

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen
Abteilung Innere Medizin VII, Tropenmedizin
(Schwerpunkt: Institut für Tropenmedizin, Reisemedizin, Human-
parasitologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. P. G. Kremsner

**Entwicklung einer neuen Methode zur *ex vivo* Quantifi-
zierung der autologen Erythrophagozytose**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Christian Johannes Ambrosch
geb. Bauernfeind
aus Zweibrücken**

2013

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. P. G. Kremsner

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. T. Feuchtinger

Meiner Tochter Mia

Abkürzungen:

ACD	Chronische Entzündungsanämie
Ak	Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Komplementfaktor
CD	Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale
CFDA-SE	Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester
CI	Konfidenzintervall
Cl ⁻	Chlorid-Ionen
CR1	Komplementrezeptor 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Erythropoese
EPZ	Erythrophagozytose
EPO	Erythropoetin
FACS	Durchflusszytometrie
Fc	Kristallisierbares Antikörper-Fragment
FCS	Fetales Kälberserum
Hb	Hämoglobinkonzentration
HCO ₃ ⁻	Bikarbonation
Hkt	Hämatokrit
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.v	Intravenös
LDH	Laktatdehydrogenase
LED	Lichtemittierende Diode
LPS	Lipopolysaccharid
MACS [®]	Magnetisch aktivierte Zellsortierung
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
MPS	Mononukleären, phagozytären System
PBMC	Periphere mononukleären Blutzellen

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Pf	Plasmodium falciparum
PS	Phosphatidylserin
RBC	Erythrozyten
SA	Schwere Anämie
SMA	Schwere Malariaanämie
sTfR	Löslicher Transferrinrezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
WHO	Weltgesundheitsorganisation

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	9
1.1	Anämie	9
1.1.1	Allgemeine Einführung mit Entstehung, Definition und Klinik	9
1.1.2	Ursachen der Anämie	9
1.1.3	Hämolyse	10
1.1.4	Anämie Diagnostik	11
1.2.	Malaria tropica	12
1.2.1	Epidemiologie	12
1.2.2	Infektionsweg	13
1.2.3	Schwere Malariaanämie (SMA)	14
1.2.3.1	Allgemeine Einführung und Definition	14
1.2.3.2	Ätiologie	15
1.2.3.3	Therapie	16
1.3	Monozyten	17
1.3.1	Definition	17
1.3.2	Bildung	17
1.3.3	Funktion	18
1.3.4	Zellmorphologie und Oberflächenmarker CD14	18
1.4	Erythrophagozytose (EPZ)	19
1.4.1	Physiologischer Mechanismus der EPZ	19
1.4.2	Rolle der EPZ bei Malariainfektion	20
1.4.3	Methoden zur Messung der EPZ	22
1.5	Ziel dieser Arbeit	22
2	PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	Studie zur Evaluation des Phagozytose-Assays	24
2.1.1	Studiendesign und Ethik Kommission	24

2.1.2	Studienort	25
2.1.3	Studienpopulation	26
2.1.4	Probenentnahme	28
2.2	Diagnostische Verfahren	28
2.2.1	Mikroskopischer Nachweis von Pf und Bestimmung der Parasitämie durch Anwendung des DT	28
2.2.2	Zählung der Hämozoïn-haltigen Monozyten im peripheren Blutausstrich	30
2.2.3	Blutbild	31
2.3.	Immunfluoreszenzfärbung der RBC mit CFDA-SE	31
2.4	Isolierung der CD 14+ Monozyten	32
2.4.1	Gewinnung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) durch Dichtegradientenzentrifugation	32
2.4.2	Separation der CD14+ Zellen durch magnetische Zellsortierung	33
2.5	Phagozytose-Assay	35
2.5.1	Vorbereitung der RBC	35
2.5.2	Phagozytose	36
2.5.3	Durchflusszytometrische Analyse der EPZ	37
2.5.4	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	39
2.5.5	Statistische Analyse	39
3	ERGEBNISSE	40
3.1	Eigenschaften von CFDA-SE als Marker für RBC	40
3.1.1	Fluoreszenzintensität von CFDA-SE gefärbten RBC und Blockierung der Bindung durch FCS	40
3.1.2	Stabilität von CFDA-SE während der Inkubationszeit	41
3.2	Darstellung des Phagozytose-Assays	43
3.2.1	Etablierung der Methode	43
3.2.1.1	Positiv- und Negativ-Kontrolle	43

3.2.1.2 Nachweis über die korrekte Erfassung der EPZ durch Fluoreszenz- Mikroskopie	46
3.2.2 Validierung der Methode durch Messung der <i>in vitro</i> EPZ von Patienten mit SMA in Vergleich zu gesunden Probanden	47
3.2.2.1 Klinische Parameter der Probanden	47
3.2.2.2 Vergleich der Phagozytoserate der SMA-Gruppe mit der der Kontrollgruppe.....	48
4 DISKUSSION	51
4.1 Verwendung von CFDA-SE als Marker für RBC	51
4.2 Die neue Methode zur Messung der <i>in vivo</i> EPZ, eine sinnvolle Innovation mit klinischem Nutzen?	52
4.2.1 Vergleich des vorgestellten Phagozytose-Assays mit bisher verwendeten Methoden.....	52
4.2.2 Potentielle Nachteile der neuen Methode	54
4.3 Erkenntnisse zur Pathogenese der SMA durch die neu entwickelte <i>in vitro</i> Methode zur Quantifizierung der EPZ	55
4.3.1 Einfluss der Monozytenfunktion auf die Phagozytose bei SMA	55
4.3.2 Rolle der pathologisch erhöhten EPZ bei der Entstehung der SMA	56
4.3.3 Neue therapeutische Ansätze zur Behandlung der SMA?	59
4.4 Anämien mit nicht vollständig verstandener Pathogenese: Beispiele für weitere Anwendungsbereiche der neuen Methode	60
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	62
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	63
7 ABBILDUNGSNACHWEIS	73
8 DANKSAGUNG	74
9 LEBENSLAUF	75

1 EINLEITUNG

1.1 Anämie

1.1.1 Allgemeine Einführung mit Entstehung, Definition und Klinik

Der Abbau von Erythrozyten (RBC, engl. *red blood cells*) nach durchschnittlich 120 Tagen durch Zellen des mononukleären, phagozytären Systems (MPS), genannt Erythrophagozytose (EPZ), ist ein physiologischer Vorgang, durch den ältere oder veränderte RBC aus dem Blutkreislauf entfernt werden. Gleichzeitig kommt es im Knochenmark zur ständigen Erythropoese (Neubildung von RBC im Knochenmark, EP), so dass im Körper ein dynamisches Gleichgewicht aus EP und EPZ besteht.

Eine Anämie ist die Folge des Ungleichgewichtes zwischen Synthese und Verlust von roten Blutkörperchen. Sie ist definiert als Verminderung der Erythrozytenzahl, der Hämoglobinkonzentration (Hb) und/oder des Hämatokrits (Hkt) unter die altersentsprechenden und geschlechtsspezifischen Referenzwerte (1).

Die Anämien lassen sich nach Größe in mikro-, normo- und makrozytär, sowie nach Hämoglobingehalt in hypo-, normo- und makrochrom unterteilen.

Klinische Zeichen einer Anämie sind unter anderem: Blässe von Haut, Schleimhäuten, Nagelbett und Konjunktiven, Müdigkeit, Dyspnoe, Tachykardie, Schwitzen, Kopfschmerzen, Ohrensausen und Schwindel.

1.1.2 Ursachen der Anämie

Neben dem Eisenmangel als weltweit häufigste Ursache der Anämie, der in Entwicklungsländern meist im Rahmen von Fehlernährung auftritt (2), führen folgende grundlegende Mechanismen zur Ausbildung einer Anämie:

1. Anämien verursacht durch Blutverlust (u.a. traumatisch, Tumorblutung)
2. Anämien infolge verminderter oder ineffektiver EP
3. Anämien durch eine verkürzte Lebenszeit der RBC (Hämolyse)

1.1.3 Hämolyse

Hämolyse ist ein etwas irreführender Begriff, da er oft synonym mit der direkten Zellyse innerhalb der Blutbahn verwendet wird. Als Hämolyse bezeichnet man allgemein den vorzeitigen Verlust von RBC und damit eine Verkürzung ihrer physiologischen Lebensdauer von 120 Tagen.

Zur besseren Differenzierung lässt sich die Hämolyse in eine intravasale und eine extravasale Form einteilen. Bei der extravasalen Form der Hämolyse handelt es sich um EPZ, d.h. die RBC werden von Zellen des MPS vorwiegend in Milz und Leber abgebaut.

Bei der selteneren intravasalen Hämolyse kommt es zu einer direkten Destruktion der Zellmembran von RBC innerhalb der Blutbahn. Sie wird meist durch die Aktivierung der terminalen Komplementfaktoren (C5b-9) in Gang gesetzt, ausgelöst z.B. durch Autoantikörper gegen RBC im Rahmen von Tumorerkrankungen, Virusinfektionen oder Medikamentengabe (3).

Auch während einer Malariainfektion kommt es nach erfolgter intrazellulärer Reifung des Parasiten zu einer Ruptur des Erythrozyten und damit zur intravasalen Hämolyse. Typische laborchemische Zeichen jeder Form der Hämolyse sind ein Anstieg des indirekten Bilirubins und der Laktatdehydrogenase (LDH). Die intravasale Hämolyse ist zusätzlich gekennzeichnet durch den Anstieg von freiem Hämoglobin und einem Abfall des Haptoglobins im Serum. Bei Haptoglobin handelt es sich um ein in der Leber gebildetes Glykoprotein, welches im Serum dazu dient, freies Hämoglobin abzufangen. Die entstehenden Komplexe werden dem MPS zugeführt. Da diese nicht nierengängig sind, wird ein renaler Eisenverlust verhindert und die Nieren werden vor einer toxischen Schädigung durch freies Hämoglobin geschützt.

Beispiele für klinisch relevante Anämien, deren Entstehung u.a. auf einen erhöhten Verlust von RBC zurückgeführt wird, sind:

- Malariaanämie (4,5)
- Anämien verursacht durch genetische Defekte der RBC: Sichelzellanämie (6) Thalassämien (7), Sphärozytose (8), G6PD-Mangel (9)

- Anämien bedingt durch Autoantikörper: primär ohne erkennbare Ursache oder sekundär bei Grunderkrankungen wie z.B. Lupus erythematodes (10)
- Tumoranämien, z.B. bei malignen Lymphomen (11)
- Anämien durch virale Infektionen, z.B. Epstein-Barr Virus (12) und Parvovirus B19 (13)
- chronische Entzündungsanämie (ACD, engl. *anemia of chronic disease*) (14)

Bei vielen der hier aufgeführten Krankheitsbilder, so auch bei der Malariaanämie, ist jedoch weiterhin unklar, welche Anteile der extravasalen und der intravasalen Hämolyse zur Entstehung beitragen.

1.1.4 Anämiediagnostik

Zur Basisdiagnostik der Anämie gehört ein großes und ein kleines Blutbild, davon sind besonders Hb, Hkt, mittleres korpuskuläres Volumen (MCV) und Retikulozytenzahl (Anzahl noch nicht ausgereifter Vorläuferzellen der RBC im peripheren Blut) von Bedeutung, sowie ergänzend ein Blutausstrich zur Beurteilung der Zellmorphologie. Die spezielle Diagnostik beinhaltet die Bestimmung von Eisen, Ferritin, Transferrin, Vitamin B12, Folsäure, LDH und indirektem Bilirubin.

Zur Bestimmung der hämatopoetischen Aktivität des Knochenmarks stehen verschiedene direkte und indirekte Messmethoden zur Verfügung. Die Messung des Hormons Erythropoetin (EPO) kann eine inadäquate Stimulation der EP durch insuffiziente renale EPO-Produktion als Ursache für eine Blutbildungsstörung ausschließen (15). Gebräuchliche Parameter zur Beurteilung der EP sind Retikulozytenanteil, löslicher Transferrin Rezeptor (sTfR) und Erythrozyten-Verteilungsweite (RDW) (16). Insbesondere sTfR dient als sensitiver Parameter zur Erfassung der frühen EP (17), noch bevor ein messbarer Anstieg der Retikulozyten vorliegt. Zudem wird sTfR nicht durch das Vorliegen einer Entzündung beeinflusst und eignet sich folglich auch zur Diagnostik von Anämien, die in Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen stehen. Als direkte Metho-

de kann die Knochenmarkbiopsie Aufschluss über morphologische und quantitative Veränderungen der EP geben (18). Immunologische Verfahren wie die Durchflusszytometrie eignen sich zur genauen Quantifizierung bestimmter Zellreihen im Knochenmark (19).

Bei Verdacht auf eine hämolytische Anämie erfolgt zusätzlich die Bestimmung von Haptoglobin sowie ein Autoantikörper-Suchtest (direkter und indirekter Coombs-Test).

Die intravasale Hämolyse lässt sich durch die Serummarker LDH, indirektes Bilirubin, freies Hämoglobin und Haptoglobin abschätzen (20).

Die Messung der EPZ hingegen stellt sich als schwierig dar und es mangelt bisher an standardisierten Verfahren, welche sich dazu eignen die EPZ quantitativ zu erfassen.

1.2. Malaria tropica

1.2.1 Epidemiologie

Die durch eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* (Erreger der Malaria tropica, Pf) weltweit verursachten Todesfälle werden in den Statistiken der WHO (Weltgesundheitsorganisation, engl. *World Health Organization*) für das Jahr 2010 mit circa 655 000 angegeben, 86 % der Opfer waren Kinder unter fünf Jahren (21). In einer weiteren epidemiologischen Studie zur Mortalität bei Malaria von Murray et al. werden die weltweiten Todesfälle für 2010 mit circa 1,1 Millionen noch höher angegeben als in dem neuesten WHO-Bericht (22). Aus beiden Statistiken geht gleichermaßen hervor, dass rund 90% aller Todesfälle in Afrika südlich der Sahara auftraten. Zudem konnte in den letzten Jahren ein signifikanter Rückgang der Mortalität beobachtet werden (21, 22). Die genauen Ursachen für die Reduktion der Sterbefälle sind nicht bekannt. Man nimmt jedoch an, dass die durch internationale Geldgeber unterstützten Projekte zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten in der Dritten Welt (u.a. flächendeckende Verteilung von Moskitonetzen, Absenkung der Malariamedikamentenpreise) ihren Teil dazu beigetragen haben (22).

Letale Komplikationen betreffen deshalb vorwiegend Kinder, da Menschen in endemischen Gebieten nach mehrmaliger Infektion mit dem Parasit eine Semi-Immunität entwickelt haben, die vor schweren Verlaufsformen schützt. Schwangere und Personen, die längere Zeit nicht exponiert sind, verlieren zum großen Teil ihre erworbene Immunität und sind ebenfalls gefährdet, eine schwere Verlaufsform zu entwickeln (23).

Nach den hier aufgeführten Statistiken trägt die Malaria tropica, neben chronischer Mangelernährung und weiteren häufigen Infektionen wie Pneumonie und Diarrhöe, wesentlich zur hohen Kindersterblichkeit im tropischen Afrika bei (24, 25).

1.2.2 Infektionsweg

Malaria tropica wird verursacht durch einen Parasiten vom Genus *Plasmodium*. Über den Stich der weiblichen *Anopheles-Mücke* während der Blutmahlzeit gelangen die motilen Formen der Parasiten, die Sporozoiten, aus der Speicheldrüse der Mücke in den menschlichen Wirtsorganismus, wo sie über die Blutbahn die Parenchymzellen der Leber befallen. Dort beginnt das Stadium der asexuellen Vermehrung (intrahepatische Schizogonie). Nach Ende der Reifung, bei der aus einem Sporozoit circa 30 000 sogenannte *Merozoiten* entstehen können, kommt es zu einer Ruptur der Leberzelle und die Parasiten gelangen erneut in die Blutbahn. Dort dringen sie rasch über spezifische Oberflächenrezeptoren in die RBC ein und werden zu *Trophozoiten*. Durch die charakteristischen Ringformen der Parasiten innerhalb der RBC kann nun eine Pf-Infektion mikroskopisch nachgewiesen werden. Nach der Invasion in einen Erythrozyten dienen dem Parasit intrazelluläre Proteine als Nahrungsquelle, insbesondere Hämoglobin. Das bei dem Stoffwechsel entstehende, potentiell toxische Häm wird zu Hämozoin kristallisiert. Im Rahmen des Reifungsprozesses kommt es auch zu einer Veränderung der Oberflächenmembran der RBC.

Der Parasit wird gegen Ende des circa 48-stündigen Zyklus als *Schizont* bezeichnet (erythrozytische Schizogonie). Er hat nun fast das ganze Hämoglobin der Zelle aufgebraucht und es haben mehrere Kernteilungen stattgefunden. Es kommt zu einer Ruptur des Erythrozyten, durch die wiederum 6-30 *Merozoiten*

in die freie Blutbahn entlassen werden. Sobald die Parasitämie eine bestimmte Konzentration im Blut erreicht hat, treten die ersten klinischen Symptome auf. Die Spannbreite der Parasitendichte, bei der es zur klinischen Symptomatik kommt, ist mit 20–20 000 Parasiten pro μl Blut sehr groß und hängt auch wesentlich von der jeweiligen Immunität des Patienten gegen Pf ab.

Neben der durch Pf verursachten *Malaria tropica* gibt es weitere humanpathogene Arten. *Plasmodium vivax* und *ovale* sind verantwortlich für die *Malaria tertiana*, *Plasmodium malariae* für die *Malaria quartana*. Schwere akute Verläufe sind jedoch bei Infektionen dieser Typen sehr selten. Bei Infektionen mit *Plasmodium vivax* und *ovale* beginnt ein Teil der intrahepatischen Formen nicht direkt mit der Vermehrung, sondern verbleibt dort für Monate bis Jahre in einer Ruhephase. Die als *Hypnozoiten* bezeichneten Formen des Parasiten sind die Ursache für die typischen Rückfälle bei einer Infektion mit *Plasmodium vivax* und *ovale* (26).

In den letzten Jahren konnte mit *Plasmodium knowlesi* eine weitere humanpathogene Art im asiatischen Raum nachgewiesen werden. Die Infektion kann ähnlich schwer verlaufen wie bei Pf (27).

1.2.3 Schwere Malariaanämie (SMA)

1.2.3.1 Allgemeine Einführung und Definition

Eine schwere Anämie (SA) kann zu einem Herz-Kreislaufversagen und in dessen Folge zum Tode führen. Die SA genau an Hand von Messgrößen zu definieren, fällt schwer. Die gebräuchlichste Definition wurde von der WHO formuliert, die eine SA als $\text{Hb} < 7 \text{ g/dl}$ festgelegt hat (28). Es hat sich jedoch gezeigt, dass bei afrikanischen Kindern ein $\text{Hb-Wert} < 5 \text{ g/dl}$ am besten mit dem klinischen Bild der SA korreliert (29). Neben dem Hb-Wert spielen das Alter des Patienten sowie die Tatsache, ob es sich um eine eher chronische oder akute Verlaufsform handelt, eine wichtige Rolle für die Prognose.

Die durch Pf verursachte SMA ist von einer Arbeitsgruppe der WHO definiert durch ein $\text{Hb-Wert} < 5 \text{ g/dl}$ bei gleichzeitiger Parasitämie von $> 1\,000$ Parasiten/ μl im peripheren Blut. Durch eine effektive medikamentöse Therapie gegen Pf kommt es auch zu einer Besserung der SMA. Eine Zweiterkrankung, die für

die Anämie ursächlich sein könnte, muss dabei ebenfalls ausgeschlossen werden (30).

Die SMA ist eine häufig vorkommende schwere Komplikation im Rahmen einer Pf-Infektion und betrifft vor allem Kleinkinder in Gebieten mit hohen Übertragungsraten (31,32). Im Rahmen einer groß angelegten epidemiologischen Studie (SMAC-Studie, engl. *severe malaria in african children*), bei der die klinischen und laborchemischen Daten aller hospitalisierten Kinder mit Pf-Infektion aus fünf Zentren in malariaendemischen Gebieten Afrikas erfasst wurden, wiesen im Jahre 2003 21% der Kinder eine SMA auf (33). Das Risiko, an den Folgen der SMA zu versterben, wird auf rund 12 % geschätzt (34).

