiel jedoch nicht auf plasmaisotone Werte ab; ebenso stieg die fraktionierte Natriumexkretion zumindest in der von uns beobachteten Initialphase nur mäßig an. Eindeutig pathologische Exkretionswerte als Hinweis auf einen Tubuluszellschaden wurden nicht beobachtet. Diese Symptomkonstellation von stark erniedrigter GFR und nur mäßig beeinträchtigtem Harnkonzentrationsvermögen sowie kaum erhöhter fraktionierter Natriumexkretion tritt typischerweise bei *prärenal* bedingten Formen eines akuten Nierenversagens  $\zeta$ . B. infolge renalen Vasokonstriktionen auf. Möglicherweise kommt die festgestellte verstärkende Wirkung der Dehydratation auf den Nierenschaden vorwiegend über ihre prärenalen Angriffspunkte zustande.

Hinweise auf eine initial prärenale Ursache des myoglobinurischen ARF fanden auch REINECK et al. (1980). Nach vorausgehender Volumendepletion konnten sie am Glycerolmodell in der Initialphase des akuten Nierenversagens die GFR-Erniedrigung und die mit ihr zeitlich einhergehende, proportionale Erniedrigung des renalen Blutflusses durch forcierte Ringerinfusionen aufheben.

#### Hämorrhagische Hypotension mit Dehydratation (*Gruppe B2*)

Während nach alleiniger hämorrhagischer Hypotension bei fehlendem oder nur mäßigem Volumendefizit (Gruppe A2) die GFR kaum vom

Ausgangswert abwich, kam es nach hämorrhagischer Hypotension mit vorheriger Dehydratation (Gruppe B2) gegen Ende des Beobachtungszeitraumes zu einem leichten Abfall der GFR. Bei einem Teil dieser *Tiere* (n = 4) war zur *Verminderung von Tieropfern* die linke Niere zur Untersuchung der Perfusionsverhältnisse (für Gruppe C2) entnommen worden. Obgleich sich dieses bei der Bestimmung der renalen Funktionsparametern zunächst nicht bemerkbar machte, könnte es als Ursache der im weiteren Versuchsverlauf auftretenden geringfügigen Abnahme der Inulin-clearance in Frage kommen. Da bei der Ratte die glomeruläre Filtrationsrate stark von ihrem Volumenstatus abhängt, dürfte jedoch dieser Befund in erster Linie im Sinne einer prärenalen Azotämie bei protrahierter Volumendepletion zu deuten sein.

Hierfür spricht auch, daß sich in dieser Gruppe sowohl Osmolalität als auch fraktionierte Natriumexkretion wieder den Ausgangswerten näherten und so für ein intaktes Harnkonzentrationsvermögen bzw. eine reguläre Tubuluszellfunktion sprachen.

Myoglobingabe und hämorrhagische Hypotension bei vorbestehender Dehydratation (*Gruppe B3*)

In dieser Gruppe verschlechterte sich die Nierenfunktion stärker als in allen anderen Versuchsgruppen, insbesondere hatte sie sich gegenüber ihrer direkten Vergleichsgruppe ohne Vorbehandlung (Gruppe A3) verschlechtert. Auffällig war, daß in der Gruppe B 3 oligurische bis oligoanurische Verläufe vorherrschten, während in Gruppe A3 Oligurie und Polyurie sich etwa gleich häufig manifestierten. Auch in dieser Gruppe sank die Urin-Osmolalität im Beobachtungszeitraum nicht auf plasmaitone Werte ab. Die fraktionierte Natriumexkretion war jedoch als Hinweis auf eine Tubuluzellschädigung schon deutlich erhöht.

Eine Verstärkung des myoglobininduzierten ARF durch zusätzliche Nierenischämie bei der Ratte fand auch PALLER (1988) sowie ZAGER et al. (1987) und ZAGER (1991). Auf diese und andere Arbeiten soll in der Diskussion der Versuchsergebnisse der Versuchsreihe C eingegangen und mögliche pathophysiologische Mechanismen erörtert werden.

#### 4.2.3 Diskussion der Versuchsergebnisse der Versuchsreihe C

Die Myoglobingabe nach vorheriger Dehydratation (*Gruppe C1*) führte zu keinen nachweisbaren Mikrozirkulationsstörungen. Der bei der Auswertung bestehende Eindruck einer etwas weniger intensiven und leicht inhomogenen Farbstoffmarkierung der Kapillaren läßt sich mit der angewandten Untersuchungsmethode nicht objektivieren und muß daher unberücksichtigt bleiben.

Auch unter alleiniger hämorrhagischer Hypotension (*Gruppe C2*) fanden sich keine Perfusionsausfälle. Es ist jedoch bekannt, daß die Nierendurchblutung auf eine hämorrhagischen Hypotension trotz autoregulatorischen Reservekapazitäten empfindlich reagiert und deutlich abfällt. Wie in der Methodenkritik erörtert, kann eine Aussage über eine diskretere unterschwellige Mikroperfu-sionsstörung – von der trotz autoregulatorischer Durchblutungsanpassung ausgegangen werden kann – nicht gemacht werden.

Bei Farbstoffgabe *unter* Myoglobin und hämorrhagischer Hypotension (*Gruppe C3*) fand sich der beschriebene *subtotale Perfusionsausfall* des gesamten Kapillargebietes sowie eines Großteils der Arteriolen. Die Durchblutung muß hier daher praktisch zum Erliegen gekommen sein.

Bei den meisten Versuchen wurden nach Nephrektomie links (zur Bestimmung der Perfusionsverhältnisse) die Hypotension durch Retransfusion beendet und anschließend die Funktionsparameter mit der rechten Niere in gewohnter Weise ermittelt. Da sich hier gegenüber den Versuchsreihen A3 und B3 vergleichbare Werte fanden, kann davon ausgegangen werden, daß die erhobenen Mikroperfu-sionsbefunde auch den in diesen Gruppen abgelaufenen Prozessen entsprechen und nicht etwa Ausdruck einer beginnenden Kreislaufzentralisation mit schwerster peripherer Vasokonstriktion waren.

Die beschriebenen schwersten Perfusionsstörungen unter kombinierter Myoglobinämie und hämorrhagischer Hypotension scheinen nicht von der in dieser Gruppe dehydrierenden Vorbehandlung abzuhängen. Sie ließen sich auch ausnahmslos bei nicht dehydrierten Versuchstieren (n = 3) sowie bei Harn-alkalisierender Vorbehandlung mit Kaliumhydrogen-carbonat p. o. (n = 3) in ähnlicher Intensität erzeugen.

Die weitgehend unauffälligen histologischen Befunde bei Nephrektomie 120 bzw. 180 Minuten nach Myoglobingabe in Versuchsgruppe A3 wie B3 zeigen die Reversibilität der unter Myoglobin und Hypotension bestehenden schweren Perfusionsstörungen an.

Wir haben deshalb untersucht, ob durch *Ausdehnung der Hypotensionsphase* auf 60 Minuten unter fortlaufender Myoglobingabe *irreversible* Perfusionsstörungen auftreten (n = 6). Die Ausdehnung der hämorrhagischen Hypotension unter Myoglobininfusion hatte eine so massive Wirkung, daß fast alle durch Dehydratation vorbehandelten Tiere diese Phase nicht überlebten: Von 6 Versuchstieren waren 4 Tiere nach 45-60 minütiger Hypotensionsdauer gestorben. Bei den verbleibenden zwei Versuchen fand sich histologisch zehn Minuten nach Retransfusion einmal ein leichter und einmal ein deutlicher, rindenbetonter Perfusionsdefekt.

Die alleinige hämorrhagische Hypotension hingegen konnte problemlos auf 60 Minuten Dauer mit anschließend stabilen Kreislaufverhältnissen ausgedehnt werden ( $n = 3$ ). Die Funktionsparameter zeigten hier weitgehend ähnliche, d. h. nur gering beeinträchtigte Befunde wie nach halbstündiger Hypotension (Gruppe B2). Histologisch fanden sich geringgradige Perfusionsstörungen.

Das Myoglobin scheint also die Empfindlichkeit des Organismus gegenüber einer hämorrhagischen Hypotension extrem zu erhöhen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in einer Beeinträchtigung der Herzfunktion, z. B. einer Verringerung der Herzauswurfraction durch Myoglobin liegen, wie sie von HSU et al. (1977) und KISHIMOTO et al. (1989) am Glycerolmodell festgestellt worden ist.

In unseren Versuchen ohne Vorbehandlung (A) waren die zu entziehenden Blutvolumina zur Beibehaltung des festgelegten Blutdruckniveaus bei Hypotension unter Myoglobininfusion signifikant höher als bei alleiniger Hypotension ( $4,6 \pm 0,3$  vs.  $6,61 \pm 0,4$  mmHg). Dieser Befund stimmt mit Beobachtungen von ZAGER (1991) überein. Diese Beobachtung spricht für die von einigen Autoren aufgestellte Vermutung einer durch Myoglobin ausgelösten systemischen Vasokonstriktion (HOFBAUER et al. [1977]). Eine solche systemische Vasokonstriktion könnte zu der gefundenen Wirkungsverstärkung des myoglobinurischen Nierenschadens bei gleichzeitiger hämorrhagischer Hypotension beigetragen haben sowie eine der möglichen Ursachen für die am Glycerolmodell festgestellte Reduktion der Herzauswurfraction sein. In diesem Zusammenhang könnte die erniedrigte Herzauswurfraction als Folge einer Steigerung der Herznachlast interpretiert werden.

Das fast vollständige Sistieren der renalen Zirkulation unter Myoglobin und hämorrhagischer Hypotension deutet auf eine das ganze Nierengefäßsystem betreffende renale Widerstandserhöhung hin. Das gleichzeitige Bestehen von Myoglobinämie/Myoglobinurie und Hypotension führt so zu einer sich verstärkenden, deutlichen Verschlechterung der Mikrozirkulation.

#### Nebenbefunde

Am Glycerol induzierten Nierenversagen wurde neben einer Reduktion des renalen Plasmaflusses auch eine Verringerung der hepatischen Durchblutung mit Leberzellschäden gefunden (KISHIMOTO et al. [1989]). Wir entnahmen daher orientierend bei zwei Versuchstieren unter Myoglobin und Hypotension Darmschlingen sowie Lebergewebe. Es zeigte sich hier eine

unauffällige Farbstoffmarkierung der Organkapillaren. Somit scheint die Potenzierung der an den Nieren beobachteten Zirkulationsdefekte durch Myoglobin und Hypotension zumindest nicht an allen Intestinalorganen aufzutreten.

