

**Aus der Universitätsklinik
für Anaesthesiologie und Transfusionsmedizin Tübingen
Abteilung für Anaesthesiologie und Intensivmedizin
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Unertl**

**Phagozytose apoptotischer humaner Lymphozyten
durch humane Monozyten in vitro
- Einfluss künstlicher Kolloide -**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
STEFAN GROMER
aus Neckarsulm**

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Unertl

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Gleiter

I Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Künstliche Kolloide	1
1.2.1. Definition, Beschreibung und Anwendung	1
1.2.2. Dextran	2
1.2.3. Gelatine	3
1.2.4. Hydroxyethylstärke	4
1.2. Apoptose	5
1.2.1. Einteilung des Zelltodes	5
1.2.2. Bedeutung der Apoptose	6
1.3. Phagozytose	7
1.3.1. Mononukleär-phagozytäres System (MPS)	7
1.3.2. Aufgaben des mononukleär-phagozytären Systems	7
1.4. Fragestellung	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Material	11
2.1.1. Geräte	11
2.1.2. Pipetten, Gefäße und Spritzen	11
2.1.3. Medien, Lösungen und Zusätze für die Zellkultur	11
2.1.4. Medien, Lösungen und Zusätze zur Apoptose- und Phagozytosebestimmung	13
2.1.5. Materialien zur Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	15
2.1.6. Gewinnung der Blutproben	15
2.1. Methoden	16
2.2.1. Isolierung und Anreicherung von Lymphozyten und Monozyten aus Buffy Coats	16
2.2.2. Zellkultur und Aufbereitung	18
2.2.3. Durchflußzytometrie	22

4. Diskussion	50
4.1. Methodische Vorversuche	51
4.1.1. Apoptose von Lymphozyten in vitro	51
4.1.1.1. Induktion von Apoptose und Apoptose-Nachweismethoden	51
4.1.1.2. Einfluss der Inkubationsdauer auf Induktion von Apoptose ..	52
4.1.2. Phagozytose apoptotischer Lymphozyten in vitro	52
4.1.2.1. Waschen und Färben apoptotischer Lymphozyten	52
4.1.2.2. Durchflußzytometrische Analyse	53
4.1.2.3. Stimulation der Phagozytose	54
4.1.2.4. Verhältnis von Monozyten zu apoptotischen Lymphozyten ..	54
4.1.2.5. Einfluss der Inkubationsdauer auf Phagozytose	54
4.2. Einfluss künstlicher Kolloide auf die Phagozytose apoptotischer humaner Lymphozyten durch humane Monozyten in vitro	55
4.3. Schlussfolgerungen aus der Arbeit	58
5. Zusammenfassung	59
6. Tabellen und Abbildungen	61
6.1. Tabellen	61
6.2. Abbildungen	66
7. Literatur	69
7.1. Literaturverzeichnis	69
7.2. Wissenschaftliche Tabellen und Lexika	77
8. Lebenslauf	78

II Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
Ak	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovine serum albumin
CD	Clusters of differentiation
CSF	Colony-stimulating-factor
DEX	Dextran
DMN	Dexamethason-21-dihydrogenphosphat
DNA	Desoxyribonucleid acid
DS	Degree of substitution
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
FACS	Fluorescence-activated-cell-sorter
FITC	Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat
FL	Fluoreszenz
FMLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	Forward Scatter
G-CSF	Granulocyte-CSF
GEL	Gelatine
GM-CSF	Granulocyte-macrophage-CSF
HES	Hydroxyethylstärke

HIV	H uman i mmunodeficiency v irus
HMW-DNA	H igh m olecular w eight DNA
ICAM	I nter c ellular a dhesion m olecule
IFN	I nter f eron
Ig	I mmung l obulin
IL	I nter l eukin
kDa	K ilodalton
LMW-DNA	L ow m olecular w eight DNA
LPS	L ipopolysaccharid
M-CSF	M onocyte-macrophage- CSF
MHC	M ajor h istocompatibility c omplex
MPS	M ononukleär- p hagozytäres S ystem
NK-Zellen	N atürliche K illerzellen
PBMC	P eripheral b lood m ononuclear c ell
PBS	P hosphate b uffered s aline
PE	P hycoerythrin
pH	p ondus h ydrogenii
RES	R etikuloendotheliales S ystem
RPMI	R osewell P ark M emorial I nstitut - M edium
SSC	S ideward S catter
TGF	T ransforming g rowth f actor
ThO	T hiazolorange
TNF	T umor- N ekrose- F aktor
TRI	T ricolor
Upm	U mdrehungen p ro m inute

1. Einleitung

1.1. Künstliche Kolloide

1.1.1. Definition, Beschreibung und Anwendung

Der kolloidale Zustand ist eine besondere Verteilungsform der Materie und bedeutet das Vorhandensein disperser Teilchen. Diese können nur ultramikroskopisch, nicht aber makro- oder mikroskopisch erkannt werden. Die Gestalt der Teilchen ist dabei sehr vielfältig, zum Beispiel kugelförmig oder fadenförmig, ein weiterer Unterschied besteht hinsichtlich der Größe der verteilten Teilchen. Man unterscheidet daher je nach Größe in eine grobdisperse (Teilchengröße über 100nm, zum Beispiel Tierkohleteilchen), in eine kolloiddisperse (Teilchengröße von 1 - 100nm, zum Beispiel kolloidale Lösungen) und in eine molekulardisperse (Teilchengröße unter 1nm, zum Beispiel Kochsalzlösungen) Verteilung. Die kolloidale Verteilung stellt den Übergang zwischen der grob- und molekulardispersen Verteilung, d.h. zwischen grober Aufschwemmung und der echten Lösung dar. Die in flüssigen Dispersionsmitteln befindlichen Kolloide werden weiter in zwei Gruppen aufgeteilt. In die Gruppe der lyophoben oder hydrophoben Kolloide, in welcher sich die Kolloide nicht mit dem Dispersionsmittel verbinden und in die Gruppe der lyophilen oder hydrophilen Kolloide, die sich durch mehr oder weniger hohes Wasserbindungsvermögen der Kolloide auszeichnet (93, 95).

Zur Gruppe der hydrophilen Kolloide werden die Plasmaersatzmittel gerechnet. Ihnen gemeinsam ist die Wasserbindungsfähigkeit, die allerdings unterschiedlich stark ist. In Abhängigkeit von Molekülgröße und Konzentration kann die Wasserbindungsfähigkeit größer sein als die der Plasmaeiweiße, dadurch wird dem interstitiellen Raum nach Infusion solcher Kolloide Wasser entzogen, die Folge ist eine intravasale Volumenzunahme, eine sogenannte Volumenexpansion. Diese Substanzen bezeichnet man daher auch als Plasmaexpander. Es gibt körpereigene und künstliche kolloidale Plasmaersatzmittel. Hauptvertreter der körpereigenen sind monodisperse Humanalbumin-Präparate, die zu ca. 95% aus Albumin bestehen und aus gemischten Spenderplasmen gewonnen werden (14).

Zur Gruppe der künstlichen Kolloide gehören Dextrane, Gelatine und Stärkelösungen. Diese Lösungen sind polydispers, d.h. die Angaben zur Molekülgröße und -masse sind als Mittelwert zu verstehen. Durch die unterschiedliche Größe und Struktur lassen sich spezifischen Wirkungen und Nebenwirkungen der jeweiligen Substanzen erklären (17). Da die künstlichen Kolloide durch Aufrechterhaltung des Kolloid-Osmotischen-Druckes das Volumen im intravasalen Raum gebunden halten, sind sie heutzutage, neben den kristalloiden Lösungen, welche primär den Flüssigkeitshaushalt ausgleichen und den Erhaltungsbedarf decken, ein wesentlicher Bestandteil des Volumenmanagements. Sie kommen bei der Behandlung von Trauma, Schock und Sepsis zur Anwendung, sind im Gegensatz zu den Humanalbumin-Präparaten unbegrenzt verfügbar, virussicher und relativ kostengünstig (14, 17).

Die Hauptanwendung leitet sich von ihrer hohen Wasserbindungsfähigkeit ab. Sie werden zur Sicherung der Makrozirkulation, also zur Aufrechterhaltung des intravasalen Volumens verabreicht. Spezifische Einflüsse der Kolloide auf die Rheologie verbessern die Mikrozirkulation (14, 42). Hämatokrit und Blutviskosität werden gesenkt, was der Thromboseprophylaxe dient (7).

1.1.2. Dextran

Dextrane sind aus Glukosemolekülen aufgebaute Polysaccharide, die durch das Bakterium *Leuconostoc mesenteroides (B512F)* synthetisiert werden. Die α -1-6-glykosidische Bindung überwiegt im kettenartigen Molekül, die Kettenlänge variiert zwischen 200 und 450 Glukosemolekülen. Klinisch kommen Lösungen mit einem mittleren Molekulargewicht von 40, 60 und 70 KD und in Konzentrationen von 6% bzw. 10% zur Anwendung. Bei hochkonzentrierten, niedermolekularen Lösungen kann durch den ausgeprägten hyperonkotischen Effekt das intravasale Volumen um bis zu 170% vermehrt werden. Dieser Effekt bleibt für die Dauer von 3-4 Stunden erhalten, bevor die Dextrane, abhängig vom Molekulargewicht in Leber, Milz und Nieren enzymatisch abgebaut und renal eliminiert werden (14).

Auf die Gabe von Dextranen wurden anaphylaktische Reaktionen unterschiedlichen Schweregrades, sogenannte Dextran induzierte anaphylaktische Reaktionen, DIAR, beschrieben. Verantwortlich dafür sind präformierte dextranreaktive Antikörper, die bei etwa 70% der Erwachsenen gefunden werden. Um diese Reaktion zu blockieren, wird Promit[®], ein monovalentes Hapten-Dextran, vorinjiziert. Dadurch kann nachfolgend infundiertes Dextran keine Aggregate mehr bilden (14). Dennoch wurden bei sehr

hohen IgG-Antikörpertitern das Auftreten von DIAR beschrieben, so dass die Inzidenz von DIAR heute immer noch etwa 0,273% beträgt (39).

Dextrane führen zu einer Beeinträchtigung der Blutgerinnung. Ursache dafür ist der sogenannte „coating-Effekt“, eine Umhüllung von Gefäßendothelzellen und Thrombozyten mit Dextranmolekülen, wodurch die Freisetzung von für die Gerinnung notwendigen Kontaktstoffen ausbleibt und keine Aggregation der Thrombozyten und Freisetzung von Plättchenfaktoren erfolgt (14, 25). Die Dilution der Gerinnungsfaktoren, insbesondere die Verminderung der Aktivität des von-Willebrand-Faktors, führt schließlich zu einer Zunahme der partiellen Thromboplastin-Zeit, PTT, und zu einer Abnahme von Fibrinogen. Da durch Dextran Fibrinnetze mit gröberer Struktur, die leichter gespalten werden können, gebildet werden, kommt es zu verstärkter Fibrinolyse.

1.1.3. Gelatine

Gelatinepräparate werden aus den Abbauprodukten des in Knochen, Sehnen und verschiedenen Bindegeweben enthaltenen Kollagens hergestellt. Durch alkalische Behandlung und anschließendem Ausschmelzen mit heißem Wasser, wird Gelatine in Peptid-Bruchstücke von etwa 12 KD gespalten. Anschließend erfolgt die Quervernetzung der Peptid-Bruchstücke mittels verschiedener Vernetzungsmittel und es entsteht Oxypolygelatine, harnstoffvernetzte Gelatine und modifizierte flüssige Gelatine. Klinisch kommen Lösungen mit einem mittleren Molekulargewicht von 30 bis 35 KD zur Anwendung, der Volumenfülleffekt beträgt 80% und bleibt für die Dauer von etwa 2 Stunden erhalten, bevor Gelatine auf Grund des Molekulargewichtes überwiegend renal eliminiert wird (14).

Ähnlich wie bei Dextran wurden schwere anaphylaktische Reaktionen beschrieben. Die Vernetzungsmittel bedingen eine Histaminfreisetzung die für diese Reaktionen verantwortlich sind. Trotz modifizierter Herstellungsverfahren und dem Einsatz von Antihistaminika liegt heute die Inzidenz immer noch bei 0,345% (39).

Aufgrund des partiellen anionischen Charakters wird kein „coating Effekt“ verursacht. Die Einflüsse durch Gelatine auf die Gerinnung werden dem Dilutionseffekt zugeschrieben. Obgleich neuere Untersuchungen eine Beeinträchtigung der Clot-Formation in vitro beschreiben, werden die Auswirkungen jedoch als vergleichsweise gering eingeschätzt (44).

1.1.4. Hydroxyethylstärke

Amylopektin (Stärke), ein hochmolekulares Glukose-Polysaccharid, ist Ausgangsstoff für die Herstellung der Hydroxyethylstärke (HES). Diese findet sich fast rein, zu 99% vorliegend in Wachsmais, weniger rein in Kartoffeln (47). Damit das körpereigene Enzym α -Amylase, dieses Molekül nur verlangsamt abbauen kann, werden die Hydroxy-Gruppen an den Positionen C₂, C₃, oder C₆ durch Hydroxyethyl-Gruppen substituiert. Dadurch wird der Zugriff auf die α -1-4-glykosidische Bindung durch die α -Amylase verzögert. Die Anzahl der mit einem oder mehreren Hydroxyethyl-Gruppen versehenen Glukoseringe wird als Substitutionsgrad DS (Degree of Substitution) bezeichnet. Sind alle Glukoseringe substituiert, ist DS=1, sind nicht alle besetzt, ist DS <1. Die heute verwendeten HES-Lösungen haben ein mittleres Molekulargewicht zwischen 70 und 450 KD, einen Substitutionsgrad zwischen 0,4 und 0,7 und liegen in Konzentrationen von 3% oder 10% vor. Der Volumenfülleffekt liegt je nach Konzentration bei 100% bzw. 140%. Die Dauer der Volumenwirksamkeit hängt vor allem vom Substitutionsgrad ab und reicht von 3-12 Stunden. Mittelsubstituierte, am weitesten verbreitete HES-Lösungen haben eine Volumenwirksamkeit von 4-6 Stunden. Nach enzymatischer Spaltung werden die Bruchstücke renal eliminiert (14). Es lässt sich ein „coating Effekt“ feststellen, der aber kaum Einfluss auf die Thrombozytenfunktion hat. Im Vordergrund stehen Einflüsse auf die plasmatische Gerinnung, im besonderen auf die Aktivität des von-Willebrand-Faktors. Allerdings ist diese stark von der Molekülstruktur abhängig (32). Bei hochmolaren, hochsubstituierten HES-Lösungen finden sich diese Einflüsse. Sie sind beim Gebrauch von mittelmolekularer, mittelsubstituierter HES-Lösung deutlich geringer (77).

Die Inzidenz von Unverträglichkeitsreaktionen ist mit 0,058% die geringste aller Kolloide (39). Schwere anaphylaktische Reaktionen wurden bisher nicht beschrieben. Die gute Verträglichkeit wird mit der strukturellen Ähnlichkeit des Amylopektin mit dem Glykogen menschlicher Zellen erklärt (15).

1.2. Apoptose

1.2.1. Einteilung des Zelltodes

In der Literatur werden die Begriffe zur Beschreibung der unterschiedlichen Arten des Zelltodes, abhängig vom Fachgebiet des Autors, nicht einheitlich verwendet. Grundsätzlich gibt es für alle Zellen zwei Möglichkeiten die zum Zelltod führen, Apoptose und Onkose. Welchen Weg die Zellen durchlaufen, hängt davon ab, ob eine Verletzung oder eine Veränderung an der Zelle mit einer Veränderung der ATP-Synthese, also mit einer Veränderung der Na^+ -Regulation zu tun hat oder nicht (82).

Onkose leitet sich vom griechischen Wort „oncos“ ab und bedeutet Schwellung. Diese folgt auf zahlreiche unterschiedliche Verletzungen, verursacht durch Toxine oder Ischämie, welche die Zellmembran und das innere Milieu der Zelle schädigen. Durch das Eingreifen in die ATP-Synthese wird das Gleichgewicht zwischen Natrium Ein- und Ausstrom gestört, Mangel an ATP führt zum intrazellulären Anstieg von Na^+ , die Zelle und verschiedene Zellorganellen schwellen an (43).

Apoptose ist ein genetisch regulierter Vorgang, der Energie sowie Proteinsynthese erfordert (82). Die Apoptose ist durch eine Vielzahl von morphologischen Veränderungen definiert (37). Diese Veränderungen umfassen das Schrumpfen der Zelle und den Zerfall in Bruchstücke (24, 37). Die DNA wird durch Endonukleasen zwischen den Nukleosomen charakteristisch gespalten. Dies führt zum Entstehen von DNA-Stücken mit einer Länge von 200 Basenpaaren und ganzzahligen Vielfachen davon (37). Weiter lässt sich eine Kondensation des Chromatins, eine Verdichtung und Neuordnung von Mitochondrien, die Vakuolisierung des Zytoplasmas durch membranumschlossene Säckchen (blebbing), das Ausstülpfen der Zellmembran (Zeiose), sowie ein Kernzerfall beobachten (37, 65, 82, 91).

Der präletalen Phase, die über Onkose oder über Apoptose laufen kann, schließt sich der Zelltod an. Zelltod bezieht sich auf die Unfähigkeit der Zelle, die Homöostase aufrechtzuerhalten, diese Phase wird als „Point of no Return“ bezeichnet. Dem Zelltod folgen charakteristische Veränderung, die als Nekrose bezeichnet werden (80). Sie beziehen sich auf die strukturellen und funktionellen Ereignisse von Onkose und Apoptose. Korrekter Weise muss in diesem Stadium weiterhin zwischen Onkose und Apoptose, besser zwischen onkotischer und apoptotischer Nekrose unterschieden werden (81,82).

Bei onkotischer Nekrose kommt es zunächst durch Zerreißen der Zellmembran zur Freisetzung zytoplasmatischer Enzyme und toxischer Metabolite, die eine Entzündung verursachen, weiter zu Gewebdemarkierung und anschließender Phagozytose durch Granulozyten und Monozyten (37).

Bei apoptotischer Nekrose kommt es zur Bildung membranumhüllter Apoptosekörper, die von Makrophagen oder Parenchymzellen phagozytiert werden. Da die toxischen Metabolite und die zytoplasmatischen Enzyme von einer intakten Membran umgeben sind, wird keine Entzündung verursacht (37, 82). In Zellkulturen, die keine Phagozyten enthalten, schwellen diese Apoptosekörper an und setzen dann ebenfalls toxische Metabolite und zytoplasmatische Enzyme frei (82), dies wird auch als sekundäre Nekrose bezeichnet.

Im allgemeinen medizinischen Sprachgebrauch konnte sich diese oben detailliert beschriebene Terminologie allerdings nicht durchsetzen. Vereinfacht wird hier nur zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden, wobei unter Nekrose die Onkose und die onkotische Form der Nekrose, also letztlich die Freisetzung zytoplasmatischer Enzyme und toxischer Metabolite, die eine Entzündung verursachen, verstanden wird.

1.2.2. Bedeutung der Apoptose

Apoptose dient der Anpassung des Gewebes an wechselnde Belastungen, der Eliminierung überflüssig gewordener Zellen bei der Embryonalentwicklung, sowie der Entfernung schädlicher Zellen, wie etwa Tumorzellen, virusbefallener Zellen oder immunkompetenter Zellen, die sich gegen körpereigene Antigene richten (20, 90). Apoptose ist ein fein regulierter physiologischer Mechanismus, der durch die Zelle selbst oder durch Induktion über einen signalgebenden Mechanismus ausgelöst werden kann. Besonders wichtig ist Apoptose im Verlauf des Ausreifens des Immunsystems (57), sowie dem Abtöten von Immunzellen, das durch Glukokortikoide oder bestimmte Zytokine vermittelt wird. Sowohl zytotoxische T-Zellen als auch natürliche Killerzellen benützen diesen Mechanismus um ihre Zielzellen abzutöten (18). Verminderte Apoptose kann zum Auftreten von Autoimmun- und Tumorerkrankungen führen. Große Fortschritte sind bei der Aufklärung der molekularen Mechanismen der Apoptosesignalgebung gemacht worden. Diese Fortschritte sind von Bedeutung für die Erklärung der Pathogenese von Erkrankungen und in Zukunft sicher auch für rationale Therapieansätze (37).

1.3. Phagozytose

1.3.1. Mononukleär-phagozytäres System (MPS)

Als mononukleäre Phagozyten bezeichnet man Zellen, die von pluripotenten Stammzellen des hämatopoetischen Systems abstammen und sich über Monoblasten und Promonozyten zu Monozyten und Makrophagen differenzieren. Die Regulation erfolgt in Anwesenheit von Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor (GM-CSF) und Monocyte-colony-stimulating-factor (M-CSF). Monozyten zirkulieren im Blut und sind funktionell aktiv, ihre Halbwertszeit beträgt 8 bis 70 Stunden. Sie treten spontan mittels Diapedese aus dem Blutgefäßsystem ins Gewebe über und differenzieren zu Makrophagen. Je nach Organ übernehmen sie verschiedene Funktionen, in der Leber (Kupffer-Zellen), im Nervengewebe (Mikroglia), in der Lunge (Alveolarmakrophagen), im Knochen (Osteoklasten), in der Haut (Langerhans-Zellen), im Magen-Darmtrakt (mesangiale Makrophagen), in serösen Häuten (Peritoneal- und Pleuramakrophagen), in Gelenkspalten (synoviale A-Zellen), und im lymphatischen Gewebe (freie und sessile Makrophagen) der Lymphknoten, der Milz und des Thymus. Die Gesamtheit der Makrophagen und Monozyten wird als mononukleär-phagozytäres System (MPS) bezeichnet (49).

1.3.2. Aufgaben des mononukleär-phagozytären Systems

Durch Befähigung zur Phagozytose und Migration, zur Prozessierung und Präsentation von Antigenen, sowie zur Sekretion einer Vielzahl von Zytokinen und biologisch aktiver Substanzen, ist das MPS sowohl an spezifischen als auch an unspezifischen Abwehrmechanismen des Organismus beteiligt und nimmt zudem reparative und entzündungsauslösende Aufgaben wahr (69, 85).

- Phagozytose

Makrophagen erkennen relativ unspezifisch Kohlenhydratkomponenten auf der Oberfläche von Bakterien, phagozytieren und verdauen diese. Sie kommen als erste Zellen des Abwehrsystems mit eingedrungenen Antigenen in Kontakt. Die Phagozytose durch Monozyten wird durch Antigenopsonierung eingeleitet. Die Makrophagen besitzen Rezeptoren für den antigenunabhängigen Fc-Teil der Immunglobuline und für

C3b, welche die an der Antigenoberfläche der zu phagozytierenden Partikel als Antikörper (IgM, IgG) oder Komplementkomponenten (z.B. C3b) opsonierten Antigene erkennen können und an diese binden. Die antigenen Partikel werden von den Pseudopodien der Makrophagen umlagert, ins Zellinnere aufgenommen und in Phagosomen eingeschlossen. Die Phagosomen verschmelzen anschließend mit den Lysosomen zu sogenannten Phagolysosomen. In diesen werden die Antigene durch die Einwirkung reaktiver Sauerstoffverbindungen, Senkung des pH-Wertes und durch Enzyme der Lysosomen abgetötet und proteolytisch abgebaut (62).

Makrophagen beseitigen durch Phagozytose nicht nur eingedrungene Antigene, sie sind auch in der Lage, Fremdmaterial, z.B. künstliche Kolloide, aufzunehmen und zu speichern (5, 13, 31). Zudem phagozytieren sie während des Gewebeumbaus auch nichtgebrauchte Zellen, einschließlich derer, die apoptotisch zugrunde gehen (20, 26, 61). Heute sind verschiedene molekulare Wege bekannt, durch die Makrophagen apoptotische Zellen erkennen und phagozytieren können (58, 59). In vitro fand man auf der Oberfläche der Makrophagen Rezeptoren, die für die Erkennung und Beseitigung apoptotische Zellen wichtig sind. Bisher kennt man den Vitronectin-Rezeptor $\alpha_v\beta_3$ (60) und den CD36-Rezeptor (53), die beide das Glykoprotein Thrombospondin als „molekulare Brücke“ zwischen Makrophagen und apoptotischen Zellen zur Erkennung benötigen (61), „Scavenger“-Rezeptoren der Klasse A (51) und der Klasse B (22), einen ATP-bindenden „cassette transporter“ ABC1 (41), den CD14-Rezeptor (12) und einige weitere Rezeptoren, die über den als erstes von Duvall et al (18) beschriebenen Lectin-Rezeptor im Zusammenspiel mit Zuckern die Veränderung apoptotischer Zellen erkennen. Auch die Expression von Phosphatidylserin (PS) auf apoptotischen Zellen, wird von Makrophagen spezifisch erkannt (20, 86).

- Prozessierung und Präsentation von Antigenen

Damit T- und B-Zellen antigenspezifisch aktiviert werden, müssen diese mit den Antigenen in Kontakt treten. B-Zellen können über ihre membranständigen Antigenrezeptoren (Immunglobuline) direkt mit dem Antigen Kontakt aufnehmen, T-Zellen sind dazu nicht in der Lage. Der Kontakt der T-Helferzelle (CD4+) mit dem Antigen wird durch antigen-präsentierende Zellen vermittelt. Die Antigen-präsentierenden Strukturen sind spezielle Glykoproteine auf der Zelloberfläche, die sogenannten MHC-Moleküle. Die phagozytierten Antigene werden in den Makrophagen in kurze Peptide gespalten. Die entstehenden Bruchstücke werden in eine eigens dafür vorgesehene Präsentationsrinne des MHC-Moleküls eingebracht und

anschließend als MHC-Antigenpeptid-Komplexe an der Zelloberfläche exprimiert (92). T-Helferzellen erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor und den Korezeptor CD4 die präsentierenden Antigene und werden dadurch aktiviert. Es kommt zur Proliferation und Differenzierung der T-Helferzellen und zum Ablauf der spezifischen Immunantwort (56).

