

Die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei Sepsis und Zystischer Fibrose

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Diplom-Biologin Nadine Agnes Engler, geborene Kemmler,
aus Reutlingen

Tübingen

2012

Tag der mündlichen Qualifikation:

20.07.2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Gernot Bruchelt

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Andreas Peschel

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	8
1.1	Immunologische Grundlagen	8
1.1.1	Granulozyten	8
1.1.2	Aktivierung von Granulozyten	9
1.1.3	Abtötung von Krankheitserregern	12
1.2	Sepsis	18
1.3	Zystische Fibrose	20
1.4	Apoptose	22
1.5	Pseudomonas bei CF: Rolle von Ceramid bei der Apoptose	25
2	ZIELE DER ARBEIT	31
3	MATERIAL UND METHODEN	32
3.1	Material	32
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien	32
3.1.2	Stammlösungen und Puffer	33
3.1.3	Antikörper	34
3.1.4	Geräte	35
3.1.5	Verbrauchsmaterial	36
3.1.6	Programme	36
3.2	Methoden	36
3.2.1	Bestimmung des Differentialblutbildes am Advia 120	38
3.2.2	Isolierung von Granulozyten aus Vollblut	41
3.2.3	Degranulation	44
3.2.4	Aufarbeitung von frischen Sputumproben von CF-Patienten	46
3.2.5	Trypanblaufärbung	49
3.2.6	Cytospins	50
3.2.7	Luminolabhängige Chemilumineszenz	51
3.2.8	Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)	54

3.2.9	Chemotaxis	58
3.2.10	In vitro-Inkubation von gesunden Granulozyten mit Amitriptylin	62
3.2.11	Inkubation von gesunden Granulozyten mit Sputum-Überstand aus der CF-Studie	62
3.2.12	Cytokinbestimmung in Blut und Sputum	63
3.2.13	Bestimmung der Pseudomonaszahl im Sputum	64
4	ERGEBNISSE	65
4.1	Einführung	65
4.2	Sepsis	65
	Untersucht wurden die Granulozyten aus dem Blut von 5 Sepsispatienten der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen während des Krankheitsverlaufs an den ersten vier Tagen, am 7., am 10. und am 17. Tag. Zwei der Patienten starben.	65
4.2.1	Untersuchung der neutrophilen Granulozyten aus dem Blut von Sepsispatienten	67
4.2.2	FACS-Untersuchungen	72
4.2.3	Untersuchung der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen an isolierten Granulozyten	89
4.2.4	Untersuchung der Chemotaxis	92
4.2.5	Untersuchung der Degranulation	94
4.2.6	Zusammenfassung der Ergebnisse der Sepsisstudie	98
4.2.7	Cytokine	109
4.3	Zystische Fibrose (CF)	112
4.3.1	Übersicht über die Patientenmedikation	114
4.3.2	In vitro-Versuche mit Amitriptylin	116
4.3.3	Untersuchungen in CF- Blut	121
4.3.4	Untersuchungen in CF-Sputum	134
4.3.5	Untersuchung der Wirkung von Sputumüberstand auf frisch isolierte Granulozyten gesunder Personen	156
4.3.6	Korrelation der Leukozytenparameter mit einer Verbesserung der Lungenfunktion durch Amitriptylinbehandlung	167
4.3.7	Cytokinkonzentrationen im Serum und Sputum von CF-Patienten	169
4.3.8	Bestimmung von Pseudomonas im Sputum von CF-Patienten	181

5	DISKUSSION	185
5.1	Einleitung	185
5.2	Sepsis	185
5.2.1	Bestimmung des Blutbildes	185
5.2.2	Selektine/Integrine und Toll-like-Rezeptoren	186
5.2.3	Phagozytose und oxidativer Burst	187
5.2.4	Chemotaxis und Degranulation	188
5.2.5	Cytokine im Sepsisblut	189
5.2.6	Die mögliche Bedeutung der MPO-Defizienz bei Sepsis	190
5.2.7	Zusammenfassung Sepsis	193
5.3	Zystische Fibrose	195
5.3.1	Einfluss von Amitriptylin auf Granulozyten gesunder Probanden	196
5.3.2	Zellzahl und Apoptose im Blut der CF-Patienten	197
5.3.3	Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen bei Blutgranulozyten von CF-Patienten	197
5.3.4	Zusammensetzung des Sputums und Apoptose der Zellen im Sputum von CF-Patienten	198
5.3.5	Cytokine, Lungenfunktion und Ceramidkonzentration	203
5.3.6	Einfluss zellfreier Sputen von CF-Patienten auf die Funktion von Granulozyten gesunder Probanden	204
5.3.7	Wirt-Erreger-Interaktion	206
5.3.8	Zusammenfassung CF-Studie	207
6	ZUSAMMENFASSUNG	211
7	SUMMARY	214
8	LITERATURVERZEICHNIS	217
9	DANKSAGUNG	226
10	VERÖFFENTLICHUNGEN	227

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ami	Amitriptylin
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
Apaf	Apoptotischer Proteaseaktivierungsfaktor
APC	Allophycocyanin
ASM	Saure Sphingomyelinase
ARDS	Acute respiratory distress syndrom
ASF	Airway surface liquid
ATP	Adenosintriphosphat
Baso	Basophile Granulozyten
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calziumionen
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CARS	Compensatory antiinflammatory response syndrome
CD	Cluster of Differention
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CGD	Chronic Granulomatous Disease
CHIPS	Chemotaxis inhibitory protein
CL	Chemilumineszenz
CF	Zystische Fibrose
CRP	C-reaktives Protein
D	Tag
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EAP	Extracellular adherence protein
ECM	Extrazelluläre Matrix
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
f.c.	final concentration
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FADD	Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne
FEV ₁	Forciertes expiratorisches Volumen pro Sekunde
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FPR2	Formyl Peptid Rezeptor 2
FSC	Forward Scatter
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GSH	Glutathion
GSH-PO	Glutathion-Peroxidase
GSSG	Oxidiertes Glutathion
GSSG-Red	Glutathion-Reduktase
h	Stunde
H ⁺	Proton
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HBSS	Hank`s Balanced Salt Solution
HBV	Hepatitis B Virus
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N´-(2-ethansulfonsäure)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HOCl	Hypochlorige Säure
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
K ⁺	Kaliumion
Kap.	Kapitel

Ko	Kontrolle
LAD	Leukozytenadhäsionsdefizienz
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LFA	Lymphocyte function associated antigen
LPS	Lipopolysaccharid
LUC	large unstained cells
M	Mol pro Liter (Molar)
Mac	Leukozytenintegrin (Cd11b/CD18)
MAP	Mittlerer arterieller Druck
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MIF	Makrophagen migration inhibitory factor
min	Minuten
MAdCAM	Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MPO	Myeloperoxidase
MRSA	Methicillin resistenter Staphylococcus aureus
MW	Mittelwert
μM	Mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NaOH	Natronlauge
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NfMLP	N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
NRBCs	Non Red Blood Cells
nu	Nicht untersucht
nw	Nicht gewertet
O ₂ ⁻	Superoxidanion
P	Patient
PACO ₂	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAF	Plättchen-Aktivierungsfaktor

PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PEROX	Peroxidase Kanal
Plaz	Plazebo
PJ	Propidiumjodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PSM	Phenol-lösliches Modulin
RLU	Relative Light Unit
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen
rpm	revolutions per minute
s	Sekunde
S.D.	Standardabweichung
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SOD	Superoxiddismutase
SSC	Side Scatter
Stauro	Staurosporin
t	Zeit
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF alpha	Tumornekrosefaktor alpha
TRADD	TNF-Rezeptor assoziiertes Protein
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
vgl.	vergleiche
Z	Zyklus
Zym	opsonisiertes Zymosan A

1 Einleitung

Vorbemerkung:

In dieser Arbeit sollte die Funktion der Granulozyten bei den Krankheiten Sepsis und Zystische Fibrose (CF) untersucht werden. Zwischen den beiden Krankheiten gibt es durch die in beiden Fällen übermäßig vorhandenen neutrophilen Granulozyten (Neutrophile) viele Zusammenhänge. Die Zahl der Neutrophilen ist im Blut von Sepsispatienten massiv erhöht, und im Sputum von Patienten mit Zystischer Fibrose ist eine enorme Anzahl an neutrophilen Granulozyten enthalten. Bei beiden Krankheitsbildern spielen ähnliche Krankheitserreger, wie *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*, eine wichtige Rolle. So besiedelt *Pseudomonas aeruginosa* chronisch Kranke wie CF-Patienten, kann aber auch Sepsis verursachen (Giamarellos-Bourboulis et al., 2004). Bei der Sepsis sollte untersucht werden, ob es erst eine Phase gibt, in der die Granulozyten überreaktiv sind und bei der sie durch Produktion großer Mengen an reaktiven Sauerstoffverbindungen und durch lytische Enzyme Schäden an Epithelien und Organen auslösen (SIRS, Systemic inflammatory response syndrome), um dann in einer zweiten Phase (CARS, Compensatory antiinflammatory response syndrome) völlig funktionslos zu werden und die Krankheitserreger nicht mehr bekämpfen zu können und somit zum schweren Verlauf und eventuell sogar Tod der Patienten beizutragen (Osuchowski et al., 2006).