1.2.3.2 Ätiologie

Ähnlich wie in der Forschung zur zerebralen Malaria, wo die Adhäsion parasitierter RBC an Endothelzellen in den Gefäßen der Mikrozirkulation als ein wichtiger Pathomechanismus bei der Entstehung vermutet wird (35), konnten auch die genauen Pathomechanismen der SMA noch nicht vollständig geklärt werden. Man geht heute von einer multifaktoriellen Genese aus, bei der drei wesentliche Mechanismen eine Rolle spielen (36). Dazu zählen, neben dem Verlust von infizierten und nicht-infizierten RBC durch direkte Lyse und EPZ, (4, 5) eine beeinträchtigte Neubildung der RBC im Knochenmark. Es wird dabei angenommen, dass ein Ungleichgewicht pro- und anti-inflammatorischer Zytokine (u.a. IL10, TNF- α) und weitere pro-inflammatorische Mediatoren, wie z. B. das beim Abbau von Hämoglobin durch den Parasiten erstandene Hämozoin, zu einer Dyserythropoese und Supprimierung der Erythropoese im Rahmen einer Pf-Infektion führen (37-39).

Die spannende Frage, wie hoch jedoch der jeweilige Beitrag an der Entstehung der SMA ist, konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden, u.a. auch weil bisher standardisierte Methoden zur quantitativen Messung der EPZ fehlten.

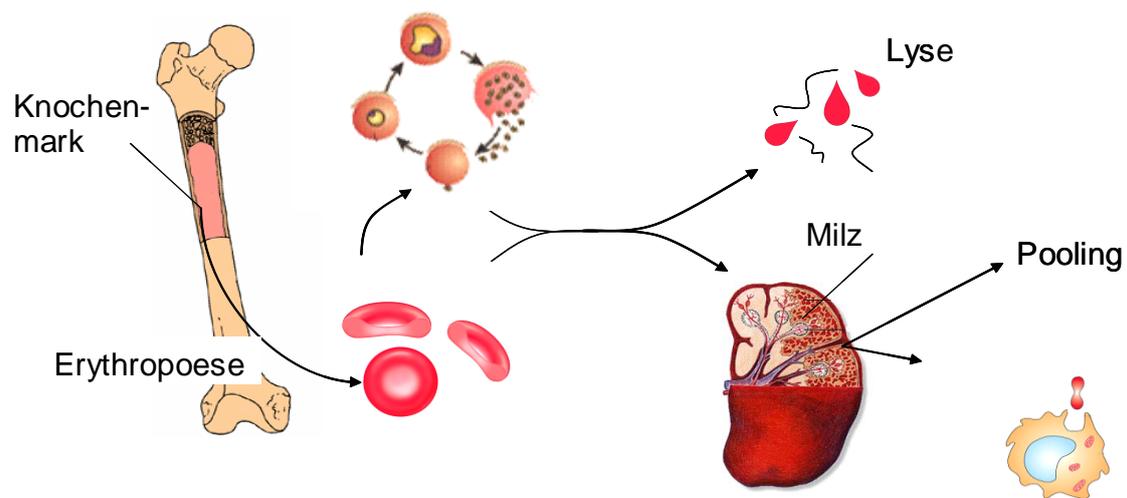


Abb. 1: Verschiedene Pathomechanismen, die zur Entstehung der SMA beitragen: Störung der EP, intravasale Lyse von mit Parasiten befallenen RBC, Pooling (Ansammlung) von befallenen und gesunden RBC in der Milz und deren Abbau durch Makrophagen (EPZ).

1.2.3.3 Therapie

Die einzige Behandlung der SMA besteht bis heute, neben einer effektiven Chemotherapie der Pf-Infektion, in der Gabe von Blutkonserven nach strenger Indikationsstellung (40).

In den Industrienationen stellt die Gabe einer Bluttransfusion ein relativ risikoarmes Verfahren dar. Dies beruht im Wesentlichen auf den strengen behördlichen Kontrollvorschriften für die Spenderauswahl, der Lagerung und der Aufbereitung der Konserven. Die drei größten Risiken für den Empfänger einer Bluttransfusion bestehen, erstens in einer Volumenüberlastung (1:100 – 1:1 000), insbesondere für Kleinkinder und ältere Menschen, zweitens in einer bakteriellen Kontamination (1:10 000 - 1:100 000) und der damit verbundenen Gefahr einer Sepsis und drittens in einer Fehltransfusion durch Verwechslung innerhalb der Blutgruppensysteme (1:1 000 – 1:10 000) (41).

Die Gefahr einer Virus-Infektion konnte dagegen in den letzten Jahren minimiert werden. Mit Hilfe moderner Labortests können auch Antikörper-negative Spender mittels direktem Antigen-Nachweis detektiert werden, so dass die aktuelle Wahrscheinlichkeit für eine Übertragung von HIV, Hepatitis B und C auf zusammen $< 1:1\,000\,000$ beziffert wird (42).

Während, aufgrund der erwähnten hohen Standards, eine Bluttransfusion in den Industrienationen meist unproblematisch verläuft, ist diese Maßnahme in den Entwicklungsländern mit einer hohen Übertragungswahrscheinlichkeit von Infektionskrankheiten, insbesondere Hepatitis B, Hepatitis C und HIV (43) assoziiert. Allein das Risiko einer HIV-Infektion wird auf 0,7 % pro erfolgte Bluttransfusion geschätzt (34). Ursache ist hier vor allem das Fehlen moderner und gleichzeitig teurer Testverfahren wie dem direkten Virus-Nachweis mittels PCR. Ein weiteres Problem ist, dass die Blutkonserven in den peripheren Krankenhäusern der Dritten Welt häufig nur inadäquat gelagert werden können. Aufgrund von häufigen Stromausfällen sind Unterbrechungen der Kühlkette an der Tagesordnung. Somit erhöht sich auch die Gefahr einer Vermehrung von Bakterien und damit die Häufigkeit einer transfusionsbedingten Sepsis. Kurzum kann man sagen, dass die Bluttransfusion in Entwicklungsländern ein sehr riskantes Verfahren darstellt und somit alternative Methoden zur Behandlung der SMA wünschenswert wären.

1.3 Monozyten

1.3.1 Definition

Monozyten sind im Blut zirkulierende, zur Phagozytose fähige Zellen des Immunsystems und die Vorläufer der gewebsständigen Makrophagen. Monozyten und gewebsständige Makrophagen bilden zusammen das MPS (44). Sie machen 3-10 % der Gesamtpopulation der Leukozyten aus und zirkulieren circa 8-72 h in der Blutbahn (45) bevor sie ins Gewebe auswandern und sich zu gewebspezifischen Makrophagen ausdifferenzieren (46).

1.3.2 Bildung

Im Knochenmark differenzieren sich aus myeloischen Vorläuferzellen die Monozyten und die Granulozyten, die eine weitere Population zur Phagozytose fähiger Zellen darstellen. Im Laufe der Monozytopoese entwickeln sie sich unter dem Einfluss der spezifischen Wachstumsfaktoren GM-CSF (engl. *granulocyte*

macrophage colony-stimulating factor) und M-CSF (engl. *macrophage colony-stimulating factor*) zu reifen Monozyten, welche vom Knochenmark ins Blut gelangen (47).

1.3.3 Funktion

Monozyten und Makrophagen sind ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. Zu ihren Aufgaben gehört es, Antigene zu phagozytieren und diese den T-Lymphozyten zu präsentieren (48,49).

Die mononukleären Zellen können nach Antigenaufnahme durch Synthese und Sekretion von inflammatorischen Mediatoren wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Interleukin 8 (IL-8) eine Immunreaktion auslösen. Dies führt dann auch zu einer Erhöhung der Rezeptoren auf der Monozytenoberfläche, wodurch wiederum deren Phagozytosefähigkeit gesteigert wird (50).

Wichtige Rezeptoren auf der Oberfläche zur Aufnahme von Partikeln sind der Fc-Rezeptor für Immunglobulin G (IgG) und der Komplementrezeptor 1 (CR1) für den Komplementfaktor 3b (C3b).

Da Monozyten besonders dafür geeignet sind, große Partikel wie RBC mit einem Zelldurchmesser von circa 7,5 μm aufzunehmen, spielen sie für die Immunabwehr der Pf-Infektion eine wichtige Rolle. Sie erkennen und phagozytieren nicht nur den Parasit im Blut, sondern auch bereits infizierte RBC.

1.3.4 Zellmorphologie und Oberflächenmarker CD14

Durch ihre Morphologie lassen sich Monozyten mikroskopisch gut von den anderen Blutzellen differenzieren. Mit einem Durchmesser von circa 15 μm sind sie die größten Zellen im peripheren Blut. Ihr Zellkern ist nierenförmig, etwas dezentral gelegen und nimmt gut die Hälfte des Zellvolumens ein.

Auf der Zelloberfläche befindet sich in hoher Anzahl das Antigen CD14 (CD = Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale, engl. *cluster of differentiation*), ein Molekül, welches mit weiteren Rezeptoren (u.a. *Toll-like receptor 4*) Teil eines Komplexes zur Bindung von Lipopolysaccharid (LPS) darstellt (51). LPS ist ein Membranbestandteil gramnegativer Bakterien, durch seine Bindung

an den Rezeptorkomplex wird eine starke Immunantwort hervorgerufen. CD14 wird in geringen Mengen auch auf neutrophilen Granulozyten exprimiert. Die Konzentration ist jedoch auf Monozyten und Makrophagen um ein Vielfaches höher, so dass dieser Marker charakteristisch für diese Zellpopulation ist. Um Monozyten von anderen Zellen des peripheren Blutes zu trennen, wird diese Eigenschaft in immunologischen Verfahren genutzt.

1.4 Erythrophagozytose (EPZ)

1.4.1 Physiologischer Mechanismus der EPZ

RBC haben eine Lebenszeit von circa 120 Tagen an deren Ende sie vom MPS abgebaut werden (52). Alte RBC verlieren am Ende der Lebensspanne die physiologische Funktion und es kommt zu Veränderungen ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften (53). Die Veränderungen drücken sich auf der Zelloberfläche aus und unser Immunsystem besitzt die Fähigkeit, alte und geschädigte RBC zu erkennen und zu eliminieren (54).

Ältere RBC weisen eine höhere Zelldichte als junge auf (55) und lassen sich somit durch Dichtegradientenzentrifugation separieren. Bei Untersuchungen ließen sich auf den älteren Zellen erhöhte Ablagerung von IgG (56-58) und C3b (59, 60) nachweisen. Es wird angenommen, dass die Ablagerungen zum großen Teil aus einer Modifikation des Transmembran-Moleküls Bande-3-Protein resultieren, welches Bikarbonat (HCO_3^-) im Austausch gegen Chlorid-Ionen (Cl^-) durch die Membran transportiert (61). Diese Modifikationen sind vermutlich Folge des oxidativen Stresses durch freie Sauerstoffradikale und Stoffwechselprodukte, denen die RBC permanent ausgesetzt sind (62-65). Dies führt dann zu einer Ablagerung von zirkulierenden Bande-3-Protein-Antikörpern (Ak), welche modifizierte und aggregierte Bande-3-Proteine binden sowie zu einer vermehrten Ablagerung von C3b und IgG, die wiederum an den Makrophagen-Rezeptor CR1 und CD35 (66) binden und die Phagozytose einleiten (67, 68). IgG und C3b dienen dabei als Opsonine. Darunter versteht man im Serum vorkommende Stoffe, die durch Anlagerung an körpereigene Zellen oder körperfremdes

Material (z.B. Bakterien, Pilze) deren Phagozytose durch Neutrophile, Monozyten und Makrophagen begünstigen.

Neben der Modifikation von Bande-3-Protein als Schlüssel zur Einleitung der EPZ, werden in der aktuellen Literatur weitere Modelle wie die Rolle der Ablagerung von Phosphatdysiderin (PS) und die Erkennung durch einen *Scavenger*-Rezeptor des Phagozyten diskutiert, die alternativ oder parallel dazu ablaufen können (69, 62, 70).

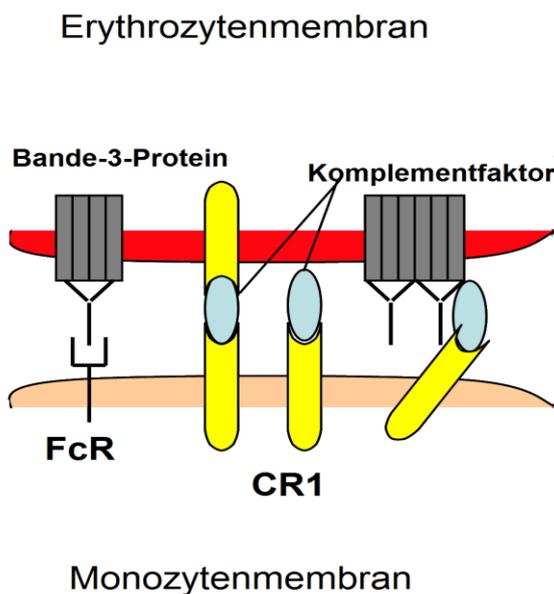


Abb. 2: Rezeptor-vermittelte Mechanismen zur Einleitung der EPZ von RBC durch Monozyten: auf der Zellmembran des Monozyten befinden sich für die Phagozytose wichtige Rezeptoren insbesondere der Fc-Rezeptor für Bande-3-Protein-AK und CR1 für Komplementfaktor. Komplementfaktor und IgG befinden sich als Opsonine angelagert auf der Zelloberfläche des Erythrozyten. Man nimmt an, dass die Phagozytose wesentlich durch eine Modifikation von Bande-3-Protein auf der Erythrozytenmembran initiiert wird.

1.4.2 Rolle der EPZ bei Malariainfektion

Bei verschiedenen Krankheitsbildern, wie auch im Rahmen einer Infektion mit Pf, ist die Lebenszeit der RBC verkürzt (5).

Während einer Malariainfektion können infizierte Zellen durch das Immunsystem erkannt und mittels Phagozytose aus der Blutbahn entfernt werden (71).

Dieser Effekt scheint gerade bei semi-immunen Personen in malariaendemi- schen Gebieten besonders ausgeprägt zu sein (72). Die *Clearence* von parasitierten RBC (Entfernung aus der Blutstrombahn) ähnelt der von alten RBC, wo- bei infizierte RBC durch eine Veränderung der Zellmembran von Phagozyten erkannt und abgebaut werden können (4, 73). Neben malariaspezifischem Anti- gen (PfEMP-1), ließen sich auch Komplementfaktor (C) und IgG vermehrt auf der Oberfläche nachweisen (71).

Nach heutigen Erkenntnissen scheinen auch freie Sauerstoffradikale, die bei der Verstoffwechselung von Hämoglobin durch Pf entstehen (74) und durch ihre Wirkung zu einer erhöhten Verdichtung von Bande-3-Protein auf der Erythrozytenmembran führen, eine Rolle bei der *Clearence* des Parasiten zu spielen (75-77).

Wie jedoch bereits im Zusammenhang mit der Ätiologie der SMA erwähnt, konnte auch ein verstärkter Abbau von nicht-infizierten RBC im Rahmen einer Pf Infektion nachgewiesen werden (5).

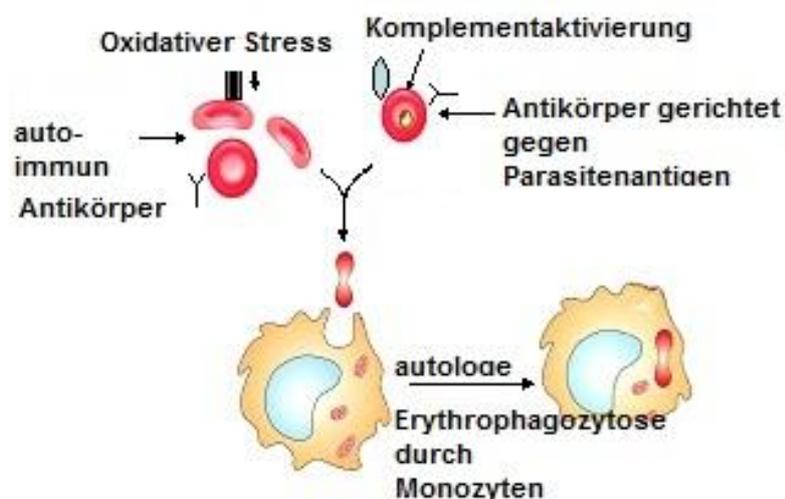


Abb. 3: EPZ im Rahmen einer Infektion mit Pf: verschiedene Mechanismen führen zur Phagozytose von parasitierten und nicht-parasitierten RBC. Bei der Phagozytose von infizierten RBC scheint die Expression von PfEMP-1 auf der Zellmembran sowie der oxidative Stress, verursacht durch freie Sauerstoffradikale, eine wichtige Rolle zu spielen.

1.4.3 Methoden zur Messung der EPZ

Die quantitative Messung der EPZ gestaltet sich schwierig. Deshalb kann ihre Relevanz an der Entstehung von Anämien im Rahmen verschiedener Krankheitsentitäten häufig nicht vollständig geklärt werden.

Um die Menge der *in vivo* Phagozytose abschätzen zu können, wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Verfahren angewandt. Man kann sie grob in drei Kategorien einteilen:

- 1) Mikroskopisches Zählen von Erythrozyten innerhalb der Phagozyten (78-80)
- 2) Bestimmung des phagozytierten Hämoglobins durch Lumineszenz-Messung (81)
- 3) Markierung der RBC mit radioaktiven (82, 83) oder fluoreszierenden (84, 85), Membran-gebundenen Markern und anschließender Messung der *in vitro* Phagozytose

Auf die hier aufgezählten Methoden wird in Kapitel 4 der Arbeit noch einmal ausführlich eingegangen. Es kann jedoch vorweggenommen werden, dass die bisher verwendeten Methoden zur quantitativen Messung der EPZ unterschiedliche Schwachstellen aufweisen und sich daher nur bedingt zum Routineeinsatz unter klinischen Bedingungen eignen.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Die Anämie infolge einer Grunderkrankung ist eine ernstzunehmende Komplikation, die leicht zum Tode führen kann. Um Komplikationen zu behandeln oder zu verhindern, ist es nützlich, die zu Grunde liegenden Ursachen besser zu verstehen.

Zur Erfassung der verschiedenen Ursachen einer Anämie, wie z.B. des Eisenmangels, einer Blutbildungsstörung im Knochenmark oder des Verlusts von RBC durch intravasale Hämolyse, stehen bereits verschiedene, im klinischen Alltag gut etablierte, diagnostische Methoden zur Verfügung.

Im Gegensatz dazu gestaltete es sich bisher schwierig mit den üblichen Labor-
methoden, den beschleunigten Verlust von RBC durch EPZ (extravasale Hämolyse)
quantitativ zu erfassen.

Da jedoch eine pathologisch erhöhte Phagozytose von RBC als relevante Ursache
für die Entstehung von Anämien im Rahmen verschiedener Krankheitsprozesse
(u.a. Tumoranämie, chronische Entzündungsanämie, Malariaanämie)
vermutet wird bzw. nachgewiesen wurde, ist die Einführung einer neuen Methode
zur quantitativen Messung der EPZ sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit wird ein neu entwickelter, auf Fluoreszenzmessung
basierender und gut reproduzierbarer *ex vivo* Assay zur quantitativen Bestimmung
der EPZ vorgestellt. Die Validität der Methode soll am Beispiel der SMA
demonstriert werden, ein Zustand bei dem eine erhöhte EPZ bereits gezeigt
werden konnte (4, 5). Das MPS wird erstmals durch die autologen Monozyten
repräsentiert. Als RBC-Marker wird der intrazellulär bindende Fluoreszenzfarbstoff
CFDA-SE (*Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester*) verwendet,
dessen positive Eigenschaften zur Färbung der RBC aufgezeigt werden sollen.
Mit der Methode soll gleichzeitig die Hypothese, nach der eine pathologisch
erhöhte EPZ wesentlich an der Entstehung SMA beteiligt ist, untersucht werden.
Dies ist von klinischer Relevanz, da die SMA eine wichtige Todesursache
von Kindern im tropischen Afrika darstellt und die einzige effektive Behandlungsmöglichkeit
(Bluttransfusion) in den Entwicklungsländern ein risikoreiches Verfahren ist.

Durch die neu entwickelte Methode soll deshalb dazu beigetragen werden die
bisherige Anämie-Diagnostik sinnvoll zu erweitern.