- Sekretion von Zytokinen und biologisch aktiver Substanzen

Makrophagen sezernieren eine Vielzahl von Zytokinen und biologisch aktiver Substanzen. Durch sie werden andere Zellen in ihrem Aktivitätszustand, ihrer Funktion und ihrem Wachstum beeinflusst. So sind sie unter anderem für Fieber (IL-1, TNF- α) oder den Anstieg Akuter-Phase-Proteine (IL-1, IL-6, CRP) verantwortlich (49), üben chemotaktische Funktionen aus (IL-8, IL-10, GM-CSF, G-CSF), induzieren die Expressierung von interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM), die zu vermehrter Migration anderer Immunzellen führen (TNF- α), aktivieren bei der Antigen-Präsentation CD4+ T-Helferzellen (IL-1, IL-12) und sind für das Wachstum und die Differenzierung vieler Zellen verantwortlich (TGF- α , IFN- γ , EGF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF) (55). Die durch Zytokine der Makrophagen aktivierten Zellen produzieren ihrerseits Zytokine, die auf die Makrophagen einwirken. So ist eine verstärkte Wechselbeziehung zwischen Makrophagen und Lymphozyten zu erkennen (49). Dadurch wird eine größere Effektivität bei der Phagozytose und Elimination von Mikroorganismen erreicht (55).

Da von Makrophagen sowohl proinflammatorische (z.B. IL-1, TNF- α) als auch antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 sezerniert werden, wird zusätzlich eine immunmodulatorische Funktion diskutiert (55, 69). Der genaue Regelmechanismus ist in diesem Zusammenhang aber noch nicht vollständig geklärt, da IL-10 neuerdings auch für die gesteigerte Differenzierung von Monozyten unter M-CSF verantwortlich gemacht wird (27).

Weitere biologisch aktive Substanzen, die von Makrophagen sezerniert werden, sind Enzyme (Angiotensin-Converting Enzyme, Arginase, Elastase, Kollagenase, lysosomale saure Hydrolase, Plasminogen-Aktivator), Enzym-Inhibitoren (α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor), Arachidonsäure-Derivate (Prostaglandine, Thromboxane) und Plasmaproteine (Apoprotein E, Fibronectin, Gerinnungsfaktoren, Komplementfaktoren). Sie modulieren lokale und systemische Entzündungs- und Immunreaktionen (85).

1.4. Fragestellung

Apoptose ist ein fein regulierter physiologischer Mechanismus, der durch die Zelle selbst oder durch Induktion über einen signalgebenden Mechanismus ausgelöst werden kann. Besonders wichtig ist Apoptose im Verlauf des Ausreifens des Immunsystems, sowie dem Abtöten von Immunzellen. Über eine Reihe verschiedener Erkennungsmechanismen können Makrophagen und Monozyten apoptotisch zugrunde gehende Lymphozyten identifizieren und durch Phagozytose beseitigen.

Da die künstlichen Kolloide durch Aufrechterhaltung des Kolloid-Osmotischen-Druckes das Volumen im intravasalen Raum gebunden halten, sind sie heutzutage, neben den kristalloiden Lösungen, welche primär den Flüssigkeitshaushalt ausgleichen und den Erhaltungsbedarf decken, ein wesentlicher Bestandteil des Volumenmanagements. Sie kommen bei der Behandlung von Trauma, Schock und Sepsis zur Anwendung.

Die Phagozytosekapazität humaner Monozyten *in vitro* wird durch die künstlichen Kolloide DEX, GEL und HES konzentrationsabhängig reduziert (64).

Vor diesem Hintergrund stellen sich folgende Fragen:

- Welchen Einfluss haben künstliche Kolloide auf die Phagozytose apoptotischer humaner Lymphozyten durch humane Monozyten *in vitro* ?
- Lässt sich ein stoffspezifischer Einfluss oder eine Konzentrationsabhängigkeit der applizierten Kolloide nachweisen ??

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Siehe Tab. 6.1. im Anhang

2.1.2. Pipetten, Gefäße und Spritzen

Siehe Tab. 6.2. im Anhang

2.1.3. Medien, Lösungen und Zusätze für die Zellkultur

Kommerziell erhältliche Medien:

Siehe Tab. 6.3. im Anhang

Selbst hergestellte Medien:

- PBS - Waschpuffer / pH 7,4

500 ml	Dulbecco's Phosphate buffered saline „minus“
+ 0,15 %	Albumin bovine fraction V 7,5%, ergibt 10 ml
+ 0,13 %	EDTA 500mM, ergibt 3,75 ml

Die ursprünglich 0,5 molare EDTA-Originallösung wurde mit 1N HCl auf einen pH von 7,4 eingestellt, wodurch sich eine 0,463 molare Lösung ergab. Die Zusätze BSA und EDTA wurden der Flasche mit PBS unter sterilen Bedingungen zupipettiert und durch Schwenken vermischt.

- Kulturmedium für Lymphozyten / pH 7,8

177 ml	RPMI 1640 Medium R-0883
+ 1 ml	α -Glutamin 2mM
+ 3,5 μ l	2-Mercaptoethanol
+ 2 ml	Antibiose-Antibiotic-Antimycotic-Solution
+ 20 ml	Humanserum Type AB H-4522, 1 Stunde hitzeinaktiviert bei 56 °C

RPMI-1640 Medium R-0883 wurde in eine 250ml Costar Flasche gegeben. Humanserum Type AB H-4522 und α -Glutamin wurden bei 37°C schnell aufgetaut und nach mehrmaligem Mischen unter sterilen Bedingungen zugegeben. Antibiose-Antibiotic-Antimycotic-Solution und 2-Mercaptoethanol wurden ebenfalls unter sterilen Bedingungen zugegeben. Durch Schwenken der Flasche wurde der Inhalt vermischt. Um im Brutschrank unter CO₂-Einfluss (5%) einen pH von 7,4 zu erreichen, wurde der pH durch Zugabe von NaOH bzw. HCL unter sterilen Bedingungen auf 7,8 eingestellt.

- Kulturmedium für Monozyten / pH 7,8

200 ml	RPMI 1640 Medium R-7509
+ 2ml	Glutamin, stabil
+ 4ml	Humanserum Type AB H-1513, 1 Stunde hitzeinaktiviert bei 56 °C
+ 2ml	MEM Non-Essential-Amino-Acid-Solution
+ 2ml	Sodium Pyruvat 100 mM

RPMI-1640 Medium R-7509 wurde in eine 250ml Costar Flasche gegeben. Humanserum Type AB H-1513 und Glutamin wurden bei 37°C schnell aufgetaut und nach mehrmaligem Mischen unter sterilen Bedingungen zugegeben. MEM Non-Essential-Amino-Acid-Solution und Sodium Pyruvat wurden ebenfalls unter sterilen Bedingungen zugegeben. Weiteres vorgehen wie oben, Kulturmedium für Lymphozyten.

2.1.4. Medien, Lösungen und Zusätze zur Apoptose- und Phagozytosebestimmung

- Kolloidlösungen / pH 7,8

Kolloidpulver zur Herstellung der Lösungen siehe Tab. 6.4. im Anhang.

Die verwendeten Lösungen wurden aus Rohstoff-Kolloidpulver hergestellt. Die Endkonzentrationen betragen 5mg/ml und 20mg/ml. Dazu wurden 100 und 400mg des Kolloidpulvers auf der Analysewaage abgewogen und mit jeweils 20ml Monozyten-Kulturmedium in ein 50ml Falcon-Röhrchen gegeben. Durch Mischen des Röhrchens konnte das Pulver vollständig gelöst werden. Die Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen mit Hilfe von 0,90*40mm Kanülen in 20ml-Einmalspritzen aufgezogen und durch einen Sterifilter in neue Falcon-Röhrchen filtriert. Wegen des Einflusses der Kolloide musste der pH Wert erneut auf 7,8 eingestellt werden (Siehe Tab. 6.12.).

- Propidiumiodid Stammlösung

Propidiumiodidpulver zur Herstellung der Stammlösung siehe Tab. 6.5. im Anhang

Um eine Konzentration von 100µg/ml Propidiumiodid zu erhalten, wurden 10mg Pulver auf der Analysewaage abgewogen und in 100ml Aqua dest. gelöst.

- Hypotone DNA-Färbelösung nach Nicoletti

Siehe Tab. 6.5. im Anhang

10ml	Aqua dest.
+ 50µg/ml	Propidiumiodid, ergibt 5ml Propidiumiodid-Stammlösung
+ 0,1% (w/v)	tri-Natriumcitrat-2-hydrat, ergibt 10mg
+ 0,1% (v/v)	Triton [®] X-100, ergibt 10µl

Mit einer Stripette wurden 10ml Aqua dest in ein 15ml Falcon-Röhrchen gegeben. Auf der Analysewaage wurden 10mg tri-Natriumcitrat-2-hydrat abgewogen und zusammen mit Propidiumiodid und Triton[®] X-100 zugegeben. Anschließend wurden die Zugaben durchmischt.

- Annexin-V-Bindungspuffer / pH 7,4

Siehe Tab. 6.5. im Anhang

48,5ml	Aqua dest
+ 0,5ml	Hepes Puffer 10mM
+ 0,5ml	Natriumchlorid 140mM
+ 0,5ml	Kalziumchlorid 5mM

Mit einer Stripette wurden 48,5ml Aqua dest in ein 50ml Falcon-Röhrchen gegeben. Die Zusätze wurden in entsprechender Menge hinzupipettiert und miteinander vermischt.

- Annexin-V-FLUOS Markierungslösung

Siehe Tab. 6.5. im Anhang

4,8ml	Annexin-V-Bindungspuffer
+ 100µl	Annexin-V-FLUOS
+ 100µl	Propidiumiodid-Stammlösung

Die Zusätze wurden in entsprechender Menge in ein 15ml Falcon-Röhrchen pipettiert und miteinander vermischt.

- Calcein-AM Lösung

Siehe Tab. 6.6. im Anhang

Ein Röhrchen mit 50µl Calcein-AM (gelagert bei -20°C) wurde dem Gefrierschrank entnommen und bei Zimmertemperatur langsam aufgetaut. Anschließend wurden 37µl DMSO zugegeben und gemischt.

- Thiazolorange Lösung

Thiazolorangepulver zur Herstellung der Lösung siehe Tab. 6.6. im Anhang

Die verwendete Lösung wurde aus Thiazolorangepulver hergestellt. Die Endkonzentration betrug 1µg/ml. Auf der Analysewaage wurden 2mg Thiazolorange abgewogen und in einem 50ml Falcon-Röhrchen in 50ml DMSO gelöst. Anschließend wurden 6,25ml in einer 250ml Costar Flasche mit 250ml Aqua dest gemischt.

- Apoptose-Induktoren

Siehe Tab. 6.7. im Anhang

- Phagozytose-Stimulatoren

Siehe Tab. 6.8. im Anhang

- Monoklonale Antikörper

Siehe Tab. 6.9 im Anhang

- Lösungen für das Durchflußzytometer

Siehe Tab. 6.10. im Anhang

2.1.5. Materialien zur Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Siehe Tab 6.11. im Anhang

2.1.6. Gewinnung der Blutproben

Humane Lymphozyten und humane Monozyten wurden aus Buffy Coats gesunder freiwilliger Spender gewonnen. Buffy Coats entstehen bei der Zentrifugation von Vollblut als Zwischenschicht zwischen Erythrozyten, die als Erythrozytenkonzentrate weiterverwendet werden und Plasma, das als FFP zum Einsatz kommt. Sie enthalten Leukozyten und Thrombozyten und werden entweder zur Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten verwandt oder verworfen. Die in dieser Arbeit verwendeten Buffy Coats wurden von der Abteilung Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen und des Katharinenhospitals Stuttgart, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen, bereitgestellt.

2.2. Methoden

2.2.1. Isolierung und Anreicherung von Lymphozyten und Monozyten aus Buffy Coats

Die Isolierung und Anreicherung von Lymphozyten und Monozyten aus den Buffy Coats erfolgte unter sterilen Bedingungen, bei Raumtemperatur, am Tag der Blutspende. Es wurden Proben beider Geschlechter und unterschiedlicher Blutgruppen verwendet.

Der Inhalt des Buffy Coats (60-100ml) wurde mit einer Perfusorspritze entnommen und in vier 50ml Falcon-Röhrchen gegeben. Aufgrund der Dickflüssigkeit des Buffy Coats wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt.

- Dichtegradientenzentrifugation

Ficoll wurde in acht 50ml Falcon-Röhrchen zu jeweils 12,5ml vorgelegt. Jeweils 15ml des Gemisches Buffy Coat / PBS wurden dem Ficoll überschichtet. Anschließend erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation über 25min bei 1600Upm und 20⁰C. Durch das Zentrifugieren wurde aufgrund der verschiedenen Massen eine Trennung von Erythrozyten, Granulozyten und PBMC mit Lymphozyten erreicht. Um diese Trennung zu erhalten, wurde die Auslaufbremse bei 500Upm abgeschaltet. Die starken Eigenschwingungen der Zentrifuge in diesem Bereich konnten so vermieden werden. Entsprechend der unterschiedlichen Masse aufgetrennt, fanden sich nach der Zentrifugation am Boden als Pellet erkennbar die Erythrozyten und Granulozyten, darüber Ficoll, über dem Ficoll eine trübe Phase, die sogenannte Interphase und über der Interphase als Überstand Serum. In der Interphase enthalten waren die PBMCs, also Lymphozyten und Monozyten. Die Interphase wurde nun vorsichtig aus den acht Falcon-Röhrchen abgesaugt und in vier neue 50ml Falcon-Röhrchen gegeben.

- Reinigungsschritte

Um die Lymphozyten und die Monozyten aufzureinigen wurden sie im folgenden mehrfach gewaschen.

In die vier Falcon-Röhrchen mit der Interphase wurde PBS-Waschpuffer gegeben und bis 50ml aufgefüllt, anschließend 10min bei 1000Upm und 20°C mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet durch vorsichtiges Rollen der Röhrchen in den Händen aufgeschüttelt. Ein Pellet wurde nun in 35ml PBS resuspendiert und die gesamte Lösung in das nächste Falcon-Röhrchen weitergegeben. Auf diese Weise wurden die Pellets aller vier Röhrchen vereinigt. Im vierten Röhrchen wurde der Inhalt belassen und erneut 10min bei 1000Upm und 20°C mit Bremse zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand abgekippt und das Pellet aufgeschüttelt. Im kalziumfreien PBS-Waschpuffer war den Zellen Kalzium entzogen worden. Die Rekalzifizierung erfolgte durch tropfenweise Zugabe von 25ml Kulturmedium für Monozyten und unter ständigem Schwenken des Falcon-Röhrchens. Eine zu schnelle Zugabe mit Bildung von Zellaggregaten wurde so vermieden. Erneut wurde 10min bei 1000Upm und 20°C mit Bremse zentrifugiert. Nach dekantieren des Überstandes und aufschütteln des Pellets, wurden 10ml Kulturmedium für Monozyten zugegeben und gut vermischt.

- Ermittlung des Zellgehaltes und der Viabilität durch Trypanblau-Färbung

Es wurden 245µl Trypanblau und 5µl Suspension in ein Eppendorf Cup pipettiert und vermischt. Davon wurden 10µl in eine Neubauer Zählkammer eingebracht. Nach Auszählen und Addieren der vier äußeren Quadranten mit jeweils 16 Quadraten wurde mit dem Faktor 125 multipliziert, um die Zellzahl/ml zu erhalten. Im Mittel waren dies $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Viabilität im Mittel 97,5%. Bei Viabilitäten <95% wurde die Bearbeitung an dieser Stelle abgebrochen und der gesamte Ansatz verworfen. Dies erfolgte bei 3% der bearbeiteten Ansätze. Die zu Grunde liegende Zellschädigung kann lagerungs- und transportbedingt oder auch durch Aufarbeitung der Buffy Coats entstehen.

2.2.2. Zellkultur und Aufbereitung

- Aussat der Zellen

Die Suspension wurde mit Kulturmedium für Monozyten auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml verdünnt. Jeweils 1ml der Suspension wurde in eine Petrischale ($\varnothing 3,5\text{cm}$) gegeben. Nach vorsichtigem Schwenken der Petrischalen, um den Boden vollständig zu bedecken, folgte eine 2h dauernde Inkubation im Brutschrank (5% CO_2 , 21% O_2 , 37°C). Die Monozyten adhärten in dieser Zeit an der Polystyroloberfläche der Petrischalen. Nach zwei Stunden wurden die nicht adhärten Lymphozyten mit dem Überstand abgenommen. Hierzu wurde mit einer 1ml Pipette der Inhalt einer Petrischale aufgenommen und der Rand des Petrischalenbodens vorsichtig gespült. Zu den adhären Monozyten wurde in jede Petrischale erneut 1ml Kulturmedium für Monozyten gegeben und die Schalen zurück in den Brutschrank gestellt.

- Aufbereitung der Lymphozyten

Die Lymphozytensuspension wurde in einem 50ml Falcon-Röhrchen gesammelt, gemischt und anschließend auf $12 \cdot 75\text{mm}$ große Falcon-Röhrchen zu je 1ml verteilt. Es folgte eine Zentrifugation für 10min bei 1000Upm und 20°C mit Bremse, um die Lymphozyten als Pellet zu gewinnen. Die Überstände wurden abgekippt, die Pellets aufgeschüttelt.

- Induktion von Apoptose bei Lymphozyten

In die Falcon-Röhrchen mit Lymphozyten, bei denen Apoptose induziert werden sollte, wurde 500µl DMN 20mM gegeben. Kontrollproben ohne Apoptoseinduktion erhielten 500µl Kulturmedium für Lymphozyten. Es folgte eine Inkubation über 1h im Brutschrank (5% CO₂, 21%O₂, 37⁰C). Anschließend wurden die Zellen gemischt und mittels Trypanblau-Färbung auf Viabilität untersucht (siehe „Ermittlung des Zellgehaltes“ unter 2.2.1.). Die Viabilität betrug nach Apoptoseinduktion im Mittel 20%, im Ansatz ohne Induktion im Mittel 90%. Es folgte eine Zentrifugation für 5min bei 1000Upm und 20⁰C mit Bremse, um die Lymphozyten wieder als Pellet zu gewinnen. Die Überstände wurden dekantiert, die Pellets aufgeschüttelt. Der Apoptose-Induktor DMN 20mM wurde ausgewaschen, um bei späterer Koinkubation mit Monozyten diese nicht zu schädigen. Dazu wurde in jedes Falcon-Röhrchen 2ml Cell Wash gegeben, die Zellen aufgeschüttelt und für 5min bei 1000Upm und 20⁰C mit Bremse zentrifugiert. Erneut wurden die Überstände dekantiert und die Pellets aufgeschüttelt.

- Färbung der Lymphozyten

In jedes Falcon-Röhrchen wurden 50µl Thiazolorange Lösung in einer Konzentration von 1µg/ml pipettiert und 30min im Brutschrank (5% CO₂, 21%O₂, 37⁰C) inkubiert. Thiazolorange, welches nicht an DNA gebunden hatte, wurde ausgewaschen, damit nachfolgend keine Zellen mehr durch den DNA-Farbstoff gefärbt werden konnten. Hierzu wurde nach Inkubation in jedes Falcon-Röhrchen 2ml Cell Wash gegeben, die Zellen aufgeschüttelt und für 5min bei 1000Upm und 20⁰C mit Bremse zentrifugiert. Die Überstände wurden abgekippt, die Pellets aufgeschüttelt und dieser Waschvorgang wiederholt.

- Kokultur von Lymphozyten und Monozyten

Gefärbte Lymphozyten wurden in 1ml Kulturmedium für Monozyten resuspendiert. Mittels Trypanblaufärbung erfolgte eine Zellzahlkontrolle. Das Zellzahlverhältnis zwischen Lymphozyten und Monozyten wurde auf $5,2 \cdot 10^6$ zu $1 \cdot 10^6$ eingestellt (Siehe 3.1.2.5.). Die Monozyten wurden aus dem Brutschrank geholt und der Überstand erneut abgenommen, diesmal aber verworfen. Lymphozyten wurden nach folgendem Schema in Kulturmedium für Monozyten oder Kolloidlösung resuspendiert und danach in Petrischalen mit Monozyten zur Kokultur gebracht.

Tabelle 2.1.: Inkubationsansätze der Phagozytose mit Kolloiden

Kulturschale	Lösung	Zusatz
1	1ml Kulturmedium für Monozyten	Keine Lymphozyten
2	1ml Kulturmedium für Monozyten	Keine Lymphozyten
3	1ml Kulturmedium für Monozyten	Lymphozyten ohne Apoptose-Induktor
4	1ml Kulturmedium für Monozyten	Lymphozyten mit Apoptose-Induktor
5	1ml Kolloidlösung DEX [5mg/ml]	Lymphozyten mit Apoptose-Induktor
6	1ml Kolloidlösung DEX [20mg/ml]	Lymphozyten mit Apoptose-Induktor
7	1ml Kulturmedium für Monozyten	Lymphozyten mit Apoptose-Induktor
8	1ml Kolloidlösung GEL [5mg/ml]	Lymphozyten mit Apoptose-Induktor
9	1ml Kolloidlösung GEL [20mg/ml]	Lymphozyten mit Apoptose-Induktor
10	1ml Kulturmedium für Monozyten	Lymphozyten mit Apoptose-Induktor
11	1ml Kolloidlösung HES [5mg/ml]	Lymphozyten mit Apoptose-Induktor
12	1ml Kolloidlösung HES [20mg/ml]	Lymphozyten mit Apoptose-Induktor

Anschließend folgte eine Inkubationsphase von 12h im Brutschrank (5% CO₂, 21% O₂, 37°C).

- Lösung der Monozyten

Die Aufbereitung der Proben zur Durchflußzytometrie erfolgte unsteril. Aus den Petrischalen wurde erneut der Überstand abgenommen und verworfen. Hierzu wurde mit einer 1ml Pipette das Medium einer Petrischale aufgenommen und der Rand des Petrischalenbodens vorsichtig gespült um die nicht phagozytierten Lymphozyten abzulösen. Das abpipettierte Medium wurde durch 1ml eisgekühlten PBS-Waschpuffer ersetzt. Die Petrischalen wurden auf Eis gelegt und für 15min in den Kühlschrank gestellt. Die Adhäsion der Monozyten wurde durch Kühlung und Kalziumentzug aufgrund des EDTA-Gehalts im Waschpuffer verringert. Mit Zellschabern wurde danach die endgültige Ablösung der Monozyten von ihrer Bindung an den Petrischalen mechanisch erreicht. Ein vorsichtiges Spülen unterstützte diesen Vorgang. Der Inhalt der Petrischalen wurde nach abgeschlossener Lösung in Falcon-Röhrchen pipettiert.

- Aufbereitung der Proben für das Durchflußzytometer

Die Monozyten-Suspension wurden für 10min bei 1000Upm und 4⁰C mit Bremse zentrifugiert. Die Überstände wurden dekantiert, die Pellets aufgeschüttelt und jeweils 5µl Antikörper nach folgendem Schema dazupipettiert.

Tabelle 2.2.: Antikörper im Phagozytoseansatz

Nr	Inhalt	Antikörper	Verwendungszweck
1	Monozyten	Mouse IgG ₁ -FITC Mouse IgG _{2a} -TRI	unspezifische Bindungen, Verstärkung FL1+FL3, FSC/SSC, Autofluoreszenz
2	Monozyten	CD14-TRI	Kompensation FL1 gegen FL3
3	Monozyten, Lymphozyten	[ThO]	Kompensation FL3 gegen FL1
4	Monozyten, apoptotische Lymphozyten	CD14-TRI, [ThO]	Phagozytoserate ohne Kolloid
5	Monozyten, apoptotische Lymphozyten	CD14-TRI, [ThO]	Phagozytoserate bei DEX [5mg/ml]
6	Monozyten, apoptotische Lymphozyten	CD14-TRI, [ThO]	Phagozytoserate bei DEX [20mg/ml]
7	Monozyten, apoptotische Lymphozyten	CD14-TRI, [ThO]	Phagozytoserate ohne Kolloid
8	Monozyten, apoptotische Lymphozyten	CD14-TRI, [ThO]	Phagozytoserate bei GEL [5mg/ml]
9	Monozyten, apoptotische Lymphozyten	CD14-TRI, [ThO]	Phagozytoserate bei GEL [20mg/ml]
10	Monozyten, apoptotische Lymphozyten	CD14-TRI, [ThO]	Phagozytoserate ohne Kolloid
11	Monozyten, apoptotische Lymphozyten	CD14-TRI, [ThO]	Phagozytoserate bei HES [5mg/ml]
12	Monozyten, apoptotische Lymphozyten	CD14-TRI, [ThO]	Phagozytoserate bei HES [20mg/ml]

[ThO] = Thiazolorange, DNA-Farbstoff, der Vollständigkeit wegen aufgeführt, apoptotische Lymphozyten bereits angefärbt

Der Ansatz wurde gut gemischt. Es folgte eine Inkubationsphase der Monozyten von 20min im dunkeln mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper CD14-TRI, bzw. den unspezifischen Antikörpern Mouse IgG₁-FITC und Mouse IgG_{2a}-TRI, welche in dieser Zeit an das entsprechende Oberflächenantigen bzw. unspezifisch an die Monozyten banden. Nicht gebundene Antikörper wurden nach der Inkubation ausgewaschen. Hierzu wurde in jedes Falcon-Röhrchen 1ml Cell Wash gegeben, gemischt und für 10min bei 1000Upm und 4⁰C mit Bremse zentrifugiert. Die Überstände wurden abgekippt, die Pellets aufgeschüttelt und in jedes Falcon-Röhrchen 500µl Cell Fix pipettiert und resuspendiert. Bis zur Analyse im Durchflußzytometer wurden die Falcon-Röhrchen bei 4⁰C gelagert.

2.2.3. Durchflußzytometrie

Beim Durchflußzytometer werden die Zellen durch eine vibrierende Fließkammer in Einzelzellsuspension gebracht und in Tröpfchenform an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Photomultiplikatoren messen die Streuung des Laserlichts. Die Vorwärts-Lichtstreuung (FSC) korreliert mit der Größe der Zellen, die seitliche Lichtstreuung (im 90° -Winkel gemessen) mit der Granularität bzw. dem Plasma/Kern-Verhältnis (SSC). So lassen sich große Zellen mit großer Plasma/Kern-Relation und granuliertem Zytoplasma (Granulozyten) von kleinen Zellen mit hohem Kernanteil (Lymphozyten) abgrenzen. Monozyten zeigen intermediäre Charakteristika.