Ein großes Problem bei der Erbkrankheit Zystische Fibrose ist die Schädigung des Lungenepithels. Man geht davon aus, dass die im Sputum in großer Zahl enthaltenen Neutrophilen durch die Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen und lytischer Enzyme zur Destruktion der Epithelzellen beitragen und eine erhöhte Ceramidkonzentration für deren Apoptose verantwortlich ist. Hemmstoffe der Ceramidbildung können die erhöhte Epithelzell-Apoptoserate verringern (Teichgräber et al., 2008).

Deshalb soll im Folgenden näher auf Granulozyten (Kapitel 1.1.1 und 1.1.2), die Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen und lytischer Enzyme (Kapitel 1.1.3), die beiden Krankheitsbilder Sepsis (Kapitel 1.2) und Zystische Fibrose (Kapitel 1.3) sowie die Apoptose (Kapitel 1.4) und die Ceramidbildung (Kapitel 1.5) eingegangen werden.

1.1 Immunologische Grundlagen

1.1.1 Granulozyten

Das Immunsystem lässt sich prinzipiell in zwei verschiedene Bereiche einteilen: das angeborene und das erworbene Immunsystem. Ein wichtiger zellulärer Bestandteil des

angeborenen Immunsystems sind die Phagozyten, die Freßzellen. Zu ihnen gehören Granulozyten und Monozyten.

Die Granulozyten sind dabei die herausragenden Zellen in der ersten Phase der Infektionsabwehr. Granulozyten lassen sich in 3 Formen unterteilen, in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Diese unterscheiden sich mikroskopisch durch ihre unterschiedliche Anfärbbarkeit aufgrund unterschiedlicher Granula. Eosinophile Granulozyten lassen sich mit dem Farbstoff Eosin rot, basophile Granulozyten mit basischen Farbstoffen blau und neutrophile Granulozyten gar nicht anfärben. Granulozyten besitzen sehr viele Granula, von denen sich auch ihr Name ableitet. Es gibt drei unterschiedliche Arten von Granula. Die azurophilen Granula enthalten unter anderem Myeloperoxidase (MPO), Elastase, Defensine und saure Hydrolasen (wie Cathepsine). Die spezifischen (sekretorischen) Granula enthalten unter anderem Lysozym, Kollagenase, alkalische Phosphatase und Cytochrom b_{558} . Die tertiären Vesikel enthalten Gelatinase. Durch Phagozytose und anschließende Abtötung der Erreger durch Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen und Aktivierung von Proteasen und anderen lytischen Enzymen findet, noch bevor das erworbene Immunsystem aktiv wird, bereits eine wichtige mikrobizide Abwehr statt.

Durch eine spezielle Enzymausstattung wird den Granulozyten die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species, ROS) ermöglicht. Zentrales Enzym dabei ist die NADPH-Oxidase (E.C. 1.6.3.1), die unter anderem durch Bindung und Phagozytose von opsonisierten Infektionserregern aktiviert wird. Ein Defekt der NADPH-Oxidase führt zur Septischen Granulomatose, englisch Chronic Granulomatous Disease (CGD). Diese schwere Krankheit äußert sich in immer wiederkehrenden Infekten und Granulombildung und führt häufig zum frühen Tod der Betroffenen.

1.1.2 Aktivierung von Granulozyten

Die Bildung von Granulozyten erfolgt im Knochenmark. Nach Ausschüttung ins Blut leben sie dort nur ca. 8 bis 12 Stunden. Ungefähr 50 – 70 % der Zellen im Blut sind Granulozyten. Über Kohlenhydrat-bindende Adhäsionsmoleküle, sogenannte Selektine, können sich die Granulozyten vorübergehend an Endothelzellen binden, was als „rolling“ bezeichnet wird (siehe Abbildung 1). Leukozyten exprimieren auf der Oberfläche L-Selektin (CD62L), Endothelzellen E-Selektin und die Blutplättchen P-Selektin. Bei einer Entzündung herrscht durch erweiterte Gefäße eine verringerte Fließgeschwindigkeit. Inflammatorische Mediatoren (Komplementfaktor C5a, Interleukin 8, Leukotrien LTB_4 , Plättchen-Aktivierungsfaktor (PAF)) (Klotz et al., 1994) werden von Granulozyten über spezifische Rezeptoren erkannt

und bewirken die Aktivierung von Integrinrezeptoren. Durch Abspaltung eines extrazellulären Anteils durch eine endogene Protease wird L-Selektin innerhalb von wenigen Minuten proteolytisch auf der Zelloberfläche abgebaut und die sich in Granula befindlichen Integrine, wie der Komplementrezeptor CD11b/CD18, werden an die Oberfläche gebracht (Carlos und Harlan 1994). β -2-Integrine bestehen aus einer β -Kette (CD18) und der α -Untereinheit, hier CD11b, und dienen der festen Bindung an Endothelzellen, die das Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) exprimieren, an das der Integrinrezeptor Mac-1 (CD11b/CD18) der Neutrophilen bindet (Carlos und Harlan 1994, siehe Abb. 1).

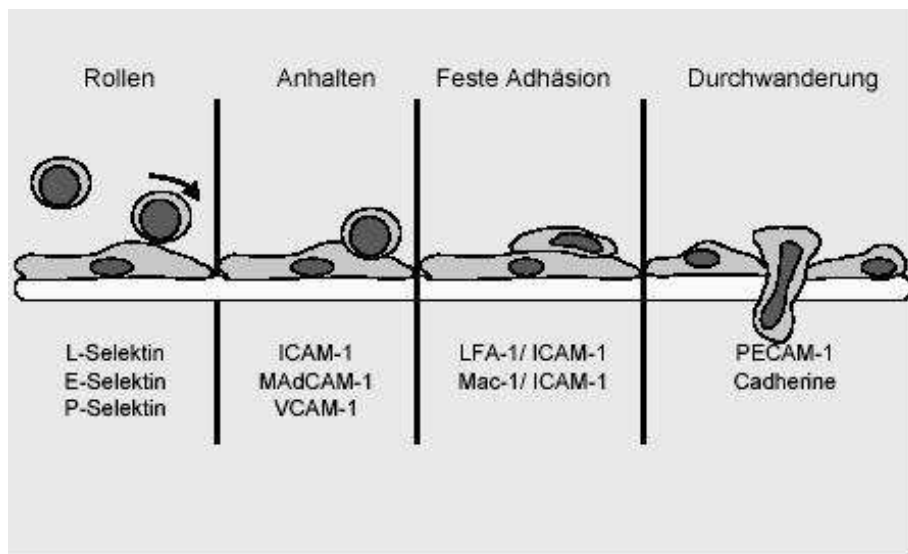


Abbildung 1: Adhäsion der Granulozyten an die Endothelzellen und Wanderung ins Gewebe

Im Entzündungsfall heften sich die Granulozyten fest an Rezeptoren auf Endothelzellen wie ICAM-1 und wandern durch die Endothelzellschicht aus der Blutbahn ins Gewebe. ICAM-1: intercellular adhesion molecule, MAdCAM-1: mucosal vascular addressin cell adhesion molecule, VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1, LFA-1: Lymphocyte function-associated antigen 1, Mac-1: CD11b/CD18; PECAM-1: platelet endothelial cell adhesion molecule.

(Abbildung modifiziert nach Carlos und Harlan 1994).