#### *4.3 Vergleich Glycerolmodell – Myoglobininfusion*

Das Standardmodell für die experimentelle Untersuchung des akuten myoglobinurischen Nierenversagens ist das Glycerolmodell. Durch dieses sind die meisten Erkenntnisse und pathophysiologischen Vorstellungen über das hämomyoglobinurische Nierenversagen gewonnen worden. In der Einleitung sind einige wesentliche Punkte und Gemeinsamkeiten beider Auslösemechanismen angesprochen worden. Will man experimentell ein akutes myoglobinurisches Nierenversagen auf eine andere Weise als durch eine Glycerolinjektion erzeugen und möchte gleichzeitig die mit diesem Standardmodell gewonnenen Erkenntnisse zur Interpretation der eigenen Ergebnisse mit heranziehen, so stellt sich die Frage nach Gemeinsamkeiten des pathophysiologischen Mechanismus. Ein Ansatzpunkt hierfür kann der Vergleich der erhobenen Befunde sein. Auf einige soll hier kurz eingegangen werden:

Makroskopisch fand sind in unseren Versuchen eine ähnliche Morphologie wie sie nach Glycerolinjektion beschrieben wurde (OKEN et al. [1966]). Die Nieren waren an der Oberfläche leicht livide, mit z. T. scharf umgrenzten blassen Herden, sowie typischerweise mit bräunlichen Sprenkeln überzogen. NB: Auch beim durch Hämoglobingabe induzierten ARF fand sich makroskopisch ein unseren Befunden ähnelndes Bild (PARRY et al. [1963]).

Auch die exkretorische Nierenfunktion entwickelte sich nach Myoglobininfusion mit Dehydration (Gruppe B1) weitgehend ähnlich wie beim Glycerolmodell mit Dehydration: Sowohl in der Größenordnung der GFR-Reduzierung (z. B. REINECK et al. [1980]) als auch in der Geschwindigkeit der Entwicklung der Nierenfunktionsstörung finden sich große Übereinstimmungen. So wurde z. B. ähnlich unseren Ergebnissen auch beim Glycerolmodell eine sehr schnelle Reduktion der GFR auf 77 % innerhalb von 30 Minuten beschrieben (LOPEZ-FARRE et al. [1990]).

Das bekräftigt die zentrale Bedeutung des Myoglobins als der wesentlichen Noxe auch bei dieser Form der Nierenschädigung. Es erscheint daher berechtigt, die mit beiden Auslösungsmodi gewonnenen Befunde zumindest hypothetisch auf gleiche pathophysiologische Mechanismen zurückzuführen.

#### **4.4 Pathophysiologische Konzepte (1): Hämodynamik**

Die Suche nach möglichen Ursachen dieser sehr raschen Entwicklung einer GFR-Erniedrigung leitet zu möglichen pathophysiologischen Gemeinsamkeiten über und legt einen unmittelbar wirkenden Angriffspunkt auf die glomeruläre Filtrationsrate nahe. Dieser könnte in erster Linie durch Veränderungen der renalen Hämodynamik ausgelöst sein und z. B. über einen herabgesetzten (effektiven) glomerulären Filtrationsdruck zustande gekommen sein. Tatsächlich hat eine große Zahl von Untersuchern am Glycerolmodell Belege für eine pathogenetisch wirksame Vasokonstriktion erbringen können:

SUZUKI und MOSTOFI (1970) untersuchten Rattennieren nach subcutaner Glyceeingabe elektronenmikroskopisch und fanden vorübergehende Spasmen renaler Arteriolen und kleiner Arterien bereits wenige Minuten nach Injektion. Diese hatten nach 5-60 Minuten ihr Maximum erreicht und ähnelten dann den bei Noradrenalin-Injektion beobachteten Veränderungen.

AYER et al. (1971) stellten mit Hilfe der Xenon-Auswaschtechnik eine bereits 10 Minuten nach Glycerolinjektion einsetzende und nach 24 Stunden ihr Minimum erreichende – vorwiegend corticale-Hypoperfusion fest (RBF nach 24 Std. auf 27 % gesunken). Weiter postulierten sie aufgrund der Befunde intravitale Nierengefäßdarstellungen mittels „Silicon rubber casts“ einen erhöhten präglomerulären Widerstand und führten die beobachtete Oligurie und Niereninsuffizienz auf den durch diese Widerstandserhöhung bedingten primären Abfall der glomerulären Filtrationsrate zurück.

HSU et al. (1979) bestimmten den renalen Blutfluß sowie den afferenten Arterioldurchmesser mit der Mikrosphärentechnik 24 Stunden nach Auslösung eines ARF durch Glycerolinjektion. Auch diese Untersucher stellten eine präglomeruläre Widerstandserhöhung fest, die sie auf eine afferente Arteriolenkonstriktion sowie eine gleichfalls ermittelte Blutviskositätserhöhung zurückführten.

KURTZ et al. (1976), die für ihre Untersuchung radioaktiv markierte Mikrosphären verwandten, fanden drei Stunden nach Glycerolinjektion bei Absinken der Kreatinin-Clearance von 0,50 auf 0,04 ml/min/100 g KG eine Erniedrigung des renalen Blutflusses von 4,92 auf 1,99 ml/min/100 g KG.

REINECK et al. (1980) maßen zur weiteren Untersuchung der Bedeutung der Völumendepletion den renalen Blutfluß flowmetrisch: Der RBF sank 3 Stunden nach Glycerolgabe auf 48 % des Ausgangswertes. Die Inulin-

clearance erniedrigte sich bei den – nicht vorbehandelten – Tieren in diesem Zeitraum auf 70%. Dieses Ergebnis stimmt in etwa mit den in unseren Versuchen (Gruppe A1, Myoglobin ohne Vorbehandlung) gefundenen Clearancereduzierungen überein.

Auch die von TORRES et al. (1975) beschriebene Verstärkung des glycerol-induzierten ARF durch Hemmung der renalen Prostaglandinsynthese bzw. der von WERB et al. (1978) an diesem Modell beobachtete nierenprotektive Effekt einer Prostaglandin(PGE<sub>2</sub>)-Infusion kann in Hinblick auf die vasodilatierende Wirkung der Prostaglandine als Hinweis auf die Bedeutung einer renalen Vasokonstriktion gedeutet werden.

Nach durch direkte Ferrochromoproteingabe induziertem ARF liegen hierzu nur wenige z. T. widersprüchliche Befunde vor: Während z. B. RUIZGUINAZU et al. (1967), JAENIKE (1969) Hinweise für eine gestörte renale Blutversorgung fanden, konnte andere diese nicht bestätigen (ZAGER [1991]).

RUIZ-GUINAZU et al. (1967) injizierten dehydrierten Ratten Methämoglobin und bestimmten den hydrostatischen Druck in den proximalen Tubuli sowie in den efferenten Glomerulargefäßen mit der Mikropunktionstechnik. Hierbei wurde festgestellt, daß der tubuläre Druck wie der renovaskuläre (Blut-)Druck bei den Tieren mit sich entwickelndem ARF insgesamt eher erniedrigt war. Daher schlossen diese Untersucher, daß einerseits die Okklusion der Tubuli durch Zylinder in der Pathogenese nur eine untergeordnete Bedeutung zukommt, andererseits postulierten sie einen erhöhten präglomerulären Widerstand als entscheidend für die Ausprägung des Krankheitsbildes.

Auch am Menschen fanden sich beim durch Rhabdomyolyse bedingten ARF klinisch Hinweise für eine renale Vasokonstriktion (z. B. OZAKI und SAKAMI, 1988).

#### *4.4.1 Einschätzung der Bedeutung einer Vasokonstriktion für das Entstehen des Myoglobininduzierten Nierenversagens aufgrund unserer Versuchsergebnisse*

Obgleich mit den von uns gewählten Methoden der Farbstoffmarkierung von Kapillaren keine quantitativen Aussagen über den renalen Blutfluß gemacht werden können, lassen sich doch zumindest durch die unauffälligen Mikrozirkulationsbefunde unter und nach alleiniger Myoglobingabe schwerste Störungen der renalen Mikrozirkulation ausschließen. Obgleich verschiedene Untersucher durch vasoaktive Substanzen am Glycerolmodell einen nierenprotektiven Effekt erzielen konnten (BIDANI und

CHURCHILL [1983], LEE et al. [1985], BOWMER et al. [1986]), erscheint eine rein oder vorwiegend vaskuläre Genese als Ursache des myoglobin-induzierten Nierenschadens auch aus Sicht unserer Befunde unwahrscheinlich. Hiergegen sprechen insbesondere die Befunde der Versuchsgruppe B1, in der es durch Dehydratation und alleinige Myoglobingabe regelmäßig zur Ausbildung eines akuten Nierenversagens kam, obwohl hier schwere Mikrozirkulationsstörungen ausgeschlossen werden konnten. BECK et al. (1992) jedoch geben an, daß erst bei einer Reduktion des Nierenblutflusses auf unter ein Sechstel des Normalflusses mit hierdurch bedingten renalen Zellschäden zu rechnen ist.

#### *4.4.2 Die Verstärkung des Myoglobininduzierten Nierenschadens durch hämorrhagische Hypotension*

In neuerer Zeit haben sich verschiedene Untersucher mit dem Zusammenspiel von Myoglobinämie und gleichzeitiger renaler Ischämie beschäftigt.

Am Glycerolmodell konnte MANDEL et al. (1989) bei Hunden mit einer unterschwelligem Glyceroldosis nach zusätzlicher Okklusion der Nierenarterien eine Nierenschädigung auslösen, sowie bei Kombination beider Schädigungsmechanismen eine Verstärkung des Nierenschadens herbeiführen. Auch eine direkte Myoglobingabe und totale Nierenarterienokklusion führen zu einer Verstärkung des Nierenschadens (ZAGER [1989]). Unsere Ergebnisse stimmen in den Auswirkungen mit denen der oben genannten Autoren überein (Versuchsreihe A und B).

In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurden die Auswirkungen von Myoglobin, hämorrhagischer Hypotension und deren Kombination auf den renalen Energiestoffwechsel untersucht (ZAGER, 1991). In früheren Untersuchungen am Glycerol induzierten ARF hatten bereits TRIFILLIS et al. (1981) einen Abfall des renalen ATP-Gehaltes feststellen können. Der von ZAGER angewandte Schädigungsmechanismus entsprach dem in unseren Versuchen durchgeführten weitgehend. Wie in unseren Versuchen kam es auch dort unter der Kombination zu einer drastischen Verschlechterung der Nierenfunktion (Kreatinin-Clearance). Der renale ATP-Gehalt verringerte sich sowohl nach alleiniger Myoglobingabe als auch unter alleinigem hämorrhagischen Schock um etwa ein Viertel. Die Kombination beider Noxen führte zu einem massiven Abfall des ATP-Spiegels auf 17% des Ausgangswertes. Dagegen konnten RATCLIFFE et al. (1989) bei NMR-Bestimmungen des Adenylat-Pools unter hämorrhagischer Hypotension bei zusätzlicher Myoglobingabe keinen verstärkten Abfall der energiereichen Phosphate gegenüber einer alleinigen Hypotension feststellen.

Eine drastische Verminderung des renalen ATP-Gehaltes bei gleichzeitiger Myoglobingabe und hämorrhagischer Hypotension ginge mit den von uns gefundenen schwersten renalen Mikrozirkulationsstörungen zeitlich einher und ließe sich mit diesen zirkulatorischen Veränderungen gut erklären.