Sämtliche hier in der Arbeit aufgeführten Resultate sind bereits zuvor in einer
Publikation von Fendel et al. 2007 veröffentlicht worden (86). Der Verfasser der
vorliegenden Arbeit ist einer der Autoren des Manuskripts und hat im Rahmen
einer Studie zur Grundlagenforschung der SMA an der praktischen Durchführung
des hier vorgestellten Phagozytose-Assays mitgewirkt (86).

2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studie zur Evaluation des Phagozytose-Assays

2.1.1 Studiendesign und Ethik Kommission

Die Evaluation der neuen Methode zur *ex vivo* Messung der EP war Teil einer prospektiven, kontrollierten Fall-Kontroll-Studie zur Pathogenese der SMA (SMA-Studie), die von Juli 2003 bis Juli 2005 im Forschungslabor des Albert-Schweitzer-Krankenhauses in Lambaréné, Gabun, durchgeführt wurde.

Insgesamt wurden in diesem Zeitraum 91 Kindern im Alter zwischen 12 Monaten und 6 Jahren, die eine Monoinfektion mit Pf aufwiesen, in die Studie aufgenommen. Die Altersgruppe wurde deshalb so gewählt, da bei Kleinkindern in malariaendemischen Gebieten in aller Regel noch keine ausreichende Immunität zum Schutze vor einer schweren Verlaufsform der Pf-Infektion besteht und die Anämie eine der wichtigsten Komplikationen der Malaria in dieser Altersgruppe darstellt (23).

Patienten, die bereits wegen der aktuellen Malaria gegen Pf wirksame Medikamente verabreicht bekamen oder eine schwere Begleiterkrankung aufwiesen, wurden ausgeschlossen. Bei allen Probanden wurden, neben einem Routinelabor, ein maschinelles und manuelles Blutbild sowie ein Dicker Tropfen (DT) angefertigt. Um weitere häufige Ursachen, die zu einer Anämie beitragen können auszuschließen wurden Tests auf Sichelzellanämie, Bilharziose und Filariose durchgeführt, zudem ein direkter und indirekter Coombs-Test zur Suche von Autoantikörpern. Zum Ausschluss eines schweren Eisenmangels diente das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV) als indirekter Indikator.

Obwohl in Europa bei Kindern bereits ein MCV von < 70 fl als pathologisch gilt, wurde für die SMA Studie ein MCV < 65 fl als Ausschlusskriterium gewählt. Damit wurde Faktoren wie Vitaminmangel, häufige parasitäre Infektionen und angeborene Hämoglobinopathien Rechnung getragen, die dafür sorgen dass der Durchschnittswert des MCV in dieser Population niedriger ist als der von europäischen Kindern.

Entsprechend dem Hb-Wert bei Aufnahme wurden die Kinder einer von drei Gruppen zugeordnet (Gruppe A: Hb \leq 5 g/dl, Gruppe B: Hb $>$ 5 und \leq 10 g/dl, Gruppe C: Hb $>$ 10 g/dl). Nach dem Aufnahmedatum erfolgte eine *Follow-up*-Periode von 56 Tagen, in der, nach initial erfolgreicher Chemotherapie der Pf-Infektion, eine Re-Infektion oder ein Rezidiv ausgeschlossen wurde.

Für die vorgestellte Arbeit wurden aus der Gesamtpopulation der SMA-Studie die ersten acht Patienten aus der Gruppe A aufgenommen, also Probanden die zum Zeitpunkt des Erstkontaktes eine SMA nach WHO-Kriterien aufwiesen (30). Demgegenüber wurden acht gesunde Kinder aus der Population der Gruppe A gestellt, bei denen für ein Intervall von 56 Tagen eine Infektion ausgeschlossen werden konnte.

Vor der Probenentnahme wurde mindestens ein Elternteil ausführlich über den Zweck der Studie und die angewendeten Testverfahren in Landessprache (französisch) aufgeklärt und eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Studie wurde den Prinzipien der Deklaration von Helsinki entsprechend durchgeführt und durch die Ethik-Kommission der internationalen Albert-Schweitzer-Stiftung sowie durch die Ethik-Kommissionen der Universitäten von Münster und Tübingen geprüft und zugelassen.

2.1.2 Studienort

Der Ort Lambaréné liegt am Fluss Ogowe und ist Hauptstadt der Provinz Moyen-Ogooué, Gabun, Westafrika. Das Klima dort ist überwiegend tropisch. Malaria gilt in dieser Region als endemisch mit ganzjährig hoher Übertragungsrate. Pro Jahr kommen auf jede Person rund 50 infektiöse Stiche (87). Bei mehr als 90 % der Fälle handelt es sich um eine Monoinfektion mit Pf (88).

In Lambaréné befindet sich das 1913 von Albert Schweitzer gegründete Krankenhaus, welches heute von der „Internationalen Stiftung für das Albert-Schweitzer-Spital in Lambaréné“ unterhalten wird und damit eine wichtige Einrichtung zur medizinischen Versorgung der Bevölkerung Gabuns darstellt. Täglich werden dort bis zu 20 Kinder mit Malaria ambulant und stationär behandelt. Angeschlossen an die Klinik ist ein Forschungslabor, dessen Projekte unabhängig vom Budget des Krankenhauses finanziert werden. Seit 1992 befindet

sich das Labor unter wissenschaftlicher Leitung von Prof. Peter G. Kremsner und ist eines der führenden Zentren für klinische und experimentelle Studien zur Therapie, Impfung, Epidemiologie und Pathogenese der *Malaria tropica*.



Abb. 4: Politische Karte des westafrikanischen Staates Gabun

2.1.3 Studienpopulation

Die Studienpopulation bestand aus insgesamt 16 Probanden. Bei den acht Patienten mit SMA erfolgte die Probenentnahme direkt nach Aufnahme in die Studie. Unmittelbar nach der Blutabnahme wurde die Therapie, basierend auf den zum Studienzeitpunkt aktuellen Empfehlungen zur Behandlung der *Malaria tropica* mit einer i.v.-Therapie-Kombination aus Quinin und Clindamycin für 5 Tage, eingeleitet (89). Gegebenenfalls stellte der jeweilige Studienarzt die Indikation zur Vollbluttransfusion, wobei er sich an den aktuellen Leitlinien der WHO zur Behandlung der SMA orientierte (40). Die Patienten befanden sich während dieses Zeitraums zur stationären Überwachung auf der pädiatrischen Station des Albert-Schweitzer-Krankenhauses.

Die Kontrollgruppe bildeten acht gesunde Probanden, bei denen eine Pf-Infektion für ein Intervall von 56 Tagen ausgeschlossen werden konnte. Sie waren initial mit einer Pf-Monoinfektion in die SMA-Studie aufgenommen und erfolgreich behandelt worden. Der Therapieerfolg wurde in den ersten fünf Tagen täglich mittels DT kontrolliert. Die Therapie galt als erfolgreich, wenn nach spätestens fünf Tagen keine Parasiten mehr nachweisbar waren. In einem *Follow-up*-Zeitraum von 56 Tagen erfolgten regelmäßige Kontrollen in Form eines DT (14-, 28-, 56 Tage nach Therapiebeginn), um eine erneute Infektion oder eine asymptomatische Parasitämie auszuschließen. Die Probanden konnten somit als gesund betrachtet werden, da nach einem zweimonatigen krankheitsfreien Intervall keine relevanten Folgen der Malariainfektion mehr zu erwarten waren. So war es möglich in einer hochendemischen Region, eine homogene Vergleichsgruppe zu schaffen.

Einschlusskriterien:

Allgemein für alle Probanden

- Alter zwischen 1 und 6 Jahren
- Aufklärung durch ärztliches Personal und schriftliche Einverständniserklärung des Erziehungsberechtigten
- Monoinfektion mit Pf
- Parasitämie > 1000 Pf/ μ l

Speziell für Probanden mit SMA

- Hb \leq 5 g/dl

Speziell für gesunde Probanden

- Patienten der Gruppe A mit erfolgreicher Behandlung der Pf - Monoinfektion und anschließendem krankheitsfreiem Intervall von 56 Tagen

Ausschlusskriterien:

- MCV < 65 fl
- Schwere Komplikation der Malariainfektion außer SMA
- Schwere Krankheit außer Malaria tropica
- Potentiell effektive Vorbehandlung der Malaria tropica
- Bluttransfusion in den letzten 28 Tagen
- Andere Grunderkrankungen, die zu einer Anämie führen: Sichelzellanämie, schwere Mangelernährung, Bilharziose, Filariose

2.1.4 Probenentnahme

Zur Isolierung der Monozyten wurde den Probanden, nach Anlage einer Oberarmstauung und leichter Stauung, mit Hilfe einer Venenpunktionsskanüle 5 ml venöses Blut in Heparin-Monovetten (15 I.E. Heparin/ml Blut, Sarstedt, Nürnberg) unter sterilen Bedingungen entnommen. Die Gewinnung der RBC erfolgte aus der Abnahme von 1,5 ml venösem Blut in EDTA-Monovetten (Sarstedt, Nürnberg). Die RBC zur Positiv- und Negativ-Kontrolle des Phagozytose-Assays wurden von einem gesunden Spender mit der Blutgruppe 0, Rhesus positiv, gewonnen. Bei den Patienten mit SMA erfolgte die Blutabnahme vor Therapiebeginn, um Mischblut nach eventueller Bluttransfusion zu vermeiden.

2.2 Diagnostische Verfahren

2.2.1 Mikroskopischer Nachweis von Pf und Bestimmung der Parasitämie durch Anwendung des DT

Der DT ist eine sichere, schnelle und leicht durchführbare Methode und gilt, trotz neuen Antigentests, aufgrund der hohen Sensitivität als Goldstandard in der Malariadiagnostik. Im Vergleich zu einem normalen Blutaussstrich wird eine ca. 10-fach höhere Konzentration an Untersuchungsmaterial pro mikroskopisches Gesichtsfeld erreicht. Plasmodien sind im DT durch die rot-violette Anfärbung des Chromatins der Zellkerne und ihres blau gefärbten Plasmas zu

erkennen. Anhand seiner charakteristischen Morphologie, wie dem Vorkommen von Doppelkernen („Siegelring“) sowie dem Fehlen von reifen Trophozoiten und Schizonten, lässt sich Pf gut von anderen Plasmodienspezies unterscheiden. Weitere endemische Plasmodiumarten wie *P. ovale* und *P. malariae* wurden damit ausgeschlossen.

Die in der Studie benutzte Methode ist ein speziell in Lambaréné entwickeltes Verfahren (90). Zur Anfertigung des DT wurden 10 µl Kapillarblut oder alternativ EDTA-Blut mittels Mikropipette (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) auf ein 10 x 18 mm großes Feld eines beschrifteten Objektträgers (Langenbrinck, Deutschland) gleichmäßig verteilt und für ca. 20 min bei 37 °C im Brutschrank getrocknet. Anschließend wurde der Objektträger in 20 % Giemsa-Lösung mit pH 7,2 (Sigma Chemical, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) für 20 min gefärbt. Die Giemsa-Lösung wurde nach Ende des Färbeschrittes vorsichtig mit Leitungswasser abgewaschen und der DT nach der Trocknung unter Anwendung von Immersionsöl mit einem Lichtmikroskop (CX31, Olympus, Japan) unter 1000-facher Vergrößerung gelesen. Eine negative Diagnostik umfasste die Durchmusterung von 100 Gesichtsfeldern. Im Falle eines positiven Befundes für eine Infektion mit Pf wurden mindestens 50 weitere Felder zum Nachweis einer Monoinfektion gesichtet.

Zur Bestimmung der Parasitämie existieren verschiedene Verfahren (91, 92). Für die Studie wurde eine von Kremsner und Kollegen entwickelte Methode verwendet, bei der über das Auszählen der Parasiten pro Gesichtsfeld im DT direkt auf die Parasitämie pro µl Blut geschlossen werden kann (90, 93). Da ein Gesichtsfeld unter 1000-facher Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop bei oben genannter Anfertigung des DT ca. 1/600 µl Blut beinhaltet, lässt sich durch die Multiplikation der Parasitenzahl mit 600 die ungefähre Parasitämie errechnen. Die Sensitivität ist vergleichbar mit der Bestimmung der Parasitämie im Blutaussstrich (90), jedoch schneller und einfacher durchführbar. Zur genaueren Berechnung kann der Mikroskopfaktor, der für jedes Mikroskop variiert, bestimmt werden. Er besagt wie viele Gesichtsfelder bei einer bestimmten Okular-Objektiv-Kombination in die Ausstrichfläche passen und berechnet sich wie folgt: Mikroskopfaktor = Ausstrichfläche/Gesichtsfeldfläche.

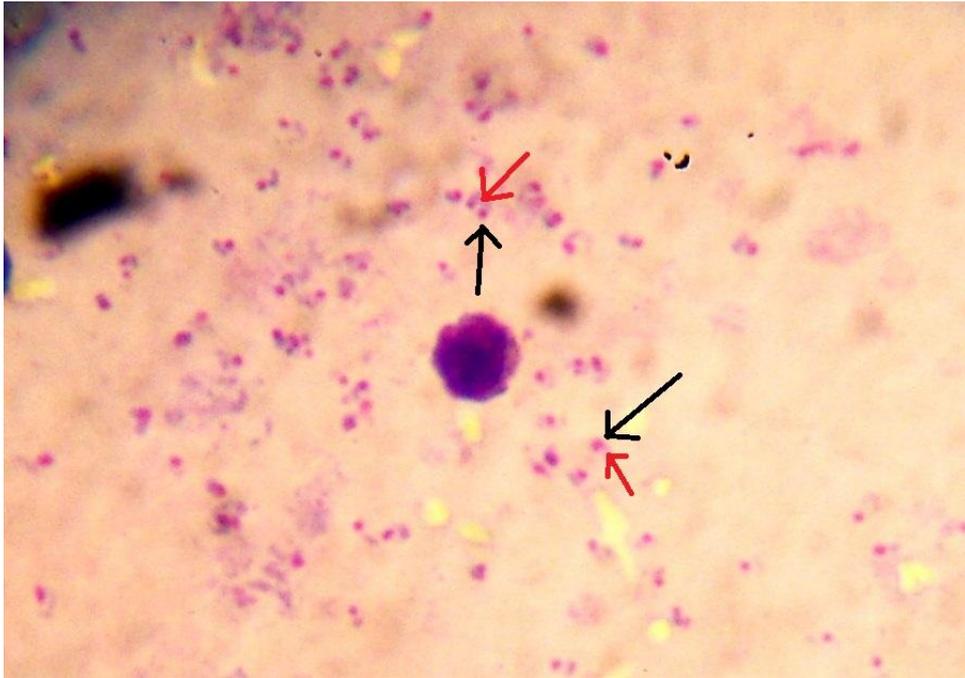


Abb. 5: Nachweis von Pf mittels DT: Das Chromatin der Zellkerne der Parasiten leuchtet in der Giemsa Färbung rot-violett (schwarze Pfeile), das Zytoplasma ist bläulich gefärbt (rote Pfeile)

2.2.2 Zählung der Hämozoin-haltigen Monozyten im peripheren Blutausstrich

Hämozoin, bzw. Malariapigment, ist ein Abbauprodukt des vom Parasiten verdauten Hämoglobins. Man findet es innerhalb von Monozyten, seltener auch in Granulozyten, nach Phagozytose befallener RBC oder von Pigment direkt. Ein erhöhter Nachweis von Malariapigment im Rahmen einer akuten Pf-Infektion geht mit einer schlechteren Prognose einher (94). Außerdem hat Hämozoin weitgehenden Einfluss auf die Funktion von Phagozyten (95, 96).

Die Ermittlung der malariapigmenthaltigen Monozyten erfolgte in einem separaten Blutausstrich. Dazu wurden 10 µl venöses EDTA-Blut mittels Mikropipette (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) auf einen beschrifteten Objektträger (Langenbrinck, Deutschland) aufgetragen, mithilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen und mit Methanol für eine Minute fixiert. Nach der Trocknung erfolgte die Färbung in May-Grünwald-Lösung (Merck, Deutschland) für 5-10 min. Anschließend wurde überschüssige Lösung mit Leitungswasser abgespült und

der Ausstrich luftgetrocknet. Es wurden so viele Gesichtsfelder gemustert bis 100 Monozyten erfasst wurden. Durch die Zahl der malariapigmenthaltigen Monozyten wurde auf die Gesamtprozentzahl geschlossen.

2.2.3 Blutbild

Konnte bei einem potentiellen Probanden mittels DT eine Pf-Monoinfektion mit einer Parasitämie $> 1\ 000$ Pf/ μ l diagnostiziert werden, wurde anschließend ein Blutbild zur Bestimmung von Hb, HCT und MCV im Forschungslabor mit einem automatischen Hämatologiegerät (CellDyn 3000, Abbott, Santa Clara, CA) angefertigt. Zusätzlich erfolgte die Herstellung eines manuellen Differentialblutbildes mittels zuvor beschriebener May-Grünwald-Färbung.

2.3. Immunfluoreszenzfärbung der RBC mit CFDA-SE

Das EDTA-Blut wurde in ein 1,5 ml Probengefäß (Eppendorf, Deutschland) pipettiert (Pipetten LabmateTM, L20, L200, L1000, Abimed, Deutschland) und in einer dafür vorgesehenen Zentrifuge (Zentrifuge EBA 12, Hettich Zentrifugen, Deutschland) für 2 min mit 3000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das überstehende Blutplasma abgenommen. Es wurde ein 2-maliger Waschvorgang angeschlossen. Dafür wurde dem Blutpellet 1 ml der Pufferlösung PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. *Phosphat buffered saline*, Sigma, USA) hinzugefügt, darin resuspendiert und anschließend für 2 min zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde nach Ende jedes Waschvorgangs abgenommen. Zur Färbung der RBC wurden 50 μ l des Blutpellets entnommen und zu 950 μ l eines 5 nM CFDA-SE-haltigen (Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester, Emissionspeak 517 nm, Fluka, St. Gallen, Schweiz) PBS-Puffers gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer inkubiert.

Bei CFDA-SE handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der nach Aufnahme in den Erythrozyten intrazellulär durch Esterasen umgewandelt wird und mit freien Aminogruppen reagiert. Das führt zu einer stabilen, nur innerhalb der gefärbten RBC nachzuweisenden Fluoreszenz.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Färbung durch Zugabe von 0,5 ml fetalem Kälberserum (FCS, Sigma Cell Culture, USA) gestoppt. Darauf folgte ein dreimaliger Waschvorgang in PBS-Pufferlösung.

Als Färbekontrolle wurden nicht-gefärbte RBC in PBS gewaschen und inkubiert. Um die effiziente Blockadefähigkeit von CFDA-SE durch FCS zu testen, wurde der Farbstoff zuerst mit FCS und anschließend mit den RBC inkubiert.

2.4 Isolierung der CD 14+ Monozyten

2.4.1 Gewinnung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) durch Dichtegradientenzentrifugation

Die Isolierung der mononukleären Zellen aus dem Patientenblut erfolgte bei sterilen Bedingungen unter einer sterilen Werkbank (The LabGard™ 425, NuAire Corporation, Plymouth, USA).

Die PBMC lassen sich über einen Ficoll-Gradienten mittels Zentrifugation von RBC, Granulozyten und toten Zellen trennen. Diese als Dichtegradientenzentrifugation bezeichnete Methode macht sich die unterschiedliche Dichte der Zellpopulationen zu Nutze. Bei Ficoll handelt es sich um ein ungeladenes Sucrose-Polymer. Es besitzt mit 1,077 g/l eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten, jedoch eine geringere als die von RBC und Granulozyten.

Zur Separation wurde sehr vorsichtig 5 ml heparinisiertes venöses Blut über 5 ml Ficoll-Paque plus (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) mithilfe einer elektrischen Saugpipette (Pipetboy acu, Integra Biosciences, Schweiz) in ein Probenröhrchen (Falcon Blue Max™ Tubes 15 ml, Becton Dickinson Labware, USA) geschichtet und für 30 min bei 1250 U/min in einer passenden Zentrifuge (Zentrifuge Rotanta / AP, Hettich Zentrifugen, Deutschland) zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wandern RBC, Granulozyten, Thrombozyten und tote Zellen auf den Boden des Röhrchens, während sich die PBMC, bestehend aus Monozyten und Lymphozyten, als gut sichtbarer Ring in der Interphase zwischen Ficoll-Flüssigkeit und darüberliegendem Plasma befinden. Dieser Ring wurde nach der Abnahme des Plasmas vorsichtig abpipettiert.