Es gibt verschiedene Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen wie ICAM-1, PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1), VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) und MAdCAM-1 (Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1), an die sich die Neutrophilen über Selektine oder Integrine anlagern können. L-Selektin bindet an MAdCAM-1 und bewirkt dadurch ein Anlagern der Leukozyten. Die Integrine LFA-1 (Lymphocyte function associated antigen, CD11a/CD18) und MAC-1 (CD11b/CD18) bewirken über die Bindung an ICAM-1 die feste Leukozytenadhäsion ans Endothel. PECAM-1 bewirkt über die Wechselwirkung mit Integrinen die Durchwanderung aus der Blutbahn ins Gewebe.

Die Expression endothelialer Adhäsionsproteine ist durch Cytokine oder Lipopolysaccharid (LPS) regulierbar und kann z. B. bei gram-negativer Sepsis durch zirkulierendes Endotoxin beeinflusst werden (Carlos und Harlan, 1994).

Patienten mit der autosomal rezessiven Erbkrankheit Leukozytenadhäsionsdefizienz (LAD) weisen einen Defekt der Leukozytenadhäsion auf. LAD Typ I - Granulozyten weisen eine intakte vorübergehende Anheftung auf, sind aber unfähig zur festen Bindung an Endothelzellen, weil sie wenig oder keine β -2-Integrine exprimieren und somit keine ausreichende Granulozytenwanderung zum Ort der Entzündung stattfinden kann. LAD Typ II - Granulozyten besitzen eine normale β -2-Integrin-Expression, aber die Granulozyten sind nicht zur vorübergehenden Anheftung an das auf Endothelzellen vorkommende E-Selektin fähig und somit auch nicht zur Integrin-vermittelten festen Bindung mit nachfolgender Migration (Chemotaxis). Diese beschreibt die aktive Hinbewegung zu einem Stoff. Im Fall einer Entzündung gelangen die Granulozyten aus der Blutbahn ins Gewebe (Diapedese). Hier folgen sie einem chemotaktischen Gradienten, der z.B. von den Erregern abgegeben wird, bis zum Ort der Entzündung. Krankheitserreger geben Substanzen wie das Peptid N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (N-formyliertes Methionin, NfMLP) ab. Über Rezeptoren aus der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren wird NfMLP erkannt und führt nach Aktivierung der Phospholipase C zur Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3). DAG bewirkt die Aktivierung der Proteinkinase C und nachfolgend der NADPH-Oxidase. IP_3 führt zur Ausschüttung von Ca^{2+} mit nachfolgender Degranulation. Aktivierte Endothelzellen können IL8 abgeben und so zur Granulozytenmigration beitragen (Carlos et Harlan 1994). Die Auflösung der extrazellulären Matrix erfolgt durch Freisetzung verschiedener Proteasen (z. B. Collagenase, Elastase und Gelatinase), die durch eine limitierte Bildung von ROS zuvor aktiviert werden (Weiss 1989). Die Lebenszeit nach Auswanderung ins Gewebe beträgt ca. 1-2 Tage.

Die Granulozyten binden sich über Rezeptoren an die fremden Stoffe (Bakterien, Pilze) und

„umfließen“ sie. Durch den Mechanismus der Phagozytose gelangen diese über Vesikel ins Zellinnere (Phagosom) und es kommt zur Verschmelzung mit Granula. Der pH-Wert in dieser „Phagolysosom“ genannten Vakuole steigt zuerst an (durch Superoxidanion-Bildung, siehe Abbildung 3, S. 15) und sinkt später wieder ab, was zuerst die Aktivierung kationischer Proteine (z.B. Defensine) bewirkt und anschließend durch den gesunkenen pH-Wert den lysosomalen Enzymen die Arbeit ermöglicht.

Die Krankheitserreger werden durch Proteolyse etc. zerstört. Zeitgleich kommt es zur Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen, die ebenfalls zu einer Zerstörung der Fremdpartikel führen. Mit dem Beginn der Bildung von Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) kommt es dabei zu einer kaskadenartigen Bildung verschiedener Sauerstoffspezies, wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben.

1.1.3 Abtötung von Krankheitserregern

Beim „klassischen“ oxidativen Burst werden reaktive Sauerstoffverbindungen wie $O_2^{\cdot-}$, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hypochlorige Säure (HOCl) mit Hilfe von Enzymen bzw. spontan ($O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2$) gebildet. Bei Anheftung des Granulozyten an ein Fremdpartikel kommt es über "2nd messenger"-Systeme wie z.B. Proteinkinase C zur Aktivierung des Multikomponenten-Enzyms NADPH-Oxidase (Abbildung 2).

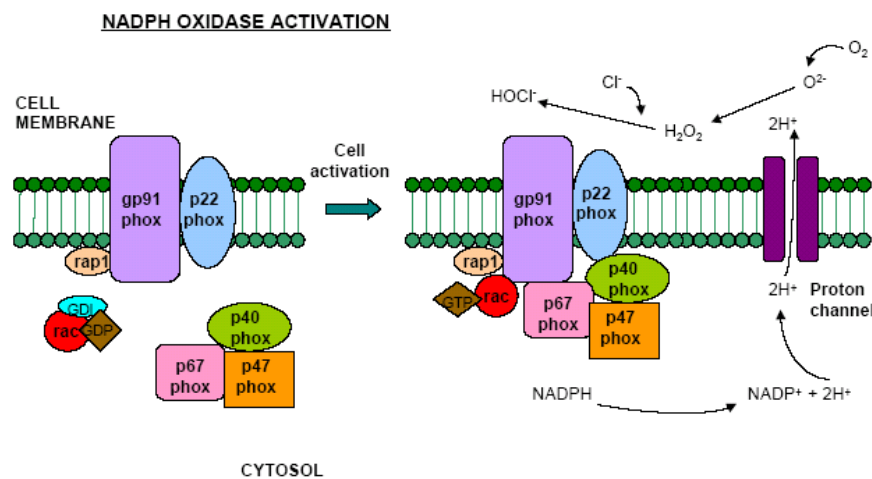


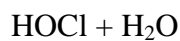
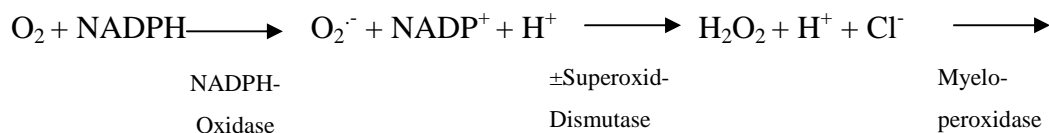
Abbildung 2: Schematische Darstellung der NADPH-Oxidase-Aktivierung
Die NADPH-Oxidase besteht aus verschiedenen Untereinheiten, die sowohl in der Membran als auch im Cytosol lokalisiert sind. Die Aktivierung erfolgt durch die Anlagerung der zytosolischen an die membranständigen Untereinheiten. (Assari, 2006)

Die NADPH-Oxidase besteht zum einen aus den membranständigen Glykoproteinen gp91^{phox}

und gp22^{phox}, die auch als Cytochrom b558 bezeichnet werden. Die Zahlen geben das Molekulargewicht in Kilodalton an, die Bezeichnung „phox“ kommt vom englischen Begriff, Phagocyte Oxidase. Im nichtaktivierten Zustand liegt die NADPH-Oxidase inaktiv vor, bei Stimulierung des Granulozyten wandern die sich frei im Cytoplasma befindenden Untereinheiten gp40^{phox}, gp47^{phox} und gp67^{phox} zur Plasmamembran und es kommt zur Aktivierung der NADPH-Oxidase (Bjorgvinsdóttir et al., 1996). Am häufigsten von Mutationen betroffen ist gp91^{phox}, das auf dem X-Chromosom codiert wird.

Aus einem Sauerstoffmolekül (O₂) entsteht durch die NADPH-Oxidase Superoxidanion (O₂⁻), das entweder spontan disproportioniert oder von der Superoxiddismutase in Wasserstoffperoxid (H₂O₂) umgewandelt wird (O₂⁻ + H⁺ ⇌ HO₂; 2HO₂ → H₂O₂ + O₂). Spontan entsteht reaktiver Singlett-Sauerstoff, während durch die Superoxiddismutase (SOD) Triplett-Sauerstoff, also unser normaler Atmungssauerstoff, entsteht.

Die MPO setzt das Peroxid zu hypochloriger Säure (HOCl) um.



Hypochlorige Säure ist ein starkes Reagenz zur Abtötung von Krankheitserregern. Die Bildung des Superoxidanions ist nicht nur für den Beginn der Kaskade der Sauerstoffspezies-Bildung wichtig, sondern ist auch ausschlaggebend für die Regulation des pH-Wertes und die Aktivierung der Proteasen innerhalb der Vakuole (siehe Abbildung 4, S. 17).