Es scheint zunächst nahezuliegen, diese auf jene zurückzuführen. Da der von ZAGER (1991) ermittelte starke Abfall der energiereichen Phosphate, insbesondere des AEC [adenylate energy Charge:  $(ATP + 1/2 ADP)/(ATP + ADP + AMP)$ ] und des ATP/ADP-Quotienten charakteristisch für einen ischämischen Mechanismus sind, untersuchte auch ZAGER die Auswirkungen gleichzeitiger Myoglobingabe und hämorrhagischer Hypotension auf den renalen Blutfluß.

Wie in früheren Untersuchungen konnte er jedoch flowmetrisch weder eine Reduktion des renalen Blutflusses durch Myoglobin allein noch eine Verstärkung der bei hämorrhagischer Hypotension gemessenen Durchblutungsverminderung durch zusätzliche Myoglobingabe feststellen. Daher schloß er eine vasokonstriktorische Genese als Ursache der ATP-Erniedrigung aus. Unsere Ergebnisse zum renalen Mikroperfusionsverhalten unter gleichzeitiger Myoglobinämie und Hypotension (Gruppe C3) scheinen zumindest für eine vasokonstriktorische – glomeruläre – Komponente dieser synergistischen GFR-Erniedrigung zu sprechen. Obgleich die flowmetrische renale Blutflußmessung keine direkten Aussagen über etwaige Mikrozirkulationsstörungen zuläßt, müßte unseren Perfusionsbefunden ein gegenüber einer alleinigen hämorrhagischen Hypotension deutlich verstärkter Abfall des RBF einhergehen. Über die Ursachen für die Diskrepanz dieser Befunde zu den ermittelten schwersten Mikrozirkulationsstörungen kann nur spekuliert werden. ZAGER führte die hämorrhagische Hypotension erst nach Beendigung einer zweistündigen Myoglobininfusion durch. Die von uns beobachtete Reversibilität der Mikrozirkulationsstörungen könnte zu diesem Zeitpunkt schon zur Verbesserung der Nierendurchblutung geführt haben. Zwei unter diesem Gesichtspunkt von uns durchgeführte Probeversuche, in denen die Perfusionsverhältnisse erst nach Beendigung einer auf zwei Stunden ausgedehnten Myoglobininfusion am Ende einer sich anschließenden Hämorrhagie untersucht wurden, zeigten tatsächlich gebesserte Mikrozirkulationsverhältnisse mit nunmehr vorwiegend noch markbetonten Ausfällen.

Eine weitere Ursache könnte auch in unterschiedlichen biologischen Wirksamkeiten von Ferrimyoglobin und Ferromyoglobin liegen.

#### 4.4.3 Bedeutung der zeitlichen Abfolge von Myoglobingabe und hämorrhagischer Hypotension

In Vorversuchen fand sich bei Myoglobin-Infusion nach bereits begonnener hämorrhagischer Hypotension nach Beendigung der Hämorrhagie die Inulin-clearance zunächst nicht eingeschränkt. Da es durch die Hämorrhagie über den Verlust des erforderlichen Filtrationsdruckes zu einem Sistieren der glomerulären Filtration kommt, blieb hier zunächst die lumenseitige Interaktion des Myoglobins mit den Tubuli/Tubuluszellen praktisch aus (Daß unter einer hämorrhagischen Hypotension auf einen arteriellen Blutdruck von 50 mmHg die Filtration von Myoglobin weitgehend zum Erliegen kommt, konnte in Probeversuchen durch fluoreszenzmarkiertes Myoglobin bestätigt werden. Auf die Fluoreszenzmarkierung von Myoglobin soll später noch näher eingegangen werden.).

Hypothetisch wäre es daher denkbar, daß das Myoglobin den schnell einsetzenden Abfall der GFR erst über Effekte im tubulären Schenkel des Nephrons auslöst. Sieht man von der Möglichkeit einer GFR-Erniedrigung durch eine mechanische Tubulusokklusion ab – in unseren Versuchen fanden sich z. B. nur vereinzelt Urinzylinder – kann man nach einem Bindeglied zwischen Myoglobinwirkung im Tubulus(zelle) und der schnell einsetzenden GFR-Erniedrigung suchen. In Anlehnung an den tubuloglomerulären Rückkoppelungsmechanismus zwischen der Natriumkonzentration im distalen Tubulus und der Steuerung der GFR ließe sich auch hier ein hypothetischer Rückkoppelungsmechanismus zwischen den durch Myoglobin z. B. in ihrem Stoffwechsel modifizierten Tubuluszellen zur glomerulären Perfusion/Filtration denken.

Da uns die Beeinflussung des pathophysiologischen Geschehens durch Änderung des zeitlichen Ablaufs zur Differenzierung der Bedeutung verschiedener vermuteter Mechanismen sehr aufschlußreich erschien, wurde eine *zusätzliche Versuchsreihe* (n = 6) durchgeführt:

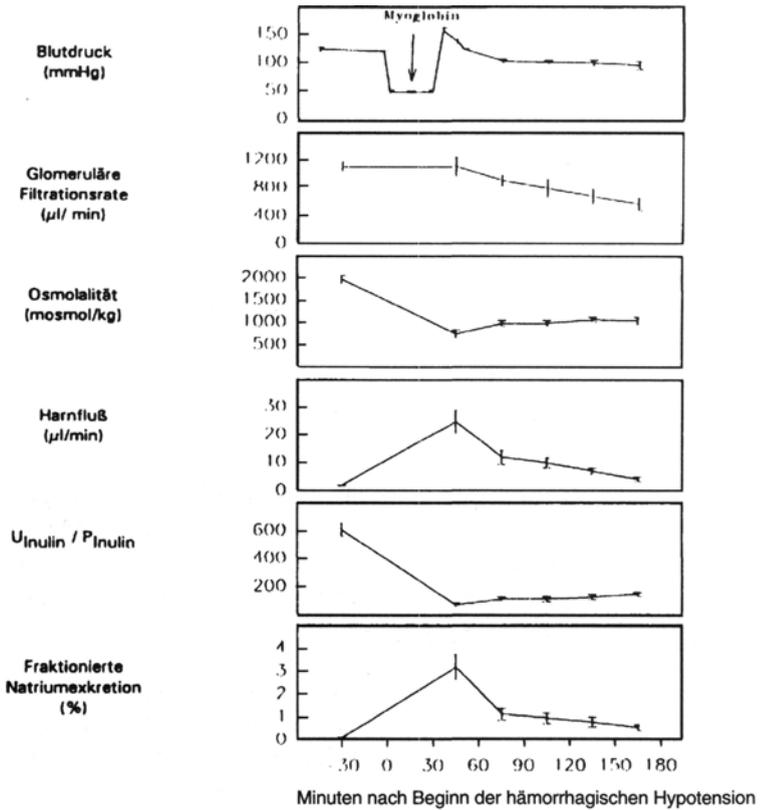
Hierbei wurde bei dehydrierten Tieren zunächst mit einer halbstündigen hämorrhagischen Hypotension begonnen und nach fünfzehn Minuten zusätzlich die Myoglobininfusion angelegt. Ziel dieser Versuchsanordnung war es, die in Hinblick auf die Ergebnisse der obengenannten Probeversuche folgenden Fragen zu prüfen: *Frage 1:* Kommt es tatsächlich zu einer Verbesserung der Nierenfunktionsparameter beim Myoglobin induzierten ARF, wenn die Niere vor Beginn der Myoglobinämie einer Ischämie ausgesetzt ist? *Frage 2:* Welche Folge hat – bei herabgesetzten Filtrationsdruck und demgemäß praktisch ausbleibenden Filtrat – das Fehlen einer

möglichen Interaktion von filtriertem Myoglobin und Tubuluszelle auf das Mikrozirkulationsverhalten unter Hypotension? Falls die in der Versuchsreihe C3 festgestellten schwersten Mikrozirkulationsstörungen auf eine nicht direkt vasokonstriktorische, sondern wie auch immer geartete intrarenale Wirkung des Myoglobins oder seiner (tubulären) Abbauprodukte zurückzuführen sind, sollten hier unauffällige Nierenmikrozirkulationsverhältnisse bestehen.

Unerwarteterweise fanden sich in dieser Versuchsreihe bei Nierenentnahme am Ende der Hypotensionsphase trotz weitgehend unterbundener Myoglobinfiltration ähnlich schwere Mikrozirkulationsdefekte wie in Versuchsreihe C3. Das Auftreten der renalen Perfusionsstörungen scheint also nicht an eine tubulär vermittelte Interaktion zwischen Myoglobin und renovaskulären System gebunden zu sein.

Dabei weichen die mit der verbleibenden (rechten) Niere gewonnenen Nierenfunktionsparameter von denen der Versuchsreihen mit Myoglobingabe vor hämorrhagischer Hypotension stark ab. Insgesamt scheint die renale Ischämie hierbei einen protektiven Effekt gegen die nierenschädigende Wirkung des Myoglobins zu erzeugen:

In allen Versuchen kam es nach Ende der hämorrhagischen Hypotension mit Wiedereinsetzen des Harnflusses zunächst zu einer starken Polyurie. Die glomeruläre Filtrationsrate war hierbei zunächst nicht und im weiteren Verlauf nur leicht reduziert. Intraexperimentell ging hiermit – angezeigt durch einen sehr dunklen Harn – die rasche Ausscheidung des Myoglobins einher. Die Urin-Osmolalität war unmittelbar nach Ende der Hämorrhagie (ähnlich wie bei alleiniger Hypotension) auf Werte um 800 mosmol/kg nur diskret erniedrigt und lag mit Nachlassen der Polyurie im weiteren Verlauf um 1000 mosmol/kg. Mit dem erhaltenen Harnkonzentrationsvermögen ging eine zunehmende Erholung der fraktionierten Natriumexkretion einher (*Abbildung 19* und *Tabelle 11* zeigen den zeitlichen Verlauf der einzelnen Nierenfunktionsparameter.).