Die abgenommenen Zellen wurden anschließend in einer PBS-Pufferlösung, welche 0,5 % BSA (Bovines Serumalbumin, Sigma, USA) und 2 mM EDTA enthält (PBS-EB), für 10 min bei 1250 U/min gewaschen und in ein 1,5 ml Probengefäß (Eppendorf, Deutschland) mit 90 µl PBS-EB überführt. Der Waschschritt diente der Entfernung des restlichen Ficolls.

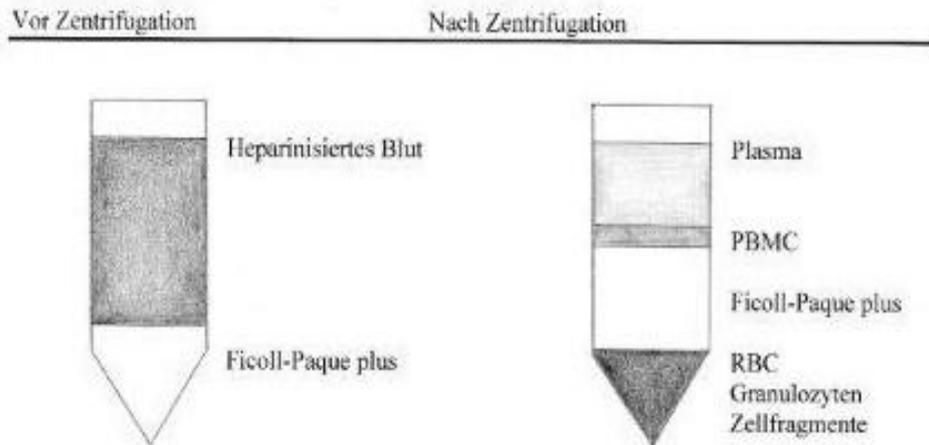


Abb. 6: Schematische Darstellung der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

2.4.2 Separation der CD14⁺ Zellen durch magnetische Zellsortierung

Zur Isolierung der Monozyten aus der Gesamtpopulation der PBMC wurde das magnetische Zelltrennsystem MACS® (engl. *magnetic cell sorting*, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Es handelt sich um ein Verfahren, bei dem mit kleinsten Eisenpartikeln (circa 50 nm) markierte Ak an bestimmte Oberflächenantigene von Zellen binden und anschließend eine Stahlkugelmatrix-Säule in einem Permanentmagnet-System durchlaufen. Die mit Ak gebundenen Zellen werden aufgrund der magnetischen Kräfte in der Säule zurückgehalten, während nicht-gebundene Zellen sie ungehindert durchlaufen. Dadurch können bestimmte Zellen aus einer Gesamtpopulation gewonnen (Positiv-Selektion) oder ausgeschlossen werden (Negativ-Selektion). Die Positiv-Selektion der Monozyten erfolgte durch die Bindung von Anti-CD14-*Microbeads* (Isotyp: IgG2a Maus, *anti-human*, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch

Gladbach, Deutschland), die einen monoklonalen Ak gegen das für Monozyten charakteristische Oberflächenmerkmal CD14 enthalten.

Zur Markierung der CD14-exprimierenden Zellen wurde die Zellsuspension der PBMC mit 20 µl der Anti-CD14-*Microbeads* dem Herstellerprotokoll folgend für 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal in PBS-EB gewaschen und in 1 ml PBS-EB vorsichtig resuspendiert, um Zellverklumpung zu vermeiden. Die Zellsuspension wurde anschließend über eine MACS®-Trennsäule (MS+, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) gegeben, die sich im magnetischen Feld eines Mini-MACS® (MS+, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) befand. Nicht-markierte Zellen durchliefen nun die Trennsäule und wurden als negative Fraktion aufgefangen. Danach wurde die Säule dreimal mit jeweils 1 ml PSB-EB gewaschen, aus dem magnetischen Feld entfernt und die antikörpergebundenen Zellen mithilfe eines Stempels daraus eluiert sowie anschließend durch Zentrifugation abgetrennt. Durch diese Prozedur konnten zwischen $0,7 \times 10^6$ und $1,4 \times 10^6$ Monozyten isoliert werden.

Die CD14+ Zellen wurden dann in 1 ml des Mediums RPMI 1640 (Sigma, Steinheim, Deutschland), welches 10 % FCS, 5 mM Glutamin, 100 E/ml Penicillin und 100 µl/ml Streptomycin enthält, aufgenommen und direkt für den Phagozytose-Assay verwendet.

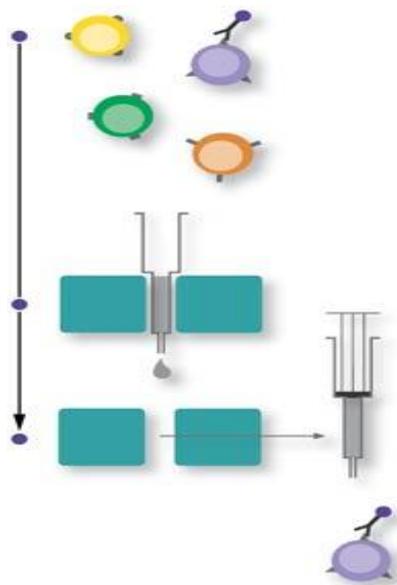


Abb 7: schematische Darstellung des Prinzips der magnetischen Zellsortierung (MACS®) zur Positiv-Selektion bestimmter Zellreihen: Die Trennsäule befindet sich in einem magnetischen Feld. Die Zellsuspension aus mit magnetischen Beads gekoppelten Zellen sowie ungebundenen Zellen werden über die Säule gegeben. Ungebundene Zellen passieren die Säule, während die gebundenen darin hängen bleiben. Die in der Säule befindlichen Zellen können, nachdem die gesamte Zellsuspension die Säule durchlaufen hat, eluiert werden.

2.5 Phagozytose Assay

2.5.1 Vorbereitung der RBC

Die RBC des Probanden und des gesunden Spenders mit der Blutgruppe 0+ wurden wie oben beschrieben mit CFDA-SE gefärbt. Aus den markierten RBC wurden nun jeweils zwei Ansätze hergestellt. Je 10 µl der autologen RBC des kranken Probanden wurden mit 90 µl des autologen Serums und 90 µl PBS inkubiert. Von dem gesunden Spender wurden 10 µl der RBC entweder mit 85 µl PBS-Puffer und 5 µl Anti-D Reagenz (Mischung aus monoklonalen IgM (TH28) und IgG (MS26) Antikörpern, Serie 5, Immunocor, Norcross, GA) zur Positiv-Kontrolle oder in 90 µl PBS zur Negativ-Kontrolle inkubiert.

Durch die Inkubation der RBC mit autologem Serum soll untersucht werden, ob sich dadurch zusätzlich ein opsonisierender Effekt in Bezug auf die Phagozytose ergibt.

Tabelle 1: Die verwendeten vier Ansätze

10 µl CFDA-SE markierte autologe RBC	10 µl CFDA-SE markierte RBC des Spenders 0+
+ 90 µl PBS	+ 90 µl PBS
+ 90 µl autologes Serum	+ 85 µl PBS/ 5 µl Anti-Rhesus-Ak

Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden alle Ansätze mit PBS gewaschen. Von den RBC wurden je 2 µl (circa 2×10^7 Zellen entsprechend) für die aufbereiteten Monozyten verwendet.

2.5.2 Phagozytose

Die isolierten Monozyten (circa 2×10^5) wurden in 1 ml RPMI/10% FCS resuspendiert. Es wurden vier 1,5 ml Probengefäße mit jeweils 750 μ l RPMI/10% FCS vorbereitet und in jedes davon wurde 250 μ l Monozyten-Zellsuspension hinzugefügt. Zu den vier Ansätzen wurden entweder 2 μ l nicht-opsonisierte autologe RBC (Abb. 8 a), 2 μ l mit autologem Plasma opsonisierte RBC, 2 μ l mit Anti-D opsonisierte Kontroll-RBC (Abb. 8 b) oder 2 μ l nicht-opsonisierte Kontroll-RBC hinzugegeben (Abb. 8 c).

Tabelle 2: Die erhaltenen vier Ansätze

Autologe Monozyten in 1 ml RPMI/ 10 % FCS + 2 μ l autologe RBC
Autologe Monozyten in 1ml RPMI/ 10 % FCS + 2 μ l mit autologem Serum vorinkubierte autologe RBC
Autologe Monozyten in 1ml RPMI/ 10 % FCS + 2 μ l mit Spender RBC (Negativ-Kontrolle)
Autologe Monozyten in 1ml RPMI/ 10 % FCS + 2 μ l mit Anti-D opsonisierte Spender RBC (Positiv-Kontrolle)

Die Inkubation erfolgt für vier Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ in der Atmosphäre. Eine zusätzliche Negativ-Kontrolle wurde parallel dazu für die gleiche Zeit bei 4 °C inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Phagozytose durch ein zweimaliges Waschen in PBS-EB gestoppt. Nicht-phagozytierte RBC wurden durch Zugabe von 0,9 ml eiskaltem destilliertem Wasser für 1 min lysiert. Sofort nach der Lyse wurde PBS-Puffer in 10-facher Konzentration bis zum Erreichen der Isotonizität hinzugefügt. Die Lyse-Methode wurde durch Mikroskopie validiert. Durch viermaliges Waschen in PBS wurden Zellfragmente und Hämoglobin entfernt.

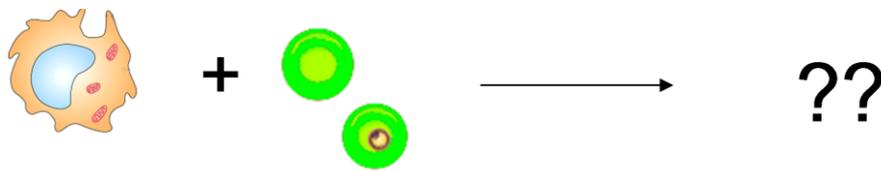


Abb. 8 a): Schematische Darstellung der autologen Phagozytose: Inkubation von autologen Monozyten mit den RBC eines SMA-Patienten



Abb. 8 b): Schematische Darstellung der Positiv-Kontrolle: Autologe Monozyten wurden zusammen mit den Anti-D opsonisierten RBC eines gesunden Spenders der Blutgruppe 0+ inkubiert

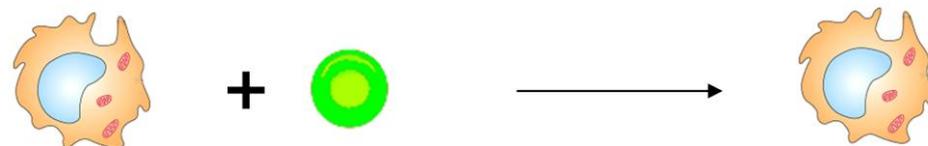


Abb. 8 c): Schematische Darstellung der Negativ-Kontrolle: Autologe Monozyten wurden zusammen mit den nicht-opsonisierten RBC des gesunden Spenders inkubiert

2.5.3 Durchflusszytometrische Analyse der EPZ

Die Messung der Phagozytoserate erfolgte mit einem Durchflusszytometer (Cyflow SL, Partec, Münster, Deutschland), das mit einem 488 nm LED-Laser (lichtemittierende Diode, engl. *light-emitting diode*) und drei Detektionskanälen (FL-1:515-550 nm, FL-2: 575–620 nm, FL-3: > 630 nm) ausgestattet ist. Die

Probenansätze wurden zur Analyse in spezielle Probenröhrchen (FACS-Tubes, Sarstedt, Deutschland) überführt. Zur Datenerfassung und Datenanalyse wurde die Software FloMax® (entwickelt von Quantum Analysis für Partec, Münster, Deutschland) verwendet.

In der durchflusszytometrischen Analyse können gleich mehrere Informationen über die gemessene Zelle gesammelt werden. Die Zellsuspension wird in eine Kapillare gesogen und die Zellen passieren darin nacheinander einen Laserstrahl, dessen Streuung von Photodetektoren in ein elektronisches Signal umgewandelt wird. Gemessen wird die Fluorochrom-Lichtintensität (CFDA-SE, Emissionspeak 517 nm) im Detektionskanal FL-1 sowie die Lichtbrechungen im Seitwärts-Streulicht-Kanal (SSC, engl. *Side Scatter*) und im Vorwärts-Streulicht-Kanal (FSC, engl. *Forward Scatter*). Durch den FSC können im wesentlichen Aussagen über die Zellgröße getroffen werden. Der SSC charakterisiert hauptsächlich die Granularität der Zelle. Durch ihre spezifischen Zellgröße und Granularität lassen sich die Monozyten im Streudiagramm (engl. *Scatterplot*) mithilfe eines elektronischen Fensters (*Gate*) gut eingrenzen (siehe auch Abb. 9).

Die Messeinstellungen wurden während des gesamten Erhebungszeitraums durch eine regelmäßige Kontrolle mit Fluoreszenz-*Beads* (Partec *Calibration Beads*, Partec, Münster, Deutschland) überwacht und konstant gehalten.

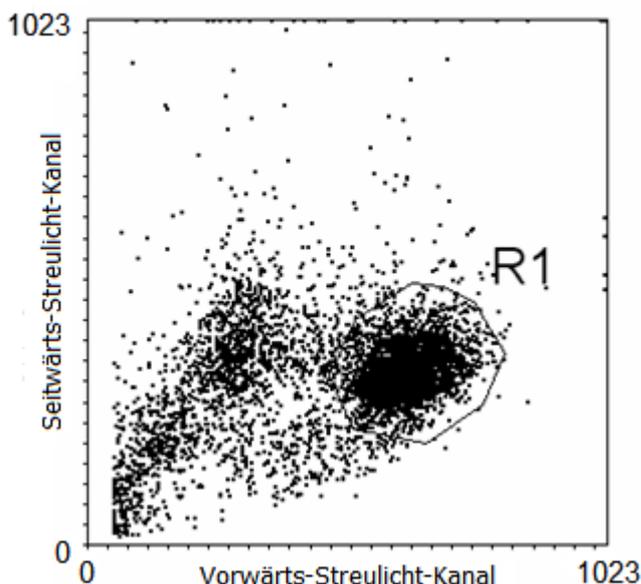


Abb. 9: Durchflusszytometrische Analyse mit Darstellung der Monozytenpopulation (Region R1) anhand von Zellgröße und Granularität im Streudiagramm (*Scatterplot*)

2.5.4 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde der Phagozytose-Assay wie oben beschrieben durchgeführt. Danach wurden die Ansätze für 30 min mit PE-gebundenen anti-humanen CD45-Maus-Ak (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) gefärbt und im Verhältnis 1:10 mit PBS-EB verdünnt. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 3,5 % Paraformaldehyd-haltigem PBS für 30 min fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit 300 nM DAPI (Sigma, USA) für 5 min. Nach einem letzten Waschritt wurden die Zellen in ein Triethylendiamin-haltiges (Sigma, USA) Mowiol- Medium aufgenommen und auf einem Objektträger zur Begutachtung ausgestrichen. Mowiol dient als wasserlösliches Einbettmittel zur Herstellung des Präparats, durch die Zugabe von Triethylendiamin wird das Ausbleichen verhindert.

Die Abbildungen wurden mithilfe eines Zeiss Axioplan-Immunfluoreszenz-Mikroskops erfasst und mit Adobe Photoshop v7.0 bearbeitet.

2.5.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe von JMP v5.1.0.2 und Stat-View v 5.0. durchgeführt. Um eine Normalverteilung der Werte zu erhalten, wurden sie logarithmiert. Zur Ermittlung der Phagozytoseraten berechneten wir den geometrischen Mittelwert. Die P-Werte wurden mittels gepaartem oder ungepaartem T-Test bestimmt. Das Signifikanzniveau wurde bei beidseitiger Testung mit $P < 0,05$ für alle Tests festgelegt.

3 ERGEBNISSE

Hinweis: Die hier folgenden Ergebnisse sind bereits in einer Arbeit von Fendel et al. veröffentlicht worden (86). Der Verfasser der vorgelegten Dissertation ist einer der Autoren des Manuskriptes. Die folgenden Abbildungen stammen aus der erwähnten Arbeit, sie werden mit freundlicher Genehmigung des Verlegers (John Wiley und Söhne) der Fachzeitschrift *Cytometry Part A* verwendet.

3.1 Eigenschaften von CFDA-SE als Marker für RBC

3.1.1 Fluoreszenzintensität von CFDA-SE gefärbten RBC und Blockierung der Bindung durch FCS

Zur Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften von mit CFDA-SE markierten RBC wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Sie ergab eine 100-fach erhöhte Fluoreszenzintensität der mit CFDA-SE gefärbten RBC im Vergleich zu einer Kontrolle mit nicht-gefärbten RBC.

In einem zweiten Schritt wurde untersucht, ob sich die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes CFDA-SE durch die vorherige Inkubation mit FCS unterbinden lässt. Tatsächlich konnte nach Vorbehandlung des Farbstoffes mit FCS und anschließendem Versuch einer Markierung der RBC mit CFDA-SE kein relevanter Unterschied in der Fluoreszenzintensität, verglichen mit den nicht-gefärbten RBC, nachgewiesen werden. Zur Veranschaulichung dieser Sachverhalte siehe auch Abb. 10.

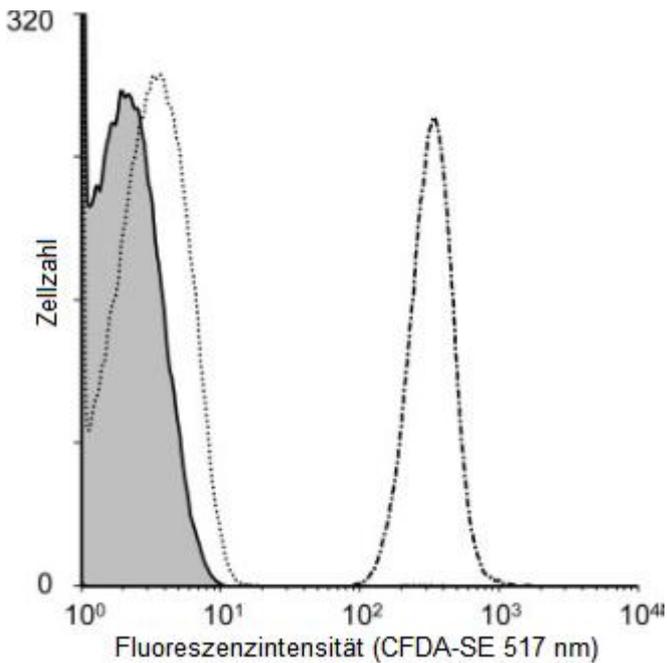


Abb. 10: Histogramm nicht-markierter RBC (grauer Bereich), CFDA-SE markierter RBC (Kettelinie) und durch FCS blockierter mit CFDA-SE behandelter RBC (gepunktete Linie)

3.1.2 Stabilität von CFDA-SE während der Inkubationszeit

In dem folgenden Versuch wurde die Stabilität der Bindung von CFDA-SE innerhalb der RBC getestet. Dazu wurden mit CFDA-SE markierte und nicht-markierte RBC in einem aufsteigenden Verhältnis (9:1 bis 1:9) gemischt und analog zu den Inkubationsbedingungen des Phagozytose-Assays für vier Stunden bei 37 °C in 5 %-iger Kohlenstoffdioxid-Atmosphäre inkubiert.

Die durchflusszytometrische Analyse ergab, unabhängig vom Mischverhältnis, ein konstantes Verhältnis von markierten zu nicht-markierten RBC vor und nach vierstündiger Inkubationszeit. Die Bindung des Markers stellte sich unter gegebenen Bedingungen als stabil mit den Zellen assoziiert heraus, es konnte keine Kontamination von gefärbten zu nicht-gefärbten RBC beobachtet werden (Abb. 11).