Als weiterer Parameter in den so eingegrenzten Zellfraktionen kann die Fluoreszenz von spezifisch gebundenen, markierten Antikörpern bestimmt werden, z.B. in derselben Probe die Immunfluoreszenzen von Lymphozyten und Monozyten getrennt. Die Intensität der Fluoreszenz korreliert in etwa mit der Antigendichte auf der Zelloberfläche und wird durch Photomultiplikatoren quantifiziert.

Es ist möglich, gleichzeitig mehrere Antikörper einzusetzen, die gegen verschiedene Antigene gerichtet und an unterschiedliche Farbstoffe gekoppelt sind, z.B. an Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat (FITC) und an Phycoerythrin (PE). Beide Farbstoffe werden mit Laserlicht von 488 nm Wellenlänge angeregt, haben jedoch unterschiedliche Fluoreszenz-Emissionsgipfel: im Grün-Bereich (FITC) bzw. im Rot-Bereich (PE). Mit dieser Methode werden z.B. Zellpopulationen abgegrenzt, die zwei unterschiedliche Antigene exprimieren (sie fluoreszieren sowohl grün als auch rot), solche die nur ein Antigen exprimieren (entweder grün oder rot), und solche, die keines der untersuchten Antigene exprimieren und daher keine Fluoreszenz ausstrahlen.

- Auswertung

Im FSC / SSC - Scattergramm wurde die „lebende“ Monozytenwolke des LPS-Rezeptors „gegatet“ (G3). Monozyten wurden zusätzlich anhand der Expression von CD14 identifiziert. Thiazolorange hat bei einer Wellenlänge von 501 nm das Absorptionsmaximum und bei 547 nm das Emissionsmaximum. Somit wird Thiazolorange überwiegend vom Detektor der niedrigen Wellenlänge im FITC-Bereich (530-560 nm, Kanal 1) wahrgenommen, Überschneidungen mit dem mittleren PE-Bereich (560-640 nm, Kanal 2) konnten aber nicht ausgeschlossen werden. Zur exakten Abgrenzung wurden daher Antikörper mit TRI-color markiert, dessen Emissionen vom Detektor der langen Wellenlänge (> 640nm, Kanal 3) wahrgenommen wird.

Im Thiazolorange / Tricolor-CD14 - Scattergramm wurden nur Zellen aus G3 berücksichtigt. Zellen die sowohl CD14 als auch Thiazolorange positiv waren, wurden als Monozyten, die Thiazolorange markierte apoptotische Lymphozyten phagozytiert hatten, identifiziert.

Im SSC / Tricolor-CD14 - Scattergramm wurden ebenfalls nur Zellen aus G3 berücksichtigt. CD14 positive Zellen, die gleichzeitig eine Erhöhung von SSC zeigten, wurde als weiteres unabhängiges Merkmal für die Phagozytose von apoptotischen Lymphozyten gewertet.

Schließlich wurden auch im Thiazolorange - Histogramm nur Zellen aus G3 ausgewertet und der Median, als Maß für die Fluoreszenzintensität dokumentiert.

Um sicher zu gehen, dass nicht nur der phagozytierte Farbstoff zur Zunahme der Granularität (SSC) geführt hatte, wurden Versuche ohne Thiazolorange durchgeführt. Auch ohne Farbstoff nahm die Granularität im Ansatz mit apoptotischen Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu (Siehe 3.1.2.3.).

2.2.4. Fluoreszenzmikroskopie

Das Leuchten eines Stoffes, der von einer Strahlung angeregt wurde, wird Fluoreszenz genannt. Dabei wird nicht die gesamte eingestrahlte Energie von dem fluoreszierenden Stoff absorbiert, so dass die „ungenutzte“ Strahlung mit geringerer Energie, d.h. größerer Wellenlänge abgestrahlt werden kann. Beim Fluoreszenzmikroskop dringt nur das Licht einer bestimmten Wellenlänge durch einen Sperrfilter und gelangt auf das Präparat. Im Präparat vorhandene Fluoreszenzfarbstoffe senden Licht mit einer entsprechenden Emissionswellenlänge durch einen Farbteiler und Bandpassfilter zum Betrachter.

- Anfärbung mit DAPI

Siehe Tab. 6.11. im Anhang

DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff der selektiv an DNA bindet und stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe bildet. Das Absorptionsmaximum von DAPI liegt bei 340nm, weshalb es sich nicht zur durchflußzytometrischen Analyse bei Geräten mit einem Argon-Laser, dessen Emissionsmaximum bei 488nm liegt, eignet. Durch die Bindung an DNA entstehen stark fluoreszierende Zellkerne, zytoplasmatische Fluoreszenz ist dagegen nicht nachweisbar. Mittels DAPI-Färbung erfolgte eine Beurteilung der Monozyten hinsichtlich der Phagozytose apoptotischer Lymphozyten, die anhand von Kernfragmenten im Zytoplasma der Monozyten identifiziert wurden.

DAPI-Lösung

Kommerzieller DAPI-Fluoreszenzfarbstoff liegt in einer Stammkonzentration von 20mg/ml vor. Um die Gebrauchskonzentration von 1µg/ml zu erreichen, wurden 20µg DAPI in 20ml Ethanol pipettiert.

Färbeprozedur

Nach dem Lösevorgang der Monozyten wurden 500µl der Suspension in Falcon-Röhrchen pipettiert und für 10min bei 1000Upm und 4°C mit Bremse zentrifugiert. Die Überstände wurden abgekippt, die Pellets aufgeschüttelt, in 200µl DAPI-Lösung resuspendiert und bei 37°C für 15min inkubiert. Nicht gebundener Fluoreszenzfarbstoff wurde nach der Inkubation ausgewaschen, um die Hintergrundfluoreszenz zu

reduzieren. Hierzu wurde in jedes Falcon-Röhrchen 1ml Cell Wash gegeben, die Zellen aufgeschüttelt und für 10min bei 1000Upm und 4⁰C mit Bremse zentrifugiert. Die Überstände wurden abgekippt, die Pellets aufgeschüttelt und in 50µl eines Glycerol-PBS-Gemisches (Verhältnis 1:10) gelöst. Diese Suspension wurde mit Hilfe von Zytospin-Einsätzen für die Zentrifuge aufkonzentriert. Dazu wurde für 5min bei 500Upm und 4⁰C mit Bremse zentrifugiert. Das Zellkonzentrat wurde dabei direkt auf einem Objektträger aufgefangen. Nach eindeckeln mit Deckgläsern wurden die Präparate mit einer Quecksilberdampflampe angeregt, mikroskopiert und digital photographiert (Siehe Abb. 6.1. + 6.2.).

2.2.5. Lichtmikroskopie

Hämalaun-Eosin-Färbung

Mittels Hämalaun-Eosin-Färbung erfolgte eine Beurteilung der Monozyten hinsichtlich der Phagozytose apoptotischer Lymphozyten anhand der Kernmorphologie. Hämalaun färbt Chromatin blau, Eosin färbt das Zytoplasma und Interzellulärsbstanz rosa.

Färbeprozedur

Nach dem Lösen der Monozyten wurden die Falcon-Röhrchen für 10min bei 1000Upm und 4⁰C mit Bremse zentrifugiert, um die Monozyten als Pellet zu gewinnen. Die Überstände wurden abgekippt, die Pellets aufgeschüttelt. Anschließend wurden 30µl BSA und 70µl Suspension in ein Eppendorf-Cup pipettiert, gut gemischt und 50µl des Gemisches mit Hilfe von Zytospin-Einsätzen für die Zentrifuge aufkonzentriert. Dazu wurde für 5min bei 500Upm und 4⁰C mit Bremse zentrifugiert. Das Zellkonzentrat wurde dabei direkt auf einem Objektträger aufgefangen. Um mit Hämalaun-Eosin gefärbt werden zu können, mussten die Präparate nun 24h lufttrocknen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Präparate für 10min in Hämalaun gelegt. Anschließend folgte 10min lang das Wässern unter fließendem Leitungswasser, danach das Färben in Eosin. Nach 1min wurden die Präparate kurz in Aqua dest gestellt, dann schloss sich die Entwässerungsprozedur an. Hierzu wurden die Präparate 4x kurz in Ethanol 70%, 4x kurz in Ethanol 96% und 2x für 5min in Ethanol 100% getaucht.

Am Ende folgte das Eindeckeln mit Deckgläsern. Die Präparate wurden nach 4h trocken mikroskopiert und sowohl digital, als auch auf Dia-negativ photographiert (Siehe Abb. 6.3. - 6.6.).

2.2.6. Statistische Auswertung

Mit Hilfe des gepaarten Student t-Tests wurde überprüft, ob unterschiedliche Monozyten- / Lymphozyten-Verhältnisse einen signifikanten Einfluss auf die Phagozytose haben.

Der Einfluss verschiedener Kolloidkonzentrationen auf die Phagozytose wurde auf statistische Signifikanz überprüft. Bei nicht normal verteilten Daten kam der Welch ANOVA Test zur Anwendung, bei Normalverteilung der Student t-Test. Diese Unterscheidung wurde anhand des Barthlett's Tests für ungleiche Varianzen getroffen.

2.2.7. Methodische Vorversuche

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss künstlicher Kolloide auf die Phagozytose apoptotischer humaner Lymphozyten durch humane Monozyten in vitro untersucht. Hierfür wurde in den methodischen Vorversuchen zunächst Apoptose bei humanen Lymphozyten in vitro mittels zweier verschiedener, bereits etablierter Substanzen induziert, um einen Induktor zu finden, der Apoptose in großem Maße auslöst. Daran anschließend wurden Versuche mit den Induktoren in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer gemacht. Ziel war es eine möglichst kurze Inkubationsdauer zu finden, damit der sich anschließende Phagozytoseansatz frühzeitig beginnen konnte.

Um den Einfluss künstlicher Kolloide auf die Phagozytose apoptotischer humaner Lymphozyten durch humane Monozyten in vitro untersuchen zu können, musste als nächstes eine Methode gefunden werden, die in großer Zahl die Phagozytose apoptotischer Lymphozyten durch Monozyten sensitiv beschreibt. Die Entscheidung fiel daher auf eine durchflußzytometrische Analyse. In den folgenden Versuchen wurde untersucht:

- wie viele Waschschrte notwendig waren, um apoptotische Lymphozyten vom Apoptose-Induktor zu reinigen, damit durch den Induktor keine Schädigung der Monozyten erfolgte,
- mit welcher Substanz sich apoptotische Lymphozyten färben ließen um sie durchflußzytometrisch sensitiv zu analysieren,

- ob eine Stimulation der Phagozytose möglich war,
- in welchem Zahlenverhältnis Monozyten zu apoptotischen Lymphozyten stehen mussten um Phagozytose in großer Zahl nachweisen zu können,
- und welchen Einfluss die Inkubationsdauer auf die Phagozytose hatte.

2.2.7.1. Induktion von Apoptose und Apoptose-Nachweismethoden

Apoptose-Induktoren siehe Tab. 6.7. im Anhang

Induktion von Apoptose wurde durch Zugabe von zwei Apoptose auslösenden Substanzen durchgeführt. Zum einen mit Staurosporin zum anderen mit DMN.

- Staurosporin

Staurosporin ist ein Alkaloid das aus Kulturen von Streptomyces-Spezies isoliert werden kann. Induktion von Apoptose erfolgt durch Hemmung der Proteinkinase C. Staurosporin-induzierte Apoptose wurde in einer Vielzahl von Zelltypen und Zelllinien beschrieben. Induktion von Apoptose geschieht unabhängig vom Grad der Zelldifferenzierung und Zellzyklus-Phase, in der sich die Zellen befinden (6).

- Dexamethason (DMN)

Fortecortin[®]100 ist der Handelsname eines Glukokortikoids dessen Wirkstoff Dexamethason-21-dihydrogenphosphat ist und in der Konzentration von 19,3mM vorliegt. Induktion von Apoptose erfolgt über den intrazellulären Steroidrezeptor, welcher sich nach Bindung als Hormon-Rezeptor-Komplex an die DNA des Zellkerns anlagert (9). Durch einen Block in der G₁-Zellzyklus-Phase wird dann das zelluläre Todesprogramm bei Leukozyten eingeleitet (45).

- Trypanblau-Färbung zur Bestimmung der Viabilität

Um zunächst einen Überblick über die Wirksamkeit der Apoptose-Induktoren zu bekommen, wurde eine Viabilitätsbestimmung durch Trypanblau-Färbung durchgeführt. Induktion von Apoptose bei Lymphozyten erfolgte mit jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Fortecortin[®]100 (2mM und 19,3mM) und Staurosporin (0,5µM und 1,0µM). Zur Kontrolle diente die Inkubation der Lymphozyten im Kulturmedium für Lymphozyten. Die Inkubationszeit betrug 6h. Trypanblau färbt tote

Zellen, d.h. sowohl nekrotische als auch apoptotische blau, viable Zellen bleiben hingegen weiß. Durch Auszählen in der Neubauer Zählkammer, wurde die Viabilität bestimmt (Siehe 3.1.1.1. - Abb. 3.1.).

- Simultane Färbung mit Annexin-V-FLUOS / Propidiumiodid

In frühen Apoptose-Stadien finden Änderungen in der Zellmembran statt (20). Eine dieser Änderungen der Plasmamembran ist die Translokation von Phosphatidylserin, welches normalerweise nur auf der zytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist auf die Außenseite der Membran (87). Annexin-V ist ein Kalzium abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin. Es bindet somit an apoptotische, nicht jedoch an viable Zellen. Da aber nekrotische Zellen durch den Verlust der Membran-Integrität ebenfalls Annexin-V binden, kann durch Färbung mit einem DNA-Farbstoff, der nur permeabilisierte Membranen von nekrotischen Zellen passieren kann, eine Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen erfolgen. Apoptotische Zellen zeichnen sich also durch positive Annexin-V-Färbung und negative Propidiumiodid-Färbung aus, nekrotische Zellen sind dagegen für beides positiv.

Versuchsansatz / Konzentrationsreihe

Die Induktion von Apoptose erfolgte mit DMN in den Konzentrationen (0,01mM, 0,05mM, 0,1mM, 0,5mM, 1,0mM, 5,0mM, 10,0mM und 19,3mM). Zur Kontrolle diente die Inkubation der Lymphozyten im Kulturmedium für Lymphozyten. Die Inkubationszeit betrug 8h.

Färbeprozedur

Nach Aufbereitung, Induktion von Apoptose und Zellzahlermittlung wurden jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen in ein 12*75mm Falcon-Röhrchen gegeben und für 5min bei 1000Upm und 4°C mit Bremse zentrifugiert. Die Überstände wurden abgekippt, die Pellets in jeweils 100µl Annexin-V-FLUOS Markierungslösung resuspendiert und für 15min bei 4°C inkubiert. Gleichzeitig erfolgte eine Markierung mit den unspezifischen Mouse IgG₁-FITC und Mouse IgG_{2a}-PE Antikörpern (3µl), die in dieser Zeit unspezifisch an die Monozyten banden. Nicht gebundene Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe wurden nach der Inkubation ausgewaschen. Hierzu wurde in jedes Falcon-Röhrchen 1ml Cell Wash gegeben, die Zellen aufgeschüttelt und für 10min bei 1000Upm und 4°C mit

Bremse zentrifugiert. Die Überstände wurden abgekippt, die Pellets aufgeschüttelt und in jedes Falcon-Röhrchen 500µl Cell Fix pipettiert und resuspendiert. Bis zur Analyse im Durchflußzytometer wurden die Falcon-Röhrchen bei 4°C gelagert.

Entsprechend der Zusammensetzung der Annexin-V-FLUOS Markierungslösung und der dazu pipettierten Antikörper, ergibt sich folgendes Färbeprotokoll (Tab. 2.3.).

Tabelle 2.3.: Färbeprotokoll

Nr.	Antikörper / Fluoreszenzfarbstoff	Verwendungszweck
1	Mouse IgG ₁ -FITC (3µl) Mouse IgG _{2a} -PE (3µl)	unspezifische Bindungen, Verstärkung FL1+FL3, FSC/SSC, Autofluoreszenz
2	Annexin-V-FLUOS (2µl)	Kompensation FL1 gegen FL3
3	Propidiumiodid (2µl)	Kompensation FL3 gegen FL1
4-n	Annexin-V-FLUOS (2µl), Propidiumiodid (2µl)	Messreihe

Auswertung

Die Auswertung der Proben erfolgte durchflußzytometrisch am FACS-SORT (Siehe 3.1.1.1. - Abb.3.2.).

- DNA-Färbemethode nach Nicoletti

Ein charakteristisches Merkmal für apoptotischen Zelluntergang ist die Fragmentierung der genomischen DNA in mono- und oligonukleosomale Untereinheiten (74). Grundlage der Fragmentierung ist die Aktivierung einer endogenen Endonuklease im Zellkern, welche die DNA zwischen den Nukleosomenstrukturen schneidet (89). Es entstehen charakteristische ca. 180bp große DNA-Fragmente. In apoptotischen Zellen ist daher der Anteil an LMW-DNA erhöht, der Anteil an HMW-DNA dagegen erniedrigt. Von Nicoletti et al (46) ist eine durchflußzytometrische Methode zum Nachweis von fragmentierten Zellkernen mit geringerem HMW-DNA-Gehalt beschrieben worden.

Die DNA-Fragmentierung in apoptotischen Zellen wird durch Extraktion der LMW-DNA aus permeabilisierten Zellen und nachfolgender Anfärbung der Zellen mit einem DNA-Farbstoff - Propidiumiodid (Siehe 4.1.4.) - nachgewiesen. Die Permeabilisierung der Zellen durch Triton X-100, führt zu einem Verlust der LMW-DNA aus apoptotischen Zellen. Der geringere DNA-Gehalt dieser Zellen lässt sich nach Anfärbung mit DNA-Farbstoff detektieren. Diese Zellen bilden im Durchflußzytometer Histogramm den sogenannten „sub-G₀-Peak“ und werden auch als „A₀-Zellen“ bezeichnet (46).

Versuchsansatz

Die Induktion von Apoptose erfolgte mit DMN in einer Konzentrationen von 2mM. Zur Kontrolle diente die Inkubation der Lymphozyten im Kulturmedium für Lymphozyten. Die Inkubationszeit betrug 24h und 60h, entsprechend den Empfehlungen von Nicoletti et al. Nach Bestätigung der Ergebnisse die von Nicoletti et al gefunden wurden, erfolgte der Apoptose-Nachweis entsprechend den eigenen Anforderungen mit DMN in einer Konzentration von 19,3mM bei 1h Inkubationszeit.

Färbeprozedur

Nach Aufbereitung, Induktion von Apoptose und Zellzahlermittlung wurden jeweils $5 \cdot 10^6$ Zellen in ein 12*75mm Falcon-Röhrchen gebracht und für 5min bei 1000Upm und 4°C mit Bremse zentrifugiert. Die Überstände wurden abgekippt, die Pellets in 500µl hypotoner DNA-Färbelösung resuspendiert, gut gemischt und 30min bei 4°C inkubiert. Bis zur Analyse im Durchflußzytometer wurden die Falcon-Röhrchen bei 4°C gelagert.

Auswertung

Die Auswertung der Proben erfolgte durchflußzytometrisch am FACS-SORT. Die Rotfluoreszenz des DNA-Farbstoffs konnte im FL2- oder FL3-Kanal analysiert werden. Die Verstärkung wurde dabei so gewählt, dass der DNA-Peak von normalen diploiden Zellkernen auf der logarithmischen Skala > 50 liegt. Zellereignisse in den Kanälen vor dem G_0 -Peak repräsentierten apoptotische Kerne. Der Prozentsatz an apoptotischen Zellen „sub- G_0 -Peak“ wurde anschließend durch Setzen von entsprechenden Markern bestimmt (Abb. 2.1. - 2.4.) Die Auswertung der Proben erfolgte durchflußzytometrisch am FACS-SORT (Siehe 3.1.1.1. - Abb. 3.3.).

Abbildung 2.1.

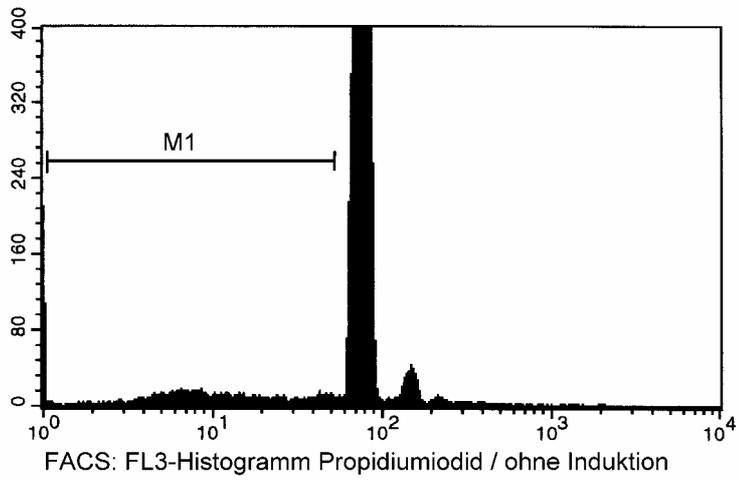


Abbildung 2.2.

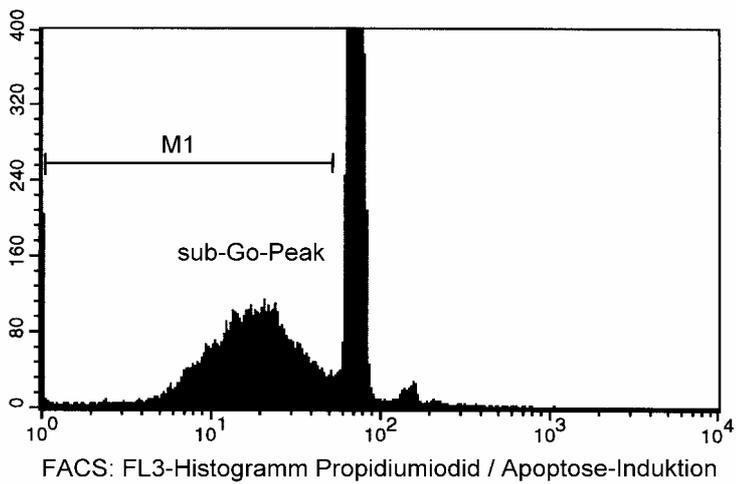
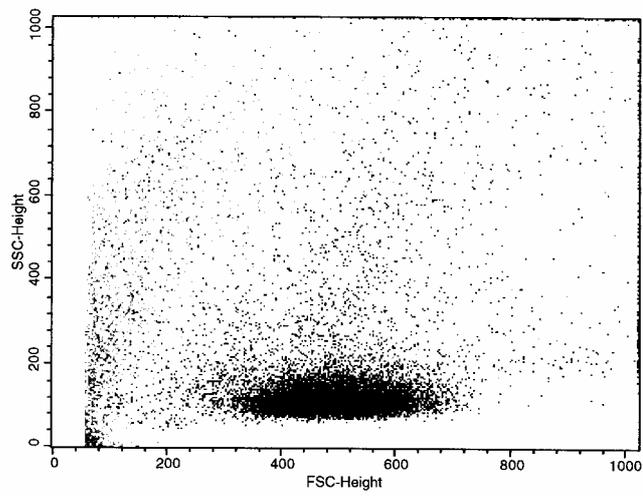
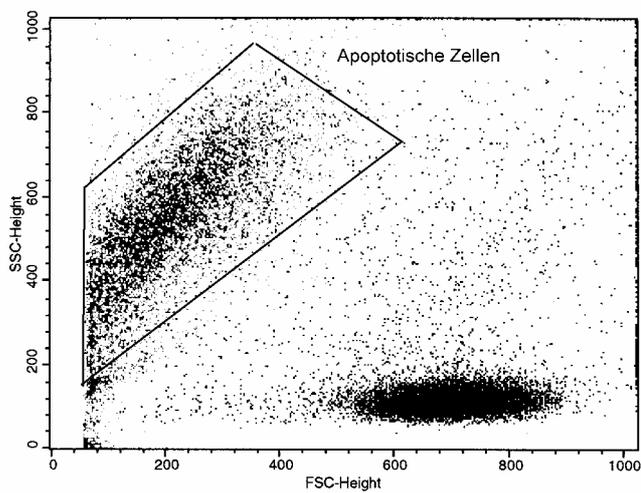


Abbildung 2.3.



FACS: "Dot Plot" - Darstellung / ohne Induktion

Abbildung 2.4.



FACS: "Dot Plot" - Darstellung / Apoptose Induktion

2.2.7.2. Einfluss der Inkubationsdauer auf Apoptose

Um einen Apoptose-Induktor zu finden, der Apoptose bei Lymphozyten in großem Maße auslöst, wurden Versuche in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer gemacht. Um zunächst wiederum einen Überblick über die Wirksamkeit der Apoptose-Induktoren zu bekommen, wurde erneut ein Trypanblau-Färbung zur Bestimmung der zeitabhängigen Viabilitäten durchgeführt.

Versuchsansatz

Die Induktion von Apoptose erfolgte mit DMN in den Konzentrationen 2mM und 19,3mM und mit Staurosporin in den Konzentrationen 1mM und 2mM. Die Inkubationszeiten betragen 1h, 6h, 8h und 12h (Siehe 3.1.1.2 – Abb. 3.4.).

Auswertung

Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse folgte die Untersuchung auf Apoptose mit dem Induktor DMN in der Konzentration 19,3mM bei einer Inkubationsdauer von 1h durch die simultane Färbung mit Annexin-V-FLUOS und Propidiumiodid (Siehe 3.1.1.2. – Abb. 3.5.).

2.2.7.3. Waschen apoptotischer Lymphozyten

Da der Apoptose-Induktor DMN nicht nur bei Lymphozyten, sondern bei allen Leukozyten, also auch bei Monozyten Apoptose induziert, wurde sicher gestellt, dass sich bei Koinkubation zwischen apoptotischen Lymphozyten und Monozyten kein Glukokortikoid mehr im Ansatz befand. Zu viele Waschschrte führten allerdings zu sehr hohem Zellverlust (Siehe 3.1.2.1.).