**Abb. 19:** Nierenfunktionsparameter nach einer halbstündigen hämorrhagischen Hypotension (50 mmHg) bei Myoglobinfusion (250 mg/kg KG) 15 Minuten nach Beginn der Hypotension. Verlauf von Blutdruck, glomerulärer Filtrationsrate (GFR  $\mu\text{l}/\text{min}$ ), Osmolalität (OSM, mosmol/kg), Harnfluß (HF,  $\mu\text{l}/\text{min}$ ), dem Quotient der Konzentration von Inulin im Urin zu Inulin im Plasma, (U/P) und fraktionierter Natriumexkretion (FeNa, %). (Mittelwerte  $\pm$  SEM)

Tab. 11 führt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe tabellarisch auf:

Zeit (min)	Minuten nach Beginn der hämorrhagischen Hypotension					
	basal	45	75	105	135	165
GFR	1100 $\pm$ 73	1114 $\pm$ 133	918 $\pm$ 78	813 $\pm$ 124	699 $\pm$ 109	588 $\pm$ 92
Harnfluß	8 $\pm$ 1,2	24,6 $\pm$ 4,2	11,9 $\pm$ 2,5	9,9 $\pm$ 1,7	6,9 $\pm$ 1,0	4,1 $\pm$ 0,8
U/P	606 $\pm$ 46	66 $\pm$ 13	109 $\pm$ 14	109 $\pm$ 18	123 $\pm$ 19	143 $\pm$ 16
Osmolalität	1966 $\pm$ 95	746 $\pm$ 86	991 $\pm$ 69	999 $\pm$ 64	1084 $\pm$ 54	1059 $\pm$ 81
FeNa	0,1 $\pm$ 0,0	3,2 $\pm$ 0,6	1,1 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,1

Es läßt sich daher vermuten, daß es trotz Hämorrhagie und Myoglobulinämie und der mit diesen einhergehenden – zumindest kurzzeitigen – renalen Perfusionstörungen zu keiner wesentlichen Schädigung des Tubuluszellsystems gekommen ist. Grundsätzlich stellt sich bei der Zusammenschau dieser Ergebnisse die Frage nach der Bedeutung von Durchblutungsstörungen für das Auftreten der Nierenschädigung überhaupt. Die Frage, wie es zu diesem Verhalten der Nierenfunktionsparameter kommen kann, bleibt zunächst offen. Dieses läßt sich z. B. nicht ohne weiteres allein auf die rasche Elimination des Myoglobins bei erhaltender GFR oder die Polyurie zurückführen:

Da sich die Dauer der Myoglobinausscheidung mindestens über die Zeit der Myoglobininfusion erstreckt – d. h. über mindestens eine Stunde erfolgt – und sich in den ausführlich beschriebenen Hauptversuchsreihen nach Myoglobingabe sehr rasch schwere Nierenfunktionsstörungen gezeigt hatten und diese hier ausbleiben, scheint die Vermutung gerechtfertigt, daß die Ursache dieser Abschwächung der Myoglobinwirkung auf die Niere durch eine hämorrhagische Hypotension durch Beeinträchtigung der schädlichen Interaktion zwischen Myoglobin und Niere – und hierbei speziell der Tubuluszellen – zustande kommen könnte.

Diesen Überlegungen liegt die *Hypothese* zugrunde, daß eine dosierte (tubuläre) Nierenschädigung – z. B. durch Ischämie – die Niere gleichsam gegen andere Schädigungsmechanismen schützt und so der Ausbildung eines akuten Nierenversagens entgegenwirken kann.

Da auch unsere Ergebnisse belegen, daß eine Vasokonstriktion wahrscheinlich nicht die einzige Komponente bei der Auflösung des ARF ist, sollen im folgenden kurz wesentliche, von anderen Autoren vorgeschlagene pathophysiologische Mechanismen angesprochen werden.

#### **4.5 Pathophysiologische Konzepte (2): Zellphysiologische Ansätze**

Verschiedene pathophysiologische Konzepte fanden in neuerer Zeit zunehmend Beachtung. Auf die wesentlichen soll im folgenden kurz eingegangen werden: Eine alte pathophysiologische Vorstellung geht von einer direkten Nephrotoxizität der Hämfarbstoffe oder ihrer Abbauprodukte – insbesondere des Hämatins – aus (z. B. MASON et al. [1963]). Dieser Gedanke wurde in neuerer Zeit unter dem Aspekt einer durch das Häm-Eisenion im Rahmen einer Haber-Weiss-Reaktion vermittelten Superoxid/Hydroxyl-Radikalbildung wieder aufgenommen SADRZADEH et al. (1984), PALLER et al. (1984), MITSOS et al. (1988), PALLER (1988), SHAH und WALKER (1988), GUIDET und SHAH (1989), ZAGER und GAMELIN (1989), ZAGER (1991). Der Nachweis einer

Gewebeschädigung durch Sauerstoffradikale erfolgt bevorzugt durch den Nachweis einer verstärkten Lipidoxidation. Obgleich diese in der Häm- oder Myoglobin geschädigten Niere nicht einhellig nachgewiesen werden konnte und auch ein therapeutischer Effekt von Antioxidantien umstritten geblieben ist (PALLER [1988], SHAH und WALKER [1988] vs. ZAGER [1989, 1991]), konnte jedoch wiederholt ein protektiver Effekt durch Eisenchelatbildner (Desferoxiamin) erzielt werden (PALLER [1988], ZAGER [1991]). Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, daß das Eisen(ion) an der Entwicklung des Nierenschadens beteiligt ist. Es setzt allerdings auch voraus, daß das an die Chromoproteine gebundene Eisen im pathophysiologischen Ablauf irgendwann einmal freigesetzt worden sein muß. Bekanntermaßen spielt die Niere physiologisch eine wichtige Rolle beim Abbau von körpereigenen, niedermolekularen und somit filtrierbaren Proteinen (low molecular weight proteins, LMWP; MAACK et al. [1992]). Diese werden in den proximalen Tubuluszellen endozytotisch resorbiert und in Lysosomen in ihre Aminosäuren abgebaut.

Auch die tubuläre Resorption und Verstoffwechslung von Häm- und Myoglobin erfolgt auf diese Weise (MILLER [1960], CARONE et al. [1979], CHRISTENSEN et al. [1981], RATCLIFFE et al. [1986]). Eine Vorstellung für die Entstehung von Tubuluzellschäden geht von einer Überladung bzw. Überbeanspruchung des lysosomalen Systems (lysosomal overload) aus. Hierbei soll es letztlich über den Verlust der Integrität des lysosomalen Kompartimentes und der Freisetzung seiner Proteasen praktisch zu einer Selbstverdauung der Tubuluzelle kommen (MAACK et al. [1992]). Diese Vorstellung ließe sich sowohl mit klinischen Erfahrungen (z. B. Plasmocytom-Niere) als auch mit experimentellen Befunden in Einklang bringen:

So führen ZAGER und GAMELIN (1989) die Tubuluzellenkrosen des akuten hämoglobinurischen Nierenversagens über eine pH-abhängige Hämoglobinzylinderbildung, nachfolgender tubulärer Obstruktion und einer hieraus resultierenden erhöhten Aufnahme von Hämoglobin in die proximale Tubuluzelle letztlich auf deren lysosomalen „Overload“ zurück.

ZAGER et al. (1987) konnten zeigen, daß ein (durch eine totale Nierenarterienokklusion herbeigeführtes) ischämisches akutes Nierenversagen durch ein tubuläres Überangebot sehr unterschiedlicher niedermolekularer Proteine (Lysozym, Ribonuclease, Myoglobin) verstärkt werden kann und postulieren als Ursache hierfür deren tubuläre Resorption.

Zur Prüfung der „Myoglobin-gebundenen Spezifität“ der schweren Mikroperfusionsstörungen unter Hypotension bei gleichzeitiger Myoglobingabe (Gruppe B3, C3) unternahmen wir zwei Probeversuche, in denen wir bei sonst gleicher Dosierung (250 mg/kg KG) und gleichem Versuchsablauf statt Myoglobin Lysozym (Chicken egg, Fa, Serva) verabreichten. Die Ergebnisse dieser Stichprobe stehen mit den Untersuchungen von ZAGER et al. (1987) in Einklang: Die GFR-Erniedrigung war hierbei größer als bei einer alleinigen Hypotension (aber kleiner als bei der Kombination von Myoglobin und hämorrhagischer Hypotension). Es fand sich jedoch bei Lysozyminfusion unter der hämorrhagischen Hypotension – anders als bei Myoglobingabe – eine unbeeinträchtigte Mikroperfusion.

Bei ihren Untersuchungen zeigte sich, daß die Infusion von Cytochrom c – im Gegensatz zu anderen niedrigmolekularen Proteinen – zu keiner Nierenfunktionsstörung führte. Die Autoren führten dieses auf eine – im Vergleich zu Myoglobin oder Lysozym – sehr geringe tubuläre Rückresorption zurück. Da RATCLIFFE et al. (1986) jedoch auch für Myoglobin ein relativ niedriges und dem Cytochrom c vergleichbares tubuläres Transportmaximum feststellen konnten, muß diese Erklärung in Frage gestellt werden. (Besonders interessant erscheinen in diesem Zusammenhang die unterschiedlichen Wirkungen von Myoglobin und Cytochrom c, wenn man berücksichtigt, daß auch das Cytochrom c die so oft für den Nierenschaden verantwortlich gemachte Hämgruppe besitzt. Greift man auf die postulierte Bedeutung des Eisens zurück, könnte eine denkbare Erklärung für dieses andersartige Verhalten z. B. in einer unterschiedlichen Freisetzung von Eisenionen liegen.)

*Insgesamt* bleibt angesichts der pathophysiologischen Vorstellungen von einer akuten Nierenschädigung durch eine massive tubuläre Proteinresorption im Hinblick auf die nierenschädigende Wirkung des Myoglobins festzuhalten, daß diese relativ unspezifisch sein könnte.

Ein denkbarer therapeutischer Ansatzpunkt zur Verhinderung einer zellulären Myoglobinwirkung wäre die Verhinderung/Reduzierung seiner Aufnahme in die proximalen Tubuluszellen. Möglicherweise wirkt die klinisch anerkannte und experimentell belegte Harnalkalisierung über diesen Mechanismus (s. z. B. BETTER und STEIN [1990], ZAGER und GAMELIN [1989]). Da das Myoglobin tubulär über eine Endozytose aufgenommen wird, kann versucht werden, Substanzen, die auf diesen Prozeß hemmend einwirken, zu untersuchen.

Wir unternahmen hierzu eine Reihe von Voruntersuchungen, die nachfolgend vorgestellt werden sollen.

*Nachweis der tubulären Myoglobinaufnahme durch Fluoreszenzmarkierung des Myoglobins sowie Voruntersuchungen zur Bedeutung der tubulären Myoglobinresorption*

Zur Einschätzung der Bedeutung der Endozytose für die Entwicklung des myoglobinurischen Nierenschadens ist es zunächst erforderlich, die Aufnahme von Myoglobin nachzuweisen. Ein weiteres Ziel der Myoglobinmarkierung könnte sein, das Ausmaß der Myoglobinresorption in die Tubuluszelle semi-quantitativ einzuschätzen, evtl. fluorometrisch zu bestimmen und so bestehende oder herbeigeführte Resorptionsunterschiede mit dem Ausmaß der jeweiligen Nierenschädigung in Beziehung zu setzen. Fluoreszenzmarkierte Proteine (ASAN et al. [1986]) und Dextrane (LENCER et al. [1990], SCHWEGLER et al. [1991]) sind bereits früher zur Beurteilung ihrer Aufnahme und ihres Abbaus in den proximalen Tubuluszellen (PTC) genutzt worden.

Wir injizierten FITC- und RB-200-markiertes Myoglobin zu verschiedenen Zeitpunkten (zwischen einer und 150 Minuten) i. v. vor Nephrektomie.