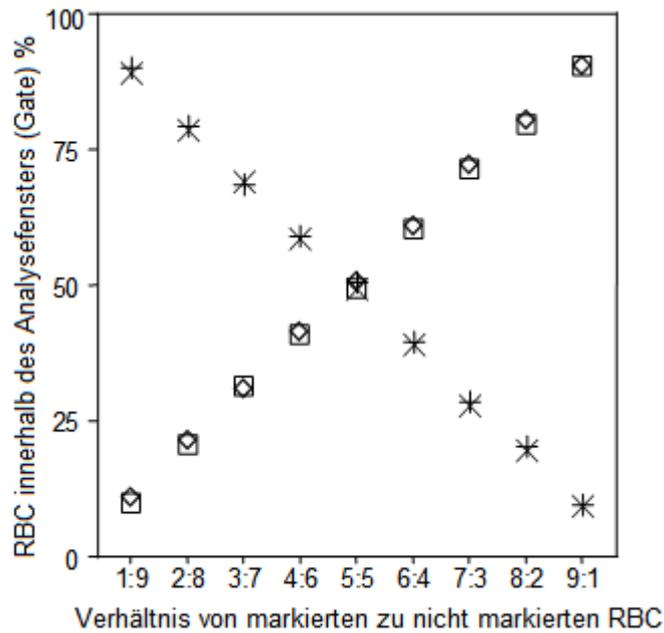


Abb. 11: Achsendiagramm mit dem Anteil CFDA-SE markierter RBC vor (□) und nach (◇) vierstündiger Inkubationszeit im aufsteigenden Verhältnis zu nicht-markierten RBC vor (+) und nach der Inkubation (x) in der durchflusszytometrischen Analyse

Die Abb. 12 veranschaulicht das Verhalten der gemessenen Intensitäten in der Fluoreszenz von CFDA-SE markierten RBC zu Beginn und vier Stunden nach Inkubation. Dabei zeigte sich nach Ende der Inkubation insgesamt eine Abnahme der Fluoreszenzintensität der markierten RBC um 4,6 % verglichen mit dem Ausgangswert. Die Fluoreszenz der nicht-gefärbten RBC blieb während der gesamten Inkubationszeit konstant, so dass eine Kontamination von nicht-gefärbten RBC durch den Farbstoff während der Inkubationszeit ausgeschlossen werden konnte. Bei dem geringen Verlust an Fluoreszenzintensität der gefärbten RBC handelte es sich somit um einen leichten Verblässungseffekt des Farbstoffs.

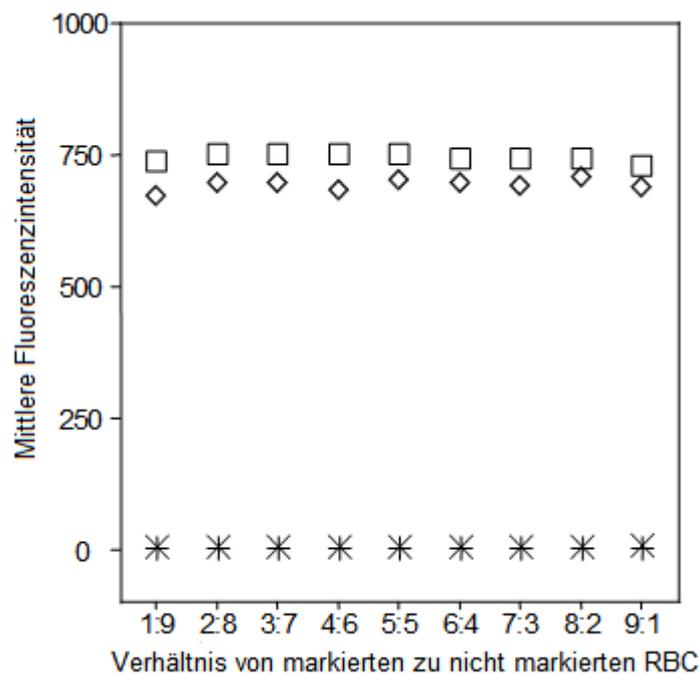


Abb. 12: Das Achsendiagramm vergleicht die Fluoreszenzintensität von mit CFDA-SE markierter RBC vor (\square) und nach (\diamond) vierstündiger Inkubation sowie von nicht-markierter RBC vor (+) und nach der Inkubation (x) in der durchflusszytometrischen Analyse

3.2 Darstellung des Phagozytose-Assays

3.2.1 Etablierung der Methode

3.2.1.1 Positiv- und Negativ-Kontrolle

Als Vergleichswert für den Phagozytose-Assay wurde eine Positiv- und Negativ-Kontrolle mit den CD14+ Monozyten eines gesunden Rh+ Spenders durchgeführt (Abb. 13B).

Nach der Isolierung der CD14+ Monozyten mittels Ficoll-Gradienten und magnetischer Zellsortierung erfolgte die Inkubation mit CFDA-SE gefärbten autologen RBC, welche je einmal mit Anti-D-AK opsonisiert wurden und einmal nicht weiter behandelt wurden. Nach der Inkubationszeit von vier Stunden wurden nicht-phagozytierte RBC lysiert und die Monozyten in der durchflusszytometrischen Analyse ausgewertet. Die erfassten Messdaten wurden in Form einer Zweiparameterdarstellung als Punktdiagramm (Dotplot) dargestellt, wodurch sich die Population der Monozyten, wie in Abb.13 A zu erken-

nen, gut identifizieren ließ. Durch das Definieren eines elektronischen Fensters (*Gate*, Region 1) wurden Zellfragmente, Partikel und kontaminierende Lymphozyten aufgrund ihrer Größe und Streulichteigenschaften im Punktdiagramm von der homogenen Population der Monozyten innerhalb des Gates abgegrenzt und von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Ereignisse innerhalb des Fensters wurden nun im nächsten Schritt der Analyse auf ihre Fluoreszenzmarkierung im FL-1-Kanal untersucht und in einem Histogramm dargestellt. Die positiv gefärbten Zellen wurden in Region zwei (R2) des Histogramms aufgeführt (s.u.), so dass sich darin ihre durchschnittliche Fluoreszenz bestimmen ließ. Während die Fluoreszenz der Monozyten, die mit nicht Anti-D-opsonisierten RBC inkubiert wurden, überwiegend negativ ausfiel, war die Fluoreszenzintensität der mit Anti-D opsonisierten RBC bis um das 1000-fache erhöht (s. Abb. 13B). Somit ließ sich die hohe Phagozytoseaktivität der Monozyten unter den Versuchsbedingungen nachweisen.

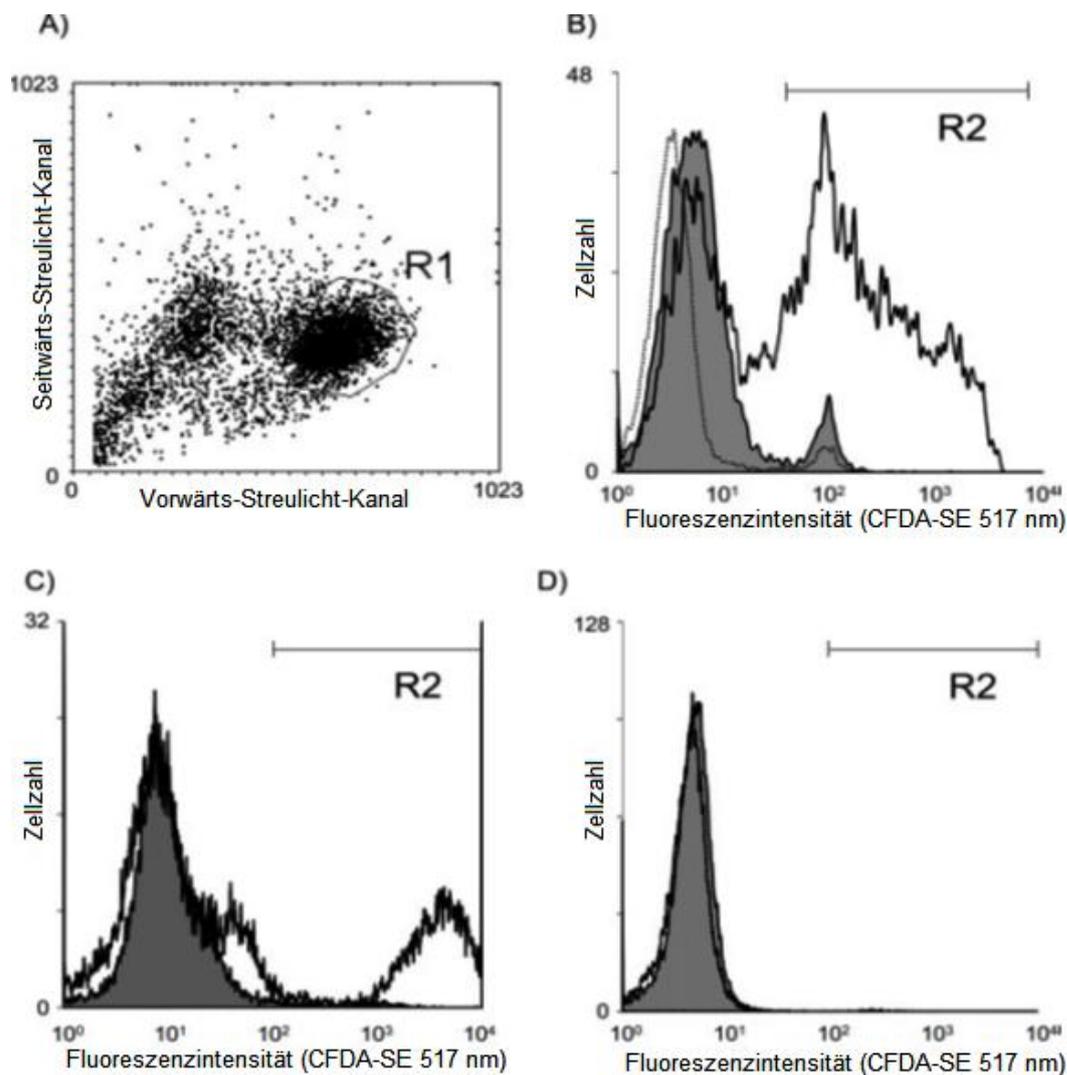


Abb. 13: EPZ eines gesunden freiwilligen Spenders und eines an SMA erkrankten Kindes. Die Monozytenpopulation wurde im Zweiparameter-Punktdiagramm eingegrenzt (R1, **A**). Die Region R2 in den Histogrammen **B-D** wurde dazu benutzt, die positiv gefärbten Zellen einzugrenzen und deren durchschnittliche Fluoreszenz zu ermitteln. **B**) Monozyten eines gesunden, Rh+ Spenders jeweils inkubiert mit CFDA-SE gefärbten, nicht-opsonisierten RBC (grauer Bereich), CFDA-SE gefärbten, Anti-D-opsonisierten RBC (durchgehende Linie) und bei 4 °C inkubierte mit CFDA-SE markierte, opsonisierte RBC (gepunktete Linie). **C**) EPZ eines an SMA erkrankten Kindes von autologen, mit CFDA-SE markierten RBC (durchgehende Linie) und den heterologen, mit CFDA-SE markierten, nicht-opsonisierten RBC des gesunden Spenders (Negativ-Kontrolle, grauer Bereich). **D**) Monozyten eines gesunden Kindes der Vergleichsgruppe jeweils inkubiert mit den autologen, CFDA-SE gefärbten RBC (durchgehende Linie) und mit den nicht-opsonisierten, CFDA-SE markierten, heterologen RBC des gesunden Spenders (Negativ-Kontrolle, schraffierter Bereich)

3.2.1.2 Nachweis über die korrekte Erfassung der EPZ durch Fluoreszenz-Mikroskopie

Um eine möglichst verlässliche Aussagekraft über die Phagozytoserate machen zu können, war es wichtig, dass nur die vollständig von den Monozyten phagozytierten RBC in der durchflusszytometrischen Analyse erfasst wurden. Wie in Abb. 14 dargestellt, konnte mittels Fluoreszenz-Mikroskopie gezeigt werden, dass sich eine Fluoreszenz nach vierstündiger Inkubationszeit lediglich innerhalb der Monozyten nachweisen ließ und nicht an deren Oberfläche. Dies bedeutet, dass die nach dem Lyseschritt möglicherweise an den Monozyten anhaftenden RBC-Zellfragmente nicht detektiert wurden. In der durchflusszytometrischen Analyse wurden demnach, wie gewünscht, nur die vollständig phagozytierten RBC erfasst. Interessanterweise konnte dargestellt werden, dass RBC, die bereits innerhalb der Monozyten zerfallen waren, die gleiche Fluoreszenz erzeugten wie intakte RBC (Abb. 14B).

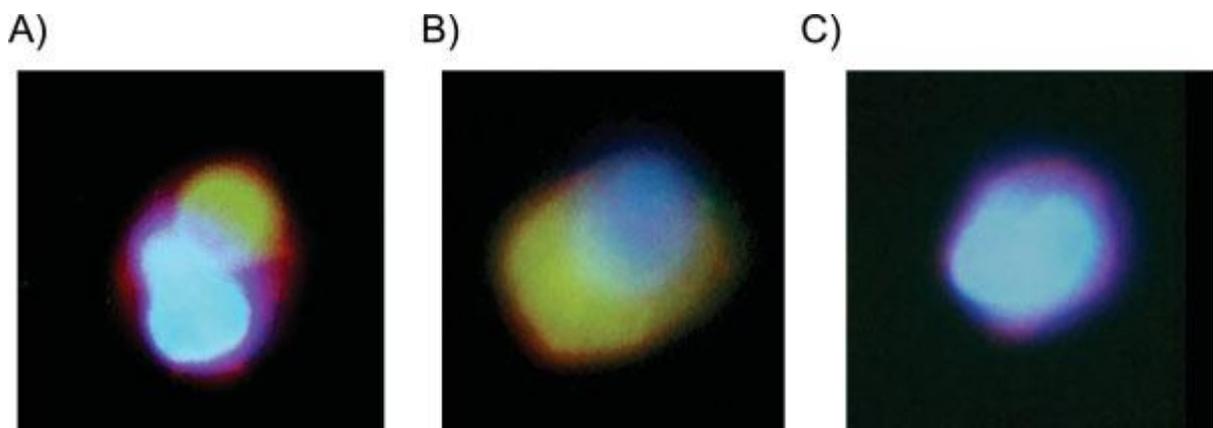


Abb. 14: Fluoreszenz-Mikroskopie der Monozyten nach vier Stunden EPZ: Die Oberfläche der Monozyten wurde mit dem PE-gebundenen Leukozyten-Oberflächenmarker CD-45-AK (rote Fluoreszenz) gefärbt. Die Färbung des Nukleus erfolgte mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (blaue Fluoreszenz), kurz DAPI, ein Fluoreszenzfarbstoff, der in der Fluoreszenzmikroskopie zur Markierung von DNA eingesetzt wird. In **A)** erkennt man einen mit CFDA-SE gefärbten, morphologisch intakten RBC (gelbe Fluoreszenz) innerhalb eines Monozyten, wohingegen in **B)** der RBC bereits zum Teil zerfallen ist, woraus eine größere Verteilung der Fluoreszenz resultiert. **C)** zeigt einen Monozyt ohne Phagozytose.

3.2.2 Validierung der Methode durch Messung der *in vitro* EPZ von Patienten mit SMA im Vergleich zu gesunden Probanden

3.2.2.1 Klinische Parameter der Probanden

Die gesteigerte EPZ eines SMA-kranken Kindes im Vergleich zu einem gesunden Kind wurde in Abbildung 13 C-D dargestellt. Zur Validierung der Methode führten wir eine Studie durch, bei der die *in vitro* EPZ von acht Patienten mit SMA mit der von acht gesunden Probanden verglichen wurde (Tabelle 3). Das Alter der insgesamt 16 Probanden lag zwischen ein und sechs Jahren. Der Hb-Wert betrug bei sämtlichen Patienten mit Malaria ≤ 5 g/dl, mit einem Durchschnittswert von 4,25 g/dl (Spannweite: 3.1 - 5 g/dl) und erfüllte damit die WHO-Kriterien der SMA (30). In der Gruppe der gesunden Probanden betrug der Hb-Wert im Durchschnitt 11,1 g/dl (Spannweite: 9,9-12.7 g/dl). Dies entspricht einem durchschnittlichen Wert am unteren Rand der altersentsprechenden Norm für europäische und nordamerikanische Kinder.

In der Gruppe der SMA-Patienten zeigte sich eine große Spannweite bei der Parasitämie (1140-150000 Pf/ μ l Blut), wobei kein Zusammenhang zwischen Zahl der parasitierten RBC und Schweregrad der Anämie zu erkennen war. Fieber, ein Hauptsymptom der Malariainfektion, konnte nicht bei allen Kindern mit SMA während der Aufnahmeuntersuchung festgestellt werden. Dagegen waren bei allen SMA-Patienten mikroskopisch Hämozoin-haltige Monozyten (3-24 %) zu erkennen.

Patientennummer	Hb (g/dl)	Hkt (%)	Alter (Jahre)	Geschlecht	Temperatur (°C)	Parasitämie (Pf/µl)	Parasitämie (%RBC)	Hämozoin in Monozyten (%)
1	4.4	13.4	6	w	38.5	3720	0.21	6
2	4.7	12.8	1	w	37.0	4500	0.30	2
3	4.6	13.7	2	w	39.8	12000	0.63	24
4	5.0	14.0	4	w	37.1	150000	6.91	22
5	3.2	9.0	1	w	38.3	12910	0.96	14
6	3.1	8.4	2	m	37.6	18300	1.70	10
7	4.4	14.8	1	w	37.2	2100	0.11	14
8	4.6	13.4	3	w	37.2	1140	0.07	3
9	12.7	35.6	3	w	38.0	0	0	0
10	9.9	27.8	5	w	37.1	0	0	0
11	11.8	34.3	2	m	37.3	0	0	0
12	11.0	31.9	4	w	37.3	0	0	0
13	12.1	35.5	6	w	37.0	0	0	0
14	10.4	31.6	2	m	36.9	0	0	0
15	9.9	29.1	2	m	37.7	0	0	0
16	11.1	34.6	5	m	37.4	0	0	0

Tabelle 3: Klinische Daten von acht Patienten mit SMA und acht gesunden Probanden mit einem überwachten, zweimonatigen krankheitsfreien Intervall. Die Parasitämie wurde durch eine Methode basierend auf der Mikroskopie eines Dicken Tropfens errechnet. Die Prozentzahl der Hämozoinhaltigen Monozyten wurde durch mikroskopische, manuelle Auszählung bestimmt.

3.2.2.2 Vergleich der Phagozytoserate der SMA-Gruppe mit der der Kontroll-Gruppe

Wie in Abb. 15 A dargestellt phagozytierten in den Versuchen 1,7 % der Monozyten aus der SMA-Gruppe die heterologen, nicht-opsonisierten, mit CFDA-SE markierten Kontroll-RBC des gesunden Spenders (95 %-Konfidenzintervall: 0,6-4,4). Im Vergleich dazu führte eine Vorinkubation der heterologen RBC mit Anti-D-Ak zu einer 7,4-fach gesteigerten Phagozytose ($P < 0,005$). Autologe RBC wurden verglichen mit der Basalaktivität um das 7,2-fache phagozytiert ($P < 0,001$).

In der Vergleichsgruppe der gesunden Kinder betrug die Basalaktivität ebenfalls 1,7 % (95 %-Konfidenzintervall: 0,8-3,7) und wurde durch eine Vorinkubation mit Anti-D um den Faktor 9,3 ($P < 0,005$) gesteigert (Abb. 15 B). Im Gegensatz zur Gruppe der SMA-Patienten, war die Phagozytose autologer RBC nicht signifikant erhöht ($P = 0,136$).

Eine Vorinkubation der autologen RBC mit autologem Serum hatte weder in der SMA-Gruppe ($P = 0,486$) noch in der Kontrollgruppe ($P = 0,302$) einen relevanten zusätzlichen Effekt auf die zuvor genannte Phagozytoseaktivität.