2.2.7.4. Färbung apoptotischer Lymphozyten

Ziel dieser Versuche war es, einen Farbstoff zu finden, welcher an apoptotisch zu Grunde gehende Lymphozyten so fest band, dass er weder ausgewaschen wurde, noch auf Grund des ablaufenden zellulären Todesprogramms von seiner Bindung frei kam. Nur so war eine sich anschließende sensitive durchflußzytometrische Analyse von durch Monozyten phagozytierten apoptotischen Lymphozyten zu gewährleisten. Zunächst wurden für Lymphozyten spezifische monoklonale Antikörper untersucht

(CD4 fluoreszenzmarkiert mit FITC oder PE, CD19 fluoreszenzmarkiert mit FITC oder PE) (Siehe 3.1.2.2.1.). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde ein das Zytoplasma färbender Farbstoff untersucht (Siehe 3.1.2.2.2.). Letztlich wurde ein die Nukleinsäuren anfärbender Farbstoff, Thiazolorange gefunden (Siehe 3.1.2.2.3.).

2.2.7.5. Stimulation der Phagozytose

Um die Möglichkeit ob Stimulation zu erhöhter Phagozytose führt zu untersuchen, also den Anteil phagozytischer Monozyten zu erhöhen, wurden Versuche mit den Stimulatoren LPS (100ng/ml) und FMLP (50µg/ml) (Siehe Tab. 6.8. im Anhang) durchgeführt (Siehe 3.1.2.4.).

2.2.7.6. Verhältnis von Monozyten zu apoptotischen Lymphozyten

Wie in eigenen Versuchen gefunden (Siehe 3.1.2.5.), so wird auch in der Literatur beschrieben, dass bei einem Verhältnis von 1:1 Monozyten zu phagozytischen Zellen, der Anteil phagozytischer Monozyten weit unter 10% liegt (30), weswegen wie in 2.2.7.5. beschrieben, versucht wurde diesen Anteil zu erhöhen. Demnach schlossen sich entsprechende Versuche an, die das Zahlenverhältnis zugunsten mehr zur Verfügung stehender apoptotischer Lymphozyten gegenüber den Monozyten untersuchten (Siehe 3.1.2.5.).

2.2.7.7. Einfluss der Inkubationsdauer auf Phagozytose

Zur Untersuchung des zeitlichen Einflusses der Phagozytoserate wurden Versuche mit Inkubationsdauern von 1, 4, 8 und 12 Stunden durchgeführt (Siehe 3.1.2.6.).

3. Ergebnisse

3.1. Methodische Vorversuche

3.1.1. Apoptose von Lymphozyten in vitro

3.1.1.1. Induktion von Apoptose und Apoptose-Nachweismethoden

Durch Zugabe verschiedener Induktoren wurde bei Lymphozyten Apoptose in vitro ausgelöst und mit verschiedenen Methoden nachgewiesen.

Trypanblau-Färbung zur Bestimmung der Viabilität

In diesem Versuchsansatz wurde Apoptose durch DMN in den Konzentrationen 2mM und 19,3mM sowie durch Staurosporin in den Konzentrationen 0,5 μ M und 1 μ M induziert. Als Kontrolle dienten die Lymphozyten, welche in Standard-Lymphozytenmedium kultiviert wurden. Die Inkubationsdauer betrug 6h.

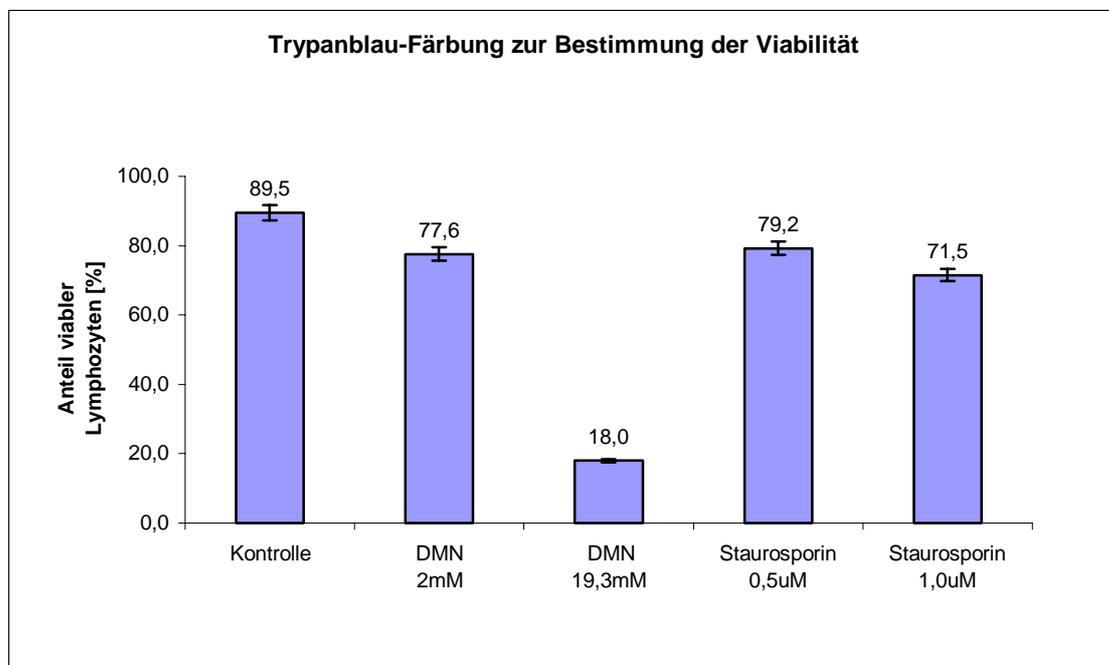


Abb. 3.1.: Anteil lebender Lymphozyten in Prozent, Lichtmikroskopische Ermittlung durch Auszählen von Zellen in der Neubauer-Zählkammer nach Trypanblau-Färbung, Inkubationsdauer 6h, Anzahl der buffy coats: n=2.

Vor Inkubation betrug die Viabilität 98,8%. Nach 6h fanden sich in der Kontrolle 89,5% viable Zellen. Im Ansatz mit niedriger Konzentration DMN 2mM waren 77,6%, im Ansatz hoher Konzentration DMN 19,3mM nur noch 18% viable Zellen zu finden. Bei Zugabe von 0,5 μ M Staurosporin waren 79,2% viabel, im höher konzentrierten Ansatz mit 1,0 μ M Staurosporin noch 71,5% der Lymphozyten.

Simultane Färbung mit Annexin-V-FLUOS und Propidiumiodid

Die Konzentrationsabhängigkeit der Induktion von Apoptose wurde durch DMN (10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1mM, 5mM, 10mM, 19,3mM) induziert. Als Kontrolle dienten die humanen Lymphozyten, welche in Standard-Lymphozytenmedium kultiviert wurden. Die Inkubationsdauer betrug 8h. Durch das gleichzeitige Färben mit Annexin-V-FLUOS und Propidiumiodid war es möglich, zwischen viablen, apoptotischen und nekrotischen Lymphozyten zu unterscheiden.

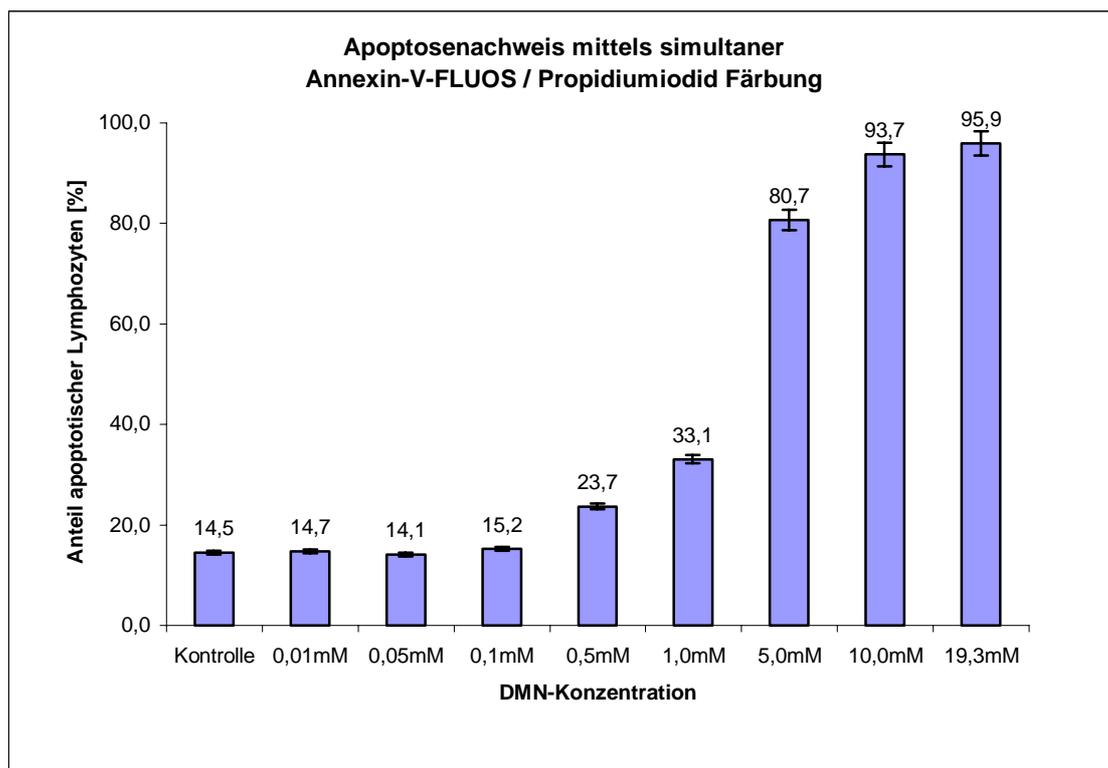


Abb. 3.2.: Anteil apoptotischer Lymphozyten in Prozent, n=15.000, Apoptose-Nachweis durchflußzytometrisch mittels gleichzeitiger Annexin-V-FLUOS und Propidiumiodid Färbung, Einfluss unterschiedlicher DMN-Konzentrationen, Inkubationsdauer 8h. Anzahl der buffy coats: n=2.

Nach der Inkubation zeigten 14,5% der Lymphozyten im Standard-Kulturmedium apoptotischen Zelluntergang. Zwischen den Konzentrationen von 0,01mM DMN (14,7%) und 0,1mM DMN (15,2%) konnte keine nennenswerte Steigerung der Apoptose-Rate gefunden werden. Bei einer Konzentration von 1mM DMN waren dann 33,1% apoptotisch. Ein deutlicher Anstieg fand sich bei 5mM mit 80,7%. Die höchste Induktion von Apoptose erfolgte durch Zugabe von 19,3mM DMN mit 95,9% der toten Lymphozyten.

DNA-Färbemethode nach Nicoletti:

Als weitere unabhängige Nachweismethode für apoptotische Lymphozyten, wurde die DNA-Färbemethode nach Nicoletti durchgeführt. Die Apoptose wurde ebenfalls durch DMN, in Konzentrationen von 2mM und 19,3mM induziert. Als Kontrolle dienten die humanen Lymphozyten, welche in Standard-Lymphozytenmedium kultiviert wurden. Es wurden Inkubationszeiten von 1h, 24h und 60h untersucht.

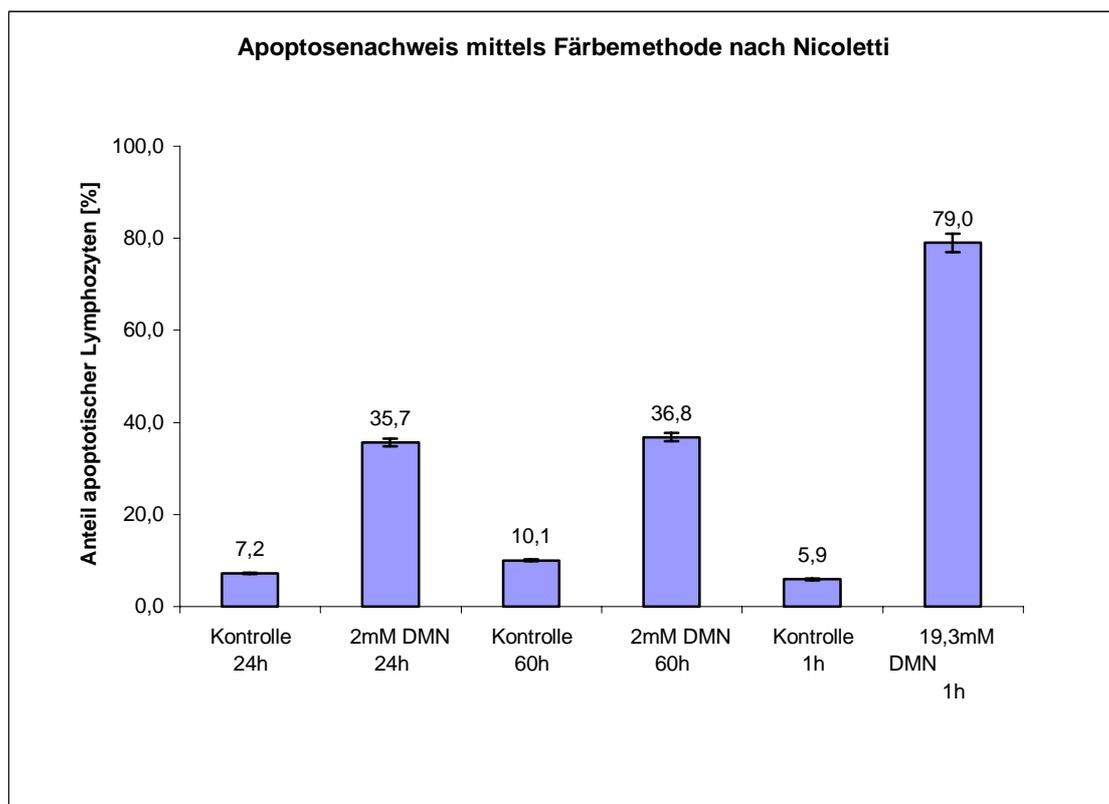


Abb. 3.3.: Anteil apoptotischer Lymphozyten in Prozent, n=25.000, Apoptose-Nachweis durchflußzytometrisch mittels DNA-Färbemethode nach Nicoletti, Vergleich von Kontrolle und Ansätzen mit Induktion von Apoptose über die Zeit. Anzahl der buffy coats: n=3.

In der Kontrolle fanden sich nach 24h 7,2% spontan apoptotisch gewordene Zellen gegenüber 10,1% nach 60h. Bei Induktion von Apoptose fanden sich nach 24h Inkubation 35,6% und nach 60h 36,8% apoptotische Lymphozyten. Es ist somit nur eine geringe Zunahme der Apoptose-Rate über die Zeit festzustellen. Bei Erhöhung der DMN Konzentration auf 19,3mM ergab sich nach 1h ein Anteil von 79,0% apoptotischer Lymphozyten gegenüber der Kontrolle mit einem Anteil von 5,9%.

Zusammenfassung

Apoptose bei Lymphozyten lässt sich sowohl mit DMN als auch mit Staurosporin in vitro induzieren. In der verwendeten Dosierung war DMN der potentere Apoptose-Induktor. Als weiterer Einflussfaktor wurde die Inkubationsdauer genauer untersucht. Dieser Faktor war für die Etablierung des Phagozytose Assays von Bedeutung.

3.1.1.2. Einfluss der Inkubationsdauer auf Induktion von Apoptose

Die Lymphozyten wurden unter Induktion von Apoptose mit DMN und Staurosporin nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mittels Trypanblaufärbung auf Viabilität untersucht.

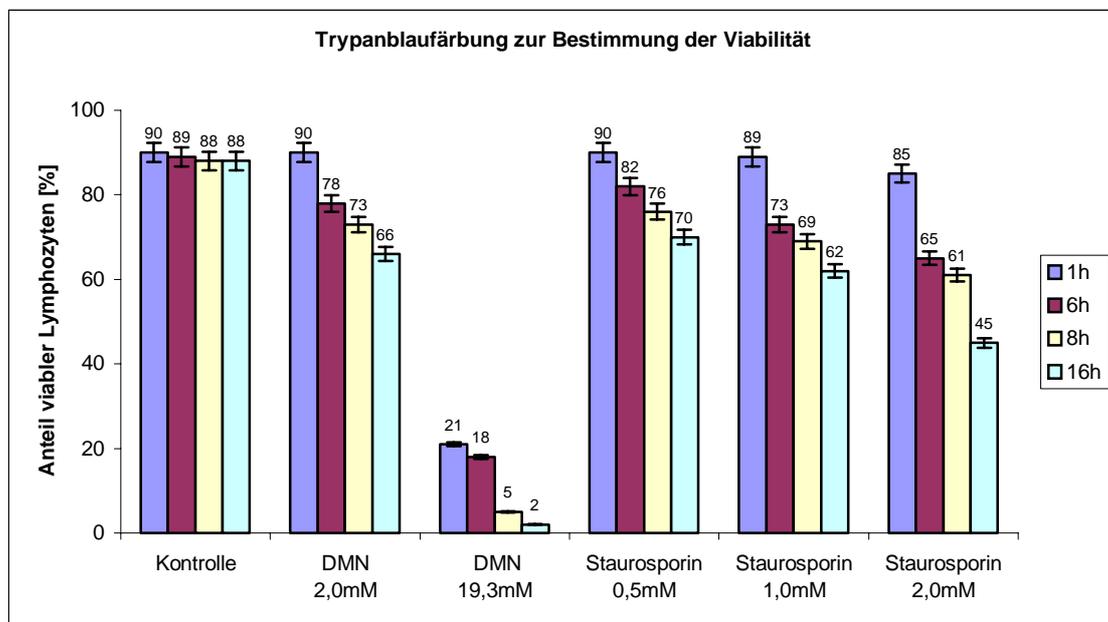


Abb. 3.4.: Anteil viable Lymphozyten in Prozent, Lichtmikroskopische Ermittlung durch Auszählen der Neubauer-Zählkammer nach Trypanblau-Färbung, Vergleich von Kontrolle und Ansätzen mit Induktion von Apoptose über die Zeit. Anzahl der buffy coats: n=3.

Vor Inkubation betrug die Viabilität 97,7%. Nach einer Inkubationszeit von nur 1h zeigte sich bei Inkubation mit DMN in der Konzentration 19,3mM eine erhebliche Abnahme der Viabilität auf 21%, nach 6h auf 18%, nach 8h auf 5% bis zum niedrigsten Wert nach 16h auf 2%. Die Inkubation mit Staurosporin in hoher Konzentration von 2mM ergab nach 1h noch 85% viable Lymphozyten, nach 6h konnten 65%, nach 8h noch 61% und nach 16h Inkubation 45% viable Lymphozyten gefunden werden. In der Kontrolle zeigte sich nach 1h eine Viabilität von 90%, die sich über die Zeit nicht weiter veränderte.

Auf Grund dieser Ergebnisse folgte die Untersuchung auf Apoptose mit dem Induktor DMN in der Konzentration 19,3mM bei einer Inkubationszeit von 1h durch die simultane Färbung mit Annexin-V-FLUOS und Propidiumiodid.

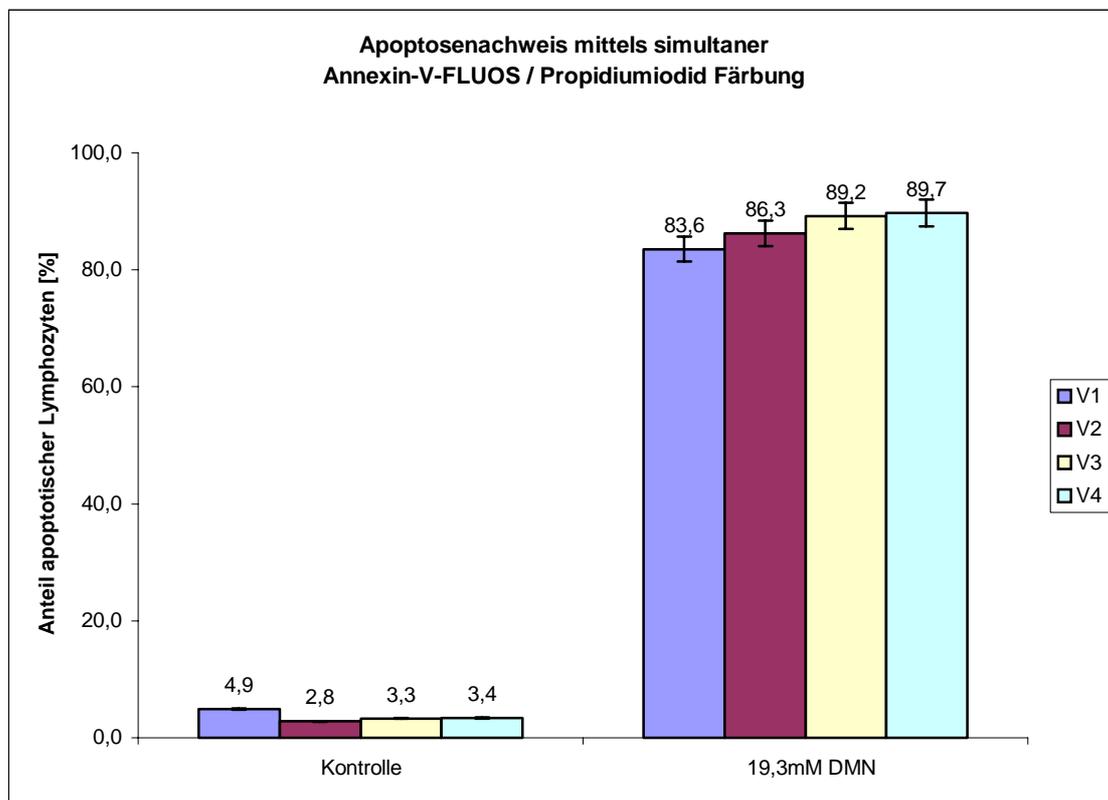


Abb. 3.5.: Anteil apoptotischer Lymphozyten in Prozent, n=20.000, Apoptose-Nachweis durchflußzytometrisch mittels gleichzeitiger Annexin-V-FLUOS und Propidiumiodid Färbung, Vergleich von DMN zur Kontrolle, Inkubationsdauer 1h, Dargestellt sind Ergebnisse aus vier Versuchen.

In vier unabhängigen Versuchen ergaben sich in den Kontrollen nach 1h Inkubation spontane Apoptose-Raten durch spontane Apoptose zwischen 3,4% und 4,9%. Im Ansatz mit Induktion von Apoptose fanden sich zwischen 83,6% und 89,7% apoptotische Lymphozyten.

Zusammenfassung

Apoptose bei Lymphozyten lässt sich nach einer Inkubationszeit von 1h am besten mit DMN in einer Konzentration von 19,3mM induzieren. Diese Inkubationszeit und die Konzentration wurden gewählt, um den Phagozytose Assay zu etablieren. Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse wurde eine Apoptose-Rate von > 75% nach 1h Inkubation mit DMN 19,3mM für weitere Versuche angenommen und durch Trypanblau-Färbungen die Viabilitätsrate in diesen Versuchen überprüft.

3.1.2. Phagozytose apoptotischer Lymphozyten in vitro

3.1.2.1. Waschen apoptotischer Lymphozyten

Auf Grund der Induktion von Apoptose durch DMN und der Zusammenführung der zuvor getrennten Lymphozyten und Monozyten zur Kokultur, wurde sicher gestellt, dass sich kein DMN mehr im Lymphozytenansatz befand, um die Induktion von Apoptose auch bei Monozyten zu verhindern. Mehrere Versuche dienten dazu, die Anzahl der notwendigen Waschschrte zu bestimmen. Bei einer geringen Anzahl von Waschschrten verblieben größere Mengen DMN im Ansatz, was zur Schädigung der Monozyten führte. Zu häufiges Waschen führte zum Verlust von Lymphozyten. Es konnten drei Waschschrte als optimale Anzahl ermittelt werden.

3.1.2.2. Färbung apoptotischer Lymphozyten

In der Literatur sind keine Erfahrungswerte für Farbstoffe zu finden, die den versuchsspezifischen Anforderungen, von durch Monozyten phagozytierte gefärbte apoptotischen Lymphozyten, durchflußzytometrisch analysiert, entsprechen. Die Eignung des Farbstoffes musste deshalb selbst ermittelt werden. Folgende Farbstoffe wurden gewählt und entsprechend untersucht:

- 3.1.2.2.1. Monoklonale Antikörper gegen Lymphozyten-Antigene
- 3.1.2.2.2. Anfärbung des Zytoplasmas durch Calcein-AM
- 3.1.2.2.3. Anfärbung der Nukleinsäuren durch Thiazolorange

3.1.2.2.1. Monoklonale Antikörper gegen Lymphozyten-Antigene

Die an Antigene der Lymphozytenzellmembran „haftende“ monoklonalen Antikörper, bleiben bei apoptotisch zu Grunde gehenden Zellen nicht gebunden und werden ausgewaschen. Zudem beeinflussen anhaftende Antikörper die Phagozytenaktivität. Phagozytose apoptotischer Zellen durch Monozyten mittels monoklonaler Antikörper auf Lymphozyten konnte nicht nachgewiesen werden.

3.1.2.2.2. Anfärbung des Zytoplasmas durch Calcein-AM

Calcein-AM wird in lebenden Zellen durch intrazelluläre Esterasen zu einem fluoreszierenden membranimpermeablen Farbstoff gespalten. Dieser intrazelluläre Farbstoff gelangt bei apoptotisch zu Grunde gehenden Zellen nach extrazellulär und wird von viablen Monozyten aufgenommen. Als sensitiver Farbstoff für phagozytierte apoptotische Lymphozyten war Calcein-AM somit nicht verwendbar.

3.1.2.2.3. Anfärbung der Nukleinsäuren durch Thiazolorange

Thiazolorange färbt die Nukleinsäuren von lebenden und toten Zellen irreversibel, d.h. Thiazolorange bleibt auch bei apoptotisch zu Grunde gehenden Zellen gebunden. Nach Auswaschen des nichtgebundenen Farbstoffes und titrieren der notwendigen Farbstoffmenge war es möglich Phagozytose von apoptotischen Lymphozyten durch Monozyten durchflußzytometrisch nachzuweisen.

3.1.2.3. Durchflußzytometrische Analyse

Die Apoptose der Lymphozyten wurde mit DMN in einer Konzentration von 19,3mM und einer Inkubationszeit von 1h induziert, anschließend wurden die apoptotischen Zellen mit Thiazolorange gefärbt. Nach Zusammenbringen der Monozyten und Lymphozyten, wurde 12h inkubiert. Zur Kontrolle diente die Inkubation der Lymphozyten im Standard-Lymphozytenmedium, welche in gleicher Weise mit Thiazolorange gefärbt und nach kokultivieren mit Monozyten im Standard-Monozytenmedium inkubiert wurde.