Erwartungsgemäß zeigt sich die Aufnahme des Myoglobins auf die proximalen Tubuluszellen im Cortex begrenzt. Bereits 5 Minuten nach Injektion besteht ein apikaler Saum mit feinen Granula in einer Breite von etwa einem Viertel der Epithelzellenhöhe. In Abhängigkeit von der Expositionszeit finden sich über die gesamte proximale Tubuluszelle ausbreitende großkörnige Granula in der entsprechenden Fluoreszenzanfärbung.

Da die Myoglobinaufnahme nur von luminal erfolgt, besteht hierbei vielleicht auch die Möglichkeit, sich auf einfache Weise direkt ein Bild über noch in Funktion befindliche Nephrone zu machen. So müßte die Myoglobinaufnahme und damit Anfärbung der Zelle bei folgenden Gegebenheiten ausbleiben: 1. bei einem totalen Ausfall des Glomerulumfiltrates; 2. bei einer tubulären Okklusion ζ. B. infolge von – fluoreszenzmarkierten – Myoglobinzyllindern oder durch Tubuluszellschwellung oder 3. bei einer Einstellung der tubulären Resorptionsleistung infolge eines schweren Tubuluszellschadens. Daher sollten sich mit dem markierten Myoglobin auch Aussagen über eine nach Nierenschädigung noch bestehende Restfiltration der Einzelglomerula machen lassen.

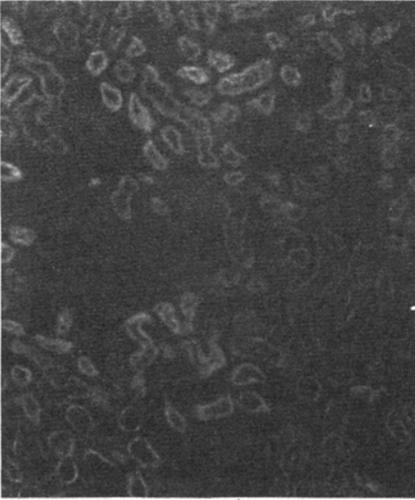
Am Glycerolmodell fanden sich früh Hinweise für ein unregelmäßiges Nebeneinander von filtrierenden und nichtfiltrierenden Glomerula (WALTHER [1965]). In Mikropunktionsuntersuchungen über das manifeste, Glycerol-induzierten ARF konnten WOLFERT und OKEN (1989) 24 Stunden nach Glycerolgabe bei annähernd 50% der Nephrone einen totalen Filtrationsausfall feststellen.

Wir injizierten zur qualitativen Beurteilung der Filtrationsverhältnisse der Einzelglomerula nach alleiniger Myoglobingabe sowie nach kombinierter Myoglobingabe und hämorrhagischer Hypotension unmittelbar nach Ende der Myoglobininfusion FITC-markiertes Myoglobin (0,15-0,20 ml einer 8-9 %-igen Lösung) i. v. Dabei blieb die Gesamtmyoglobindosis unverändert. Um sich darüber hinaus ein Bild über die Entwicklung von Filtration (und Resorption) machen zu können, wurde zusätzlich RB-Myoglobin fünf Minuten vor Nephrektomie gegeben.

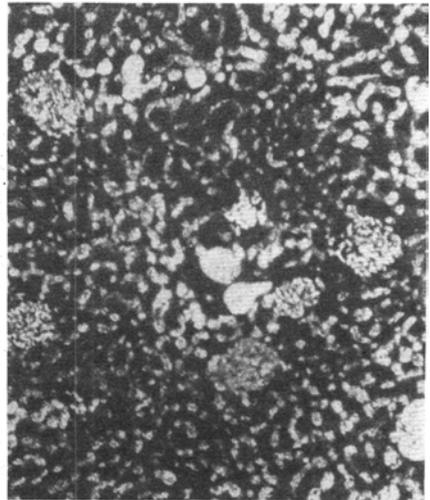
In unseren Versuchen mit fluoreszenzmarkiertem Myoglobin nach alleiniger Myoglobingabe (entsprechend Versuchsgruppe A1, B1) konnten wir einen totalen oder auch nur weitgehenden Filtrationsausfall eines großen Teiles der Nephrone nicht bestätigen: Von Einzelversuchen abgesehen, konnte ein bis zwei Stunden nach Auslösung eines myoglobininischen ARF in praktisch allen proximalen Tubuli resorbiertes – und damit filtrierte – Myoglobin gefunden werden (s. Abb. 20). Um diese Befunde mit den Ergebnissen von WOLFERT und OKEN (1989) in Einklang zu bringen, kann man zum einen annehmen, daß das Sistieren der Filtration vieler Nephrone sich erst nach der von uns untersuchten Initialphase des myoglobininischen Nierenversagens entwickelt, zum anderen muß man wahrscheinlich bei den beiden Methoden zur Untersuchung einer noch nachweisbaren Filtrationsleistung von verschiedenen Meßbereichen mit unterschiedlicher Empfindlichkeit ausgehen.

Auch bei der Kombination von Myoglobingabe und hämorrhagischer Hypotension fand sich FITC-Myoglobin praktisch in allen Tubuluszellen, obwohl dieses auch hier erst nach Beendigung der eigentlichen Myoglobininfusion – d. h. gegen Ende der Hauptschädigungsphase mit ihren unter Hypotension bestehenden schwersten Perfusionsstörungen – gegeben worden war (Abb. 22a). Es muß daher in fast allen Nephronen nach Schädigung während des 90-minütigen Zeitintervalls bis zur Nephrektomie zu einer glomerulären Filtration gekommen sein. Darüber hinaus weist die fortbestehende tubuläre Endozytose daraufhin, daß dieser gegenüber den zugeführten Noxen relativ unempfindlich ist.

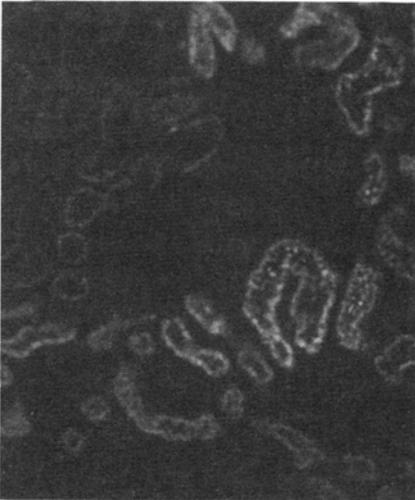
Dagegen fand sich nicht in allen FITC-markierten Tubuluszellen auch das später gegebene RB-Myoglobin resorbiert (Abb. 22b), so daß hier von einem weitgehenden Filtrationsausfall (oder zumindest von einer verzögerten oder abgeschwächten Filtrations- oder/und Resorptionsleistung) der dazugehörigen Nephrone ausgegangen werden kann. Funktionell ging dieser Befund an der Gesamtniere mit einer progredienten Erniedrigung der Inulin-clearance einher.



**Abb. 20:** Tubuläre Resorption von FITC-markiertem Myoglobin. Nach Myoglobin-induzierter Nierenschädigung besteht eine weitgehend unauffällige tubuläre Myoglobinfiltration und Resorption.



**Abb. 21:** Weitgehende Normalisierung der Mikrozirkulationsverhältnisse nach Theophyllingabe (15 mg/kg KG) unter Myoglobininfusion und hämorrhagischer Hypotension.



**Abb. 22a, b:** Resorption von FITC- und RB-200-markiertem Myoglobin bei schwerem (oligo-anurischen) Nierenversagen infolge kombinierter Myoglobingabe und hämorrhagischer Hypotension. Nur in einem Teil der FITC-Myoglobin enthaltenden Tubuli findet sich auch das später zugeführte RB-200-Myoglobin. Dieser Befund zeigt die Entwicklung der Filtrations-/Resorptionsverhältnisse zwischen dem Zeitpunkt der FITC- und RB-200 Myoglobingabe an. Dieses ist ein Hinweis dafür, daß es in den entsprechenden Nephronen zu einer deutlichen Störung der Filtration bzw. Resorption gekommen ist.

## Beeinflussung der Myoglobinresorption

In Probeversuchen versuchten wir, die tubuläre Myoglobinresorptionsleistung durch Gabe von möglichen „Endozytosehemmstoffen“ (Colchicin und Cytochalasin D, siehe KACICH et al. [1983]), durch Aminosäuren (L-Lysin: siehe MOGENSEN und SOLLING [1977]; CHRISTENSEN et al. [1981]) und Proteine (Albumin: siehe LIPPMAN et al. [1950]; RATCLIFFE et al. [1986], BERNARD et al. [1987]) zu vermindern, beziehungsweise seine intrazelluläre (lysosomale) Verstoffwechslung durch Chloroquine (CAMARGO et al. [1984], ZAGER und GAMELIN [1989]) zu beeinflussen. Während unsere Versuche mit Endozytosehemmstoffen ohne eindeutiges Ergebnis blieben und nicht fortgesetzt wurden, scheint in ersten Versuchen die Gabe von L-Lysin und insbesondere die Erzeugung einer massiven Albuminurie durch intraperitoneale Injektion von bovinem Albumin (siehe LIPPMAN et al. [1950]) 6, 16 und 24 Stunden vor Myoglobingabe und hämorrhagischer Hypotension einen protektiven Effekt auf die Nierenfunktion zu besitzen. Als eine mögliche Ursache hierfür käme eine kompetitive Resorptionshemmung des Myoglobins durch Albumin in Frage (RATCLIFFE et al. [1986], BERNARD et al. [1987]).

### 4.6 Therapeutische Ansätze

Es soll hierbei anhand der erhobenen Versuchsergebnisse nach möglichen therapeutischen Ansatzpunkten zur Behandlung des myoglobinurischen akuten Nierenversagens gesucht werden. Der bekannten und auch in unseren Versuchen bestätigten Bedeutung von Urin-pH und Volumendepletion wird in der klinischen Behandlung des Crush-Syndroms mit einer allgemein anerkannten *Harnalkalisierung und massiver Volumensubstitution* mit hierdurch herbeigeführter forcierter Diurese Rechnung getragen (z. B. BETTER und STEIN [1990]).

Das Zusammenfallen von Nierenschädigung und schwersten renalen Zirkulationsstörungen bei gleichzeitigem Auftreten von Myoglobinämie und hämorrhagischer Hypotension bietet sich der Versuch einer therapeutische Beeinflussung des Krankheitsgeschehens durch *vasoaktive Substanzen* an.