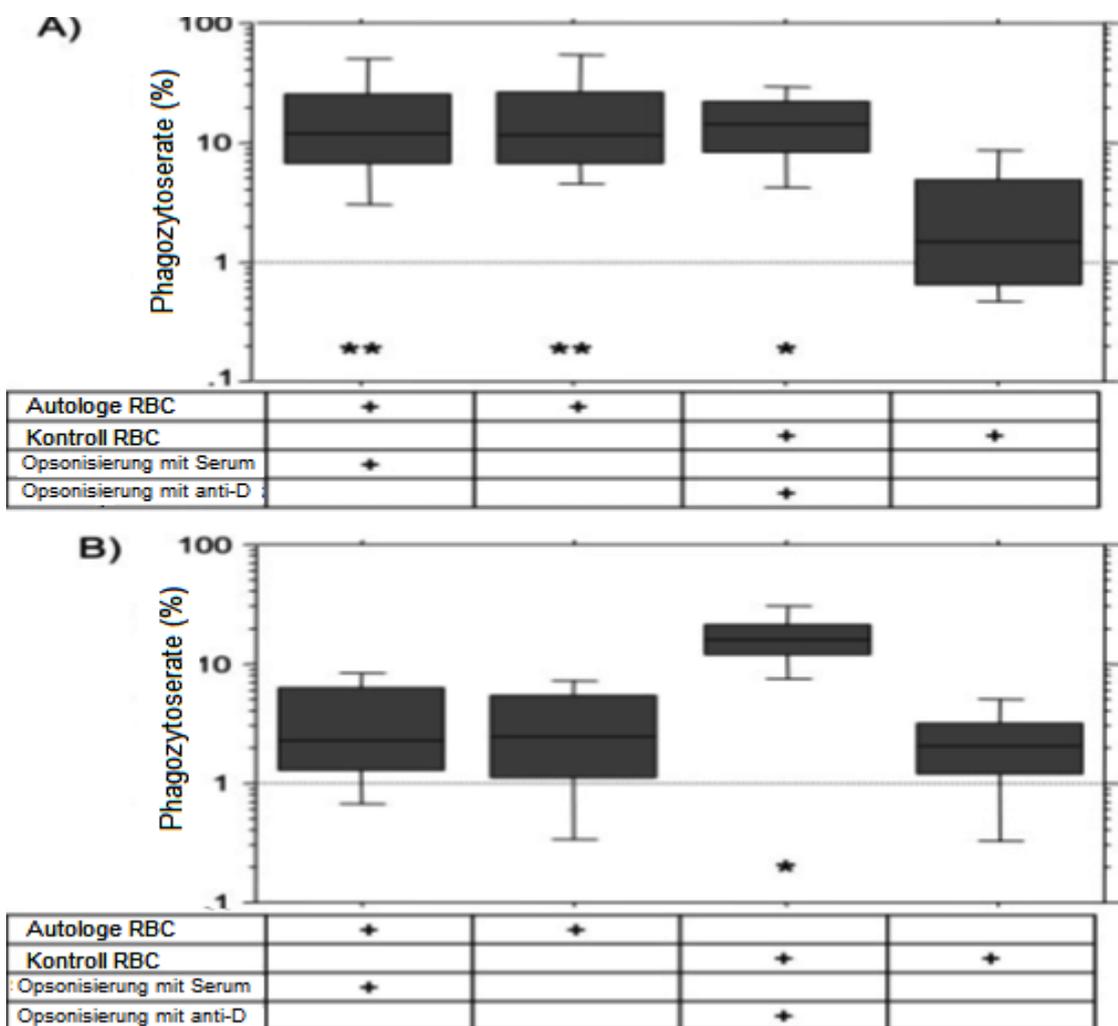


Abb. 15: Erythrophagozytoserate in der Gruppe der SMA-Patienten (A) und der gesunden nicht-anämischen Kinder (B) dargestellt mittels Boxplots: Die isolierten Monozyten der SMA-Gruppe (A) sowie der Vergleichsgruppe (B) wurden jeweils mit: CFDA-SE gefärbten, nicht weiter behandelten autologen RBC, mit: CFDA-SE gefärbten, im autologem Serum inkubierten, autologen RBC, mit: CFDA-SE gefärbten, nicht weiter behandelten heterologen RBC eines

gesunden Rh+ Spenders (Negativ-Kontrolle) und mit: Anti-D-opsonierten, heterologen RBC des gesunden Spenders (Positiv-Kontrolle) inkubiert. Daraus ergaben sich die vier aufgeführten Ansätze. Die Phagozytoserate wurde als Prozentzahl der Fluoreszenz-positiven Monozyten definiert, 100 % bedeutet, dass alle Monozyten eine positive Fluoreszenz aufweisen. Die Positiv-Kontrolle wies eine jeweils signifikant höhere Fluoreszenz auf als die verbundene Negativ-Kontrolle (*: $P < 0.005$; **: $P < 0,001$).

Um die Phagozytoserate der SMA-Patienten mit der der gesunden Kinder vergleichen zu können, wurden die Werte an der jeweiligen Basalaktivität genormt (nicht- opsonisierte Kontroll-RBC; Negativ-Kontrolle). Es zeigte sich eine signifikant erhöhte EPZ von autologen RBC in der Gruppe der SMA-Patienten im Vergleich zu der Gruppe der gesunden Kinder ($P < 0,001$). Die Aufnahme der heterologen, Anti-D-opsonierten RBC (Positiv-Kontrolle) war in beiden Gruppen vergleichbar.

Durch die Region R2, wie in Abb. 13 dargestellt, wurde auch die jeweilige durchschnittliche Fluoreszenz der Monozyten betrachtet, die eine durch Einschluss gefärbter RBC positive Fluoreszenz aufwiesen. Die Analyse offenbarte, verglichen mit den Positiv-Kontrollen (52 [-68 bis 171]), in der SMA-Gruppe den Trend zu einer höheren Fluoreszenzintensität ($P < 0,05$) bei den mit autologen RBC inkubierten Monozyten (295 [95 %-Konfidenzintervall: 175–414]). Dies zeigt, dass die Monozyten in der SMA-Gruppe insgesamt mehr autologe RBC als mit Anti-D-opsonierte Kontroll-RBC phagozytierten. Die durchschnittliche Fluoreszenz der Positiv-Kontrolle wies in der SMA-Gruppe im Vergleich zur Vergleichsgruppe keinen Unterschied auf.

4 DISKUSSION

4.1 Verwendung von CFDA-SE als Marker für RBC

Im folgenden Abschnitt soll der Nutzen des verwendeten Farbstoffs CFDA-SE zur Färbung von RBC erörtert werden. Bisher wurde er zur Färbung verschiedener Zelltypen, u.a. von Bakterien (105), Amöben (106) und Pflanzenzellen (107) verwendet. Die äußerst stabile Bindung, die helle Fluoreszenz, das homogene Färbemuster und die niedrige Toxizität konnten bereits in Untersuchungen zur Zellteilung, die sich bis zur 10. Generation nachverfolgen ließen, dargestellt werden. Es wird vermutet, dass die konstante Fluoreszenz auf einer Bindung von CFDA-SE mit intrazellulären Proteinen mit niedriger Umsatzrate beruht (108).

Wegen dieser positiven Eigenschaften war es deshalb verlockend CFDA-SE zur Markierung der RBC zu verwenden. In den Versuchen dieser Arbeit ließ sich eine stabile Bindung des Farbstoffs innerhalb der RBC nachweisen. So trat im Rahmen der vierstündigen Inkubationszeit nur ein minimaler Verlust der Fluoreszenz auf. Weiterhin kam es zu keinem Austritt des Farbstoffs aus der Zelle und damit zu keiner Kontamination weiterer Zellen. Mittels Fluoreszenz-Mikroskopie konnte eine stabile Färbung auch bei teilweise innerhalb der Monozyten degradierten RBC gezeigt werden.

Ein in der Vergangenheit eingesetzter Farbstoff zur Färbung von RBC ist PHK-26. Bei PHK-26 handelt es sich um einen lipophilen Fluoreszenzfarbstoff mit roter Fluoreszenz (109). Obwohl sich PKH-26 zur effektiven Färbung der RBC eignet, gibt es bei der Anwendung mehrere Mängel. So erfordert die Färbeprozedur die Inkubation in Puffern unterschiedlicher Isotonitäten, wodurch erheblicher Stress auf die RBC ausgeübt wird. Dazu kommen die inhomogene Verteilung auf der Oberfläche und das Problem, dass es nach längeren Inkubationszeiten zu einer Kontamination von ursprünglich nicht-gefärbten Zellen kommen kann. Aufgrund dieser Nachteile kann CFDA-SE als Alternative zur Färbung von RBC, insbesondere zur durchflusszytometrischen Analyse der EPZ, empfohlen werden.

4.2 Die neue Methode zur Messung der *in vivo* EPZ, eine sinnvolle Innovation mit klinischem Nutzen?

4.2.1 Vergleich des vorgestellten Phagozytose-Assays mit bisher verwendeten Methoden

Verschiedene Ansätze wurden, wie in der Einleitung bereits kurz erwähnt, zur Messung der EPZ angewandt. Die einfachste und am häufigsten verwendete Methode ist die makroskopische Zählung von gefärbten RBC innerhalb der Phagozyten (78-80). Sie ist allerdings dadurch limitiert, dass nur eine relativ kleine Anzahl von circa 500-1000 Zellen pro Objektträger erfasst wird (78). Zudem ist die mikroskopische Begutachtung für den Untersucher verhältnismäßig zeitaufwendig und lässt unerwünschten Spielraum für Interpretation. Mittels der hier präsentierten Methode können hingegen in kürzester Zeit (sec) mehrere Tausend Zellen analysiert werden. Aus den 5 ml Vollblut lassen sich $0,7 - 1,4 \times 10^6$ Monozyten isolieren. Die große Zellzahl spielt vor allem dann für die genaue Quantifizierung eine wesentliche Rolle, wenn die Phagozytoserate gering ist. Ein weiteres großes Problem der mikroskopischen Analyse der Phagozytose besteht darin, dass einmal phagozytierte RBC innerhalb der Monozyten schnell degradiert werden. Da aber eine längere Inkubationszeit eine bessere Simulierung der *in vivo* Verhältnisse garantiert, würden bereits abgebaute RBC in der mikroskopischen Analyse nicht mehr korrekt erfasst werden. Trotz allem stellt die mikroskopische Analyse der EPZ weiterhin eine attraktive Methode dar, da sie relativ unkompliziert und ohne hohen technischen Aufwand durchführbar ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass man sie zur groben Erfassung der EPZ hinzuziehen kann, zur exakten Quantifizierung ist sie jedoch weniger geeignet.

Als weitere Alternative zur Messung der EPZ wurde eine auf Lumineszenzmessung basierende Methode verwendet. Dabei kommt es zum Einsatz von Luminol. Man macht sich zu Nutze, dass Luminol mit Oxidationsmitteln unter Abgabe von blauem Licht reagiert, ein Vorgang, der als Chemilumineszenz bezeichnet wird. Die Reaktion erfordert die Gegenwart eines Katalysators, in diesem Fall das Eisen des Hämoglobins. Mit dieser Methode können

bereits kleinste Blutmengen nachgewiesen werden, weshalb sie vorwiegend in der forensischen Diagnostik zum Einsatz kommt. Sie wurde in der Vergangenheit aber ebenfalls erfolgreich zur Messung der EPZ angewandt (81). Das von den RBC ausgehende blaue Licht des Luminols wird dabei von einem sogenannten Luminometer gemessen, wodurch die EPZ geschätzt wird. Der Vorteil ist, dass es sich um eine schnelle und sensitive Methode zur Detektion von Hämoglobin handelt. Dies bedeutet für die Praxis, dass Messungen selbst mit einer geringen Menge an Zellen durchgeführt werden können. Schwarzer und Arese, die diese Methode 1994 als Erste auch zur Untersuchung der Malaria anwendeten, gaben die minimale Zellzahl mit lediglich 500 Monozyten und 10 RBC an (84). Es wird allerdings nicht, wie bei der Messung mit einem Durchflusszytometer üblich, jede einzelne Zelle gemessen, d.h., die Methode müsste immer mit der identischen Anzahl an Zellen und gleichem Verhältnis von RBC zu Phagozyten durchgeführt werden. Das ist in der Praxis problematisch, da durch die Gewinnung der autologen Monozyten aus Spenderblut die Anzahl individuell variiert und angeglichen werden müsste. Weiterhin kann die unterschiedliche Hämoglobinbeladung der RBC ein Störfaktor darstellen und müsste korrigiert werden. Für die Untersuchung der SMA ist diese Methode aber deshalb stark fehlerbehaftet, da das von den Malariaparasiten zu Hämozoin umgewandelte Hämoglobin, genauso wie das Ausgangsprodukt, eine Chemilumineszenz auslöst. Bei Patienten mit SMA zeigte sich jedoch aus vorausgehenden Studien, dass eine stark variierende Anzahl der Monozyten Hämozoin phagozytierten (94, 96). Auch in dieser Arbeit waren bis zu 24% der Monozyten mit Malariapigment beladen. Im Umkehrschluss bedeutet dies aber gleichzeitig, dass sich die Lumineszenz-Methode gut zum Nachweis von Malariapigment in nativen Monozyten eignen würde, sofern eine EPZ ausgeschlossen werden kann.

Um die oben aufgeführten Schwierigkeiten zu umgehen, kam es in mehreren Studien zum Einsatz von speziellen radioaktiven (82, 83) oder fluoreszierenden (84, 85) Markern für RBC, mit denen sich die RBC nach erfolgter Phagozytose detektieren ließen. Auf Grund der Genauigkeit der Fluoreszenzmessung mittels

Durchflusszytometrie, bei der jede einzelne Zelle einzeln erfasst wird, wurde diese Methode für die Studie favorisiert.

Um eine möglichst genaue Aussage zur Phagozytoserate machen zu können, war es wichtig, innerhalb des Versuchs die *in vivo* Situation bestmöglich zu simulieren. Erstmals wurden deshalb in einem Phagozytose-Assay bei Malariapatienten autologe Phagozyten verwendet. Dadurch wurde auch die individuelle Aktivität der Monozyten in die Analyse integriert. Zur Separation der sensiblen Monozyten wurden verschiedenen Methoden getestet, u.a. die häufig verwendete Isolierung mittels Plastik-Adhäsion (97). Der Vergleich gängiger Methoden der Monozytenisolation zeigte jedoch, dass die Positivselektion der CD14+ Zellen durch magnetische *Beads* die am besten standardisierbare Methode darstellte (Daten dazu sind in der Arbeit nicht aufgeführt). Die Vitalität der CD14+ positiv selektierten Monozyten ließ sich dadurch in vorhergehenden Studien mit > 95 % belegen (98).

4.2.2 Potentielle Nachteile der neuen Methode

Eine Schwierigkeit der hier vorgestellten Methode besteht darin, dass die Durchführung des Assays insgesamt als anspruchsvoll angesehen werden kann. Gerade die Isolierung von sensiblen Zellpopulationen wie den Monozyten erfordert Erfahrung in den entsprechenden labortechnischen Arbeitsweisen. Der Assay sollte deshalb, um die Qualität der Methode zu gewährleisten, von ausreichend geschultem Personal durchgeführt werden und einer Qualitätskontrolle unterliegen. Durch die jeweilige Negativ- und Positiv-Kontrolle kann jedoch immer eine Aussage getroffen werden, ob der jeweilige Versuch auswertbar ist. Obwohl der Assay im Vergleich zu anderen bereits erwähnten Methoden zur Bestimmung der EPZ ein sehr genaues Verfahren darstellt und man innerhalb weniger Stunden eine Auswertung erhält, ist die Durchführung an sich für das Personal zeitintensiv (reiner Arbeitsaufwand circa 1,5 h bei einer Gesamtdauer von circa 6 h bis zur Auswertung) und erfordert das Arbeiten unter sterilen Bedingungen. Dafür sind die Kosten pro Assay inklusive aller Kontrollen überschaubar (circa 25,- € pro Assay nach Schätzung der Kosten für Verbrauchs-

materialien; Kosten für die Selektion der Monozyten mittels MACS® circa 11,- € pro Assay, nach Angaben des Herstellers, Miltenyi Biotec).

Für eine Routineanwendung im Rahmen einer Anämiediagnostik eignet sich der Assay aufgrund des personellen Aufwands weniger, er kann jedoch hilfreiche Informationen bei speziellen Fragestellungen geben.

Eine weitere mögliche Schwäche ist, dass im vorgestellten Assay das Verhältnis von autologen Monozyten zu RBC individuell variiert. Die Bandbreite von Monozyten im humanen peripheren Blut wird allgemein mit 3-10 % der Gesamtpopulation der Leukozyten angegeben (45). Zudem finden sich im Rahmen einer Malariainfektion regelmäßig erhöhte Monozytenwerte (99). Es wäre daher zweckmäßig zu untersuchen, ob eine genaue Zellzahlbestimmung, zum Beispiel durch einen elektronischen Zellzähler oder eine manuelle Zählung mittels Neubauer-Zählkammer, zu einer noch exakteren Messung führen würde.

Zudem muss noch erwähnt werden, dass durch die angewandte Methode speziell die EPZ durch Monozyten untersucht wird, obwohl auch Neutrophile zur EPZ fähig sind. Im Rahmen einer Pf-Infektion spielen Neutrophile, ebenso wie Monozyten und Makrophagen, eine wichtige Rolle, in dem sie nach der Phagozytose von Hämoozin eine primäre Immunantwort auslösen (100). Eine relevante EPZ durch Neutrophile konnte bereits im Zusammenhang mit erworbener hämolytischer Anämie, Sichelzellanämie und weiteren Krankheitsbildern beobachtet werden (101). Der Einfluss der EPZ durch Neutrophile an der Entstehung der SMA wird hier nicht speziell beachtet, es wäre aber durchaus interessant diesen Aspekt weiterzuverfolgen.

4.3 Erkenntnisse zur Pathogenese der SMA durch die neu entwickelte *in vitro* Methode zur Quantifizierung der EPZ

4.3.1 Einfluss der Monozytenfunktion auf die Phagozytose bei SMA

Eine erhöhte Phagozytose kann sowohl durch eine veränderte Oberfläche der RBC als auch durch eine gesteigerte Aktivität der Phagozyten verursacht werden. Deshalb wurden in den Versuchen ausschließlich autologe Monozyten verwendet. Gerade im Rahmen der Malariainfektion ist dies ein wichtiger As-

pekt, da durch vorherige Studien eine verstärkte Aktivierung der Makrophagen durch die erhöhte Konzentration pro-inflammatorischer Mediatoren gezeigt wurde (102). Gleichzeitig konnte aber auch eine negative Beeinflussung der Phagozytose durch Hämозoin nachgewiesen werden (95). Trotz des Nachweises von Hämозoin in 2-24 % der Monozyten innerhalb der SMA-Studienpopulation, lassen die hier gewonnenen Ergebnisse darauf schließen, dass die signifikant erhöhte EPZ im Rahmen einer SMA wesentlich mit einer Veränderung der Oberfläche der RBC zusammenhängt. So kam es nach Inkubation von Monozyten der SMA-Patienten mit den RBC eines gesunden Spenders zu keinem signifikanten Anstieg der Phagozytose. Eine Hemmung der Phagozytose bei den Patienten mit hohem Hämозoinanteil wurde ebenfalls nicht beobachtet, so dass man davon ausgehen kann, dass der Hämозoingehalt innerhalb der Monozyten keinen relevanten Einfluss auf die Fähigkeit der Monozyten zur EPZ ausübt. Auch wenn die gesteigerte EPZ bei SMA-Patienten wesentlich durch eine Veränderung der RBC-Oberfläche verursacht werden dürfte, konnten aber gleichwohl in einer neueren Studie erhöhte Werte von Neopterin als Serummarker für die gesteigerte Monozytenaktivität bei SMA-Patienten nachgewiesen werden (103). Die genaue Rolle der Monozyten und Makrophagen an der Entstehung der SMA wird zurzeit weiter untersucht. Die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-12 durch Monozyten, Makrophagen und Neutrophile spielen eine wichtige Rolle in der menschlichen Immunabwehr bei Pf-Infektion. Sie fördern u.a. die Phagozytose von parasitierten RBC und hemmen somit das Wachstum der Plasmodien (100). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass stark erhöhte Serumspiegel pro-inflammatorischer Zytokine mit dem Schweregrad der Malaria korrelieren (104).

4.3.2 Rolle der pathologisch erhöhten EPZ für die Entstehung der SMA

Für die Entstehung der SMA sind bislang verschiedene Pathomechanismen bekannt. Dazu zählen, neben der direkten Zelllyse von parasitierten RBC, die Unterdrückung der hämatopoetischen Aktivität des Knochenmarks (37, 38) und eine gesteigerte EPZ (4, 5).