Die Fähigkeit zur ROS-Bildung wird auch als „oxidativer Burst“ bezeichnet und kann mit der Chemilumineszenzmethode gemessen werden, wobei Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) und opsonisiertes Zymosan A zur Stimulation dienen. PMA bewirkt als Phorbol-Myristat-Acetat die Aktivierung der Proteinkinase C mit nachfolgender Aktivierung der NADPH-Oxidase. Opsonisiertes Zymosan A besteht aus Bruchstücken aus der Zellwand der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die durch Inkubation mit humanem Serum von Komplementfaktoren wie C5 und C3b und Antikörpern besetzt und durch Phagozytose aufgenommen werden.

Nachfolgend ist in Abbildung 3 die schematische Abbildung eines ROS-produzierenden

neutrophilen Granulozyten zu sehen.

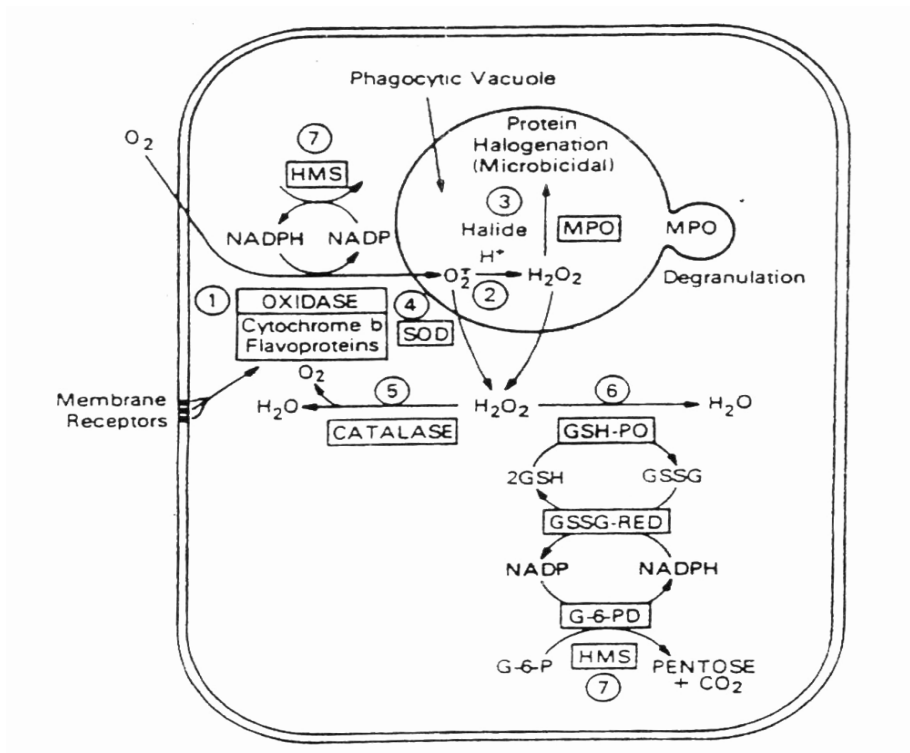


Abbildung 3: Schema der ROS-Produktion

Die Bildung von ROS lässt sich in mehrere Schritte unterteilen: 1. Sauerstoff wird durch die NADPH-Oxidase zu Superoxidanion (O_2^-). 2. O_2^- zerfällt spontan zu H_2O_2 und O_2 . 3. H_2O_2 und Chlorid werden im Phagolysosom durch die MPO zu $HOCl$. 4. Aus dem Phagolysosom austretendes O_2^- wird durch die SOD in H_2O_2 umgewandelt. Die Bildung der ROS in Schritt 1 bis 4 dient zur Abtötung der Mikroorganismen im Phagolysosom.

5. Catalase spaltet H_2O_2 zu H_2O und O_2 . 6. H_2O_2 kann auch über das Glutathion (GSH)-System entgiftet werden, dabei oxidiert es mit Hilfe der Glutathion-Peroxidase (GSH-PO) Glutathion. Das dabei oxidierte Glutathion (GSSG) wird durch die Glutathion-Reduktase (GSSG-Red) unter NADPH-Verbrauch reduziert. 7. Der Hexose-Monophosphat-Shunt (HMS) bzw. die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion stellt NADPH zur Verfügung. Schritt 5 bis 7 sind Schutzreaktionen, die der Granulozyt für eine gewisse Zeit zum Überleben benötigt (Abbildung modifiziert nach Metcalf et al., 1986).

Obwohl der Granulozyt für die Abtötung der Mikroorganismen viel Energie benötigt, produziert er das dafür notwendige ATP nicht über die effektive oxidative Phosphorylierung ($C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$, Energiegewinn > 30 ATP pro Glucosemolekül). Eine experimentelle Hemmung der oxidativen Phosphorylierung vermindert beim Granulozyten den Sauerstoffverbrauch nicht, was darauf hinweist, dass Granulozyten ihre Energie mit Hilfe der anaeroben Glykolyse gewinnen (Glucose \rightarrow Laktat; Energiegewinn 2 ATP pro Glucosemolekül). Dies macht insofern Sinn, als Granulozyten vor allem an Entzündungsorten benötigt werden, an denen Sauerstoff (und Glucose) kaum vorhanden sind. So wird der wenige zur Verfügung stehende Sauerstoff ausschließlich zur Bildung von Superoxidanionen in der NADPH-Oxidase-Reaktion verwendet. Da der Granulozyt während seiner Reifung im Knochenmark große Mengen an Glykogen (der Speicherform der Glucose) synthetisiert, macht er sich auch von der im interstitiellen Gewebe kaum vorhandenen Glucose unabhängig. Bis vor kurzem war die vorherrschende Theorie, dass reaktive Sauerstoffspezies, insbesondere hypochlorige Säure, die wichtigste Rolle bei der Keimabtötung durch neutrophile Granulozyten spielen (Hampton et al., 1998). Allerdings wurde seit der Einführung durchflusszytometrischer Systeme wie des auf der Peroxidasereaktion beruhenden Advia 120 zur Blutzellendifferenzierung in der hämatologischen Routinediagnostik entdeckt, dass ca. jedem 2000 bis 4000. Menschen die Myeloperoxidase fehlt und deshalb kein HOCl gebildet werden kann (Nauseef, 1988). Der Advia 120 differenziert die Leukozyten über ihren Peroxidasegehalt. Die Klassifikation der Leukozyten mit anderen Durchflusszytometertypen wie dem Sysmex erfolgt durch Peroxidase- unabhängige Methoden und ist daher nicht in der Lage, eine Myeloperoxidasedefizienz zu erkennen. Entgegen der Erwartungen sind MPO-defiziente Patienten klinisch jedoch unauffällig und zeigen normalerweise keine vermehrte Infektanfälligkeit. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von Reeves et al. interessant, die 2002 über die zentrale Bedeutung lysosomaler Enzyme, vor allem der Elastase, für die effektive Abtötung von Mikroorganismen berichteten. Nach der Bildung negativ geladener Superoxidanionen entsteht der Ladungsausgleich in den Phagolysosomen durch Einströmen positiv geladener Ionen. Reeves geht hierbei von K^+ -Ionen aus, während neuere Befunde keinen Einfluss durch die Hemmung der BK-Kanäle zeigen, was gegen den K^+ -Ionen-Einstrom spricht. Stattdessen scheinen Protonen für den Ladungsausgleich verantwortlich zu sein (Essin et al., 2009).

Positiv geladene inaktive Proteasen wie Elastase sind im Lysosom in der Membran der azurophilen Granula an sulfatierte Glykoproteine gebunden. Positiv geladene Teilchen (wahrscheinlich Protonen) machen den sauren pH-Wert alkalisch, ermöglichen die

Freisetzung der Elastase und anderer Proteasen und bewirken so ihre Aktivierung, wie in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Die Elastase und die anderen lytischen Enzyme können die phagozytierten Mikroorganismen abbauen. An dieser Stelle wird die enorme Bedeutung der Superoxidanionen auch bei dieser Theorie deutlich, was die drastischen klinischen Symptome bei der Septischen Granulomatose erklärt.