Von einigen Untersuchern sind deutliche Hinweise für die Bedeutung des *Renin-Angiotensin-Systems* für das Glycerol induzierte ARF gefunden worden (RAUH et al. [1975], ISHIKAWA und HOLLENBERG [1976], HOFBAUER et al. [1977], BARANOWSKI et al. [1978], MENDELSON und SMITH [1980]). Obwohl durch die Blockierung des *Renin-Angiotensin-Systems* die in der Initialphase des Glycerol induzierten ARF

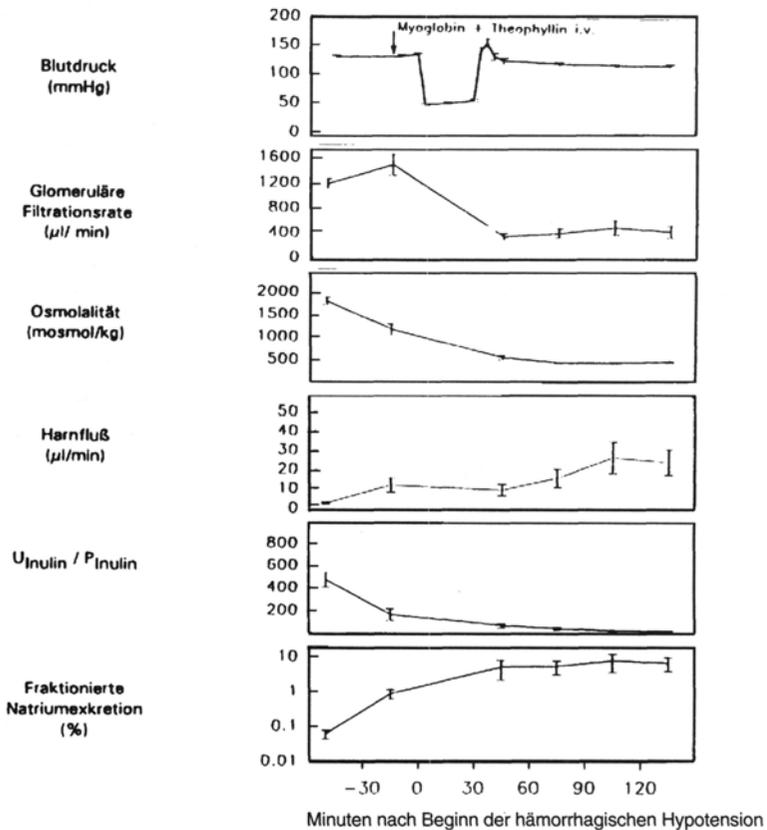
auftretende renale Minderdurchblutung weitgehend aufgehoben wurde, konnte dennoch durch ACE-Hemmer oder Angiotensin-Antikörper ein positiver Einfluß auf die Ausprägung des Nierenversagens nicht erzielt werden (ISHIKAWA und HOLLENBERG [1976], HOFBAUER et al. [1977], BARANOWSKI et al. [1978], LEE et al. [1985]). Dagegen ließ sich durch Calciumantagonisten (Diltiazem, Nisoldipine) ein protektiver Effekt auch gegenüber dem glycerolinduzierten ARF auslösen (LEE et al. [1985], NEUSER et al. [1991]).

In neuerer Zeit konnte am Glycerolmodell wiederholt ein therapeutischer Effekt durch *Adenosin-Rezeptor-Antagonisten* festgestellt werden (Aminophyllin + Theophyllin: BIDANI und CHURCHILL [1983], BIDANI et al. [1987]; 8-Phenyltheophyllin: BOWMER et al. [1986]; 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin, ein selektiver Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-antagonist: KELLETT et al. [1989]). Als ein potentieller Wirkungsmechanismus hierfür wurde die (gefäß-)relaxierende Wirkung der Xanthin-Derivate vorgeschlagen. Ihre Wirkung könnte möglicherweise auch über eine Hemmung des tubulären Feedbackmechanismus zustande kommen (SCHNERMANN et al. [1977], OSSWALD et al. [1982]). Bei unserer Versuchsanordnung mit kombinierter Myoglobingabe und hämorrhagischer Hypotension bestehen – neben der ermittelten renalen Vasokonstriktion – Hinweise für eine systemische Vasokonstriktion. Ursächlich kommt hierfür eine Sympathikus-Stimulation in Frage. Theophyllin soll eine durch Noradrenalin herbeigeführte renale Vasokonstriktion antagonisieren (HEDQVIST et al. [1978]).

Da eine Myoglobingabe und hämorrhagische Hypotension zu einem massiven Abfall des renalen ATP-Spiegels führt (ZAGER, 1991), daraus vermutlich ein Anstieg des renalen Adenosingewebespiegels resultiert (OSSWALD et al., 1977), und Adenosin auf das Nierengefäßsystem eine starke vasokonstriktorische Wirkung hat (OSSWALD, 1975), bietet sich eine Untersuchung der Effekte von Adenosinrezeptoren-Antagonisten (z. B. Theophyllin) auch auf unser Modell an.

Wir führten daher eine weitere *Versuchsreihe* (n = 6) durch, in der bei nicht vorbehandelten Tieren mit Beginn der Myoglobinfusion zusätzlich *Theophyllin* in einer Dosierung von 15 mg/kg KG i. v. verabreicht wurde. Das weitere Procedere entsprach mit einer 15 Minuten später einsetzenden halbstündigen hämorrhagischen Hypotension dem der Versuchsgruppe C3. *Ziel* dieser Versuchsanordnung war es, durch Theophyllin die renalen Perfusionsverhältnisse zu verbessern und so einen nierenprotektiven Effekt zu erzeugen.

Zur Untersuchung der Theophyllineffekte auf die renale Mikrozirkulation wurde bei den Versuchstieren nach Durchführung der obengenannten Maßnahmen die linke Niere unter Hypotension entnommen. Im Gegensatz zu den Versuchen ohne Theophyllin traten hierbei nur sehr diskrete Perfusionstörungen auf (*Abb. 21*). Das Theophyllin scheint also die Nierenperfusion unter Myoglobingabe und hämorrhagischer Hypotension zu verbessern. Die funktionellen Nierenstörungen blieben von dieser verbesserten Hämodynamik nur verhältnismäßig wenig beeinflusst (*Abb. 23, Tab. 12*): Während die glomeruläre Filtrationsrate nach Myoglobin und hämorrhagischer Hypotension weniger stark als in den Kontrollgruppen (A3, *Abb. 4*; C3, *Abb. 10*) abfiel, wichen die übrigen Nierenfunktionsparameter nicht wesentlich von den Versuchsergebnissen ohne Theophyllingabe ab. Dieses Ergebnis scheint die in der Diskussion vermutete Annahme einer untergeordneten Bedeutung der Störung der Perfusionsverhältnisse zu unterstützen.



**Abb. 23:**  
 Nierenfunktionsparameter nach einer Myoglobininfusion (250 mg/kg KG) und einer halbstündigen hämorrhagischen Hypotension (50 mmHg) bei zusätzlicher Theophyllin-gabe (15 mg/kg KG) i. v. zu Beginn der Myoglobininfusion.

Verlauf von Blutdruck, glomerulärer Filtrationsrate (GFR,  $\mu\text{l}/\text{min}$ ), Osmolalität (OSM, mosmol/kg), Harnfluß (HF,  $\mu\text{l}/\text{min}$ ), dem Quotient der Konzentration von Inulin im Urin zu Inulin im Plasma (U/P) und fraktionierter Natriumexkretion (FeNa, %). (Mittelwerte  $\pm$  SEM)

Tabelle 12 führt die Ergebnisse dieser Vorversuchsreihe tabellarisch auf:

Zeit (min)	basal	Minuten nach Beginn der Myoglobin-Infusion				
		8	45	75	105	135
GFR	1187 $\pm$ 83	1500 $\pm$ 167	369 $\pm$ 54	426 $\pm$ 74	522 $\pm$ 113	456 $\pm$ 102
Harnfluß	2,7 $\pm$ 0,41	2,1 $\pm$ 3,7	9,8 $\pm$ 2,9	16,0 $\pm$ 4,8	26,8 $\pm$ 8,3	24,5 $\pm$ 6,8
U/P	469 $\pm$ 63	163 $\pm$ 52	70 $\pm$ 19	43 $\pm$ 11	26 $\pm$ 6	23 $\pm$ 4
Osmolarität	1805 $\pm$ 79	1178 $\pm$ 126	573 $\pm$ 48	458 $\pm$ 18	463 $\pm$ 12	490 $\pm$ 14
FeNa	0,06 $\pm$ 0,02	0,85 $\pm$ 0,26	5,08 $\pm$ 2,96	5,35 $\pm$ 2,32	7,96 $\pm$ 4,36	6,74 $\pm$ 2,84

Eine Vorstellung von der pathophysiologischen Wirksamkeit des Myoglobins beim Glycerol induzierten/Myoglobin induzierten ARF beruht auf der Vorstellung einer toxischen Myo-/Hämoglobinwirkung auf den Zellstoffwechsel der resorbierenden Tubuluszellen. So ist in den letzten Jahren von verschiedenen Untersuchern die Bedeutung einer über eine Haber-Weiss-Reaktion – d. h. durch eine Eisen(III)-Ion vermittelten – Myoglobinwirkung auf eine *Sauerstoffradikalbildung* als Agens der Nierenschädigung geprüft worden (PALLER et al. [1984], PALLER [1988], SHAH und WALKER [1988], GUIDET und SHAH [1989], ZAGER, [1989, 1991]). Hierbei konnte z. T. durch Sauerstoffradikalfänger oder Eisenchelatbildner (z. B. durch Dimethylhioharnstoff [DMTU] bzw. Desferoxiamin [DFO]) eine Verbesserung der Nierenfunktion herbeigeführt werden.

Ein denkbarer therapeutischer Ansatzpunkt zur Verhinderung einer zellulären Myoglobinwirkung wäre die *Verhinderung/Reduzierung seiner Aufnahme in die proximalen Tubuluszellen*. Wie oben dargestellt, wirkt möglicherweise die klinisch anerkannte und experimentell belegte Harnalkalisierung über diesen Mechanismus. Da das Myoglobin tubulär über eine Endozytose aufgenommen wird, kann versucht werden, durch Substanzen, die auf diesen Prozeß hemmend einwirken, einen nierenprotektiven Effekt zu erzielen.

## 5. Zusammenfassung

An insgesamt 56 männlichen, mit Pentobarbital-Na narkotisierten Ratten wurde der Einfluß einer intravenösen Myoglobin-Infusion, einer hämorrhagischen Hypotension allein und in Kombination an unvorbehandelten Tieren sowie nach Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz auf die Nierenfunktion und die intrarenale Mikrozirkulation untersucht. Auf diese Weise sollte versucht werden, ein reproduzierbares tierexperimentelles Modell zu entwickeln, an dem medikamentöse Behandlungsverfahren zur Beeinflussung der Crushniere studiert werden können.

Es ergab sich:

1. Die alleinige Infusion von 250 mg/kg KG Myoglobin (innerhalb einer Stunde infundiert) löste eine mäßige Einschränkung der Nierenfunktion mit einer Abnahme der Inulin-Clearance auf 46% des Ausgangswertes aus. Der Effekt war nach vorheriger Nahrungs- und Wasserkarenz verstärkt (Abfall der GFR auf 22% des Ausgangswertes). An der mit makromolekülgekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen untersuchten Mikrozirkulation konnten dadurch keine Veränderungen ausgelöst werden.