3.1.2.4. Stimulation der Phagozytose

Anders als in der Literatur beschrieben konnte durch LPS keine Stimulation der Phagozytose durch Monozyten nachgewiesen werden. Durch FMLP konnte die Phagozytose sowohl in der Kontrolle, als auch im Ansatz mit Induktion von Apoptose gesteigert werden. Eine bessere Differenzierung und Aussagekraft konnte jedoch nicht gezeigt werden, weswegen im weiteren auf eine Stimulation verzichtet wurde.

3.1.2.5. Verhältnis Monozyten zu apoptotischen Lymphozyten

Da bei einem Verhältnis 1:1 von Monozyten zu apoptotischen Zellen, der Anteil phagozytischer Monozyten weit unterhalb von 10% liegt, wurde als nächstes die Zahl der Lymphozyten nach Induktion von Apoptose, Waschschritten und Färbung ermittelt und mit der Zahl zur Verfügung stehender Monozyten verglichen um einen höheren Anteil phagozytischer Monozyten zu finden.

Bei Aufarbeitung der Buffy Coats wurden zur Adhärenz $1 \cdot 10^7$ PBMC pro Kulturschale gegeben. Nach Behandlung waren $1,3 \cdot 10^6$ apoptotische Lymphozyten vorhanden, die mit $1 \cdot 10^6$ Monozyten kokultiviert wurden. Beim Verhältnis 1:1,3 zeigte sich keine deutliche Zunahme der Phagozytose. Daher wurden Versuche mit den Verhältnissen 1:3,9 und 1:6,5 Monozyten zu Lymphozyten durchgeführt.

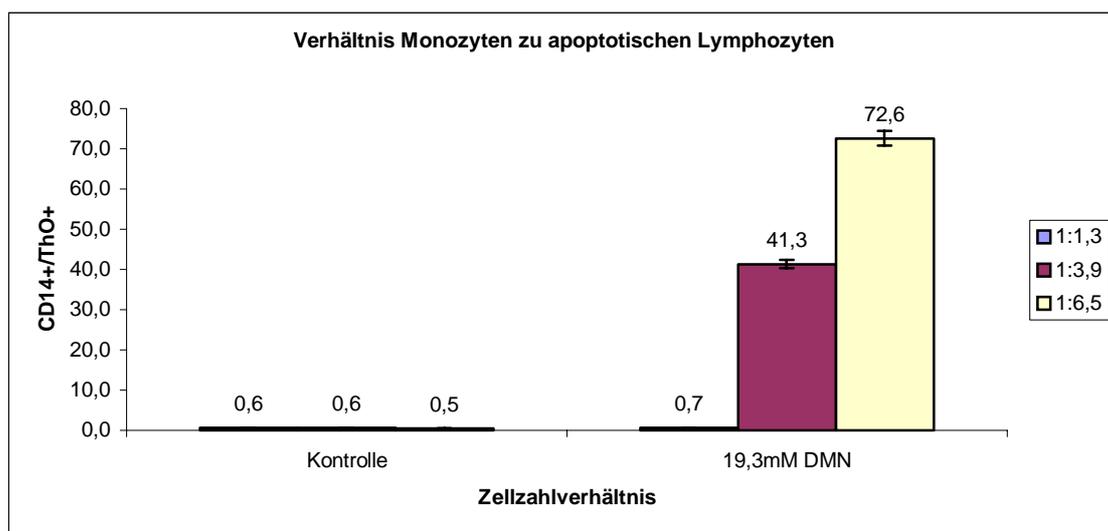


Abb. 3.7.a.: Durchflußzytometrische Analyse von Monozyten nach Phagozytose von durch DMN induzierter Apoptose bei Lymphozyten im Vergleich zur Kontrolle, $n=10.000$. Der Parameter CD14+/ThO+ beschreibt Zellen, die mit Monozyten spezifischem monoklonalem Antikörper [CD14] markiert sind und Thiazolorange aufgenommen haben. Des Weiteren sind drei unterschiedliche Verhältnisse von Monozyten zu apoptotischen Lymphozyten dargestellt, Verhältnis 1:1,3 Verhältnis 1:3,9 und Verhältnis 1:6,5. Phagozytoseinkubationszeit 12h.

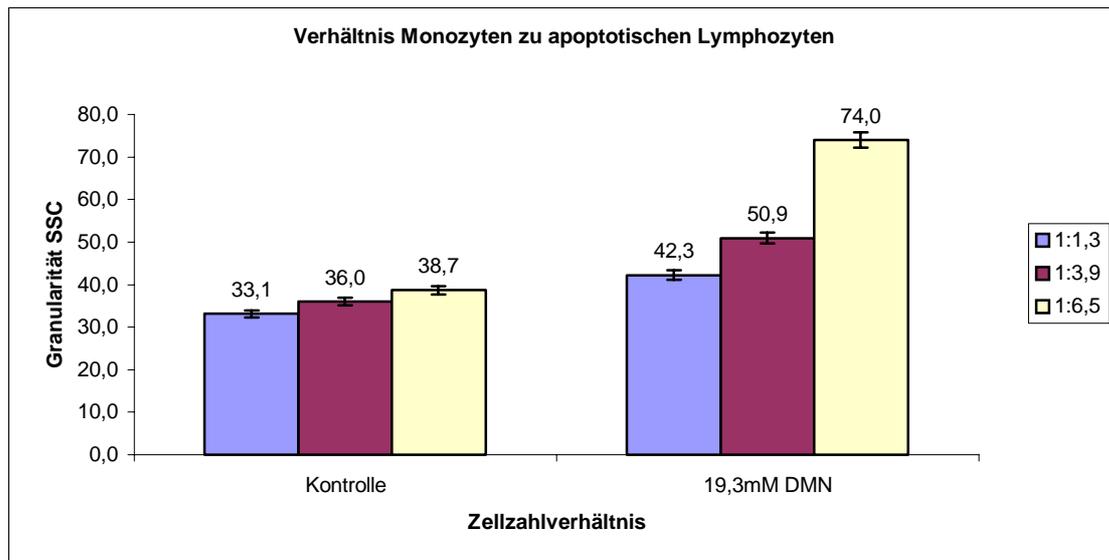


Abb. 3.7.b.: Durchflußzytometrische Analyse von Monozyten nach Phagozytose von durch DMN induzierter Apoptose bei Lymphozyten im Vergleich zur Kontrolle, n=10.000, Der Parameter Granularität SSC beschreibt den Granularitätsgehalt der Monozyten. Des weiteren sind drei unterschiedliche Verhältnisse von Monozyten zu apoptotischen Lymphozyten dargestellt, Verhältnis 1:1,3 Verhältnis 1:3,9 und Verhältnis 1:6,5. Phagozytoseinkubationszeit 12h.

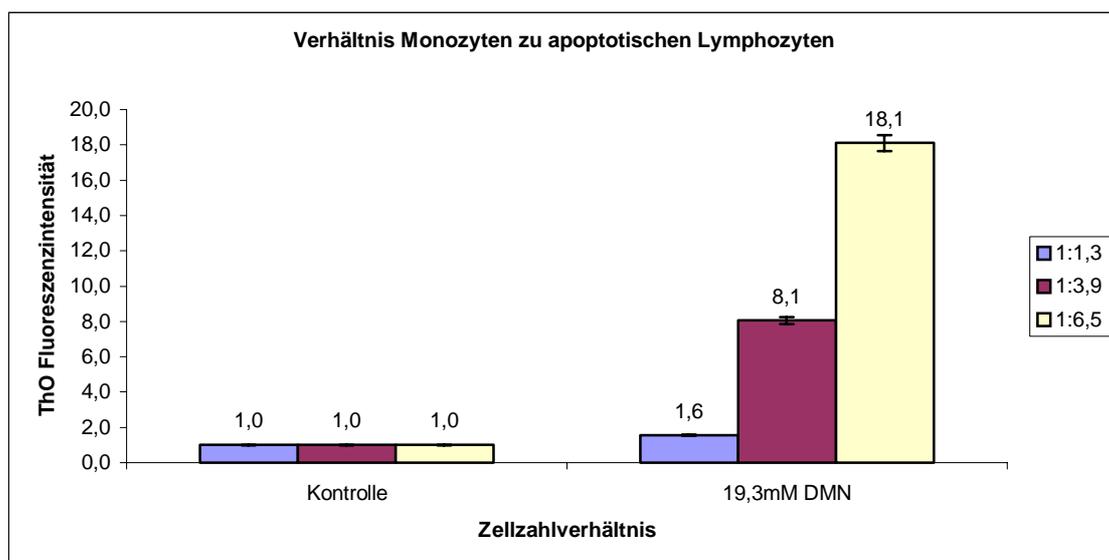


Abb. 3.7.c.: Durchflußzytometrische Analyse von Monozyten nach Phagozytose von durch DMN induzierter Apoptose bei Lymphozyten im Vergleich zur Kontrolle, n=10.000, Der Parameter ThO Fluoreszenzintensität beschreibt die Fluoreszenzintensität der Monozyten. Des weiteren sind drei unterschiedliche Verhältnisse von Monozyten zu apoptotischen Lymphozyten dargestellt, Verhältnis 1:1,3 Verhältnis 1:3,9 und Verhältnis 1:6,5. Phagozytoseinkubationszeit 12h.

Der Parameter CD14 positiv / Thiazolorange positiv (Abb. 3.7.a.) beschreibt Zellen, die mit Monozytenspezifischem Antikörper [CD14] markiert sind und Thiazolorange aufgenommen haben. Der Parameter Granularität SSC (Abb. 3.7.b.) beschreibt den Granularitätsgehalt der Monozyten. Der Parameter ThO Fluoreszenzintensität (Abb. 3.7.c.) beschreibt die Fluoreszenz-Intensität der Monozyten.

Vergleicht man die Verhältnisse miteinander kommt man zu folgenden Ergebnissen:

Der Parameter CD14 positiv / Thiazolorange positiv zeigte beim Verhältnis 1:1,3 keine deutliche Zunahme der Phagozytose (0,6% bei der Kontrolle und 0,7% im Ansatz mit Induktion von Apoptose). Beim Verhältnis 1:6,5 phagozytierten 72,6% der Monozyten apoptotische Zellen, in der Kontrolle nur 0,5%.

Der Parameter Granularität SSC zeigte beim Verhältnis 1:1,3 eine Zunahme von 33,1% bei der Kontrolle, auf 42,3% beim Ansatz mit Induktion von Apoptose und beim Verhältnis 1:6,5 von 38,7% bei der Kontrolle auf 74,0% bei Monozyten die apoptotische Lymphozyten phagozytiert haben.

Beim Verhältnis 1:1,3 war der Parameter ThO Fluoreszenzintensität bei der Kontrolle 1%, im Ansatz mit Induktion von Apoptose 1,6%, im Vergleich beim Verhältnis 1:6,5 konnte man eine Zunahme von 1% bei der Kontrolle auf 18,1% bei den apoptotischen Lymphozyten feststellen.

Bereits bei einem Verhältnis von 1:3,9 Monozyten zu apoptotischen Lymphozyten zeigten sich höhere Phagozytoseraten als beim Verhältnis 1:1,3. Am höchsten war die Phagozytoserate aber bei einem Verhältnis von 1:6,5.

Um zu beweisen, dass nicht nur der Farbstoff Thiazolorange, sondern Apoptose-induzierte Lymphozyten phagozytiert wurden, folgten Versuche ohne die Färbung mit Thiazolorange. Hier lag die Granularität der Kontrolle bei 37,9%, im Ansatz von durch DMN apoptotisch gewordenen Lymphozyten bei 51,3%.

Zusammenfassung

Die Versuche zur Bestimmung des optimalen Verhältnisses zwischen Monozyten und apoptotischen Zellen ergaben beim Verhältnis 1:3,9 erhöhte und beim Verhältnis 1:6,5 noch höhere Phagozytoseraten. Auf Grund der limitierten und zum Teil sehr unterschiedlichen Anzahl zur Verfügung stehender Zellen in einem Buffy Coat, musste jedoch ein Verhältnis von 1:5,2 gewählt werden, um den Einfluss künstlicher Kolloide auf die Phagozytose Apoptose-induzierter humaner Lymphozyten durch humane Monozyten in vitro untersuchen zu können.

Zusätzlich zu den durchflußzytometrischen Phagozytosenachweisen wurde die Phagozytose apoptotischer Zellen auch mittels fluoreszenz- (durch DAPI-Färbung, Siehe 2.2.4. und Abb. 6.1. + 6.2. im Anhang) und lichtmikroskopischen Bildern (mittels Hämalaun-Eosin-Färbung, Siehe 2.2.5. und Abb. 6.3. - 6.6. im Anhang) nachgewiesen, in welchen sich zusätzliches Kernmaterial im Zytoplasma fand.

3.1.2.6. Einfluss der Inkubationsdauer auf Phagozytose

Als weitere Variable mit Einfluss auf die Phagozytose wurde die Dauer der Koinkubation von Monozyten und gefärbten, apoptotischen Lymphozyten untersucht.

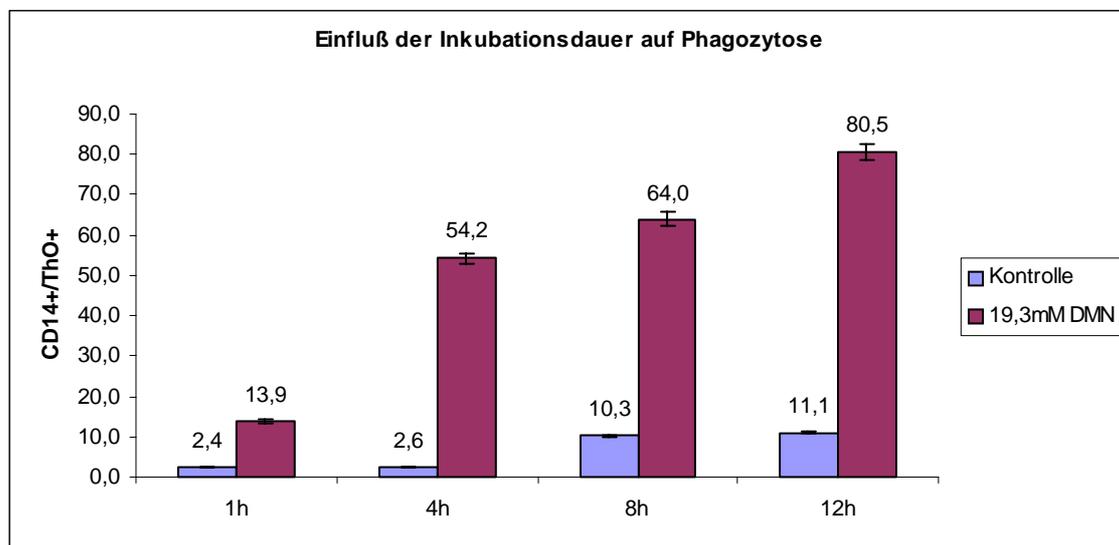


Abb. 3.8.a.: Durchflußzytometrische Analyse von Monozyten nach Phagozytose von durch DMN induzierter Apoptose bei Lymphozyten im Vergleich zur Kontrolle über die Zeit, n=5.000. Der Parameter CD14+/ThO+ beschreibt Zellen, die mit Monozyten spezifischem monoklonalem Antikörper [CD14] markiert sind und Thiazolorange aufgenommen haben.

Der Parameter CD14 positiv / Thiazolorange positiv zeigte nach 1h einen Anstieg der Phagozytose von 2,4% bei der Kontrolle auf 13,9% beim Ansatz mit Induktion von Apoptose und nach 4h von 2,6% auf 54,2%. Nach 12h hatten 11,1% der Monozyten in der Kontrolle und 80,5% der Monozyten im Ansatz mit Induktion von Apoptose apoptotische thiazolorangegefärbte Lymphozyten phagozytiert.

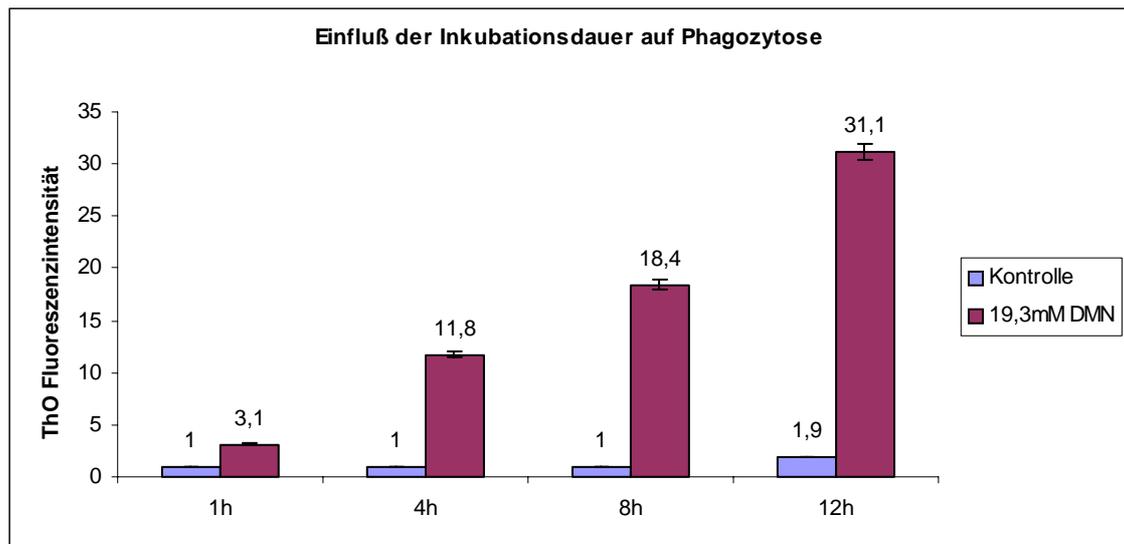


Abb. 3.8.b.: Durchflußzytometrische Analyse von Monozyten nach Phagozytose von durch DMN induzierter Apoptose bei Lymphozyten im Vergleich zur Kontrolle über die Zeit, n=5.000. Der Parameter ThO Fluoreszenzintensität beschreibt die Fluoreszenzintensität der Monozyten.

Die Fluoreszenzintensität der Kontrolle blieb nach 1h, 4h und 8h unverändert bei 1%, nach 12h stieg sie auf 1,9%. Im Ansatz mit apoptotischen Lymphozyten stieg die Fluoreszenzintensität nach 8h auf 18,4% und nach 12h auf 31,1% an.

Zusammenfassung

Phagozytose von durch DMN induzierter Apoptose bei Lymphozyten durch Monozyten, fand sich bereits nach 1h Phagozytoseinkubationszeit. Nach 12h Inkubation wurde maximale Phagozytose beobachtet. Zur Untersuchung des Einflusses künstlicher Kolloide auf die Phagozytose humaner Lymphozyten nach Induktion von Apoptose, durch humane Monozyten in vitro, wurde die Inkubationsdauer von 12h gewählt.

3.2. Einfluss künstlicher Kolloide auf die Phagozytose apoptotischer humaner Lymphozyten durch humane Monozyten in vitro

Monozyten wurden nach Inkubation in Kulturmedium mit zwei Kolloidkonzentrationen (5mg/ml, 20mg/ml) und zur Kontrolle im Standard-Kulturmedium auf Phagozytose untersucht.

Parameter CD14+ / ThO+

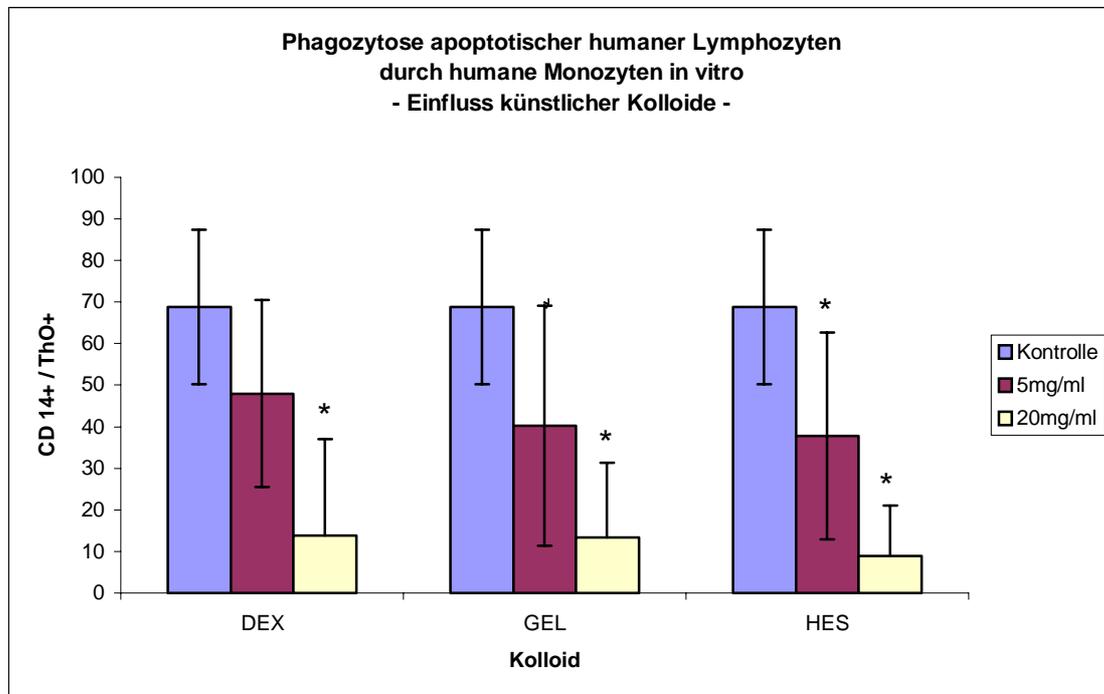


Abb. 3.9.: Anteil von Monozyten nach Phagozytose von durch DMN induzierter Apoptose bei Lymphozyten, Nachweis durchflußtometrisch mittels des Parameters CD14+/ThO+; Inkubation der Kolloidkonzentrationen 5mg/ml und 20mg/ml im Vergleich zur Kontrolle ohne Kolloid; Anzahl der Buffy Coats: n=6; Anzahl ausgewerteter Zellen: n=10.000.

Nach der Inkubation im Standard-Kulturmedium waren 68,8% der Monozyten CD14+ / ThO+. Alle drei künstlichen Kolloide (DEX, GEL, HES) reduzierten den Anteil phagozytischer Monozyten. Der Effekt war jeweils konzentrationsabhängig zu beobachten.

Signifikant war der Rückgang bei HES in einer Konzentration von 5mg/ml und bei allen Kolloiden in einer Konzentration von 20mg/ml zu beobachten.

Im direkten Vergleich, fand sich die stärkste Reduktion durch HES auf 8,9%, die schwächste Reduktion durch DEX auf 13,9% CD14+/ThO+ Zellen (Siehe Tab. 6.13.).

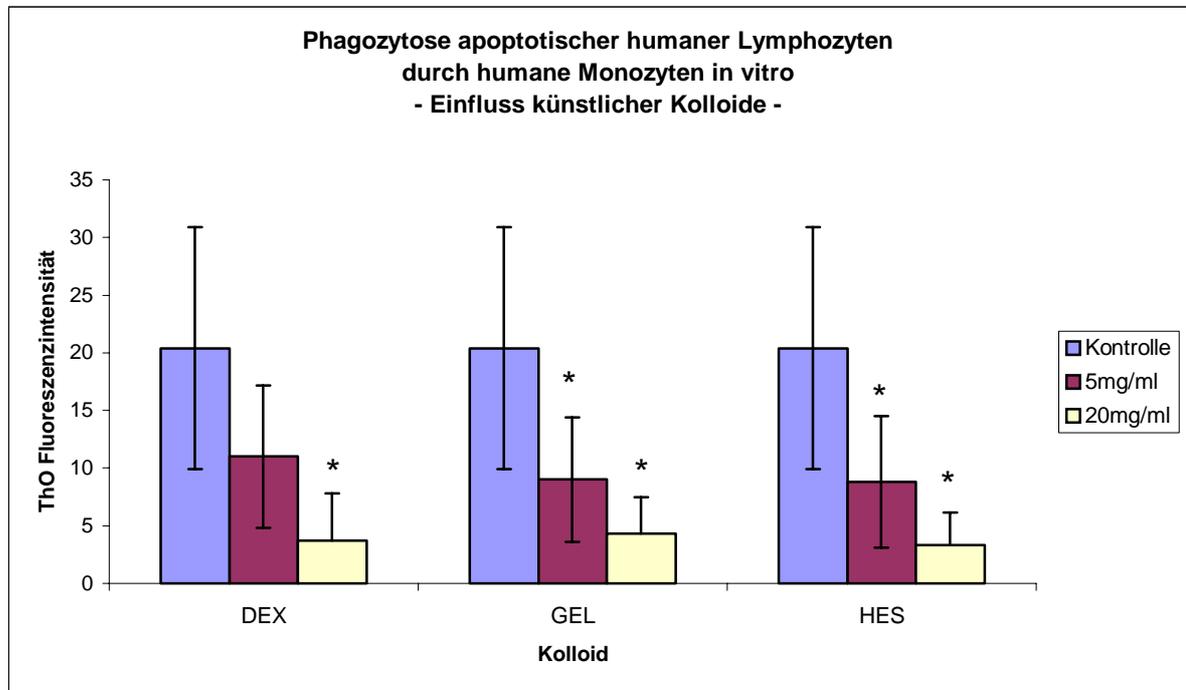
Parameter Fluoreszenzintensität:

Abb. 3.10.: Anteil von Monozyten nach Phagozytose von durch DMN induzierter Apoptose bei Lymphozyten, Nachweis durchflußtommetrisch mittels des Parameters ThO Fluoreszenzintensität; Inkubation der Kolloidkonzentrationen 5mg/ml und 20mg/ml im Vergleich zur Kontrolle ohne Kolloid; Anzahl der Buffy Coats: n=6; Anzahl ausgewerteter Zellen: n=10.000.