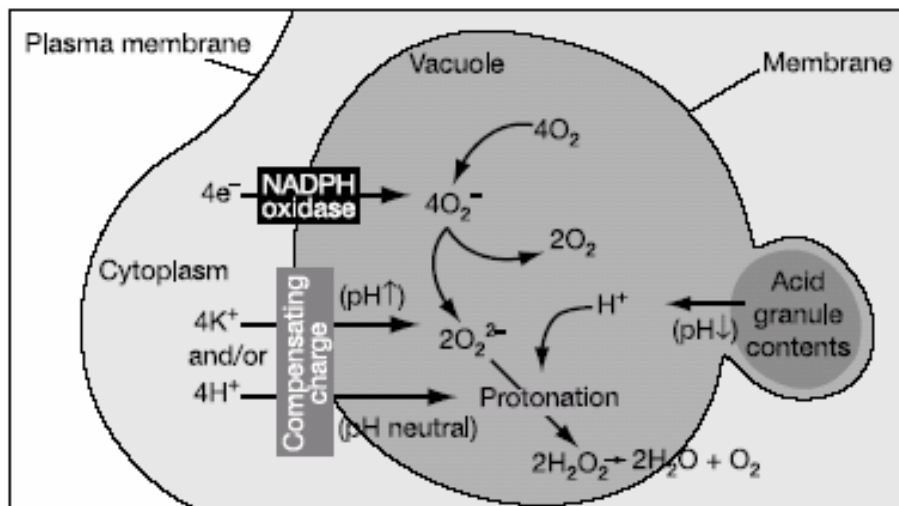


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ladungsausgleiches an der phagosomalen Membran beim Ablauf des oxidativen Bursts

Durch Aktivierung der NADPH-Oxidase wird negativ geladenes Superoxidanion gebildet. Durch den Einstrom von positiv geladenen Ionen ins Phagolysosom kommt es durch Ladungsausgleich zum pH-Anstieg und damit zur Freisetzung der an die Membran des Lysosoms gebundenen positiv geladenen Proteasen, wie der Elastase. Nach Reeves et al., 2002.

Auch Rada et al. (2004) stimmen dieser neuen Sichtweise zu, betonen aber die Wichtigkeit beider Abläufe (Ionen-Einstrom und Bildung von ROS). Die die Superoxidanionproduktion begleitende Depolarisation (in ruhenden neutrophilen Granulozyten -60 mV, nach Aktivierung durch PMA wurde ein Membranpotential von +60 mV gemessen) mit nachfolgendem Ioneneinstrom sei wichtig, aber ebenso die Wirkung der aggressiven Sauerstoffmetabolite. Allerdings räumen sie die Bedeutung der Enzyme in Regionen mit geringer Sauerstoffversorgung, z.B. in Abszessen ein. Roos und Winterbourn halten diesen neuen Ansatz in einer 2002 erschienen Rezension für sehr interessant, führen aber noch verschiedene kritische Argumente an: so sei die von Reeves et al. vorgeschlagene alleinige neue Rolle der MPO als Entgifter für H_2O_2 (aufgrund ihrer Katalase-Aktivität) fraglich, weil

die in den Experimenten gewählte H_2O_2 -Konzentration von 100 mM viel zu hoch sei, so dass die MPO zu schnell inaktiviert würde.

Vor kurzem wurde ein weiterer Mechanismus des Abtötens von Krankheitserregern entdeckt. Beim „Killing“ bilden die aktivierten Granulozyten extrazelluläre Fasern aus, mit denen sie sich an Bakterien anheften (siehe Abbildung 5). Diese netzartigen „neutrophil extracellular traps“ (NETs) bestehen zu 70 % aus Chromatinprotein, zu geringeren Teilen aus Granulaprotein (v.a. Elastase) und DNA (Brinkmann et al., 2004) und werden von aktivierten Granulozyten zum Zeitpunkt des Todes freigesetzt. Diese neue Art des Zelltodes ist weder apoptotischer noch nekrotischer Art, es handelt sich um einen neuen Sterbemechanismus. NETs sind in der Lage, sowohl Gram-positive und Gram-negative Bakterien als auch Pilze abzutöten (Urban et al., 2006). Stimulation neutrophiler Granulozyten mit IL8, LPS oder PMA induzieren nach 45 Minuten NETs-Bildung (Brinkmann et al., 2004; Gupta et al., 2005). Stimulation mit lebenden Bakterien oder PMA aktiviert die NADPH-Oxidase und die ROS-Produktion. Interessanterweise sind die neutrophilen Granulozyten von CGD-Patienten nicht in der Lage, NETs zu bilden. Dies ist erst nach Stimulation mit H_2O_2 möglich, weil für die NETs-Bildung reaktive Sauerstoffverbindungen benötigt werden (Fuchs et al., 2007).

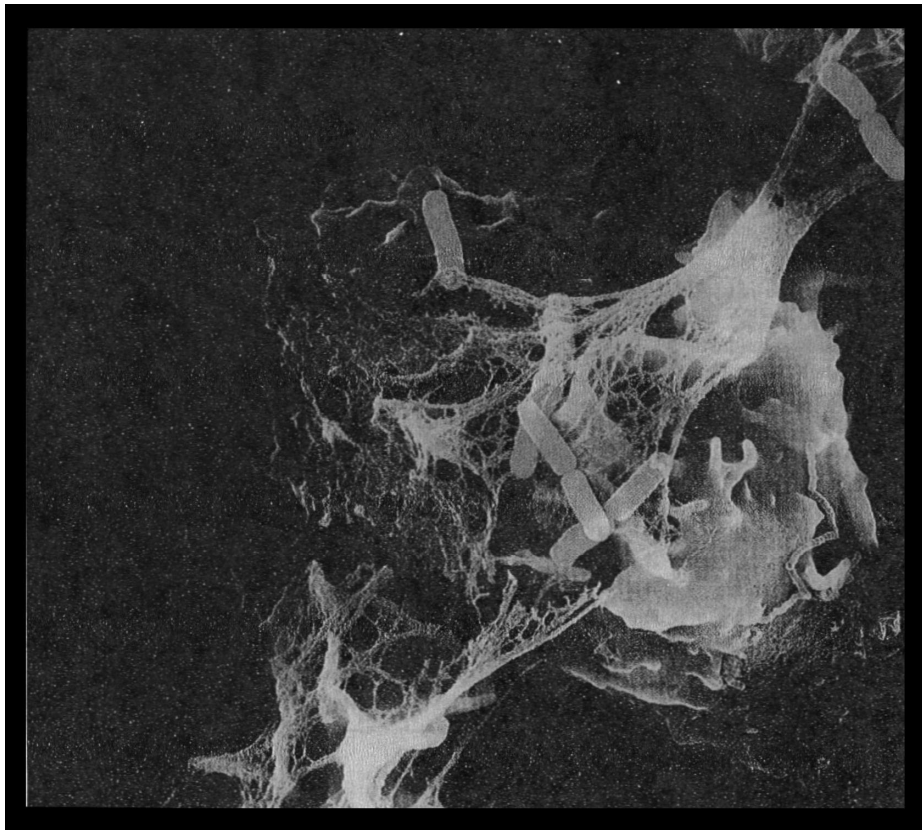


Abbildung 5: mechanische Bakterienabwehr

Granulozyten bilden neutrophil extracellular traps (NETs), die von Neutrophilen abgegeben werden und dem mechanischen Einfangen von Bakterien dienen. In diesem Bild verfangen sich Shigellen, die stäbchenförmigen Erreger der Bakterien-Ruhr, in den Netzen.

Quelle: V. Brinkmann, MPI für Infektionsbiologie, Berlin

1.2 Sepsis

Unter Sepsis versteht man eine systemische Entzündung, die durch Infektion mit Bakterien oder Pilzen verursacht wird. Am häufigsten sind Gram-positive Bakterien und Pilze als Auslöser zu finden (Martin et al., 2003).

Besonders in Krankenhäusern ist sie durch resistent gewordene Keime nach häufigem Antibiotikaeinsatz verbreitet und stellt ein großes Problem dar. Sepsis ist die häufigste Ursache für die Mortalität in Krankenhäusern. Zwischen 20 und 50% der Sepsispatienten sterben. Die Kosten für die Behandlung eines Sepsispatienten belaufen sich auf 50 000 US-Dollar, was allein in den USA fast 17 Millionen US-Dollar Kosten jährlich verursacht.

Männer sind für die Entwicklung einer Sepsis gefährdeter als Frauen. Die jährliche Inzidenz für schwere Sepsis liegt in den Industrienationen bei 50 bis 100 Fällen pro 100 000 Personen (Moss, 2005).