2. Eine hämorrhagische Hypotension mit einer Senkung des arteriellen Druckes auf 50 mmHg über 30 min mit anschließender Retransfusion der entzogenen Blutmenge war die GFR praktisch unverändert (108 % des Ausgangswertes). Auch an dehydrierten Tieren blieb der Wert mit 70% nur gering verändert. Auch an der intrarenalen Durchblutungsverteilung konnten keine Veränderungen nachgewiesen werden.
3. Bei gleichzeitiger Myoglobinbelastung und hämorrhagischer Hypotension war eine synergistische Wirkung nachweisbar: Die Inulin-Clearance war auf 20% bei den unvorbehandelten und auf 14% des Ausgangswertes bei den dehydrierten Tieren abgefallen. Die Prüfung der Perfusionsverhältnisse ergab eine massive Störung der Mikrozirkulation sowohl im Mark als auch im Rindbereich. In großen Arealen konnte ein völliges Sistieren des kapillären Plasmaflusses nachgewiesen werden. Zwei Stunden nach Retransfusion waren diese Veränderungen nicht mehr nachweisbar. Eine Verlängerung der Hypotensionsphase von 30 auf 60 Minuten konnte nicht systematisch untersucht werden, weil dies bereits bei einer größeren Zahl von Tieren letale Reaktionen auslöst.

Der nierentoxische Effekt von Myoglobin bei hämorrhagischer Hypotension war geringer, wenn die Myoglobininfusion erst nach eingetretener Hypotonie eingesetzt wurde. Eine frühe Myoglobinexposition zum Zeitpunkt normaler Filtrationsverhältnisse steigert die nephrotoxische Wirkung des Myoglobins. Die einsetzende intrarenale Mikrozirkulationsstörung fördert offenbar die nephrotoxische Wirkung des filtrierte Myoglobins.

Anhand des ausgearbeiteten tierexperimentellen Modells können Substanzen, die entweder in die vaskuläre Reaktion oder in die nephrotoxische Wirkung des Myoglobins eingreifen, auf die Beeinflussung der Myoglobin-Hämorrhagie-bedingten Nierenschädigung untersucht werden.

## 6. Literatur

- ANDREUCCI V (1984): *Myoglobinuria and acute renal failure*. in: *Acute Renal Failure, Pathophysiology, Prevention and Treatment* hrsg. v. Andreucci V. u. a. Martinus Nijhoff Publishing, Boston 1984, 251-270
- ASAN E, KUGLER P, SCHIEBLER TH (1986): *Sex – related differences in handling of fluorescent ovalbumin by the proximal tubule of the rat kidney*. *Histochemistry* 84, 408-417
- AYER G, GRANDCHAMP A, WYLER T, AND TRUNINGER B (1971): *Intrarenal hemodynamics in glycerol-induced myohemoglobinuric acute renal failure in the rat*. *Circ Res* 29, 128-135
- BARANOWSKI RL, WESTERFELDER C AND KURTZMAN NA (1978): *Intrarenal renins and angiotensins in glycerol-induced acute renal failure*. *Kidney Int* 14, 576-584
- BECK F, THURAU K, GSTRAUNTHALER G (1992): *Pathophysiology and pathobiochemistry of acute renal failure* in: *The Kidney, Physiology and Pathophysiology* hrsg. v. Seidlin DW, Giebisch G, 2. Auflage, Raven Press, New York 1992, Chapter 94: 3157-3175
- BERNARD A, VLAU C, OULED A, LAUWERYS R (1987): *Competition between low- and high-molecular-weight proteins for renal tubulär uptake*. *Nephron* 45, 115-118
- BETTER OS (1990): *The Crush Syndrome revisited (1940-1990)*. *Nephron* 55, 97-103
- BETTER OS, STEIN HJ (1990): *Early management of shock and Prophylaxis of acute renal failure in traumatic rhabdomyolysis*. *N Engl J Med* 322, 12: 825-828
- BIDANIAK, CHURCHILL PC (1983): *Aminophylline ameliorates glycerol-induced acute renal failure in rats*. *Can J Physiol Pharmacol* 65, 567-571
- BIDANIAK, CHURCHILL PC, PACKER W (1987): *Theophylline-induced protection in myoglobinuric acute renal failure: further characterization*. *Can J Physiol Pharmacol* 65, 42-45
- BLACHAR Y, FONG JSC, DE CHADAREVIAN J-P, DRUMMOND KN (1981): *Muscle extract infusion in rabbits. A new experimental model of the Crush Syndrome*. *Circ Res* 49, 114-124
- BOWMER CJ, COLLIS MG, YATES MS (1986): *Effect of the adenosine antagonist 8-phenyltheophylline on glycerol-induced acute renal failure in the rat*. *Br J Pharmacol* 88, 205-212
- BUCHBORN E, EDEL H: *Akutes Nierenversagen*. In: „Handbuch der Inneren Medizin“ hrsg. v. Schweigk H, Springer-Verlag Berlin 1968, 943-1083
- BYWATERS EGL, BEALL D (1941): *Crush injuries with impairment of renal funktion*. *B Med J* 1941, 1,427
- BYWATERS EGL, STEAD JK (1944): *The production of renal failure following injection of Solutions containing myohemo globin*. *R J Exp Physiol* 33, 55-70
- CAMARGO MSF, SUMPPIO BE, MAACK T (1984): *Renal hydrolysis of absorbed protein: Influence of load and lysosomal pH*. *Am J Physiol* 247, F656-F664

CARONE FA, PETERSON DR, OPARIL S, PULLMANN TN (1979): *Renal tubulär transport and catabolism of proteins and peptides*. *Kidney Int* 16, 271-278

CHEDRU MF, BAETKE R, OKEN DE (1972): *Renal cortical bloodflow and glomerular filtration in myohemoglobinuric acute renal failure*. *Kidney Int* 1, 232-239

CHRISTENSEN EL, CARONE FA, RENNKE HG (1981): *Effect of molecular change on endocytotic uptake of ferritin in renal proximal tubule cells*. *Lab Invest* 44, (4), 351-358

CUSHNER HM, BARNES JL, STEIN JH, AND REINECK HJ (1986): *Role of volume depletion in the glycerol model of acute renal failure*. *Am J Physiol* 250, F315-321

DAVIDSON WD, SACKNER MA (1963): *Simplification of the anthrone method for the determination of inulin in clearance studies*. *J Lab Clin Med* 62, 351-356

DUBROW A, FLAUMENBAUM W (1988): *Acute renal failure associated with myoglobinuria and hemoglobinuria* in: *Acute renal failure* hrsg. v. Brenner B, Lazarus u. a., 2. Auflage, W. B. Saunders Company, Philadelphia 1988, 279-293

GABOW PA, KAEHNY WD, KELLEHER SP (1982): *The spectrum of rhabdomyolysis*. *Medicine* 61, (3), 141-152

GARCIA G, SNIDER T, FELDMAN M, CLYNE DH (1981): *Nephrotoxicity of Myoglobin in the rat: relative importance of urine pH and prior dehydration*. *Kidney Int* 19, 200 A

GUIDET B, SHAH SV (1989): *Enhanced in vivo H, O, generation by rat kidney in glycerol-induced rhabdomyolysis*. *Am J Physiol* 256, R1000-1004

HACKL JM, NEUMANN M, WEIRATHER E, STROSCHEIDER E (1990): *Myoglobinfreisetzung und Nierenfunktion bei polytraumatisierten Intensivpatienten*. *Anaesthesist* 39 Jun, 319-322

HEDQVIST P, FREDHOLM B, ÖLUNDH S (1978): *Antagonistic effects of theophylline and adenosine on adrenergic neuroeffector transmission in the rabbit kidney*. *Circ Res* 43, 592-598

HOFBAUER KG, KONRADS A, BAUERREIS K, MOHRING B, MOHRING J, GROSS F (1977): *Vasopressin and renin in glycerol-induced acute renal failure in the rat*. *Circ Res* 41 (4), 424-427

HOLLE G, (1959): *Beitrag zur Morphologie der Vasomotorik in der Niere. Untersuchung an der Crush-Niere des Meerschweinchens*. *Virchow Arch Path Anat* 332, 283-293

HSU CH, KURTZ TW, WALDINGER TP (1977): *Cardiac Output and renal bloodflow in glycerol-induced acute renal failure in the rat*. *Circ Res* 40, (2) 178-181

HSU CH, KURTZ TW, SANDS CE (1979): *Intrarenal vascular resistance in glycerol-induced acute renal failure in the rat*. *Circ Res* 45, 583-587

ISHIKAWA I, HOLLENBERG NK (1976): *Pharmakologie Interruption of the renin-angiotensin System in myohemoglobinuric acute renal failure*. *Kidney Int* 10, 183-190

JAENIKE JR (1967): *The renal lesion associated with hemoglobinuria: A study of the pathogenesis of the excretory defect in the rat*. *J Clin Invest* 46, (3): 378-387

- JAENIKE, JR (1969): *Micropuncture study of methemoglobin-induced acute renal failure in the rat*. J Lab Clin Med 73, (3) 459-468
- KACICH RL, RENSTON RH, JONES AL (1983): *Effects of cytochalasin D and colchicine on the uptake, translocation, and biliary secretion of horseradish peroxidase and (c14) sodium taurocholate in the rat*. Gastroenterology 85, 385-394
- KANT KS, PESCE AJ, CLYME DH, POLLAK VE (1977): *Co-precipitation of tamm-horsefall protein with myoglobin, Bence Jones protein and albumin: Effect of pH*. Clin Res 25, 594 A
- KELLETT R, BOWMER CJ, COLLIS MG, YATES MS (1989): *Amelioration of glycerol-induced acute renal failure in the rat with 8-cyclopentyl-1, 3-di-propylxanthine*. Br J Pharmacol 98, 1066-1074
- KISHIMOTO T, SAKAMOTO W, NAKATANI T, ITO T, IWAI K, KIM T, ABE Y (1989): *Cardiac Output, renal blood flow and hepatic blood flow in rats with glycerol-induced acute renal failure*. Nephron 53: 353-357
- KNOCHEL JP (1990): *Catastrophic medical events with exhaustive exercise: „White collar rhabdomyolysis“*. Kidney Int 38, 709-719
- KURTZ, TW, MALETZ RM, HSU CH (1976): *Renal cortical blood flow in glycerol-induced acute renal failure in the rat*. Circ Res 38, (1): 30-34
- LALICH JJ (1947): *The influence of injections of homologous hemoglobin on the kidney of normal and dehydrated animals*. J Exp Med 86: 153-157
- LALICH JJ, SCHWARTZ SI (1950): *The role of aciduria in the development of hemoglobinuric nephrosis in dehydrated rats*. J Exp Med 92: 11-23
- LEE SM, HILLMAN BJ, CLARK RL, MICHAEL UF (1985): *The effects of diltiazem and Captopril on glycerol-induced acute renal failure in the rat: functional, pathologic and microangiographic studies*. Invest Radiol 20, 961-970
- LENCER WI, WEYER P, VERKMAN AS, AUSIELLO DA, BROWN D (1990): *FITC-dextran as a probe for endosome function and localisation in kidney*. Am J Physiol 258 (2, 1), C309-C317
- LIPPMANN RW, UREEN HJ, OLIVER J (1950): *Mechanism of Proteinuria. III. A comparison to the functional and structural aspects of Vertain intraperitoneally administered proteins on hemoglobin excretion in the rat*. J Exp Med 93, 325-336
- LOATS JT, SILLAU AH, BANCHERO N (1978): *How to quantify skeletal muscle capillary oxygen transport in tissue* (hrsg. v. Silver JS, Ereciska M, und Bichler HI) Plenum Press, New York 1978, Vol. 3, 41-48
- LOPEZ-FARRE A, GOMEZ-GARRE D, BERNABEU F, Y CAJAL SR, PEREZ-RODRIGO P, BRAQUET P, LOPEZ-NOVOA JM (1990): *Platelet-activating factor mediates glycerol-induced acute renal failure in rats*. Clin Sci 79, 551-558
- MAACK T, PARK CH, CAMARGO MJF (1992): *Renal filtration, transport and metabolism of proteins*. In: The Kidney, Physiology and Pathophysiology hrsg. v. Seidin DW, Giebisch G, 2. Auflage, Raven Press, New York 1992, 3005-3038