Die hier gesammelten Daten unterstützen die Hypothese, dass eine pathologisch erhöhte Phagozytose von nicht-infizierten RBC wesentlich an der Entstehung der SMA beteiligt ist. In den Untersuchungen konnte eine signifikant höhere EPZ in der SMA-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden. Die Phagozytoserate lag dabei deutlich über der Rate an parasitierten RBC. Die hier dargestellten Ergebnisse befinden sich im Einklang mit vorausgegangenen Untersuchungen an Menschen (5, 110) und Mäusen (111), die ebenfalls eine deutlich erhöhte Phagozytose nicht-parasitierter RBC bei Pf-Infektion nachweisen konnten. Die EPZ durch Makrophagen in Milz und Leber sowie durch periphere Monozyten ist der wahrscheinlichste Mechanismus für den massiven Abbau von nicht-infizierten RBC im Rahmen einer Malaria. Das erklärt auch, dass SMA-Patienten aus der Studie als indirektes Zeichen der gesteigerten Phagozytose meist eine erhebliche Splenomegalie aufwiesen (sonographisch und palpatorisch evaluiert, die Daten dazu sind in der Arbeit nicht aufgeführt). Der Zusammenhang zwischen einer Splenomegalie und erhöhter EPZ im Rahmen einer Malaria konnte bereits in vorherigen Studien beobachtet werden (112). Wie hoch das Verhältnis von phagozytierten parasitierten zu nicht-parasitierten RBC ist, wurde in der Vergangenheit von Jakeman et al. mithilfe eines mathematischen Modells beleuchtet. Dabei konnte errechnet werden, dass für jeden parasitierten Erythrozyt weitere 8,5 nicht-infizierte RBC durch Phagozytose aus der Blutbahn entfernt werden (5). Dieser Wert ist so auch mit den hier gewonnenen Ergebnissen vereinbar. In dieser Arbeit war die Rate der EPZ bei Patienten mit SMA im Vergleich zur physiologischen Basalrate um den Faktor 7,2 erhöht. Bei einer durchschnittlichen Parasitämie der acht Probanden mit SMA von 25 583 Pf/ μ l bedeutet es, wenn man von etwa 1 500 000 RBC pro μ l Blut ausgeht, dass geschätzt nur jeder 60. Erythrozyt befallen ist und somit für jeden parasitierten circa 8,6 nicht-parasitierte RBC durch EPZ verloren gehen. Allerdings ist die hier aufgezählte Gruppe mit nur acht SMA-Patienten relativ klein und damit nur eingeschränkt repräsentativ.

Die Resultate dieser Arbeit führen auch zu der Annahme, dass die erhöhte Phagozytose, wie im Abschnitt zuvor bereits erwähnt, wesentlich auf eine veränderte RBC-Oberfläche zurückzuführen sein dürfte. Die zusätzliche Inkubation

der RBC im autologem Serum von SMA-Patienten hatte allerdings keinen weiteren Effekt auf die Phagozytoserate. Am wahrscheinlichsten dürfte sein, dass die RBC der SMA-Patienten bereits ausreichend opsonisiert waren, so dass eine Exposition in deren zytokinreichen Serum keinen zusätzlichen Effekt mehr ausübte.

Die genauen Mechanismen, die durch eine Pf-Infektion eine Veränderung der RBC-Membran bewirken, müssen nun weiter untersucht werden. Es konnten bereits erhöhte Ablagerungen von IgG sowie eine Veränderung der komplementregulierenden Proteine, u.a. CD35 und CD55 bei schwerer Malaria nachgewiesen werden (81, 113, 114). Der Vorgang des Abbaus von nicht-infizierten RBC im Rahmen einer SMA ähnelt demzufolge dem in der Einleitung beschriebenen Abbau älterer RBC. Man kann die bisherigen Erkenntnisse also so interpretieren, dass es sich bei der SMA nicht um eine rein von der Malaria direkt ausgelöste Komplikation handelt, sondern, dass die Immunantwort des Wirts maßgeblich für den Schweregrad mitverantwortlich ist. Dies spiegelt sich auch in der erhöhten Serumkonzentration pro- und anti-inflammatorischer Zytokinen, wie TNF- α bzw. IL-10 wider (115-117).

Für die Zukunft wird es ein interessanter Aspekt, sein weiter zu untersuchen, welche Rolle die genetische Prädisposition bei der Immunabwehr der Pf-Infektion und bei der Entstehung der SMA spielt. Aus neueren Studien geht hervor, dass das genetische Verteilungsmuster der Monozyten-Subpopulationen für die Prognose mit entscheidend sein könnte (118), da für die verschiedenen Subpopulationen unterschiedliche inflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden konnten (119). So könnte das Verhältnis von pro- inflammatorische zu anti-inflammatorisch wirksamen Monozyten einen großen Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen. Auch zwischen einzelnen ethnischen Gruppen in malariaendemischen Gebieten konnte bereits bei Kindern eine unterschiedliche Immunantwort, resultierend aus einer stärkeren Antikörperbildung und stärker Ausschüttung von Zytokinen, aufgezeigt werden (120).

4.3.3 Neue therapeutische Ansätze zur Behandlung der SMA?

Basierend auf der Tatsache, dass im Verständnis der SMA bereits Fortschritte erzielt werden konnten, öffnen sich für die Zukunft Chancen für eine alternative Behandlung zur effektiven, allerdings riskanten Bluttransfusion. Neben den erwähnten Infektionsrisiken in den Ländern der Dritten Welt (34, 43), gibt es zudem wegen einer kulturell bedingt wenig ausgeprägten Spenderbereitschaft und fehlenden Lagerungsmöglichkeiten häufig nicht ausreichend Blutkonserven.

Bei dem Versuch einer Malaria durch eine effektive Impfung vorzubeugen, sind in den letzten Jahren einige vielversprechende Ansätze entwickelt worden (121). Der aktuell verheißungsvollste Kandidat ist der Impfstoff RTS,S, der bisher als einziger in Phase-III-Studien erfolgreich getestet werden konnte (122). RTS,S stimuliert das menschliche Immunsystem durch die Simulation eines Sporozoiten-Oberflächenproteins (123). Wegen der positiven Ergebnisse in den Phase-II- und Phase-III-Studien wird bereits mit einer Markteinführung bis 2015 gerechnet. Hierzu ist selbstverständlich relativierend zu erwähnen, dass der Impfstoff dann erst noch über Jahre seine Effektivität nachweisen muss. Zudem besteht im Vergleich zu anderen Vakzinen, wie zum Beispiel dem gegen Malaria, nur eine relativ mäßige Wirkung von etwa 50 % (122). Auch deshalb ist es durchaus sinnvoll, nach weiteren Therapieoptionen zur Behandlung der Komplikationen einer Malaria zu forschen.

Da es sich bei der SMA, nach aktuellem Wissenstand, vorwiegend um eine Anämie immunologischer Genese handelt, stellt die Beeinflussung der menschlichen Immunreaktion ein möglicher Therapieansatz dar. Interessant wäre zum Beispiel die Fragestellung, ob durch den Einsatz von Immunsuppressiva die Prognose der SMA verbessert werden könnte. Dies ist bereits erfolgreich bei Behandlung der hämolytischen Anämie ausgelöst durch Autoantikörper vom Wärme-Typ geschehen (124). Ähnlich wie bei der SMA, finden sich auch bei der Wärme-Ak-assoziierten Hämolyse vermehrt IgG auf der RBC-Oberfläche. Man muss jedoch relativierend hinzufügen, dass sich eine supportive Cortisontherapie bei zerebraler Malaria als eher nachteilig für den Verlauf erwies (125, 126), u.a. traten vermehrt intestinale Blutungen auf, weshalb gerade die SMA-Therapie mit Cortison problematisch wäre. Dahingegen konnte zumin-

dest an Mäusen der positive Effekt des Immunsuppressivum Azathioprin zur schnelleren Eliminierung der Parasiten nachgewiesen werden (127). Neuere immunmodulierende Medikamente wie TNF- α -Blocker wären eine weitere denkbare Alternative, die es in Zukunft zu testen gilt.

Zudem könnte das tiefere Verständnis genetisch bedingter Resistenzmechanismen helfen, Wege zu innovativen Therapien zu finden.

Ob in Zukunft eine in der Dritten Welt anwendbare und finanzierbare, spezifische Therapie gefunden werden kann, hängt auch wesentlich von den weiteren Forschungen zu diesem Thema ab und wird eine spannende Frage bleiben.

4.4 Anämien mit nicht vollständig verstandener Pathogenese: Beispiele für weitere potentielle Anwendungsbereiche der neuen Methode

Da es bisher nur wenige Möglichkeiten gab, den Anteil der EPZ mit einer vergleichsweise gut reproduzierbaren Methode quantitativ zu messen, soll der hier entwickelte Phagozytose-Assay die Möglichkeit bieten weitere Anämien besser verstehen zu können.

Dazu zählen in erster Linie Anämien mit positiven Parametern der Hämolyse wie zum Beispiel Sichelzellanämie (6) Thalassämien (7), Sphärozytose (8) und Anämien ausgelöst durch Wärme- oder Kälte-AK.

Im Weiteren handelt es sich auch um Anämien mit multifaktorieller Genese. Diesbezüglich soll hier kurz auf zwei in den Industrienationen häufig vorkommende Krankheitsbilder eingegangen werden, die Tumoranämie und die chronische Entzündungsanämie (ACD). Die Tumoranämie kann, u.a. ausgelöst werden durch eine Tumordinfiltration des Knochenmarks, Tumorblutungen oder Hämolyse bei Wärme- oder Kälteantikörpern. Oft findet sich jedoch keine weitere Erklärung für die Entstehung der Anämie außer der malignen Erkrankung selbst (128, 129). Nach aktuellem Wissensstand wird die Tumor-assoziierte Anämie als eine Funktionsstörung des Immunsystems gesehen, bei der es als Resultat der Interaktion zwischen Tumorzellen und Wirt zu einer Überexpression an pro-inflammatorischen Zytokinen (u.a. IL-6, TNF- α) kommt. Das entspricht in etwa auch den Mechanismen, die zur ACD führen (130). Neben den

bekannten Mechanismen im Rahmen chronisch-entzündlicher Prozesse wie der Erhöhung des Heparin-Spiegels speziell durch IL-6 und der damit verbundenen verminderten Eisenerfreisetzung aus den Makrophagen (131), einer verminderten EPO-Produktion und einer Knochenmarksuppression, ließ sich auch hier eine verkürzte Lebenszeit der RBC nachweisen (129).

Es finden sich jedoch sowohl zur Anämie bei chronischer Erkrankung (u.a. chronisch entzündliche Darmerkrankungen, rheumatoide Erkrankungen) als auch speziell zur Tumor-assoziierten Anämie in der aktuellen Literaturrecherche keine Angaben darüber, zu welchem Anteil die EPZ an der Anämie beteiligt ist. Gerade weil die Tumor-assoziierte Anämie mit einer Prävalenz von 10-40 % (132) eine häufige Komplikation des Tumorleidens darstellt, könnte ein besseres Verständnis helfen, die bisherigen Therapieoptionen (Gabe von Epo und Bluttransfusionen) (133) zu erweitern.

Mit der hier vorgestellten Methode bietet sich nun die Möglichkeit zu eruieren, in welchem Ausmaß die gesteigerte EPZ eine Rolle spielt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: Eine Anämie kann aus einem erhöhten Abbau und einer verminderten Produktion von Erythrozyten (RBC) resultieren. Zur Diagnostik verschiedener Ursachen der Anämie wie der intravasalen Hämolyse oder der Knochenmarksaktivität stehen bereits etablierte direkte und indirekte Messmethoden zur Verfügung. Dagegen war es bislang schwierig, die Erythrophagozytose (EPZ) quantitativ zu erfassen. **Methoden:** Es wurde daher eine neue Methode zur quantitativen Messung der EPZ entwickelt. Als Phagozyten dienten die autologen Monozyten aus 5 ml Vollblut. Die Separation der CD14⁺ Monozyten wurde mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und magnetischer Zellsortierung durchgeführt. Die RBC wurden mit dem Fluoreszenzmarker Carboxyfluoreszin Diacetat, Succinimidyl Ester (CFDA-SE) markiert und mit den CD14⁺ Monozyten für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Phagozytoserate wurde anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Nachdem der Assay standardisiert wurde, sollte dessen Validität am Beispiel der schweren Malariaanämie (SMA) gezeigt werden. Bei der Entstehung einer SMA spielt die Phagozytose von parasitierten und nicht- infizierten RBC eine wichtige Rolle. Wir untersuchten acht Patienten mit SMA nach WHO-Definition und stellten ihnen acht gesunde Probanden als Kontrollgruppe gegenüber. **Ergebnisse:** Während der vierstündigen Inkubationszeit zeigte sich eine konstante Fluoreszenz des Farbstoffs CFDA-SE, eine Kontamination nicht-gefärbter Zellen wurde nicht beobachtet. Die Phagozytoserate der autologen Monozyten war in der SMA-Gruppe signifikant um den Faktor 7,2 im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert. **Schlussfolgerung:** CFDA-SE eignet sich gut zur Markierung von RBC und stellt eine Alternative zu den bisher verwendeten Substanzen dar. Der hier vorgestellte Assay ist in der Lage eine klinisch relevante EPZ quantitativ zu messen und zeigt zudem den Zusammenhang der SMA mit einer erhöhten EPZ von nicht-infizierten RBC auf. Die neue Methode ist gut reproduzierbar und bietet wesentliche Vorteile zu den bisherigen Versuchen die EPZ zu bestimmen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Pschyrembel, klinisches Wörterbuch, de Gruyter, 259. Auflage
2. McLean E et al. (2008) Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993–2005. *Public Health Nutrition*, vol 23: 1-11
3. Dinesh D, Dugan N, Carter J (2008) Intravascular haemolysis in a patient on ceftriaxone with demonstration of anticeftriaxone antibodies. *Intern Med J* 38(6): 438-41.
4. Turrini F, Ginsburg H, Bussolino F, Pescarmona GP, Serra MV, Arese P (1992) Phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected human red blood cells by human monocytes: involvement of immune and nonimmune determinants and dependence on parasite developmental stage. *Blood* 80(3): 801-8
5. Jakeman GN, Saul A, Hogarth WL, Collins WE (1999) Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. *Parasitology* 119 (Pt 2): 127-33.
6. Stuart MJ, Nagel RL (2004) Sickle-cell disease. *Lancet* 364(9442): 1343-60.
7. Sarnaik SA (2005) Thalassemia and related hemoglobinopathies. *Indian J Pediatr* 72(4): 319-24. Review.
8. Gallagher PG (2005) Red cell membrane disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 13-8
9. Beutler E (1994) G6PD deficiency. *Blood* 84(11): 3613-36.
10. Giannouli S, Voulgarelis M, Ziakas PD, Tzioufas AG (2006) Anaemia in systemic lupus erythematosus: from pathophysiology to clinical assessment. *Ann Rheum Dis* 65(2): 144-8.
11. Khadzhiev E, Popova L, Raikov Kh (1989) Autoimmune hemolytic anemia in malignant lymphomas. *Vutr Boles* 28(6): 56-60
12. Merino A, Pereira A, Zabalza M (2006) Transfusion medicine illustrated. Erythrophagocytosis in Epstein-Barr virus IgM-mediated hemolytic anemia. *Transfusion* 46(12): 2035.
13. Zaki Mel S, Hassan SA, Seleim T, Lateef RA (2006) Parvovirus B19 infection in children with a variety of hematological disorders. *Hematology* 11(4): 261-6.
14. Brown EB (1979) Anemia associated with infection and chronic systemic diseases (Simple chronic anemia, Anemia of chronic disorders). In:

Beeson PB, McDermott W, Wyngaarden JB, editors. Cecil Textbook of Medicine. Philadelphia, PA: WB Saunders: 1731–1732

15. Mercadante S, Gebbia V, Marrazzo A, Filosto S (2000) Anaemia in cancer: pathophysiology and treatment. *Cancer Treat Rev* 26: 303-10
16. Helleberg M, Goka BQ, Akanmori BD, Obeng-Adjei G, Rodrigues O, Kurtzhals JA. (2005) Bone marrow suppression and severe anaemia associated with persistent *Plasmodium falciparum* infection in African children with microscopically undetectable parasitaemia. *Malar J* 4(1): 56
17. Skikne B, Cook J (1993) Influence of recombinant human erythropoietin on iron metabolism in healthy subjects. In: Bauer C, Koch KM, Scigalla P, Wieczorek L, editors. Erythropoietin. New York, Marcel Dekker Inc: 177-87.
18. Nelson, DA (1997) Hematopoiesis. In: Henry, JB, editor. Clinical Diagnosis and management by laboratory methods, ed 16. WB Saunders, Philadelphia: 956.
19. Olaru D, Campos L, Flandrin P, Nadal N, Duval A, Chautard S, Guyotat D (2008) Multiparametric analysis of normal and postchemotherapy bone marrow: Implication for the detection of leukemia-associated immunophenotypes. *Cytometry B Clin Cytom* 74(1): 17-24.
20. Ballas SK, Marcolina MJ (2006) Hyperhemolysis during the evolution of uncomplicated acute painful episodes in patients with sickle cell anemia. *Transfusion* 46(1): 105-10.
21. WHO (2011) World Malaria Report 2011: www.who.int/malaria
22. Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, Fullman N, Naghavi M, Lozano R, Lopez AD (2012) Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 379(9814):413-31.
23. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK (2009) Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev.* 22(1):13-36.
24. Snow RW, Craig M, Deichmann U, Marsh K (1999) Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population. *Bull World Health Organ* 77(8): 624-40.
25. Snow RW, Marsh K (1998) New insights into the epidemiology of malaria relevant for disease control. *Br Med Bull* 54(2): 293-309.
26. White N, Breman J In: *Harrisons Innere Medizin*, 17. Auflage ABW Wissenschaftsverlag, Berlin, 1583-1584.
27. Sing B, Daneshvar C (2010) *Plasmodium knowlesi* malaria in Malaysia. *Med J Malaysia* 65 (3): 166-72

28. World Health Organization, UNICEF & United Nations University (1998) Iron Deficiency: Indicators for Assessment and Strategies for Prevention. WHO, Geneva, Switzerland
29. Luby SP et al. (1995) Using clinical signs to diagnose anaemia in African children. *Bulletin of the World Health Organization* 73: 477-482
30. WHO (2000) Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 1-90.
31. Greenwood BM (1997) The epidemiology of malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 91(7): 763-9.
32. Phillips RE, Pasvol G (1992) Anaemia of Plasmodium falciparum malaria. *Baillieres Clin Haematol* 5(2): 315-30.
33. Taylor T, Oloba C, Valim C, Agbenyega T, Kremsner PG, Krishna S, Kwiatkowski D, Newton C, Missinou M, Pinder M, Wypij D (2006) Standardized data collection for multi-center clinical studies of severe malaria in African children: establishing the SMAC network. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100: 615-622
34. Obonyo CO, Steyerberg EW, Oloo AJ, Habbema JD (1998) Blood transfusions for severe malaria-related anemia in Africa: a decision analysis. *Am J Trop Med Hyg* 59(5): 808-12.
35. Beeson JG, Brown GV (2002) Pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria: the roles of parasite adhesion and antigenic variation. *Cell Mol Life Sci* 59(2):258-71.
36. Menendez C, Fleming AF, Alonso PL (2000) Malaria-related anaemia. *Parasitol Today* 16(11): 469-76.
37. Wickramasinghe SN, Abdalla SH (2000) Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 13(2):277-99.
38. Abdalla SH (1990) Hematopoiesis in human malaria. *Blood Cells* 16(2-3): 401-16; discussion 417-9.
39. Fendel R, Kreidenweiss A, Mordmuller B, Rudat A, Brandts C, Kremsner PG (2005) A new and simple method to quantify erythrophagocytosis in patients with severe malarial anaemia. *Acta tropica* 95: 73-73
40. WHO (2000) Management of severe malaria: a practical handbook -2nd. Ed.
41. Serious Hazards of Transfusion Steering Group. www.shotuk.org
42. Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong M, Caglioti S, Wright DJ, et al. (2004) Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. *NEJM* 351:760-8.