Andere Autoren beschreiben die Inzidenz allein für die USA mit ungefähr 700 000 Fällen pro Jahr mit mehr als 200 000 Toten jährlich (Martin et al., 2003; Angus et al., 2001). In Deutschland betragen die Kosten für die Sepsisbehandlung ungefähr 2 Milliarden Euro pro Jahr, also 20 bis 40% der Gesamtkosten für die Intensivmedizin. Ein Patient mit schwerer Sepsis verursacht hier Kosten von ungefähr 40 000 Euro. Die Inzidenz wird sich wegen der ansteigenden Altersstruktur der Bevölkerung und einer verbreiteten Verwendung von Immunsuppressiva, z.B. bei Knochenmarkstransplantationen, wahrscheinlich um 1,5% jährlich erhöhen.

Die Symptome der Erkrankung sind zu Beginn oft sehr unspezifisch. Nach Definition der ACCP/SCCM-Konsensus-Konferenz von 1992 lässt sich der Krankheitsverlauf in 3 Stadien unterteilen (ACCP/SCCM Consensus Conference Committee, 1992; Bone et al., 1992).

1. Das Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) ist durch mindestens zwei der folgenden Symptome gekennzeichnet: Fieber oder Untertemperatur, die Temperatur beträgt mehr als 38°C oder weniger als 36°C. Die Atmung beträgt weniger als 20 Atemzüge pro Minute oder es liegt Hyperventilation vor. Der Puls ist mit einem Herzschlag von mehr als 90 Schlägen pro Minute erhöht, die Leukozytenzahl ist meist stark erhöht und beträgt mehr als 12 Mio pro ml. Der Prozentsatz unreifer stabkerniger Granulozyten liegt bei über 10%.

2. Oft entwickelt sich das SIRS-Stadium zur Sepsis weiter (definiert durch SIRS-Symptome und Nachweis einer Infektion). Bei zusätzlicher Schädigung der inneren Organe spricht man von schwerer Sepsis, was sich in Symptomen wie Niereninsuffizienz mit Oligurie und erhöhtem Kreatininwert äußert und bis zum Nierenversagen reichen kann. Auch die Leber zeigt schwere Störungen wie Gerinnungsstörungen und Bilirubinämie. Die Thrombozytenzahl ist erniedrigt, es kommt zu Blutungen und Sauerstoffmangel. Der hohe Laktatspiegel im Serum bewirkt eine Übersäuerung des Blutes (Laktatazidose).

3. In 20 bis 50% der Fälle kommt es zum nächsten Stadium, dem septischen Schock, bei dem Sepsis und refraktäre Hypotension (der systolische Blutdruck liegt bei weniger als 90 mmHg), Nierenversagen und allgemeines Organversagen vorliegen. 2001 wurde auf der Internationalen Konferenz zur Sepsisdefinition der SIRS-Begriff abgeändert und die PIRO-Definition eingeführt in der Absicht, durch Berücksichtigung vieler unterschiedlicher Faktoren eine genauere Diagnostik zu erreichen: P steht für Prädisposition, I für Infektion, R für Antwort (Response) auf die Infektion (einschließlich SIRS) und O steht für

Organdysfunktion (Remick, 2007, Levy et al., 2003). Allerdings findet dieses Konzept momentan in der Praxis keine Anwendung. Der Krankheitsverlauf ist bei den einzelnen Patienten unterschiedlich, bei manchen liegt möglicherweise eine überschießende Entzündungsreaktion vor, während bei anderen eine zu geringe Immunabwehr zu beobachten ist. Bei Sepsis findet man neben einer stark erhöhten Anzahl neutrophiler Granulozyten eine starke Cytokinausschüttung. Vor allem erhöhte Mengen an IL1, IL6, IL8, IL12 und TNFalpha sind zu finden. Eventuell lässt sich das unterschiedliche Entzündungsprofil durch die Untersuchung sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Cytokine verfolgen (Osuchowski et al., 2006).

Bei den Bakterien sind als Gram-positive Erreger vor allem Staphylococcus aureus und Streptokokken, bei den Gram-negativen vor allem Enterobakterien und Pseudomonas zu nennen. Die Behandlung erfolgt vor allem mit beta-Lactam Antibiotika wie Cephalosporin und seit neuestem mit rekombinant hergestelltem aktiviertem Protein C, wobei dies allerdings aufgrund der Blutungsgefahr stark diskutiert wird. Außerdem werden Hydrocortison und Volumenersatztherapie sowie Catecholamingabe eingesetzt.

1.3 Zystische Fibrose

Zystische Fibrose (englisch cystic fibrosis, CF) ist eine häufige autosomal rezessive Erbkrankheit, einer von 25 Menschen ist Träger einer Mutation, 1 von 2500 Kindern ist betroffen (Ratjen, 2004). Das CFTR-Molekül (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) liegt auf Chromosom 7 (Riordan et al., 1989). Der CFTR-Kanal zählt zu den ABC-Transportern und kommt auf den Schleimhäuten vor, z.B. im Darm und in der Lunge. Der cAMP-abhängige Chloridkanal besteht aus 1480 Aminosäuren und ist sehr wichtig für den Transport von Chlorid durch die apikale Membran der Epithelzelle (Akabas, 2000). Damit es zur Ausprägung der Krankheit kommt, müssen beide Eltern Träger der Mutation, also heterozygot in Bezug auf das CFTR-Gen, sein. Oft wird dies erst festgestellt, wenn die Eltern bereits mehrere erkrankte Kinder haben.

Mutationen im CFTR-Gen werden in 6 Klassen eingeteilt (Ballmann et Smaczny, 1998). Bei manchen Mutationen wird durchaus ein funktionsfähiges CFTR-Molekül gebildet, allerdings in geringerer Anzahl als bei Gesunden. Deshalb variieren die unterschiedlichen Mutationen in der Schwere der Krankheitsausprägung. Die $\Delta F508$ -Mutation ist mit 71% aller Fälle in Deutschland die häufigste Mutation, die ein Fehlen von Phenylalanin und dadurch eine fehlerhafte Faltung des Proteins bewirkt. Das Protein wird unzureichend transportiert und früh intrazellulär abgebaut. Es erscheint deshalb nicht auf der Zelloberfläche. Das häufige

Vorkommen der $\Delta F508$ - Mutation ist erstaunlich. Eine Erklärung hierfür könnte ein Heterozygotenvorteil gegenüber Krankheiten sein. Heterozygote sind eventuell resistenter gegen Cholera, weil das Choleratoxin den cAMP-Spiegel erhöht und somit die Chlorid-Abgabe durch den CFTR-Kanal und die Flüssigkeitsabgabe in das Darmlumen drastisch erhöht. Bei Typhus ist bekannt, dass *Salmonella typhi* das CFTR-Molekül als Eintrittspforte in den Körper benutzt. Menschen mit reduzierter CFTR-Kanal-Anzahl könnten resistenter gegen diese Krankheiten sein (Pier et al., 1998, Gabriel et al., 1994). Die Häufigkeit der einzelnen CFTR-Mutationen variiert stark in Abhängigkeit von der geographischen Lage. In Europa ist die $\Delta F508$ -Mutation im Norden verbreiteter als im Süden.

Symptome sind bei schwerer CFTR-Mutation Pankreasinsuffizienz mit mangelhaftem Ernährungszustand, Mekoniumileus, Lebererkrankungen, Ansammlung zähen Schleims in der Lunge, Infektionen mit Erregern wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus*, chronische Lungenentzündung, Lungenversagen, Trommelschlegelfinger und Uhrglasnägel.