Nach der Inkubation im Standard-Kulturmedium zeigten 20,4% der Zellen eine nachweisbare ThO Fluoreszenzintensität. Alle drei künstlichen Kolloide (DEX, GEL, HES) reduzierten den Anteil phagozytischer Monozyten. Der Effekt war jeweils konzentrationsabhängig zu beobachten.

Signifikant war der Rückgang bei GEL und HES in einer Konzentration von 5mg/ml und bei allen Kolloiden in einer Konzentration von 20mg/ml zu beobachten.

Im direkten Vergleich, fand sich die stärkste Reduktion durch HES auf 3,3% der Zellen und die schwächste Reduktion durch GEL auf 4,3% Zellen mit nachweisbarer ThO Fluoreszenzintensität (Siehe Tab. 6.14.).

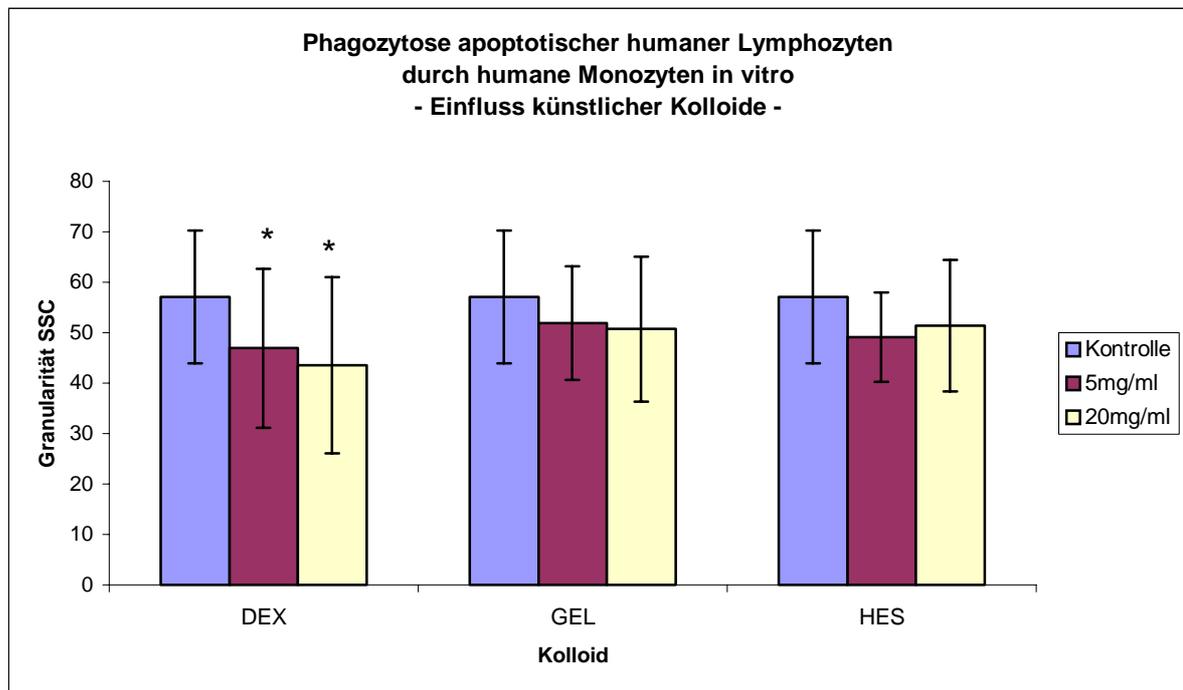
Parameter Granularität SSC:

Abb. 3.11.: Anteil von Monozyten nach Phagozytose von durch DMN induzierter Apoptose bei Lymphozyten, Nachweis durchflußtomtrisch mittels des Parameters Granularität SSC; Inkubation der Kolloidkonzentrationen 5mg/ml und 20mg/ml im Vergleich zur Kontrolle ohne Kolloid; Anzahl der Buffy Coats: n=6; Anzahl ausgewerteter Zellen: n=10.000.

Nach der Inkubation im Standard-Kulturmedium betrug die Granularität SSC der Monozyten 57,1%. Alle drei künstlichen Kolloide (DEX, GEL, HES) reduzierten den Anteil phagozytischer Monozyten. Der Effekt war konzentrationsabhängig zu beobachten. Signifikant war der Rückgang bei DEX sowohl in einer Konzentration von 5mg/ml, als auch in einer Konzentration von 20mg/ml (Siehe Tab. 6.15.).

Aufgenommene Kolloide beeinträchtigen die Auswertbarkeit des Parameters Granularität SSC (Siehe 4.2.).

Zusammenfassung

Als Einfluss der künstlichen Kolloide (DEX, GEL, HES) auf das Phagozytoseverhalten humaner Monozyten von durch DMN induzierter Apoptose bei Lymphozyten in vitro, konnte bei steigender Konzentration der Kolloide in allen Fällen eine Reduktion der Phagozytose gezeigt werden. Signifikant war die Reduktion durch HES sowohl bei einer Konzentration von 5mg/ml als auch bei 20mg/ml, bei DEX und GEL jeweils nur bei einer Konzentration von 20mg/ml.

4. Diskussion

Da die künstlichen Kolloide durch Aufrechterhaltung des Kolloid-Osmotischen-Druckes das Volumen im intravasalen Raum gebunden halten, sind sie heutzutage, neben den kristalloiden Lösungen, welche primär den Flüssigkeitshaushalt ausgleichen und den Erhaltungsbedarf decken, ein wesentlicher Bestandteil des Volumenmanagements. Sie kommen bei der Behandlung von Trauma, Schock und Sepsis zur Anwendung. Sie sind im Gegensatz zu den Humanalbumin-Präparaten unbegrenzt verfügbar, virussicher und relativ kostengünstig (14, 17).

Eine Speicherung künstlicher Kolloide wurde beim Menschen in Zellen des mononukleär-phagozytären Systems *in vitro* (31) und *in vivo* (5, 13) nachgewiesen. In welcher Weise dadurch Zellen des mononukleär-phagozytären Systems in ihrer Funktion beeinflusst werden ist noch nicht geklärt. *In vitro* Befunde beschreiben sowohl eine Veränderung der monozytären Oberflächenantigen-Expression, als auch eine Verminderung der Phagozytosekapazität (16). Andererseits wird ein verlängertes Überleben von Monozyten unter Einfluss von HES *in vitro* beschrieben, eine Ursache dafür ist jedoch noch nicht identifiziert (71).

Apoptose ist ein fein regulierter physiologischer Mechanismus, der durch die Zelle selbst oder durch Induktion über einen signalgebenden Mechanismus ausgelöst werden kann (2, 8, 65, 82). Besonders wichtig ist Apoptose im Verlauf des Ausreifens des Immunsystems (57), sowie dem Abtöten von Immunzellen, das durch Glukokortikoide (66, 89) oder bestimmte Zytokine vermittelt wird (18). Über eine Reihe verschiedener Erkennungsmechanismen können Makrophagen und Monozyten apoptotisch zugrunde gehende Lymphozyten identifizieren und durch Phagozytose beseitigen (12, 18, 20, 22, 41, 51, 53, 60, 61, 86).

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss der künstliche Kolloide auf die Phagozytose nach Induktion von Apoptose bei humanen Lymphozyten durch humane Monozyten *in vitro*, sowie die Abhängigkeit von Art und Konzentration des applizierten Kolloids.

4.1. Methodische Vorversuche

4.1.1. Apoptose von Lymphozyten in vitro

4.1.1.1. Induktion von Apoptose und Apoptose-Nachweismethoden

Apoptose wurde durch Zugabe von zwei Induktoren bei humanen Lymphozyten in vitro ausgelöst und durch verschiedene etablierte Methoden nachgewiesen. Als Apoptose-Induktor diente zum einen Staurosporin (6), ein Proteinkinase C Hemmer und zum anderen das Glukokortikoid (20, 66, 89) Dexamethason-21-dihydrogen-phosphat (DMN). Es konnte eine zuverlässige Induktion von Apoptose bei humanen Lymphozyten in vitro gezeigt werden (Siehe 3.1.1.1. und Abb. 3.2. + Abb. 3.3.).

Um einen Überblick über die Wirksamkeit der Apoptose-Induktoren zu gewinnen, erfolgte der Nachweis von Apoptose zunächst durch Viabilitätsbestimmungen mit Trypanblau-Färbung (20, 45). Des weiteren wurde die simultane Färbung mit Annexin-V-FLUOS und Propidiumiodid (36, 38, 84, 86), sowie eine DNA-Färbemethode nach Nicoletti et al (46) angewandt, um Apoptose nachzuweisen. Der Färbung der DNA, welche bei Apoptose charakteristischer Weise in mono- und oligonukleosomale Untereinheiten fragmentiert, liegt die Auswertung des sich auf Grund des Verlustes der LMW-DNA bildenden „sub-G₀-Peak“ zu Grunde, welche auch von anderen Autoren beschrieben wird (11, 33, 45, 74, 75).

Die unterschiedlichen Nachweismethoden zeigten gute Korrelation im Sinne der Induktion von Apoptose. Abweichungen sind unter anderem auf das zeitlich sehr unterschiedliche Auftreten, des mit der jeweiligen Methode nachgewiesenen Stadiums der Apoptose, zurückzuführen.

Auf Grund der relativ langen Inkubationszeiten beim Nachweis von Apoptose mittels der DNA-Färbemethode nach Nicoletti et al, mit 24 und 60 Stunden, wurde die simultane Färbung mit Annexin-V-FLUOS und Propidiumiodid, mit 1 und 8 Stunden Inkubationsdauer, für die weiteren Untersuchungen gewählt. DMN schien bei den untersuchten Konzentrationen Staurosporin in der Potenz der Induktion von Apoptose überlegen zu sein, was sich auch nach Untersuchung der Inkubationsdauer bestätigte.

4.1.1.2. Einfluss der Inkubationsdauer auf Induktion von Apoptose

Ziel der Untersuchung zum Einfluss der Inkubationsdauer auf Induktion von Apoptose war es, eine möglichst kurze Inkubationsdauer eines Apoptose-Induktors zu finden, damit der sich anschließende Phagozytoseansatz frühzeitig beginnen und einem spontanem Viabilitätsverlust der Monozyten begegnet werden konnte. Apoptose bei humanen Lymphozyten ließ sich bereits nach 1h am besten mit DMN in der Konzentration 19,3mM induzieren, wodurch bei einem Anteil von 79,0% der humanen Lymphozyten Apoptose induziert wurde. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen anderer Autoren, die bei Induktion von Apoptose mit Glukokortikoiden ebenfalls Apoptose bei humanen Lymphozyten erreichten (66, 89), allerdings bei einer Konzentration von 1µM DMN, nach 6h Inkubation einen Anteil von nur 49,5% apoptotischen Lymphozyten fanden (89).

4.1.2. Phagozytose apoptotischer Lymphozyten in vitro

4.1.2.1. Waschen und färben apoptotischer Lymphozyten

Da der Apoptose-Induktor DMN nicht nur bei Lymphozyten, sondern auch bei Monozyten Apoptose induziert, musste durch Auswaschen von DMN sichergestellt werden, dass sich bei Koinkubation zwischen apoptotischen Lymphozyten und Monozyten kein Glukokortikoid mehr im Ansatz befand. Zu viele Waschschriffe führten allerdings zu sehr hohem Zellverlust. Es konnten drei Waschschriffe als optimale Anzahl ermittelt werden (Siehe 3.1.2.1.). Diese Ergebnisse decken sich mit den Befunden anderer Autoren, die nach einer Behandlung von Lymphozyten mit Glukokortikoid über extensives (20), bzw. dreimaliges (30) waschen berichten, bevor die Zellen mit Monozyten koinkubiert wurden.

In der Literatur finden sich nur wenige Berichte über Farbstoffe, die für durchflußzytometrische Nachweise geeignet sind, um durch humane Monozyten phagozytierte gefärbte apoptotische humane Lymphozyten zu analysieren. Daher wurden verschiedene Markierungsmöglichkeiten untersucht.

Phagozytose von mit monoklonalen Antikörpern markierten apoptotischen humanen Lymphozyten konnte durchflußzytometrisch nicht nachgewiesen werden. Da monoklonale Antikörper außen an Proteinen der Zellmembran binden, diese sich aber bei apoptotisch zugrunde gehenden Zellen verändert (65, 82, 91), ist eine Ablösung

und das Auswaschen von monoklonalen Antikörpern die wahrscheinlichste Erklärung. Da an Zellen anhaftende Antikörper zudem die Phagozytenaktivität beeinflussen (30), wurde die Eignung anderer Farbstoffe überprüft. Um die Phagozytenaktivität so wenig wie möglich zu verändern wurden Farbstoffe, die interne Zellenbestandteile färben, untersucht. Zunächst wurde mit Calcein-AM das Zytoplasma gefärbt (89). Phagozytose von apoptotischen Lymphozyten konnte durchflußzytometrisch aber nicht nachgewiesen werden, da auch alle Monozyten gefärbt waren, also Monozyten den Farbstoff Calcein-AM unspezifisch aufgenommen hatten. Calcein-AM wird in lebenden Zellen durch intrazelluläre Esterasen zu einem fluoreszierenden membranimpermeablen Farbstoff gespalten (30). Es muss angenommen werden, dass Calcein-AM aufgrund der apoptotischen Veränderungen aus den Lymphozyten austrat und von Monozyten aufgenommen wurde. Diese Vermutung wird durch die Erfahrungen anderer Autoren unterstützt, die von einer großen Einschränkung der Methode bei Zellwandveränderungen berichten (28). Im folgenden wurde daher ein Farbstoff untersucht, über den sich die Nukleinsäuren anfärben lassen. Thiazolorange färbt die Nukleinsäuren lebender und toter Zellen irreversibel (30). Da verschiedenen Arbeitsgruppen entdeckten, dass sich apoptotische Zellen im Vergleich zu intakten Zellen mit DNA-Farbstoffen nur schwer anfärben lassen (9, 10, 35, 73), wurde die notwendige Farbstoffmenge titriert. Die Phagozytose von apoptotischen mit Thiazolorange gefärbten humanen Lymphozyten konnte anhand des entwickelten Protokolls durchflußzytometrisch nachgewiesen werden.

4.1.2.2. Durchflußzytometrische Analyse

Die durchflußzytometrische Analyse und deren Auswertung erfolgte anhand dreier unabhängiger Parameter. Die Veränderungen CD14 positiver und Thiazolorange positiver Zellen, die Veränderung der Granularität SSC der Monozyten und die Veränderung der Fluoreszenzintensität von Thiazolorange. Alle drei Parameter erbrachten das Ergebnis, dass humane Monozyten apoptotische humane Lymphozyten phagozytiert hatten. Die Zunahme der Granularität SSC und der Fluoreszenzintensität als Maß für die Aufnahme von apoptotischen Zellen wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (38).

4.1.2.3. Stimulation der Phagozytose

Anders als in der Literatur (3, 37) beschrieben konnte durch LPS keine Stimulation der Phagozytose erreicht werden. Der Grund dafür ist möglicherweise in der Anreicherung der Zellen aus Buffy Coats zu suchen, welche als unphysiologische Behandlung der Monozyten zu betrachten ist. So wurde im Vollblut eine Stimulation der Phagozytose, im Buffy Coat dagegen sogar eine Hemmung durch LPS beschrieben (1). Warum durch LPS keine Stimulation erreicht wird bleibt zu klären. Eine vergleichende Untersuchung zwischen der Aufarbeitung aus Vollblut und Buffy Coats, bezogen auf die Viabilität und den Aktivierungsgrad der Monozyten, brachte allerdings gute Übereinstimmung (54), weshalb die Anreicherung der Zellen aus Buffy Coats beibehalten wurde.

Durch FMLP konnte die Phagozytose sowohl in der Kontrolle, als auch im Apoptose-induziertem Ansatz gesteigert werden. Eine bessere Differenzierung und Aussagekraft konnte jedoch nicht gezeigt werden, weswegen im weiteren auf die Stimulation verzichtet wurde.

4.1.2.4. Verhältnis von Monozyten zu apoptotischen Lymphozyten

Wie in der Literatur beschrieben und entsprechend in eigenen Versuchen gefunden, wird der Anteil reagierender Monozyten bei einem Verhältnis von 1:1 Monozyten zu phagozytierenden Zellen mit weit unterhalb von 10% beschrieben (30), weswegen dieser Anteil in nachfolgenden Versuchen erhöht wurde. Das beste Ergebnis der untersuchten Verhältnisse, war das mit 1:6,5 am höchsten angesetzt. Autoren mit vergleichbaren Untersuchungen berichten über Verhältnisse von 1:5, 1 :20 (4) oder gar von 1:50 (48) phagozytierende zu phagozytierten Zellen. Aufgrund der begrenzten Anzahl zur Verfügung stehender Zellen in einem Buffy Coat, wurde hier jedoch ein Verhältnis von 1:5,2 gewählt, um den Einfluss künstlicher Kolloide auf die Phagozytose nach Induktion von Apoptose bei humanen Lymphozyten durch humane Monozyten in vitro untersuchen zu können. (siehe 3.1.2.5.).

4.1.2.5. Einfluss der Inkubationsdauer auf Phagozytose

Die Monozyten wurden nach Koinkubation mit apoptotischen und Thiazolorange gefärbten Lymphozyten nach unterschiedlichen Inkubationsdauern auf Phagozytose untersucht. Phagozytose fand sich bereits nach 1h. Nach 4h, 8h und 12h war jeweils

eine weitere Steigerung der Phagozytose in vitro nachzuweisen (Siehe 3.1.2.6.). Da im folgenden der Einfluss künstlicher Kolloide auf die Phagozytose in vitro zu untersuchen war, musste die Inkubationszeit auch im Hinblick ausreichender Zeit zur Phagozytose von Kolloiden, Berücksichtigung finden. Humane Monozyten phagozytieren künstliche Kolloide (16, 72). Eine Sättigung der Monozyten mit Kolloiden wird in vitro nach einer Inkubationsdauer von 10-12h erreicht (64). Aufgrund dieser Daten wurde hier eine Inkubationsdauer von 12h gewählt.

4.2. Einfluss künstlicher Kolloide auf die Phagozytose apoptotischer humaner Lymphozyten durch humane Monozyten in vitro

Die künstlichen Kolloide DEX, GEL und HES reduzieren mit steigender Konzentration die Phagozytose von durch DMN induzierter Apoptose bei humanen Lymphozyten durch humane Monozyten in vitro (Siehe 3.2.).

In der Literatur finden sich widersprüchliche Berichte. Neben Arbeiten, die einen hemmenden Einfluss künstlicher Kolloide auf das mononukleär-phagozytäre System (63, 78) beschreiben, stehen Arbeiten die keinen solchen Einfluss fanden (40, 67, 79).

So gibt es Befunde, die beim Menschen auf die Speicherung der künstlichen Kolloide in Zellen des mononukleär-phagozytären Systems in vitro (31) und in vivo (5, 13) hinweisen. Das Ausmaß ihrer Speicherung ist vorwiegend von der kumulativen Dosis und der Eliminationsgeschwindigkeit abhängig (5, 13). Die Speicherung lässt sich sowohl Licht- als auch Elektronenmikroskopisch nachvollziehen (5). Grund für die Speicherung in Zellen des mononukleär-phagozytären Systems ist die Phagozytose der Kolloide durch diese Zellen (72). Dadurch ist zu erklären, warum sich der in der vorliegenden Arbeit mittels durchflußzytometrischer Messung untersuchte Parameter Granularität SSC anders verhält (siehe Abb. 3.11.), als der untersuchte Parameter CD14 positiver und Thiazolorange positiver Zellen (siehe Abb. 3.9.) und der Parameter Fluoreszenzintensität von Thiazolorange (siehe Abb. 3.10.). Die Phagozytose apoptotischer Zellen wird durch Kolloide gehemmt, dennoch konnte keine wesentliche Reduktion der Granularität gegenüber der Kontrolle ohne Kolloideinfluss zu sehen. Die

wahrscheinlichste Erklärung ist die Aufnahme der Kolloide durch Monozyten (72). Durch Reduktion der Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Kolloide einerseits, und der Aufnahme der Kolloide durch Monozyten auf der anderen Seite, muss die Aussagekraft der Veränderung des Parameters Granularität SSC, im Sinne der Fragestellung dieser Arbeit, stark eingeschränkt werden. Durch Färbung apoptotischer humaner Lymphozyten bleiben die Auswertung des Parameters Fluoreszenzintensität von Thiazolorange und des Parameters CD14 positiver und Thiazolorange positiver Zellen, als sensitive Parameter für die Phagozytose apoptotischer Lymphozyten. Die Granularität SSC ist zwar als Maß für die Phagozytose geeignet, es kann im weiteren Versuchsmodell mit Kolloiden aber nicht zwischen aufgenommenen Kolloiden oder Zellen unterschieden werden.

In welcher Weise Zellen des mononukleär-phagozytären Systems durch die Aufnahme und Speicherung von Kolloiden in ihrer Funktion beeinflusst werden ist noch nicht abschließend geklärt.

Diskutiert wird eine Sättigung der Phagozyten mit Kolloiden, was eine Erklärung für die Beeinflussung der Zellen des MPS sein könnte. So zeigen Untersuchungen *in vitro* eine verminderte Phagozytosekapazität von Monozyten nach Aufnahme von künstlichen Kolloiden, gemessen durch Aufnahme fluoreszierender Latex-Beads (16). Diese Befunde könnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die Reduktion der Phagozytose apoptotischer Zellen unter Einfluss künstlicher Kolloide erklären.

Weitere *in vitro* Befunde beschreiben eine Substanz-spezifische Veränderung der monozytären Oberflächenantigen-Expression durch künstliche Kolloide (16). Die Phagozytose apoptotischer humaner Lymphozyten durch humane Monozyten findet über verschiedene Rezeptoren statt (12, 18, 22, 41, 51, 53, 60, 61). Eine möglicherweise stattfindende Veränderung der Rezeptoren wäre eine weitere Erklärung der Reduktion der Phagozytose apoptotischer Lymphozyten durch künstliche Kolloide.

Zudem besitzen die Kolloide DEX und HES Kohlenhydratstrukturen (23), die möglicherweise an den gleichen Rezeptoren wie apoptotische humane Lymphozyten binden und diese im Sinne eines Blockierungsmechanismus besetzen, wodurch eine Aufnahme apoptotischer Lymphozyten durch humane Monozyten verhindert wird.

Über den genauen Mechanismus der Reduktion der Phagozytose Apoptose-induzierter humaner Lymphozyten durch humane Monozyten unter dem Einfluss künstlicher Kolloide, konnte durch die vorliegende Arbeit keine direkte Aussage gemacht werden.

Zum Einfluss künstlicher Kolloide auf die Überlebenszeit humaner Monozyten gibt es sich unterscheidende Literaturhinweise. So führen die künstlichen Kolloide DEX, GEL, und HES in vitro konzentrationsabhängig und Substanz-spezifisch zu vermehrtem monozytären Zelltod (54), andere Autoren berichten über eine verlängerte Überlebenszeit humaner Monozyten nach Kultur in HES-haltigem Medium in vitro (71). Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Autoren, sind am wahrscheinlichsten auf die Verwendung verschiedener Kolloidkonzentrationen zurückzuführen. Verlängerte Überlebenszeiten wurden bei HES-Konzentrationen von 5mg/ml, reduzierte Überlebenszeiten bei 20mg/ml und 40mg/ml signifikant gefunden. Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen einer weiteren Arbeit. So wird eine Steigerung der Phagozytoserate bei Kolloidkonzentrationen von 5mg/ml und eine konzentrationsabhängige und Substanz-spezifische Abnahme der Phagozytoserate bei Konzentrationen von 25mg/ml bei DEX, 30mg/ml bei HES und 40mg/ml bei GEL beschrieben (64). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ein günstiger Einfluss niedriger Kolloidkonzentrationen ableiten, im Gegensatz zu hohen Kolloidkonzentrationen, durch welche sich vermehrter monozytärer Zelltod und dadurch bedingte Reduktion der Phagozytoserate ableiten lässt.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei Kolloidkonzentrationen von 5mg/ml keine Steigerung der Phagozytoserate bestätigt werden, es wurde bereits eine Reduktion der Phagozytose apoptotischer Lymphozyten gefunden. Eine Erklärung könnte der oben beschriebene spezielle Mechanismus der Aufnahme apoptotischer Lymphozyten über Rezeptoren sein, die durch künstliche Kolloide blockiert oder verändert werden. Die gefundene Reduktion der Phagozytose apoptotischer humaner Lymphozyten durch humane Monozyten ist bei der zusätzlich untersuchten Kolloidkonzentration von 20mg/ml gut mit den Ergebnissen der oben genannten Autoren zu vereinbaren, die ebenfalls über eine Reduktion der Phagozytose und ab Kolloidkonzentrationen von 20mg/ml Substanz-spezifisch sogar von vermehrtem monozytären Zelltod berichten.

Der Plasmaspiegel des Menschen beim Volumenersatz mit künstlichen Kolloiden erreicht nach einmaliger Gabe Werte um 5-10mg/ml (21), in der Hämodilutionstherapie bis zu 20mg/ml (16, 76). Bei hochdosierter HES-Infusionstherapie werden Plasmakonzentrationen von 15-20mg/ml erreicht (77). Die untersuchten Kolloidkonzentrationen von 5mg/ml und 20mg/ml in vitro kommen den klinisch relevanten in vivo somit sehr nahe. Ob die Phagozytose apoptotischer humaner

Lymphozyten durch humane Monozyten in vivo tatsächlich durch künstliche Kolloide reduziert wird, bleibt allerdings noch zu untersuchen.

Auch ein weiterer Zusammenhang bedarf in vivo einer genaueren Untersuchung. So berichten einige Autoren übereinstimmend von einer Hemmung der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und IL-12 nach Phagozytose apoptotischer Zellen durch Monozyten und Makrophagen in vitro (12, 19, 29, 52, 70) und sogar einer vermehrten Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 (52), was die immunsuppressiven Effekte apoptotischer Zellen unterstützen würde und im Rahmen der Auflösung lokaler Entzündungsgeschehen von Bedeutung wäre. Andere Autoren berichten jedoch von gegenteiligen Ergebnissen, einer Steigerung der Produktion proinflammatorischer Zytokine nach Phagozytose apoptotischer Zellen durch Monozyten und Makrophagen (38, 83). Des Weiteren ergab eine in vitro Untersuchung eine erhöhte Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ durch den Einfluss kolloidaler Plasmaersatzmittel im Vollblut (68).