43. Greenberg AE, Nguyen-Dinh P, Mann JM, Kabote N, Colebunders RL, Francis H, Quinn TC, Baudoux P, Lyamba B, Davachi F, et al. (1988) The association between malaria, blood transfusions, and HIV seropositivity in a pediatric population in Kinshasa, Zaire. *JAMA* 259(4): 545-9.
44. Lasser A (1983) The mononuclear phagocytic system: a review. *Hum Pathol* 14(2): 108-26.
45. Whitelaw DM (1972) Observations on human monocyte kinetics after pulse labelling. *Cell Tissue Kinet* 5(4): 311-7
46. Shi C, Simon DI (2006) Integrin signals, transcription factors, and monocyte differentiation. *Trends Cardiovasc Med* 16(5): 146-52
47. Johnston RB Jr. (1988) Current concepts: Immunology. Monocytes and Macrophages. *N Engl J Med* 318(12): 747-52.
48. Bhardwaj V, Colston MJ (1988) The processing and presentation of mycobacterial antigens by human monocytes. *Eur J Immunol* 18(5): 691-6.
49. Mannhalter JW, Zlabinger GJ, Ahmad R, Eibl MM (1983) Human T cell proliferation in response to *E. coli* presented by autologous macrophages is antigen specific. *Clin Exp Immunol* 54(1): 95-102.
50. Speer CP, Gahr M (1989) The monocyte-macrophage system in the human. *Monatsschr Kinderheilkd* 137(7): 390-5.
51. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249(4975): 1431-3.
52. Berim NI (1964) Life-span of red cell, the red blood cell. In: Bishop T, Surgenor DM, editors. Academic Press, New York: 423-450
53. Bratosin D et al. (1998) Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* 80(2): 173-95.
54. Vaysse J, Gattegno L, Bladier D, Aminoff D (1986) Adhesion and erythrophagocytosis of human senescent erythrocytes by autologous monocytes and their inhibition by beta-galactosyl derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(5): 1339-43.
55. Piomelli S, Seaman C (1993) Mechanism of red blood cell aging: relationship of cell density and cell age. *Am J Hematol* 42(1): 46-52. Review.
56. Kay MM (1981) Isolation of the phagocytosis-inducing IgG-binding antigen on senescent somatic cells. *Nature* 289(5797): 491-4.
57. Lutz HU, Kay MM (1981) An age-specific cell antigen is present on senescent human red blood cell membranes. A brief note. *Mech Ageing Dev* 15(1): 65-75.

58. Alerman EM, Fudenberg HH, Lovins RE (1981) Isolation and characterization of an age-related antigen present on senescent human red blood cells. *Blood* 58(2): 341-9.
59. Turrini F, Arese P, Yuan J, Low PS (1991) Clustering of integral membrane proteins of the human erythrocyte membrane stimulates autologous IgG binding, complement deposition, and phagocytosis. *J Biol Chem* 266(35): 611-7.
60. Freedman J (1984) Membrane-bound immunoglobulins and complement components on young and old red cells. *Transfusion* 24(6): 477-81.
61. Hamasaki N, Okubo K (1996) Band 3 protein: physiology, function and structure. *Cell Mol Biol* 42(7): 1025-39. Review
62. Bartosz G (1991) Erythrocyte aging: physical and chemical membrane changes. *Gerontology* 37(1-3): 33-67. Review
63. Tang TK (1997) Free radical theory of erythrocyte aging. *J Formos Med Assoc* 96(10): 779-83.
64. Tyan ML (1982) Age-related increase in erythrocyte oxidant sensitivity. *Mech Ageing Dev* 20(1): 25-32.
65. Stoute JA (2005) Complement-regulatory proteins in severe malaria: too little or too much of a good thing? *Trends Parasitol* 21(5): 218-23.
66. Fearon DT, Wong WW (1983) Complement ligand-receptor interactions that mediate biological responses. *Annu Rev Immunol* 1: 243-71.
67. Lutz HU, Bussolino F, Flepp R, Fasler S, Stammer P, Kazatchkine MD, Arese P (1987) Naturally occurring anti-band-3 antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(21): 7368-72.
68. Lutz HU (1990) Erythrocyte clearance. In: *Blood Cell Biochemistry, Vol. 1, Erythroid Cells*. Harris JR, editor. Plenum Press, New York: 81-120.
69. Lang KS, Lang PA, Bauer C, Duranton C, Wieder T, Huber SM, Lang F (2005) Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 15(5): 195-202. Review.
70. Bratosin D, Montreuil J, Ameisen JC et al. (2001) Programmed cell death in mature erythrocytes : a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ* 8(12): 1143-56.
71. Sherman IW, Eda S, Winograd E (2004) Erythrocyte aging and malaria. *Cell Mol Biol* 50(2): 159-69

72. Celada A, Cruchaud A, Perrin LH (1983) Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes by human polymorphonuclear leukocytes. *J Parasitol* 69(1): 49-53.
73. Turrini F, Ginsburg H, Arese P (1991) Erythrophagocytosis in malaria: Host defence or menace to the macrophage? *Parasitol Today* 7(1): 25-8.
74. Ayad F, Tilley L, Dedy LW (2001) Synthesis, antimalarial activity and inhibition of haem detoxification of novel bisquinolines. *Bioorg Med Chem Lett* 11(16): 2075-7
75. Clark IA, Hunt NH (1983) Evidence for reactive oxygen intermediates causing hemolysis and parasite death in malaria. *Infect Immun* 39(1): 1-6.
76. Greve B, Lehman LG, Lell B, Luckner D, Schmidt-Ott R, Kremsner PG (1999) High oxygen radical production is associated with fast parasite clearance in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 179(6): 1584-6.
77. Arese P, Turrini F, Schwarzer E (2005) Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 16(4-6): 133-46. Review.
78. McGilvray ID, Serghides L, Kapus A, Rotstein OD, Kain KC (2000) Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood* 96(9): 3231-40.
79. Tebo AE, Kremsner PG, Luty AJ (2002) Fcγ receptor-mediated phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in vitro. *Clin Exp Immunol* 130(2): 300-6.
80. Mendoza E, Gutgsell N, Temple JD, Issitt P (1991) Monocyte phagocytic activity in sickle cell disease. *Acta Haematol* 85(4): 199-201.
81. Schwarzer E, Turrini F, Arese P (1994) A luminescence method for quantitative determination of phagocytosis of erythrocytes, of malaria-parasitized erythrocytes and malaria pigment. *Br J Haematol* 88(4): 740-5.
82. Kuster JM, Schauer R (1981) Phagocytosis of sialidase-treated rat erythrocytes: evidence for a two-step mechanism. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 362(11): 1507-14.
83. Bussolino F, Turrini F, Arese P (1987) Measurement of phagocytosis utilizing [¹⁴C]cyanate-labelled human red cells and monocytes. *Br J Haematol* 66(2): 271-4.
84. Bratosin D, Mazurier J, Slomianny C, Aminoff D, Montreuil J (1997) Molecular mechanisms of erythrophagocytosis: flow cytometric quantitation of in vitro erythrocyte phagocytosis by macrophages. *Cytometry* 30(5): 269-74.

85. Van Amersfoort ES, Van Strijp JA (1994) Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leucocytes. *Cytometry* 17(4): 294-301.
86. Fendel R, Mordmüller B, Kreidenweiss A, Rudat A, Steur C, Ambrosch C, Kirstein M, Berdel WE, Kreamsner PG, Brandts C (2007) New method to quantify erythrophagocytosis by autologous monocytes. *Cytometry* 71A: 258-264 L
87. Sylla EH, Kun JF, Kreamsner PG (2000) Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 652-656.
88. Eigene Auswertung aller dokumentierten positiven Dicken Tropfen im Forschungslabor in Lambarene, Gabun, im Zeitraum vom 01.12.03-01.06.05
89. Kreamsner PG, Radloff P, Metzger W, Widling E, Mordmüller B, Phillips J, Jenne L, Nkeyi M, Prada J, Bienzle U et al. (1995) Quinine plus clindamycin improves chemotherapy of severe malaria in children. *Antimicrob Agents Chemother* 39(7): 1603-5
90. Planche T, Krishna S, Kombila M, Engel K, Faucher J, Ngou-Milama E, Kreamsner PG (2001) Comparison of methods for the rapid laboratory assessment of children with malaria. *Am J Trop Med Hyg* 65(5): 599-602
91. Greenwood BM, Armstrong JR. (1991) Comparison of two simple methods for determining malaria density. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 186-188
92. Prudhomme O'Meara W, Remich S, Ogutu B, Lucas M, Mtalib R, Obare P, Oloo F, Onoka C, Osoga J, Ohrt C, McKenzie FE (2006) Systematic comparison of two methods to measure parasite density from malaria blood smears. *Parasitol Res* 99(4): 500-4.
93. Kreamsner PG, Zotter GM, Feldmeier H, Graninger W, Rocha RM, Wiedermann G (1988) A comparative trial of three regimens for treating uncomplicated falciparum malaria in Acre, Brazil. *J Infect Dis* 158: 1368-1371
94. Lyke KE, Diallo DA, Dicko A, Kone A, Coulibaly D, Guindo A, Cissoko Y, Sangare L, Coulibaly S, Dakouo B, Taylor TE, Doumbo OK, Plowe CV (2003) Association of intraleukocytic Plasmodium falciparum malaria pigment with disease severity, clinical manifestations, and prognosis in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* 69(3): 253-9.
95. Schwarzer E, Alessio M, Ulliers D, Arese P (1998) Phagocytosis of the malaria pigment, hemozoin, impairs expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54, and CD11c in human monocytes. *Infect Immun* 66(4): 1601-6.
96. Metzger WG, Mordmüller BG, Kreamsner PG (1995) Malaria pigment in leucocytes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89: 637-638.

97. Dörffel Y, Lätsch CH, Stuhlmüller B, Schreiber ST, Scholze S, Burmester G, Scholze, J (1999) Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. *Hypertension* 34: 113-117
98. Nateghi Rostami M, Keshavarz H, Edalat R, Sarrafnejad A, Shahrestani T, Mahboudi F, Khamesipour A (2010) CD8+ T cells as a source of IFN- γ production in human cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 4(10): 845.
99. Hübl, W. (2003) Informationen über Laborbefunde, Monozyten. Laborbefunde. Facharzt für Medizinische und Chemische Labordiagnostik, Wien.
100. Perkins D, Were T, Hittner J, Ong'echa M (2011) Severe Malaria Anemia: Innate Immunity and Pathogenesis. *Int J Biological Sciences* 7(9):1427-42
101. Lewandowski K, Homenda W, Mital A, Hellmann A (2011) Erythrophagocytosis by Neutrophils-a rare morphological phenomenon resulting in acquired haemolytic anaemia? *Int J Lab Hematol.* 33(4):447-50
102. Bussolino F, Fischer E, Turrini F, Kazatchkine MD, Arese P (1989) Platelet-activating factor enhances complement-dependent phagocytosis of diamide-treated erythrocytes by human monocytes through activation of protein kinase C and phosphorylation of complement receptor type one (CR1). *J Biol Chem* 264(36): 711-9.
103. Fendel R, Brandts C, Rudat A, Kreidenweiss A, Steur C, Appelmann I, Ruehe B, Schröder P, Berdel WE, Kremsner PG, Mordmüller B (2010) *PLoS One* 5(4):e10038
104. Clark IA, Chaudhri G (1988) Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Br. J. Haematol* 70: 99–103
105. Ueckert JE, Nebe von-Caron G, Bos AP, ter Steeg PF (1997) Flow cytometric analysis of *Lactobacillus plantarum* to monitor lag times, cell division and injury. *Lett Appl Microbiol* 25: 295–299.
106. Frisardi M, Ghosh SK, Field J, Van Dellen K, Rogers R, Robbins P, Samuelson J (2000) The most abundant glycoprotein of amebic cyst walls (Jacob) is a lectin with five Cys-rich, chitin-binding domains. *Infect Immun* 68: 4217–4224.
107. Schulz A, Knoetzel J, Scheller HV, Mant A (2004) Uptake of a fluorescent dye as a swift and simple indicator of organelle intactness: Import-competent chloroplasts from soil-grown *Arabidopsis*. *J Histochem Cytochem* 52: 701–704.
108. Lyons AB (2000) Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods* 243: 147–154.

109. Bratosin D, Mazurier J, Slomianny C, Aminoff D, Montreuil J (1997) Molecular mechanisms of erythrophagocytosis: Flow cytometric quantitation of in vitro erythrocyte phagocytosis by macrophages. *Cytometry* 30: 269–274
110. Waitubi JN, Opollo MO, Muga RO, Misore AO, Stoute JA (2000) Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe plasmodium falciparum anemia. *Blood* 95(4): 1481-6.
111. Salmon MG, Playfair JH (1997) Premature removal of uninfected erythrocytes during malarial infection of normal and immunodeficient mice. *Clin Exp Immunol* 108: 471–476
112. Looareesuwan S, Ho M, Wattanagoon Y, White NJ, Warrell DA, Bunnag D, Harinasuta T, Wyler DJ (1987) Dynamic alteration in splenic function during acute falciparum malaria. *N Engl J Med* 317: 675–679.
113. Stoute JA, Odindo AO, Owuor BO, Mibei EK, Opollo MO, Waitumbi JN (2003) Loss of red blood cell-complement regulatory proteins and increased levels of circulating immune complexes are associated with severe malarial anemia. *J Infect Dis* 187(3): 522-5.
114. Fendel R, Kreidenweiss A, Rudat A, Steur C, Ambrosch C, Berdel WE, Kreamsner PG, Brandts C and Mordmüller M (2009) Pathophysiological mechanisms of severe malarial anemia in African children. 5th MIM Pan-African Malaria Conference Late-Breaker Abstracts, Nairobi, Kenya.
115. Clark IA, Chaudhri G (1988) Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Br J Haematol* 70: 99–103
116. Ramharter M, Kreamsner PG, Willheim M, Winkler H, Graninger W, Winkler S (2004) Plasmodium falciparum-specific interleukin-2 and tumor necrosis factor-alpha expressing-T cells are associated with resistance to reinfection and severe malaria in healthy African children. *Eur Cytokine Netw* 15(3): 189-96.
117. Clark I et al. (2006) Human malaria disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malar J* 5:85
118. Ogonda LA, Orago AS, Otieno MF, Adhiambo C, Otieno W, Stoute JA (2010) The Levels of CD16/Fc_γ Receptor IIIA on CD14⁺ CD16⁺ Monocytes Are Higher in Children with Severe Plasmodium falciparum Anemia than in Children with Cerebral or Uncomplicated Malaria. *Infect Immun* 78(5): 2173-81.
119. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L (2002) The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168: 3536–3542.

120. Boström S, Troye-Blomberg M (2012) Changes in levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to *Plasmodium falciparum* infection in children living in sympatry in Mali. *Malar J* 11:109
121. Tarleton RL (2005). New approaches in vaccine development for parasitic infections. *Cell Microbiol* 7(10): 1379-86
122. Agnandji S et al. (2011) First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in african children. *NEJM* 365:20
123. Agnandji S, Fendel R, Kremsner PG, Mordmüller B et al. (2011) Induction of plasmodium falciparum-specific CD4+ T cells and memory B cells in Gabonese children vaccinated with RTS,S/AS01 RTS,S/AS02 *PLoS ONE* 6(4)
124. Gerber B, Schanz U, Stüssi G (2010) Autoimmune hemolytic anemia. *Ther Umsch* 67(5): 229-36
125. Rampengan TH, Salendu-Warouw S, Wantania JM, Munir M (1984) Corticosteroid in the treatment of cerebral malaria. *Paediatr Indones* 24(1-2): 11-6.
126. Prasad K, Garner P (2000) Steroids for Treating cerebral malaria. *Cochrane Database Syst Rev* (2).
127. Bobbala D, Koka S, Geiger C, Föllner M, Huber SM, Lang F (2009) Azathioprine favourably influences the course of malaria. *Malar J* 8: 102.
128. Birgegård G, Gascón P, Ludwig H (2006) Evaluation of anaemia in patients with multiple myeloma and lymphoma: findings of the European CANCER ANAEMIA SURVEY. *Eur J Haematol* 77(5): 378-86
129. Birgegård G, Aapro MS, Bokemeyer C, Dicato M, Drings P, Hornedo J, Krzakowski M, Ludwig H, Pecorelli S, Schmoll H, Schneider M, Schrijvers D, Shasha D, Van Belle S (2005) Cancer-Related Anemia: Pathogenesis, Prevalence and Treatment *Oncology* 68 Suppl 1: 3-11.
130. Means RT (2003) Recent developments in the anemia of chronic disease. *Current Hematol Rep* 2: 116–121.
131. Ganz T, Nemeth E (2006) Iron imports. IV. Heparin and regulation of body iron metabolism. *AM J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(2):199-203
132. Monnerat C, Leyvraz S (1999) Tumor anemia. Overview of the role of human recombinant erythropoietin (r-hu-EPO) in treatment of tumor anemia. *Praxis* 88(5): 178-88.
133. Nowrousian MR (1998) Recombinant human erythropoietin in the treatment of cancer-related or chemotherapy-induced anaemia in patients with solid tumours. *Med Oncol* 15 Suppl 1: 19-28.

7 ABBILDUNGSNACHWEIS

Abb. 1, 2, 3, 8a, 8b, 8c:

Fendel R, Kreidenweiss A, Mordmüller B, Rudat A, Brandts C, Kremsner PG (2005) A new and simple method to quantify erythrophagocytosis in patients with severe malarial anaemia. *Acta tropica* 95: 73-73

Abb. 4:

M. A. Guide to Geography, <http://geography.about.com>

Die Karte wird verwendet mit dem freundlichen Einverständnis von Matt T, Rosenberg

Abb. 5:

Eigenes Bildmaterial, Forschungslabor Lambarene, Gabun

Abb. 6:

Selbstangefertigte Skizze anhand des Protokolls zur Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation mithilfe von Bleistift und Lineal

Abb. 7:

Firma Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

Die Abbildung wird verwendet mit deren freundlichem Einverständnis

Abb. 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, Tab. 3:

Fendel R, Mordmüller B, Kreidenweiss A, Rudat A, Steur C, Ambrosch C, Kirstein M, Berdel WE, Kremsner PG, Brandts C (2007) New method to quantify erythrophagocytosis by autologous monocytes. *Cytometry* 71A: 258-264

8 DANKSAGUNG

Mein Dank geht zu allererst an meinen Doktorvater Prof. Dr. Peter G. Kremsner sowie Dr. Benjamin Mordmüller und Dr. Rolf Fendel dafür, dass sie mir die Mitarbeit an dieser Studie überhaupt erst ermöglicht haben.

Durch sie hatte ich die einzigartige Gelegenheit klinisch-experimentelle Forschung von Grund auf kennenzulernen und mich mit spannenden wissenschaftlichen Fragestellungen auseinanderzusetzen. Von den speziell in Lambarene gesammelten Erfahrungen habe ich im weiteren Verlauf meiner Berufslaufbahn aber auch im Leben immer wieder aufs Neue profitieren können.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Familie insbesondere bei meinem Vater Oliver Pontius und bei meinen Großeltern Margarete und Anton Bauernfeind für die jahrelange finanzielle und moralische Unterstützung, vor allem während meines Studiums und der Arbeit an meiner Promotion, bedanken.

Für das kritische Durchlesen dieser Arbeit danke ich Christiane Benne-Müllerleile, meinem Bruder Simon Ambrosch und Maike Schug.

Ein besonderer Dank geht an meine geliebte Partnerin Dr. Johanna Regener, die mich mit einer wundervollen Tochter beschenkt hat und auf die ich mich jederzeit verlassen konnte.

Zum Schluss möchte ich allen Teilnehmern dieser Studie und deren Eltern danken, die dazu beigetragen haben, dass sich die Forschung auf dem Gebiet der Malaria ein Stück weiter entwickeln konnte. Dies wird hoffentlich nachfolgenden Generationen zu Gute kommen.

8 LEBENS LAUF

Christian Johannes Ambrosch wurde am 17.02.1980 in Zweibrücken geboren

Schulbildung

08/1986 – 06/1990 Grundschole in Saarbrücken
07/1990 – 04/2000 Deutsch-Französisches Gymnasium in Saarbrücken

Abschluss: Abitur

Zivildienst

09/2000 – 07/2002 Rotes Kreuz, Rettungswache St. Wendel mit Ausbildung zum Rettungsassistenten

Studium

10/2001 – 11/2008 Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
08/2003 Ärztliche Vorprüfung
09/2004 – 08/2005 Forschungsaufenthalt: Medical Research Unit des Albert Schweitzer Hospitals in Lambarene, Gabun zur Erforschung des Pathomechanismus der Schwere Malaria Anämie (SMA) unter Prof. Kremsner, Leiter der Abteilung Parasitologie der Uni Tübingen
08/2007 – 07/2008 Praktisches Jahr
Innere Medizin: St. Michaels Hospital, Department of Infectious Diseases, Toronto, Kanada (2 Monate)
Städt. Klinikum Karlsruhe, Hämatologie-Onkologie und Kardiologie (2 Monate)
Chirurgie: Kenyatta National Hospital, Nairobi, Kenia
HNO: Städt. Klinikum Karlsruhe
5.11.2008 Staatsexamen

Beruf

Seit 02/2009 Assistenzarzt in der Abteilung Hämatologie/Gastroenterologie des Vinzentius Krankenhaus in Landau, Pfalz