- MANDEL K, DAVIS JB, BELL RD, MILLER JM (1989): *Myoglobinuria exacerbates ischemic renal damage in dog*. Nephron 53, 261-267
- MASON AD, ALEXANDER JW, TESCHAN PE (1963): *Studies in acute renal failure: Development of a reproducible lesion in experimental animals*. J Surg Res 3, (9), 430-441
- MENDELSON FAO, SMITH EA (1980): *Intrarenal renin angiotensin II and plasma-renin in rats with uranyl-nitrate-induced and Glycerol-induced acute renal failure*. Kidney Int 17; 465-472
- MILLER F (1960): *Hemoglobin absorption by the cells of the proximal tubule in mouse kidney*. J Biophys Biochem Cytol 8, 689-715
- MITOSOS SE, KIM D, LUCCHESI BR, FANTONE JC (1988): *Modulation of myoglobin-H2O2 mediated peroxidation reactions by sulfhydryl-compounds*. Lab Invest 59, (6), 824-829
- MOGENSEN CE, SOLLING K (1977): *Studies on renal tubular protein reabsorption: partial and near complete Inhibition by certain aminoacids*. Scand J Clin Lab Invest 37, 477-486
- NAIRN RC: *in: Fluorescent Protein Tracing*. 4. Auflage Churchill Livingstone, Edinburgh 1976, 369-371
- NEUSER D, HIRTH-DIETRICH C, STASCH J-P, KAZDA S (1990): *Influence of calcium antagonists on renal function and secondary hyperparathyroidism in acute renal failure in rats*. Ren Fail 12 (4), 221-225
- ODEH M (1991): *The role of reperfusion-induced injury in the pathogenesis of the Crush Syndrome*. N Engl J Med 324, 20: 1417-1421
- OKEN DE, ARCE ML, WILSON DR (1966): *Glycerol-induced hemoglobinuric acute renal failure in the rat: Micropuncture study of development of oliguria*. J Clin Invest 45, 724-730
- OSSWALD H (1975): *Renal effects of adenosine and their Inhibition by theophylline in dogs*. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 288, 79-86
- OSSWALD H, SCHMITZ HJ, KEMPER R (1977): *Tissue content of adenosine inosine and hypoxanthine in the rat kidney after ischemia and postischemic recirculation*. Pflügers Arch 371, 445-449
- OSSWALD H, HERMES HH, NABAKOWSKI G (1982): *Role of Adenosine in signal transmission of tubuloglomerular feedback*. Kidney Int 22 (Suppl 12): 136-142
- OZAKI I, SAKAMI T (1988): *Patchy renal vasoconstriction in rhabdomyolysis-related acute renal failure*. Nephron 48: 136-137, 1988
- PALLER MS (1988): *Hemoglobin- and Myoglobin-induced acute renal failure in rats: role of iron in nephrotoxicity*. Am J Physiol 255, F 539-544
- PALLER MS, HOIDAL JR, FERRIS TF (1984): *Oxygen Free Radicals in the rat*. J Clin Invest 74, 1156-1164
- PARRY WL, SCHAEFER JA, MUELLER CB (1963): *Experimental studies of acute renal failure. The protective effect of mannitol*. J Urol 89 (1), 1-6

- PERRI GP, GORINIP (1952): *Uraemia in the rabbit after injection of crystalline myoglobin*. Br J Exp Pathol 33, 440-444
- RATCLIFFE PJ, ESNOUF MP, LEDINGHAM JG (1986): *Tubulär reabsorption rates for myoglobin in the isolated perfused rat kidney*. Clin Sei 70, 595-599
- RATCLIFFE PJ, MOONEN CTW, LEDINHAM JGG, RADDA GK (1989): *Timing of the onset of changes in renal energetics in relation to blood pressure and glomerular filtration in haemorrhagic Hypotension in the rat*. Nephron 51, 225-232
- RAUH W, OSTER P, DIETZ R, GROSS F (1975): *The renin-angiotensin System in acute renal failure*. Clin Sei 48, 467-473
- REINECK HJ, O'CONNOR GJ, LIFSCHITZ MD, STEIN JH (1980): *Sequential studies on the pathophysiology of glycerol-induced acute renal failure*. J Clin Med 92, (2) 356-362
- ROTH D, ALARCON FJ, FERNANDEZ JA, PRESTON RA, BOURGOIGNIE JJ (1988): *Acute rhabdomyolysis associated with cocaine intoxication*. N Engl J Med 319, 613-677
- RUIZ-GUINAZU A, COELHO JB, PAZ RA (1967): *Methemoglobin-induced acute renal failure in the rat*. Nephron 4, 257-275
- SADRZADEH SMH, GRAF E, PANTER SS, HALLAWAY PE, EATON JW (1984): *Hemoglobin – A biologic Fenton-reagent*. J Biol Chem 259, 14354-14356
- SANDOZ P, GRANDCHAMP A, TRUNIGER B (1974): *Intrarenal haemodynamics in rats during haemorrhagic hypotension*. Eur J Clin Invest 4, 229-234
- SCHNERMANN J, OSSWALD H, HERMLE M (1977): *Inhibitory effect of methybeanthines on feedback control of glomerular filtration rate in the rat kidney*. Pflügers Arch. 369, 39-48
- SCHWEGLER JS, HEPPELMANN B, MILDENBERGER S, SILBERNAGL S (1919): *Receptor-mediated endocytosis of albumin in cultured opossum kidney cells: A model for proximal tubular protein reabsorption*. Pflügers Arch 418, 383-392
- SHAH SV, WALKER PD (1988): *Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in glycerol-induced acute renal failure*. Am J Physiol 255, F438-F443
- SUZUKI T, MOSTOFIFK (1970): *Vascular changes in the rat kidney after subcutaneous Injektion of glycerin*. Lab Invest 23 (1), 29-38
- THIEL G, WILSON DR, ARCE ML, OKEN DE (1967): *Glycerol-induced hemoglobinuric acute renal failure in the rat. The experimental model, predisposing factors and pathophysiological features*. Nephron 4, 276-294
- TORRES VE, STRON CG, ROMERO JC, WILSON DM (1975): *Indomethacin enhancement of glycerol-induced acute renal failure in rabbits*. Kidney Int 7, 170-178
- TRIFILLIS AL, KALUNG MW, TRUMP B (1981): *Metabolism studies of glycerol-induced acute renal failure in the rat*. Exp Mol Path 35, 1-13
- VENKATACHALAM MA, RENNKE HG, SANDSTROM DJ (1976): *The vascular basis for acute renal failure in the rat: Preglomerular and postglomerular vasokonstriction*. Circ Res 38, (4), 267-278

VETTERLEIN F, DAL RI H, SCHMIDT G (1982): *Capillary density in rat myocardium during timed plasma staining*. Am J Physiol 242, H133-H141

VETTERLEIN F, PETHÖ A, SCHMIDT G (1986): *Distribution of capillary bloodflow in rat kidney during postischemic renal failure*. Am J Physiol 255, H510-H519

WALTHER D (1965): *Das Substrat der Anurie und Polyurie beim akuten Nierenversagen der Ratte*. Symp Ges Nephrol 3, 291-297

WARD MM (1988): *Factors predictive of acute renal failure in rhabdomyolysis*. Arch Intern Med 148, 1553-1557

WERB R, CLARK WF, LINDSAY RM, JONES EOP, TURNBULL DI, LINTON AL (1978): *Protective effect of Prostaglandin (PGE<sub>2</sub>) in glycerol-induced acute renal failure in the rat*. Clin Sci 55, 505-507

WERDLE EN, WRIGHT NA (1973): *Intravascular coagulation and glycerin hemoglobinuric acute renal failure*. Arch Pathol 95, 271-275

WESTENFELDER C, AREVALO GJ, CRAWFORD PW, ZERWER P, BARANOWSKI RL, BIRCH FM, EARNEST WR, HAMBURGER RK, COLEMAN RD, KURTZMAN NA (1980): *Renal tubular function in glycerol-induced acute renal failure*. Kidney Int 18, 432-444

WILSON DR, THIEL G, ARCE ML, OKEN DE (1969): *The role of concentration mechanism in the development of acute renal failure. Micropuncture studies using diabetes insipidus rats*. Nephron 6, 128-139

WOLFERT AL, OKEN DE (1989): *Glomerular hemodynamics in established glycerol-induced acute renal failure in the rat*. J Clin Invest 84, 1967-1973

ZAGER RA (1989): *Studies of mechanisms and protective maneuvers in myoglobinuric acute renal injury*. Lab Invest 60 (5), 619-629

ZAGER RA (1991): *Myoglobin depletes renal adenine nucleotide pools in the presence and absence of shock*. Kidney Int 39, 111-119

ZAGER RA, GAMELIN LM (1989): *Pathogenetic mechanisms in experimental hemoglobinuric acute renal failure*. Am J Physiol 256, F446-F455

ZAGER RA, TEUBNER EJ, ADLER S (1987): *Low molecular weight proteinuria exacerbates experimental ischemic renal injury*. Lab Invest 56 (2), 180-187

## **Die Autoren**

*Henschler, Dietrich*

Professor Dr. med.

Vorstand des Instituts für Toxikologie  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität  
Versbacher Straße 9  
97078 Würzburg

*Becht, Hermann*

Dr. med. vet.

Professor am Institut für Virologie des Fachbereichs  
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Frankfurter Straße 107  
35392 Gießen

*Hoffmann, Frank*

Dr. med.

Assistenzarzt am Nephrologischen Zentrum  
Niedersachsen Hann. Münden  
Am Vogelsang 105  
34346 Hann. Münden

*Vetterlein, Friedrich*

Professor Dr. med.

Akad. Oberrat am Zentrum Pharmakologie und  
Toxikologie der Universität Göttingen  
Robert-Koch-Straße 40  
37075 Göttingen

*Schmidt, Gerhard*

Professor Dr. med.

Abteilungsvorsteher am Zentrum Pharmakologie  
und Toxikologie der Universität Göttingen  
Robert-Koch-Straße 40  
37075 Göttingen