4.3. Schlussfolgerungen aus der Arbeit

Der Einfluss der drei untersuchten künstlichen Kolloide DEX, GEL und HES auf das Phagozytoseverhalten humaner Monozyten von durch DMN induzierter Apoptose bei humanen Lymphozyten in vitro, zeigt bei steigender Konzentration der Kolloide eine signifikante Reduktion der Phagozytose.

Ob diese Ergebnisse auch in vivo nachzuvollziehen sind und ob sich dadurch Veränderungen im Einsatz der Kolloide ergeben bleibt zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Da die künstlichen Kolloide durch Aufrechterhaltung des Kolloid-Osmotischen-Druckes das Volumen im intravasalen Raum gebunden halten, sind sie heutzutage, neben den kristalloiden Lösungen, welche primär den Flüssigkeitshaushalt ausgleichen und den Erhaltungsbedarf decken, ein wesentlicher Bestandteil des Volumenmanagements. Sie kommen bei der Behandlung von Trauma, Schock und Sepsis zur Anwendung.

Apoptose ist ein fein regulierter physiologischer Mechanismus, der durch die Zelle selbst oder durch Induktion über einen signalgebenden Mechanismus ausgelöst werden kann. Besonders wichtig ist Apoptose im Verlauf des Ausreifens des Immunsystems, sowie dem Abtöten von Immunzellen, das durch Glukokortikoide oder bestimmte Zytokine vermittelt wird. Werden Zellen, die apoptotisch zugrunde gehen von Phagozyten aufgenommen, kommt es zu keiner Entzündung, da die toxischen Metabolite und die zytoplasmatischen Enzyme der Zellen von einer Membran umgeben sind.

Als mononukleäre Phagozyten bezeichnet man Zellen, die von pluripotenten Stammzellen des hämatopoetischen Systems abstammen und sich über Monoblasten und Promonozyten zu Monozyten und Makrophagen differenzieren. Monozyten zirkulieren im Blut und sind funktionell aktiv. Sie treten spontan, mittels Diapedese aus dem Blutgefäßsystem ins Gewebe über und differenzieren zu Makrophagen. Je nach Organ übernehmen sie dort verschiedene Funktionen. Die Gesamtheit der Makrophagen und Monozyten wird als mononukleär-phagozytäres System (MPS) bezeichnet. Zellen des MPS sind sowohl an spezifischen als auch an unspezifischen Abwehrmechanismen des Organismus beteiligt. Eine ihrer hauptsächlichen Aufgaben ist die Phagozytose eingedrungener Mikroorganismen und durch die Homöostase des hämopoetischen Systems apoptotisch zugrunde gehende Zellen.

Es gibt Befunde, die beim Menschen auf die Speicherung der künstlichen Kolloide in Zellen des mononukleär-phagozytären Systems in vitro und in vivo hinweisen. In welcher Weise dadurch Zellen des mononukleär-phagozytären Systems in ihrer Funktion beeinflusst werden ist noch nicht abschließend geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss künstlicher Kolloide auf die Phagozytose apoptotischer humaner Lymphozyten durch humane Monozyten in vitro untersucht. Lymphozyten und Monozyten wurden aus Buffy Coats freiwilliger gesunder Spender

durch Isolierung gewonnen und unter standardisierten sterilen Bedingungen aufbereitet. Mittels DMN wurde bei Lymphozyten in vitro Apoptose induziert. Apoptose wurde durch verschiedene etablierte Methoden nachgewiesen. Nach Reinigung und spezieller Färbung der Lymphozyten mit Thiazolorange, einem Nukleinsäure-Farbstoff, erfolgte für 12h die Koinkubation mit Monozyten, im Standard-Kulturmedium (Kontrolle) oder im Kulturmedium mit klinisch relevanten Kolloidkonzentrationen von 5mg/ml und 20mg/ml. Der Nachweis der Phagozytose apoptotischer Lymphozyten durch Monozyten erfolgte mittels durchflußzytometrischer Analyse.

Als Einfluss der untersuchten künstlichen kolloidalen Volumenersatzmittel auf die Phagozytose von Lymphozyten durch Monozyten nach induzierter Apoptose in vitro, konnte bei steigender Konzentration der Kolloide in allen Fällen eine Reduktion der Phagozytose gezeigt werden. Signifikant war die Reduktion durch Hydroxyethylstärke sowohl bei einer Konzentration von 5mg/ml als auch bei 20mg/ml, bei Dextran und Gelatine jeweils nur bei einer Konzentration von 20mg/ml.

Kolloide werden von Monozyten aufgenommen und gespeichert. In diesem Zusammenhang wird ein Mechanismus bedingt durch eine Sättigung der Monozyten diskutiert, der eine Reduktion der Phagozytose apoptotischer Zellen erklärbar macht. Dafür spricht die in dieser Arbeit gefundene nur geringe Änderung der Granularität der Zellen im Vergleich von Kontrolle und Kolloidansatz. Da die Kolloide DEX und HES Kohlenhydratstrukturen besitzen, die möglicherweise an den gleichen Rezeptoren wie apoptotische Zellen binden, ist auch eine Blockierung im Sinne einer Konkurrenz um den Rezeptor denkbar. Des weiteren kommt die Änderung der CD14-Oberflächenantigen-Expression von Monozyten, verursacht durch die Kolloide, als mögliche Veränderung der Rezeptoren in Betracht, die für die Phagozytose wichtig sind und daher die Reduktion verursachen.

Andere Autoren berichten bei noch höheren Kolloidkonzentrationen ab 30mg/ml nicht nur von einer Reduktion der Phagozytose, sondern zudem noch von vermehrtem monozytären Zelltod. Ebenfalls wird von einer Produktionshemmung proinflammatorischer Zytokine nach Phagozytose apoptotischer Zellen in vitro berichtet, was für das Entzündungsgeschehen von großer Bedeutung ist.

Ob sich diese Ergebnisse allerdings auch in vivo bestätigen lassen und ob dies Veränderungen im Einsatz der Kolloide nach sich zieht bleibt zu untersuchen.

6. Tabellen und Abbildungen

6.1. Tabellen

Tabelle 6.1.: Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage; AE 240	Mettler Instrumente GmbH, Giessen
Brutschrank; Cytoperm 8080	Heraeus, Stuttgart
Computer; Power Mac	Macintosh, Cupertino, USA
Computer; Quadra 650	Macintosh, Cupertino, USA
Drucker; HP DeskJet 1600 CM	Hewlett Packard, Böblingen
Durchflußzytometer; FACS-SORT	Becton&Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop; Leitz DMIRB	Leica, Wetzlar
Gefrierkühlschrank	Liebherr, Biberach / Riß
Lichtmikroskop; Leica DMIL	Leica, Wetzlar
Magnetrührer; MINI-MR	Janke&Kunkel, Staufen
Mikrobiologische Reinraumwerkbank; Lamin Air© HB 2472 S	Heraeus, Stuttgart
pH-Meter; pH 539	WTW, Weilheim
Quecksilberdampfampe; E4-H100/SL	IREM, Borgone, Italien
Software zur Facsanalyse; Cell Quest	Becton&Dickinson, Heidelberg
Vortex; 4010 Multi-Tube Vortexer	Corning, Medfield USA
Vortex; Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad; Schüttelwasserbad 1083	GFL©, Burgwedel
Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim / Main
Zentrifuge; Megafuge 1,0 R	Heraeus, Stuttgart
Zentrifuge; TJ-6	Beckmann, Glenrothes Fife, GB

Tabelle 6.2.: Pipetten, Gefäße und Spritzen

Artikel	Hersteller
Combitips; 1,25ml, 2,5ml, 5,0ml, 10ml, 12,5ml	Eppendorf, Hamburg
Costar Flaschen; 250ml, 500ml	Costar, Cambridge, USA
Cryo Röhrchen; Nunc cryo tube™ vials	Nalge Nunc International, DK
Einmalspritze; 10ml, 20ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Eppendorf Cup; 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Reaktionsgefäß; 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Falcon Röhrchen; 12*75mm, 15ml, 50ml	Becton&Dickinson, Heidelberg
Falkon Stripette; 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Becton&Dickinson, Heidelberg
Glasgefäß; 40ml	Schott/Duran, Mainz

Kanülen 0,90*40mm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Multipipetten; Multipette© 4780, Multipette© plus	Eppendorf, Hamburg
Perfusorspritze; 50ml	Becton&Dickinson, Heidelberg
Petrischalen; 6cm	Costar, Cambridge, USA
Petrischalen; CELLSTAR© 3,5cm, 6cm	Greiner Labortechnik,
Pipettierhilfe; Pipetboy acu	Integra Biosciences, Wallisellen, CH
Polyethylen Verschluss; 12mm	Becton&Dickinson, Heidelberg
Polypropylen Facs-Röhrchen; 12*75mm	Becton&Dickinson, Heidelberg
Polystyren Gefäß; Costar 8393	Costar, Cambridge, USA
Sterifilter; Minisart©	Sartorius, Göttingen
Varipette; 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Zellschaber; Costar 3010	Costar, Cambridge, USA

Tabelle 6.3.: Medien, Lösungen und Zusätze für die Zellkultur

Reagenz	Hersteller
α-Glutamin 200mM	GibcoBRL, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	GibcoBRL, Karlsruhe
Antibiose-Antibiotic-Antimycotic-Solution	Sigma, Deisenhofen
BSA (bovine serum albumin); 7,5 %	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco-PBS; ohne Ca und Mg	Sigma, Deisenhofen
EDTA; 0,5M	Sigma, Deisenhofen
Ficoll; Pâque® plus	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Glutamin, stabilisiert; 200mM	Biochrom seromed, Berlin
Humanserum; Type AB H-1513, hitzeinaktiviert bei 56°	Sigma, Deisenhofen
Humanserum; Type AB H-4522, hitzeinaktiviert bei 56°	Sigma, Deisenhofen
Hydrochloric acid (HCl); 1,0N	Sigma, Deisenhofen
MEM non essential amino acid solution; 100*	Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640 Medium R-0883; ohne Glutamin	Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640 Medium R-8005; ohne Glutamin	Sigma, Deisenhofen
Sodium hydroxide (NaOH); 1,0N	Sigma, Deisenhofen
Sodium Pyruvat	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Water, sterile	Sigma, Deisenhofen

Tabelle 6.4.: Pulver zur Herstellung der Kolloidlösungen

Kolloid	Hersteller
Dextran 70; 004002 G	Kabi-Fresenius AG, Bad Homburg
HES 200/0,5; 7432021	Kabi-Fresenius AG, Bad Homburg
Polygelylin; E01 01760 18081/E	Behring Werke AG, Marburg

Tabelle 6.5.: Medien, Lösungen und Zusätze für Apoptose-Nachweis

Reagenz	Hersteller
Annexin-V-FLUOS	Boehringer Mannheim, Mannheim
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merk, Darmstadt
Hepes Puffer 1M	Sigma, Deisenhofen
Natrimuchlorid (NaCl)	Sigma, Deisenhofen
Propidiumiodid P4170	Sigma, Deisenhofen
tri-Natriumcitrat-2-hydrat 106448	Merck, Darmstadt
Triton [®] X-100	Sigma, Deisenhofen

Tabelle 6.6.: Medien, Lösungen und Zusätze für Phagozytose-Nachweis

Reagenz	Hersteller
Calcein-AM C-3100	Molecular probes Eugene, OR, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Thiazolorange 39,006-2; 250mg	Aldrich, Deisenhofen

Tabelle 6.7.: Apoptose-Induktoren

Induktor	Hersteller
Fortecortin [®] 100	Merck, Darmstadt
Staurosporin	Sigma, Deisenhofen

Tabelle 6.8.: Phagozytose-Stimulatoren

Stimulator	Hersteller
Lipopolysaccharid L6529 (LPS)	Sigma, Deisenhofen
N-Formyl-Met-Leu-Phe F3506 (FMLP)	Sigma, Deisenhofen

Tabelle 6.9.: Monoklonale Antikörper

Antikörper	Hersteller
CD4; MHCD 0404, fluoreszenzmarkiert mit PE	Caltag laboratories, Medac, Hamburg
CD4; MHCD 0401, fluoreszenzmarkiert mit FITC	Caltag laboratories, Medac, Hamburg
CD14; MHCD 1401, fluoreszenzmarkiert mit FITC	Caltag laboratories, Medac, Hamburg
CD14; MHCD 1406, fluoreszenzmarkiert mit TRI	Caltag laboratories, Medac, Hamburg
CD19; MHCD 1901, fluoreszenzmarkiert mit FITC	Caltag laboratories, Medac, Hamburg
CD19; MHCD 1904, fluoreszenzmarkiert mit PE	Caltag laboratories, Medac, Hamburg
Mouse-IgG ₁ ; 349041, fluoreszenzmarkiert mit FITC	Becton&Dickinson, Heidelberg
Mouse-IgG _{2a} ; 349053, fluoreszenzmarkiert mit PE	Becton&Dickinson, Heidelberg
Mouse-IgG _{2a} ; MG 2a 06, fluoreszenzmarkiert mit TRI	Caltag laboratories, Medac, Hamburg

Tabelle 6.10.: Lösungen für das Durchflußzytometer

Lösung	Hersteller
Cell Wash; 349524	Becton&Dickinson, Heidelberg
Facs Flow; 342003	Becton&Dickinson, Heidelberg
Cell Fix; 340181	Becton&Dickinson, Heidelberg
Facs Rinse; 340346	Becton&Dickinson, Heidelberg
Facs Safe; 340345	Becton&Dickinson, Heidelberg

Tabelle 6.11.: Materialien und Medien zur Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Material	Hersteller
4',6-Diamidin-2'-Phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Becher 75002252 der Megafuge 1,0R, Cytozubehör	Heraeus, Stuttgart
Deckgläser, 24*50mm	Superior Marienfeld
Eisessig; 1.00063	Merck, Darmstadt
Eosin GNa; 15935	Merck, Darmstadt
Ethanol; 1.00983.1000	Merck, Darmstadt
Glycerol; G-8773	Sigma, Deisenhofen
Hämalaun; 9249	Merck, Darmstadt
Objekträger; 76*26mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Tragringsrotor 75003360 der Megafuge 1,0R, Cytozubehör	Heraeus, Stuttgart

Tabelle 6.12.: Einfluss der Kolloide auf den pH-Wert

Kolloidlösung	0 mg/ml	5 mg/ml	20mg / ml
DEX	7,80	7,87	7,99
GEL	7,80	7,85	7,88
HES	7,80	7,84	7,91

Tabelle 6.13.: Monozyten die unter dem Einfluss der Kolloide phagozytierten
Ausgewerteter Parameter CD14+/ThO+ / Zellen [%], n=6

Proband	Konzentration der Kolloide in mg/ml						
	0	DEX 5	DEX 20	GEL 5	GEL 20	HES 5	HES 20
1	58,82	46,36	0,53	13,13	0,40	11,74	0,21
2	51,35	40,17	1,35	19,51	5,05	17,37	0,65
3	46,76	19,91	9,28	9,60	3,04	23,28	3,48
4	83,21	32,00	8,96	61,65	7,55	38,84	2,60
5	83,69	75,89	60,43	69,65	16,00	69,42	14,81
6	89,09	73,39	2,86	67,38	48,28	65,91	31,72
Mittelwert	68,82	47,96	13,90	40,15	13,39	37,76	8,91
Standard- abweichung	18,61	22,50	23,10	28,86	17,91	24,89	12,10

Tabelle 6.14.: Monozyten die unter dem Einfluss der Kolloide phagozytierten
Ausgewerteter Parameter Granularität SSC / Zellen [%], n=6

Proband	Konzentration der Kolloide in mg/ml						
	0	DEX 5	DEX 20	GEL 5	GEL 20	HES 5	HES 20
1	70,41	63,68	61,55	62,75	69,54	41,28	67,70
2	41,68	34,44	33,07	39,85	40,66	47,11	41,90
3	39,84	22,65	15,12	41,32	29,44	41,36	43,68
4	67,81	59,22	55,72	50,61	54,48	60,08	34,87
5	60,82	55,19	54,91	48,82	49,02	44,21	57,09
6	61,73	46,39	40,81	67,85	61,22	60,31	62,92
Mittelwert	57,05	46,93	43,53	51,87	50,73	49,06	51,36
Standard- abweichung	13,14	15,78	17,47	11,32	14,39	8,89	13,07

Tabelle 6.15.: Monozyten die unter dem Einfluss der Kolloide phagozytierten
Ausgewerteter Parameter ThO Fluoreszenzintensität Zellen [%], n=6

Proband	Konzentration der Kolloide in mg/ml						
	0	DEX 5	DEX 20	GEL 5	GEL 20	HES 5	HES 20
1	13,06	9,39	1,38	4,49	1,41	1,70	1,31
2	10,68	8,35	1,39	5,52	2,64	5,28	1,36
3	10,16	3,92	1,93	2,71	1,93	6,15	2,19
4	27,83	7,50	4,53	12,52	4,33	8,43	1,18
5	25,19	16,85	11,76	14,33	5,38	15,54	5,57
6	35,26	20,17	1,35	14,72	10,00	15,68	7,91
Mittelwert	20,37	11,03	3,72	9,05	4,28	8,80	3,25
Standard- abweichung	10,51	6,17	4,12	5,39	3,17	5,70	2,82

6.2. Abbildungen

Abbildung 6.1.:



Abbildung 6.2.:

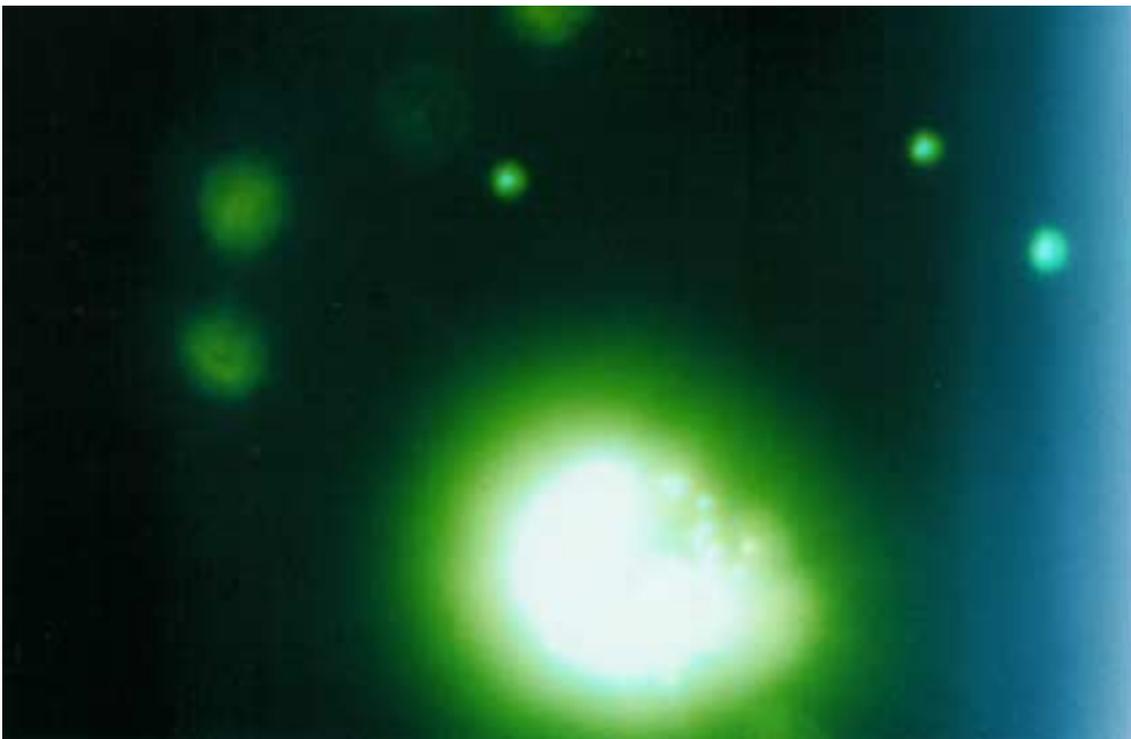


Abbildung 6.3.:

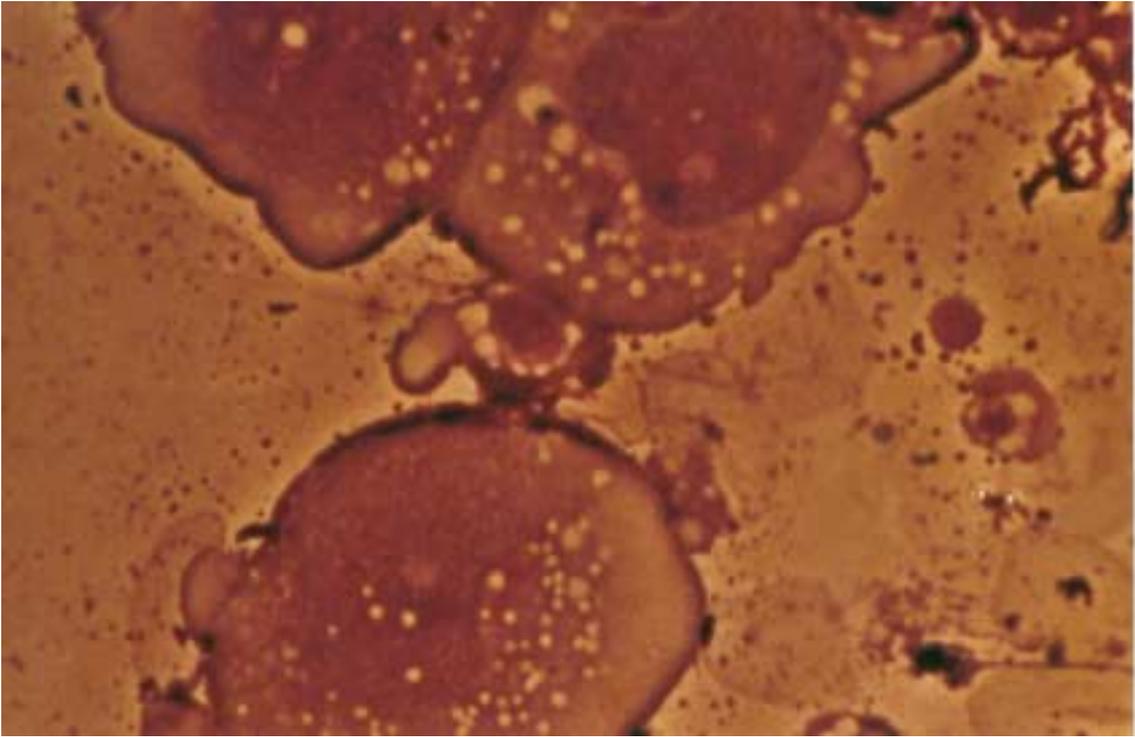


Abbildung 6.4.:

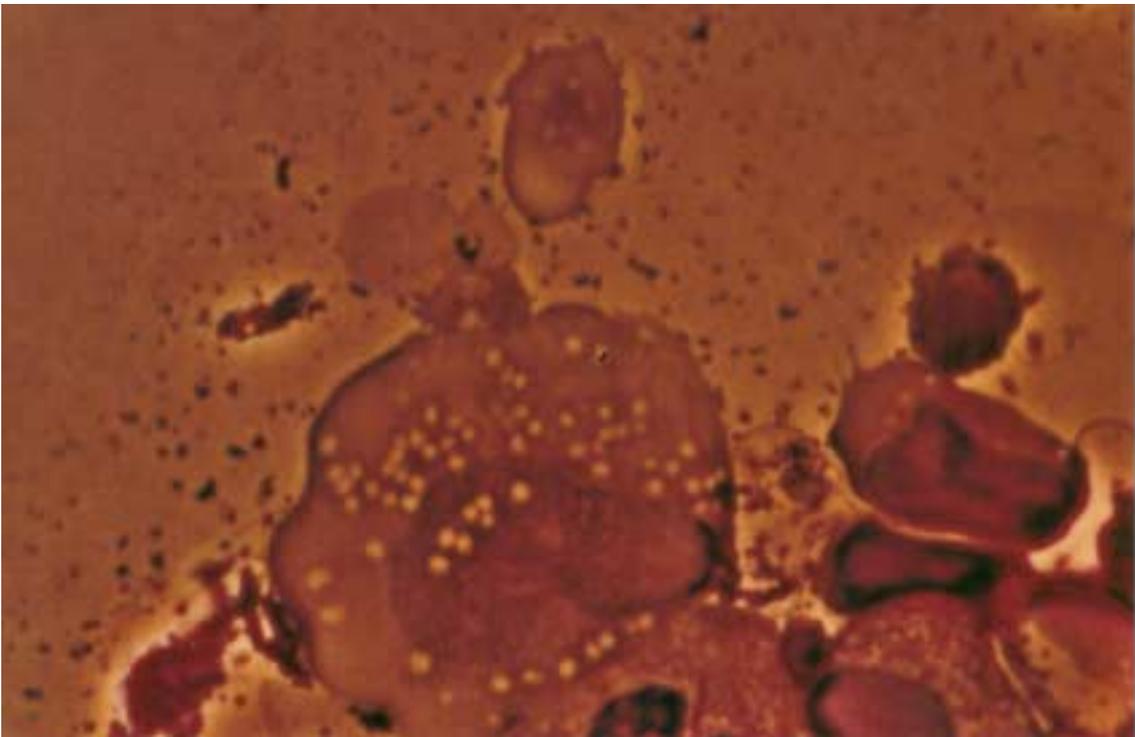


Abbildung 6.5.:

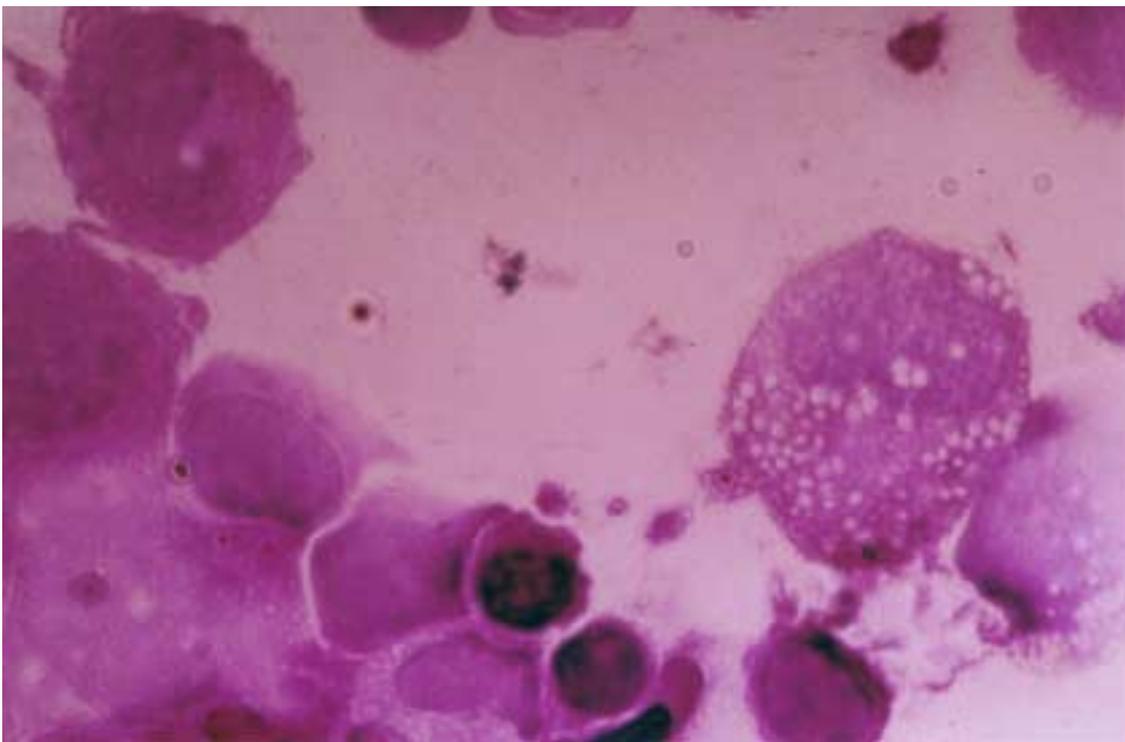
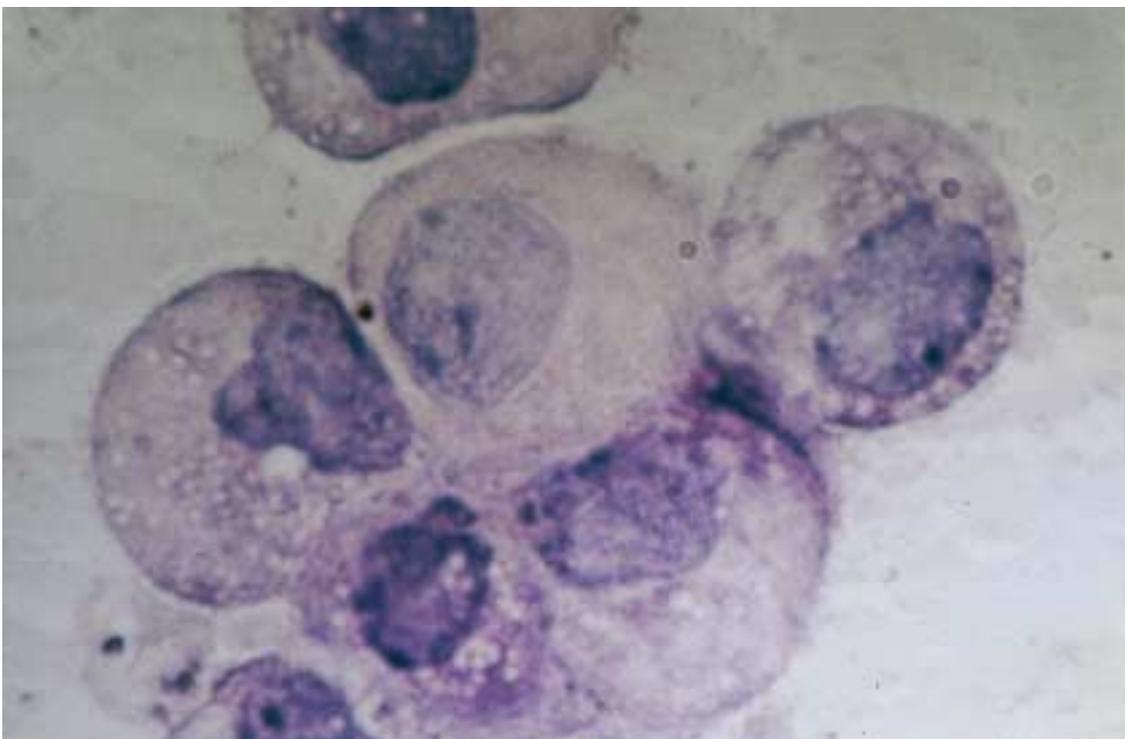


Abbildung 6.6.:



7. Literatur

7.1. Literaturverzeichnis

- 1 **Aberle, D.**
(Publikation in Vorbereitung)
- 2 **Ayala, A., Karr, S.M., Evans, T.A., Chaudry, I.H.** (1997)
Factors responsible for peritoneal granulocyte apoptosis during sepsis
J. Surg. Res. **69**, 67-75
- 3 **Baqui, A.A., Meiller, T.F., Turng, B.F., Kelley, J.I., Falkler, W.A. Jr.** (1998)
Functional changes in THP-1 human monocytic cells after stimulation with lipopolysaccharide of oral microorganisms and granulocyte macrophage colony stimulating factor
Immunopharmacol. Immunotoxicol. **20/4**, 493-518
- 4 **Baran, J., Guzik, K., Hryniewicz, W., Ernst, M., Flad, H.D., Pryjma, J.** (1996)
Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria
Infect. Immun. **64**, 4242-4248
- 5 **Bergonzi, C., Paties, C., Zangrandi, A., Poisetti, P.G., Ballochi, S., Fontana, F., Scarpioni, L.** (1990)
Dextran deposits in patients in tissue of patients undergoing hemodialysis
Nephrol. Dial. Transplant. **5**, 54-58
- 6 **Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K.W., Pommier, Y.** (1994)
Induction of a common pathway of apoptosis by Staurosporine
Exp. Cell Res. **211**, 314-321
- 7 **Brehme, S., Keysser, G., Turowski, A.** (1993)
Zur in vitro Beeinflussung von Plasmapviskosität und Erythrozytenaggregation durch vier Plasmaersatzmittel
Z. Gesamte Inn. Med. **48**, 605-608
- 8 **Cohen, J.J., Duke, R.C., Fadok, V.A., Sellins, K.S.** (1992)
Apoptosis and programmed cell death in immunity
Annu. Rev. Immunol. **10**, 267-293
- 9 **Compton, M.M., Haskill, J.S., Cidlowski, J.A.** (1988)
Analysis of glucocorticoid actions on rat thymocyte deoxyribonucleic acid by fluorescence-activated flow cytometry
Endocrin. **122**, 2158-2164
- 10 **Cowden, R.R., Curtis, S.K.** (1981)
Microfluorometric investigations of chromatin structure
Histochem. **72**, 11-23
- 11 **Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P., Traganos, F.** (1992)
Features of apoptotic cells measured by flow cytometry
Cytometry **13**, 795-808

- 12 **Devitt, A., Moffatt, O.D., Raykundalia, C., Capra, J.D., Simmons, D.L., Gregory, C.D.** (1998)
Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells
Nature **392**, 505-509
- 13 **Dienes, H.P., Gerharz, C.D., Wagner, R., Weber, M., John, H.D.** (1986)
Accumulation of hydroxyethyl starch (HES) in the liver of patients with renal failure and portal hypertension
J. Hepatol. **3**, 223-227
- 14 **Dieterich, H.J.** (1994)
Volumenersatzlösungen
In: Hartig, W. (Hrsg): *Moderne Infusionstherapie; Künstliche Ernährung*
7.Auflage, W.Zuckschwerdt Verlag, München
- 15 **Dieterich, H.J., Kraft, D., Sirtl, C., Laubenthal, H., Schimetta, W., Pözl, W., Gerlach, E., Peter, K.** (1998)
Hydroxyethyl starch antibodies in humans – incidence and clinical relevance
Anesth. Analg. **86**, 1123-1126
- 16 **Dieterich, H.J., Nohé, B., Deschner, N.** (1998)
Modulation von Phagozytose und Endothelfunktion
Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. **33**, 270-274
- 17 **Dieterich, H.J., Unertl, K.** (1998)
Volumenersatz mit künstlichen Kolloiden
Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. **33**, 250
- 18 **Duvall, E., Wyllie, A.H., Morris, R.G.** (1985)
Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis)
Immunology **56**, 351-358
- 19 **Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., Henson, P.M.** (1998)
Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE2 and PAF
J. Clin. Invest. **101/4**, 890-898
- 20 **Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M.** (1992)
Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages
J. Immunol. **148**, 2207-2216
- 21 **Förster, H.** (1989)
Pharmakologie von Hydroxyethylstärke: Verweildauer, Kinetik und klinische Folgerungen, 15-25
In: Lawin, P., Zander, J., Weidler, B. (Hrsg.): *Hydroxyethylstärke-Eine aktuelle Übersicht*
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- 22 **Fukasawa, M., Adachi, H., Hirota, K., Tsujimoto, M., Arai, H., Inoue, K.** (1996)
SRB1, a class B scavenger receptor, recognizes both negatively charged liposomes and apoptotic cells
Exp. Cell Res. **222**, 246-250

- 23 **Gordon, S., Mokoena, T.** (1989)
Receptors for mannosyl structures on mononuclear phagocytes, 141-151
In: Zembala, M., Asherson, G.L. (Hrsg.): Human monocytes
Academis Press, London, San Diego
- 24 **Halaas, O., Vik, R., Ashkenazi, A., Espevik, T.** (2000)
Lipopolysaccharide induces expressoin of APO2 ligand/TRIAL in human monocytes and macrophages
Scand. J. Immunol. **51/3**, 244-250
- 25 **Harke, H., Thoenies, R., Margraf, I., Momsen, W.** (1976)
Der Einfluss verschiedener Plasmaersatzmittel auf Gerinnungssystem und Thrombozytenfunktion während und nach operativen Eingriffen. Vorläufige Ergebnisse einer klinischen Studie
Anaesthesist **25**, 366-373
- 26 **Hart, S.P., Haslett, C., Dransfield, I.** (1996)
Recognition of apoptotic cells by phagocytes
Experientia **52**, 950-956
- 27 **Hashimoto, S., Yamada, M., Motoyoshi, K., Akagawa, K.S.** (1997)
Enhancement of macrophage colony-stimulating-factor-induced growth and differentiation of human monocytes by interleukin-10
Blood **89**, 315-321
- 28 **Haugland, R.P.** (1992)
Handbook of fluorescent probes and research chemicals
5.Aufl. Molecular Probes, Eugene, USA
- 29 **Hughes, J., Liu, Y., van Damme, J., Savill, J.** (1997)
Human glomerular mesangial cell phagocytosis of apoptotic neutrophils
J. Immunol. **158**, 4389-4397
- 30 **Husfeld, L.** (1996)
Entwicklung einer durchflußzytometrischen Methode zur Messung der Phagozytose-, Burst- und Killingfähigkeit humaner Phagozyten
Med. Disseration, Technische Universität München
- 31 **Jurecka, W.** (1998)
Befunde zur Speicherung künstlicher Kolloide beim Menschen
Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. **33**, 264-265
- 32 **Kapiotis, S., Quehenberger, P., Eichler, H.G., Schwarzinger, I., Pärtan, C., Schneider, B., Lechner, K., Speiser, W.** (1994)
Effect of hydroxyethyl starch on the activity of blood coagulation and fibrinolysis in healthy volunteers: Comparison with albumin
Crit. Care Med. **22**, 606-612
- 33 **Kerr, J.F.R., Harmon, B.V.** (1991)
Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective, 5-29
In: Tomei L.D., Cope, F.O. (Hrsg.): Apoptosis: The molecular basis of cell death
Curr. Commun. Cell Mol. Biol. Vol. **3**
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- 34 **Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R.** (1972)
Apoptosis: A basic biological phenomen with wide-ranging implications in tissue kinetics
Br. J. Cancer **26**, 239-257

- 35 **Klein, S.A., Dobmeyer, J.M., Dobmeyer, T.S., Falke, D., Kabelitz, D., Friese, K., Helm, E.B., Hoelzer, D., Rossol-Voth, R.** (1996)
TNF- α mediated apoptosis of CD4 positive T-lymphocytes. A model of T-cell depletion in HIV infected individuals
Eur. J. Med. Res. **1**, 249-258
- 36 **Koopman, G., Reutelingsperger, C.P.M., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., van Oers, M.H.** (1994)
Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis
Blood **84**, 1415-1420
- 37 **Krammer, P.H.** (2000)
Apoptose
Dtsch. Ärztebl. **97**, A-1752-1759
- 38 **Kurosaka, K., Watanabe, N., Kobayashi, Y.** (1998)
Production of proinflammatory cytokines by phorbol myristate acetate-treated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages after phagocytosis of apoptotic CTLL-2 cells
J. Immunol. **161**, 6245-6249
- 39 **Laxenaire, M.C., Charpentier, C., Feldman, L.** (1994)
Anaphylactoid reactions to colloid plasma substitutes: frequency, risk factors, mechanisms
Ann. Fr. Anesth. Reanim. **13**, 301-310
- 40 **Lenz, G., Hempel, V., Junger, H., Werle, H., Buckenmaier, P.** (1986)
Auswirkungen von Hydroxyethylstärke, Oxypolygelatine und Humanalbumin auf die Phagozytosefunktion des Retikuloendothelialen Systems (RES) gesunder Probanden
Anaesthesist **35**, 423-428
- 41 **Luciani, M.F., Chimini, G.** (1996)
The ATP binding cassette transporter, ABC1, is required for the engulfment of corpses generated by apoptotic cell death
Eur. Mol. Biol. Organ. J. **15**, 226-235
- 42 **Lutz, H.** (1986)
Plasmaersatzmittel
4.Aufl, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- 43 **Majno, G., Joris, I.** (1995)
Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of the cell death
Am. J. Pathol. **146**, 3-15
- 44 **Mardel, S.N., Saunders, F., Ollerenshaw, L., Edwards, C., Baddeley, D.** (1996)
Reduced quality of in-vitro clot formation with gelatin-based plasma substitutes
Lancet **347**, 825-835
- 45 **McGahon, A.J., Martin, S.J., Bissonnette, R.P., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R.J., Nishioka, W.K., Green, D.R.** (1995)
The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro
Methods Cell. Biol. **46**, 153-185
- 46 **Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., Riccardi, C.** (1991)
A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry
J. Immunol. Methods **139**, 271-279

- 47 **Nitsch, E.** (1998)
Volumenersatz mit künstlichen Kolloiden
Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. **33**, 255-260
- 48 **Oda, T., Meada, H.** (1986)
A new simple fluorometric assay for phagocytosis
J. Immunol. Methods **88**, 175-183
- 49 **Oppenheim, J.J., Leonard, E.J.** (1989)
Introduction, 1-6
In: Zembala, M., Asherson, G.L. (Hrsg.): Human monocytes
Academis Press, London, San Diego
- 50 **Orrenius, S.** (1995)
Apoptosis: molecular mechanisms and implications for human disease
J. Intern. Med. **237**, 529-536
- 51 **Platt, N., Suzuki, H., Kurihara, Y., Kodama, T., Gordon, S.** (1996)
Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 12456-12460
- 52 **Reinhard, E.V., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R.** (1997)
Immunosuppressive effects of apoptotic cells
Nature **391**, 350
- 53 **Ren, Y., Silverstein, R.L., Allen, J., Savill, J.** (1995)
CD36 Gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis
J. Exp. Med. **181**, 1857-1862
- 54 **Rieg, S.R.** (2002)
Der Einfluss künstlicher Kolloide auf basale und induzierte Apoptoserate humaner Monozyten in vitro
Med. Dissertation, Universität Tübingen
- 55 **Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.K.** (1996)
Immunology
4.Aufl., Gower Medical Publishing, London
- 56 **Rosenthal, A.S.** (1980)
Regulation of the immun response - role of the macrophage
N. Engl. J. Med. **303**, 1153-1156
- 57 **Savill, J.** (1997)
Apoptosis in resolution of inflammation
J. Leukoc. Biol. **61**, 375-380
- 58 **Savill, J.** (1997)
Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis
Med. Bull. **53**, 491-508
- 59 **Savill, J.** (1998)
Apoptosis: Phagocytic docking without shocking
Nature **392**, 442-443
- 60 **Savill, J., Dransfield, I., Hogg, N., Haslett, C.** (1990)
Victronecton receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis
Nature **343**, 170-173

- 61 **Savill, J., Hogg, N., Ren, Y., Haslett, C.** (1992)
Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis
J. Clin. Invest. **90**, 1513-1522
- 62 **Schaechter, M., Engleberg, N.C., Eisenstein, B.I., Medoff, G.** (1998)
Mechanisms of microbial disease
William & Wilkins, Baltimore, USA
- 63 **Schildt, B., Bouveng, R., Sollenberg, M.** (1975)
Plasma substitute induced impairment of the reticuloendothelial system function
Acta. Chir. Scand. **141**, 7-13
- 64 **Schulze, J.** (1998)
Untersuchungen zum Einfluss künstlicher kolloidaler Volumenersatzmittel auf die phagozytäre Kapazität humaner Monozyten in vitro
Med. Dissertation, Universität Tübingen
- 65 **Schwartz, L.M., Osborne, B.A.** (1993)
Programmed cell death, apoptosis and killer genes
Immunol.Today. **14**, 582-590
- 66 **Sellins, K.S., Cohen, J.J.** (1987)
Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes
J. Immunol. **139**, 3199-3206
- 67 **Shatney, C.H., Chaudry, I.H.** (1984)
Hydroxyethyl starch administration does not depress reticuloendothelial function or increase mortality from sepsis
Circ. Shock **13**, 21-26
- 68 **Sirtl, C., Salewsky, G., Baier, J., Lange, S., Laubenthal, H., Neumann, H.A.** (1995)
Der Einfluss kolloidaler Plasmaersatzmittel auf die Freisetzung von Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha) in menschlichem Vollblut in vitro
Infusionsther. Transfusionsmed. **22**, 332-338
- 69 **Solbach, W., Moll, H., Rollinghoff, M.** (1991)
Lymphocytes play the music but the macrophages calls the tune
Immunol. Today **12**, 4-6
- 70 **Stern, M., Savill, J., Haslett, C.** (1996)
Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis
Am. J. Pathol. **149**, 911-921
- 71 **Szefalusi, Z., Dieterich, H.J., Willheim, M., Spittler, A., Ebner, C., Boltz-Nitulescu, G., Schwarz, T., Urbanek, R., Kraft, D.** (1995)
HES-induced monocyte/macrophage long-term viability in culture (abstract)
Immunol. Lett.
- 72 **Szefalusi, Z., Parth, E., Jurecka, W., Luger, T.A., Kraft, D.** (1993)
Human monocytes and kretinocytes in culture ingest hydroxyethyl starch
Arch. Dermatol. Res. **285**, 144-150
- 73 **Telford, W.G., King, L.E., Fraker, P.J.** (1991)
Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmenatation in mouse thymocytes by flow cytometry
Cell. Prolif. **24**, 447-459

- 74 **Telford, W.G., King, L.E., Fraker, P.J.** (1994)
Rapid quantitation of apoptosis in pure and heterogenous cell populations using flow cytometry
J. Immunol. Methods **172**, 1-16
- 75 **Tomei L.D., Cope, F.O.** (1991)
Apoptosis: The molecular basis of cell death
Curr. Commun. Cell Mol. Biol. Vol. **3**
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- 76 **Treib, J., Haass, A., Pindur, G., Grauer, M.T., Treib, W., Wenzel, E., Schimrigk, K.** (1996)
Influence of low molecular weight hydroxyethyl starch (HES 40/0.5-0.55) on hemostasis and haemorrhology
Haemostasis **26**, 258-265
- 77 **Treib, J., Haass, A., Pindur, G., Grauer, M.T., Wenzel, E., Schimrigk, K.** (1996)
All medium starches are not the same: Influence of the degree of hydroxyethyl substitution of hydroxyethyl starch on plasma volume, hemorrhologic conditions and coagulation
Transfusion **36**, 450-455
- 78 **Treib, J., Haass, A., Pindur, G., Grauer, M.T., Wenzel, E., Schimrigk, K.** (1996)
Decrease of fibronectin following repeated infusion of highly substituted hydroxyethyl starch
Infusionsther. Transfusionsmed. **23**, 71-75
- 79 **Trop, M., Schiffrin, E.J., Callahan, R., Carter, E.A.** (1992)
Effect of heta-starch colloidal solutions on reticuloendothelial phagocytic system (RES) function in burned and infected rats
Burns **18**, 463-465
- 80 **Trump, B.F., Berezsky, I.K.** (1994)
Cellular and molecular pathobiology of reversible and irreversible injury, 1-22
In: Tyson, C.A., Frazier, J.M. (Hrsg): Methods in toxicology
Academic Press, New York
- 81 **Trump, B.F., Berezsky, I.K.** (1996)
The mechanisms of calcium-mediated cell injury and cell death
New Horiz **4**, 139-150
- 82 **Trump, B.F., Berezsky, I.K.** (1998)
The reactions of cells to lethal injury: Oncosis and necrosis - the role of calcium, 57-96
In: Lockshin, R.A., Zakeri, Z., Tilly, J.L. (Hrsg.): When cells die
Wiley-Liss, New York, Chichester, Weinheim
- 83 **Uchimura, E., Kodaira, T., Kurosaka, K., Yang, D., Watanabe, N., Kobayashi, Y.** (1997)
Interaction of phagocytes with apoptotic cells leads to production of proinflammatory cytokines
Biochem. Biophys. Res. Commun. **239**, 799-803
- 84 **van Engeland, M., Ramaekers, F.C.S., Schutte, B., Reutelingsperger, C.P.M.** (1996)
A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherant cells in culture
Cytometry **24**, 131-139

- 85 **van Furth, R.** (1992)
Mononuclear phagocytes: Biology of monocytes and macrophages
Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, UK
- 86 **Verhoven, B., Schlegel, R.A., Williamson, P.** (1995)
Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes
J. Exp. Med. **182**, 1597-1601
- 87 **Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C.P.M.** (1995)
A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V
J. Immunol. Methods **184**, 39-51
- 88 **Weston, S.A., Parish, C.R.** (1990)
New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by new cytometry and fluorescence microscopy
J. Immunol. Meth. **133**, 87-97
- 89 **Wyllie, A.H.** (1980)
Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation
Nature **284**, 555-556
- 90 **Wyllie, A.H., Duvall, E., Blow, J.J.** (1984)
Intracellular mechanisms in cell death in normal and pathological tissues, 269
In: Davies, A.I., Sigel, D.C. (Hrsg.): Cell aging and cell death
Cambridge Press, Cambridge
- 91 **Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R.** (1980)
Cell death: the significance of apoptosis
Int. Rev. Cytol. **68**, 251-306
- 92 **Zwilling, B.S., Eisenstein, T.K.** (1994)
Macrophage-pathogen interactions
Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong

7.2. Wissenschaftliche Tabellen und Lexika

- 93 **Ciba-Geigy AG** (1977)
Wissenschaftliche Tabellen Geigy. Teilband Körperflüssigkeiten
8.Aufl. 4.Nachdruck 1985. Ciba-Geigy, Basel
- 94 **Ciba-Geigy AG** (1979)
Wissenschaftliche Tabellen Geigy. Teilband Hämatologie und Humangenetik
8.Aufl. 4.Nachdruck 1985. Ciba-Geigy, Basel
- 95 **Ciba-Geigy AG** (1982)
Wissenschaftliche Tabellen Geigy. Teilband Somatometrie und Biochemie
8.Aufl. Ciba-Geigy, Basel
- 96 **Clark, M., Mohan, B., Scholze-Stubenrecht, W., Thyen, O., Waite, M., Alsleben, B., Connell, T., Görke, L., Heise, C., Hope, C., Lang, U., Lewis, P., Röhrenbeck, U., Seubel, M., Vennebusch, E.** (1991)
Duden-Oxford-Standartwörterbuch Englisch
Dudenverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich
- 97 **Drosdowski, G., Dose, M., Eckey, W., Folz, J., Hartmann, H., Mang, D., Mangold, M., Schrupp, C., Trunk-Nußbaumer, M., Thyen, O., Wermke, M.** (1989)
Duden Deutsches Universalwörterbuch
2.Aufl. Dudenverlag, Mannheim, Wien, Zürich
- 98 **Drosdowski, G., Müller, W., Scholze-Stubenrecht, W., Wermke, M., Dose, M., Folz, J., Mang, D., Schrupp, C., Trunk-Nußbaumer, M.** (1990)
Duden Band 5: Das Fremdwörterbuch
5.Aufl. Dudenverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich
- 99 **Nöhring, F.J.** (1996)
Langenscheidts Fachwörterbuch Medizin. Englisch-Deutsch
3.Aufl. Langenscheidt, Berlin, München, Wien, Zürich, New York
- 100 **Pschyrembel** (1994)
Klinisches Wörterbuch
257.Aufl. de Gruyter, Berlin, New York

8. Lebenslauf

I. Persönliche Daten

Stefan Gromer
geb. 10.12.1970, in Neckarsulm
verheiratet, zwei Töchter

II. Schulbildung

Abschluss: 11. Mai 1990 Abitur, Technisches Gymnasium
Max-Eyth-Schule, Stuttgart

III. Zivildienst

Okt. 1990 – Dez. 1991 DRK Mannheim

IV. Berufsausbildung

Abschluss: 15. Dez. 1991 Rettungssanitäter
Abschluss: 15. Nov. 1994 staatlich geprüfter Rettungsassistent
Franz-Anton-Mai Schule, Mannheim

V. Hochschulen

Okt. 1992 - Apr. 1994 Pädagogische Hochschule, Ludwigsburg
Studiengang: Lehramt an Realschulen

Apr. 1995 - Mai 2002 Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
Studiengang: Humanmedizin
PJ-Wahlfach: Anaesthesiologie

Abschluss: 14. Mai 2002 3.Staatsexamen
Klinikum Stuttgart

VI. Famulaturen

1998 Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin
1999 Arbeitsmedizin und Betriebsmedizin
2000 Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin
2000 Klinik für Anaesthesiologie, Pädiatisches Zentrum

VII. Praktisches Jahr

Apr. 2001 - Mär. 2002 Klinikum Stuttgart