Bei den Patienten ist die Menge an Chlorid- und Natriumionen im Schweiß erhöht, wie Sant' Agnese et al. 1953 entdeckten. Mit einem Schweißtest, der sogenannten Pilocarpin-Ionotoporese, über den Gibson et al. 1959 berichteten, kann die erhöhte Elektrolytkonzentration im Schweiß nachgewiesen werden, ebenso durch genetische Untersuchungen zum Nachweis der Mutationen. Bei Gesunden werden Krankheitserreger meist ohne Probleme aus der Lunge entfernt, bevor es zu Erkrankungen kommt. Bei CF-Patienten ist dies aus ungeklärten Gründen nicht möglich, man findet bei ihnen sehr häufig eine bakterielle Besiedelung der Lunge, sehr oft mit *Pseudomonas aeruginosa*. Mit zunehmendem Alter nimmt die *Pseudomonas*-Besiedelung der Patienten immer mehr zu (Stern et al., 2002). Es gibt verschiedene Theorien, warum dies so ist. Die Lungen werden von Epithel ausgekleidet, auf dem eine dünne Flüssigkeitsschicht aufliegt (airway surface liquid, ASF). Eventuell beeinträchtigt die bei CF erhöhte Salzkonzentration dieser Flüssigkeit die Wirkung der Defensine gegen Krankheitserreger (Goldman et al., 1997, Smith et al., 1996) und der in der Lunge vorhandene Schleim dient als Nährboden für Bakterien. Die Entzündungsreaktion in der Lunge ist ein großes Problem. Mit zunehmendem Alter kommt es zur Zerstörung des Lungenepithels, die durch die große Zahl an eingewanderten Granulozyten und die hohe Proteasekonzentration, z.B. von freier Elastase, verursacht wird. CF-Epithel sezerniert große Mengen an proinflammatorischen Cytokinen wie IL6 und IL8, aber wenig entzündungshemmendes IL10 (Bonfield et al., 1995). Die bisherige Therapie besteht in der Verabreichung von Antibiotika (beta-Lactame, Aminoglykoside), von Mukolytika (Schleimlöser), DNase, Glucokortikoide gegen die Entzündung, Antiproteasen,

Physiotherapie (Lockern des Schleims), Ernährungsberatung zur Verbesserung des Gesamtzustandes und schließlich als letzte therapeutische Maßnahme Lungentransplantationen. All diese Verfahren reichen aber noch nicht aus, um die Krankheit ausreichend behandeln zu können. 2008 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Erich Gulbins in *Nature Medicine* einen Artikel über erhöhte Ceramid-Konzentrationen in den Lungen CFTR-defizienter Mäuse mit erhöhter Empfänglichkeit für *Pseudomonas*-Infektionen und die Reduktion sowohl der erhöhten Ceramidkonzentrationen als auch der *Pseudomonas*-Anfälligkeit durch das trizyklische Antidepressivum Amitriptylin (Teichgräber et al., 2008). Ceramide sind maßgeblich an der Ausbildung der Apoptose beteiligt und können so zum Absterben des Lungenepithelgewebes beitragen.

1.4 Apoptose

Es gibt zwei Arten von Zellsterben: bei der Nekrose schwillt die Zelle an und zerplatzt, das Zellinnere (Cytoplasma, DNA und Zellorganellen) gelangt ins Außenmedium und wird von den Phagozyten in einer Entzündungsreaktion beseitigt. Im Gegensatz hierzu schrumpft die Zelle beim programmierten Zelltod (Apoptose), das Chromatin im Zellkern kondensiert und die DNA wird aufgrund von erhöhter Endonukleaseaktivität in kleine Stücke definierter Größe zerteilt. Membranvesikel mit Zellinhalt (apoptotic bodies) schnüren sich ab, die von Makrophagen aufgenommen werden. So gelangt das Zellinnere nicht nach außen und die Entzündungsreaktion bleibt aus.

Die Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus bei neutrophilen Granulozyten, um alte Granulozyten zu eliminieren, was durch Apoptoseinduktion mit nachfolgender Phagozytose durch Makrophagen geschieht. Die Apoptose spielt eine große Rolle bei vielen Krankheitsbildern, z. B. liegt bei rheumatoider Arthritis in der Frühphase der Krankheit eine verzögerte Apoptose vor, was an der Cytokin-Zusammensetzung in der Synovial-Flüssigkeit aus vorwiegend antiapoptotischen Cytokinen (IL2, IL4, IL15, GM-CSF) liegen könnte (Raza et al., 2006). Ein Wirkmechanismus antirheumatischer Medikamente ist die Apoptose-Induktion (Herman et al., 2005, Liptay et al., 2002). Generell weisen die Granulozyten älterer Menschen eine beschleunigtere Apoptose auf als bei Jüngeren (Tortorella et al., 1998, Fülöp et al., 1997).

Bei der Apoptose unterscheidet man zwei verschiedene Wege. Der extrinsische benötigt Todesrezeptoren und führt zur Fas-vermittelten Caspase-8-Aktivierung. Der intrinsische wird z.B. durch oxidativen Stress ausgelöst und führt Mitochondrien-abhängig zur Aktivierung der Caspase 9 (Ueda et al., 2002). Beide Wege enden in der Aktivierung von Caspasen, der

sogenannten Caspase-Kaskade (siehe Abbildung 6). Diese Proteasen besitzen Cystein im aktiven Zentrum und schneiden Proteine nach Aspartat-Resten (Cysteiny-Aspartase). Beim Menschen sind 11 unterschiedliche Caspasen bekannt (Degterev et al., 2003).

Beim intrinsischen Weg wird Cytochrom c durch einen Membranporenkomplex in der äußeren Mitochondrienmembran freigesetzt, bindet an Apaf 1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1), das nun ATP-abhängig oligomerisiert und ermöglicht dadurch die Bindung von Procaspase 9 an Apaf 1. Es kommt zur Bildung des Apoptosoms. Jetzt kann die Caspase 9 aktiviert werden. Über eine Caspase-Kaskade, in deren Verlauf verschiedene andere Caspasen wie Caspase 3, 6 und 7 aktiviert werden, kommt es zur Apoptose.

Beim extrinsischen Weg leiten extrazelluläre Signale wie zum Beispiel Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) oder Apo oder Fas durch Bindung an einen Rezeptor der TNF-Rezeptor-Familie wie CD95 die Apoptose ein. Durch nachfolgende Trimerisierung erfolgt die Bildung einer membranständigen Todesdomäne, an welche das TNF-Rezeptor-assoziierte Protein (TRADD) bindet. Hieran bindet das FAS-assoziierte Protein mit Todesdomäne (FADD), an das die Procaspase 8 bindet. Diese wird autokatalytisch aktiviert und es kommt genauso wie beim intrinsischen Weg zur Auslösung der Caspase-Kaskade, in deren Verlauf die Procaspasen 3, 6 und 7 aktiviert werden, die ihrerseits Enzyme aktivieren, die vor allem DNA abbauen. Es kommt zum Abbau der Zelle.

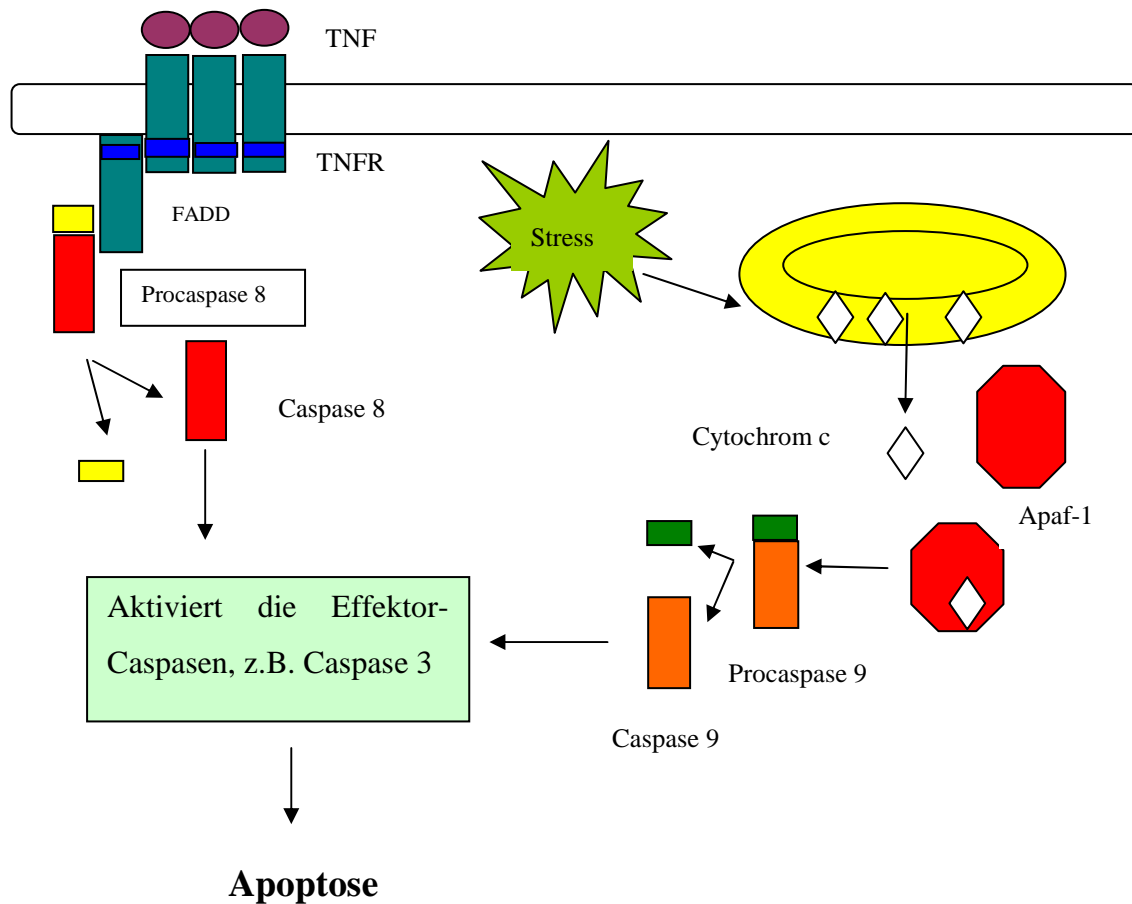


Abbildung 6: Apoptosewege

Der extrinsische Weg führt durch Aktivierung der sogenannten Todesrezeptoren (z. B. TNF α -Rezeptor) zur Aktivierung von Caspase 8. Beim intrinsischen Weg bewirkt Stress eine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, das an das Adaptorprotein Apaf-1 bindet und zur Aktivierung der Caspase 9 führt. Die Caspasen führen zur Apoptose. Modifiziert nach Löffler, Basiswissen Biochemie, 6. Auflage, 2005.

Beim extrinsischen Weg bewirkt CD95-Aktivierung eine Spaltung von Sphingomyelin in der Zellmembran, Ceramid wird freigesetzt und es kommt zur Apoptose. P53 bewirkt ebenfalls eine Spaltung von Sphingomyelin in der Zellmembran, gefolgt von Ceramidfreisetzung und einem Anstieg an Superoxidation. Die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen führt zur Apoptose.

Die Aktivierung des intrinsischen Weges führt durch Öffnung des Porenkomplexes in den

Mitochondrien zu vermehrter Bildung von freien Radikalen wie Superoxidation, zur Oxidation von Coenzym NADPH₂ und zur Bildung von GSSG aus GSH. Gleichzeitig gelangt in einer frühen Phase der Apoptose Phosphatidylserin von der cytoplasmatischen Innenseite der Membran auf die extrazelluläre Außenseite. Dieser Vorgang wird als Flip-Flop-Reaktion bezeichnet. Bei Vorhandensein von Calcium kann das ca. 35 kD große Protein Annexin V an das Phosphatidylserin binden und so die Apoptose zu einem frühen Zeitpunkt nachweisen. Wenn an Annexin ein Farbstoff wie FITC gekoppelt ist, kann die Apoptose durchflusszytometrisch bestimmt werden. Weil bei der Nekrose die Zellmembran geschädigt ist, wird auch hier Phosphatidylserin erkannt, und zwar auf der Innenseite der permeabilisierten Membran. Durch gleichzeitige Färbung mit Propidiumjodid, das an die DNA im Zellkern bindet, können doppelt positive Zellen, die sowohl Annexin als auch Propidiumjodid binden, als nekrotische Zellen erkannt werden. Allerdings kann keine eindeutige Unterscheidung zu Zellen in der späten Apoptose getroffen werden.

1.5 Pseudomonas bei CF: Rolle von Ceramid bei der Apoptose

Pseudomonas aeruginosa-Infektionen stellen ein großes Problem dar, insbesondere bei immunsupprimierten Patienten oder bei Verbrennungen. Die Letalität beträgt ungefähr 20 %, bei zusätzlichen Komplikationen sogar 30 bis 50% (Vidal et al., 1996). Außerdem ergibt sich die große Bedeutung dieses Bakteriums aus der Tatsache, dass es bei 40 % aller Todesfälle bei Beatmungs-Pneumonie eine Rolle spielt (Crouch et al., 1996). Die Hauptbedeutung liegt aber in den Komplikationen, die *Pseudomonas aeruginosa* bei zystischer Fibrose verursacht. Während des Krankheitsverlaufes kommt es bei fast allen CF-Patienten zu einer chronischen *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion, die zu Lungenentzündung mit Gewebeerstörung und frühem Tod führt. Es ist unklar, weshalb CF-Patienten so anfällig für *Pseudomonas*-Infektionen sind. Der bei zystischer Fibrose defekte CFTR-Kanal besitzt eine Chloridkanalfunktion. Eventuell ergeben sich dadurch die Veränderungen in der Fluidität der Schleimschicht, die die Entfernung von Krankheitserregern erschweren können (Sheppard und Welsh, 1999). Hierdurch könnten sich auch Veränderungen in der Salzkonzentration ergeben, die zu einer Hemmung der Defensine von neutrophilen Granulozyten führen und somit zu einer schlechteren *Pseudomonas*-Eliminierung (Goldman et al., 1997). Ebenso kann das von mehreren Autoren bei CF-Patienten beschriebene Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Cytokinen zur erhöhten Infektionsanfälligkeit bei CF-Patienten beitragen. Sezerniert werden bei Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* vor allem proinflammatorische Cytokine wie IL1, IL8 und TNF alpha (Schultz et al., 2002; Oceandy et

al., 2002, Tabary et al., 2001; Tirouvanziam et al., 2000; Inoue et al., 1994). Die IL8-Expression ist bereits bei nicht-infizierten CFTR-defizienten Mäusen in der Trachea erhöht (Inoue et al., 1994). Gleichzeitig werden von diesen Mäusen sowohl im Grundzustand als auch nach Infektion weniger antiinflammatorische Zytokine wie IL10 gebildet. Epithelzellen weisen neben vermehrter Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine auch eine erhöhte NFkappaB-Aktivität auf (Venkatakrisnan et al., 2000, Bonfield et al., 1995).

Pseudomonas aeruginosa bewirkt in Epithelzellen sowohl *in vitro* als auch in der Lunge eine Aktivierung des CD95Rezeptor/CD95-Ligand-Systems mit nachfolgender Apoptose (Jendrossek et al., 2003, Jendrossek et al., 2001, Grassmé et al., 2000). Pseudomonaden aktivieren in Säugerzellen die saure Sphingomyelinase und sorgen so für die Ceramidfreisetzung und die Bildung Ceramid-reicher Membranplattformen (Grassmé et al., 2003; Esen et al., 2001, Grassmé et al., 1997), die sich dann aufgrund der biochemischen Ceramid-Eigenschaften zu großen Membranplattformen zusammenschließen (Hauck et al., 2000). In diesen Plattformen werden verschiedene Rezeptormoleküle wie z.B. CD95 angehäuft, was auch als Clustern bezeichnet wird. Die Apoptose der befallenen Zellen ist für die Beherrschung der Infektion von entscheidender Bedeutung. Bei CFTR-defizienten Epithelzellen konnte eine gestörte Apoptoseinduktion durch *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion nachgewiesen werden (Kowalski und Pier, 2004). Die Stimulation des CD95-Rezeptors bewirkt ebenfalls eine Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (Grassmé et al., 2001; Cremesti et al., 2001). Auch *Pseudomonas aeruginosa* infiziert über die Rezeptorcluster die Epithelzellen und löst so die Apoptose der Zellen aus. Die Bedeutung des CFTR-Kanals für den Ceramidstoffwechsel liegt eventuell auch in dessen Eigenschaft als ABC-Transporter, der u.a. eine Rolle beim Lipidtransport spielt (Boujaoude et al., 2001, Sheppard und Welsh, 1999; Bodzioch et al., 1999). Durch das Fehlen von CFTR kommt es deshalb eventuell zu einer Änderung im Sphingolipidstoffwechsel in der Zellmembran. Möglicherweise ist CFTR ein Transporter für Sphingosin-1-phosphat. Durch den Transport durch CFTR von der Außenseite nach innen könnte Sphingosin-1-Phosphat durch eine Lyase abgebaut werden, siehe Abbildung 7. Bei CFTR-defekten Zellen würde es also zu einer Sphingosin-1-phosphat-Anhäufung kommen, ebenso der Vorläuferprodukte wie Ceramid (Boujaoude et al., 2001).

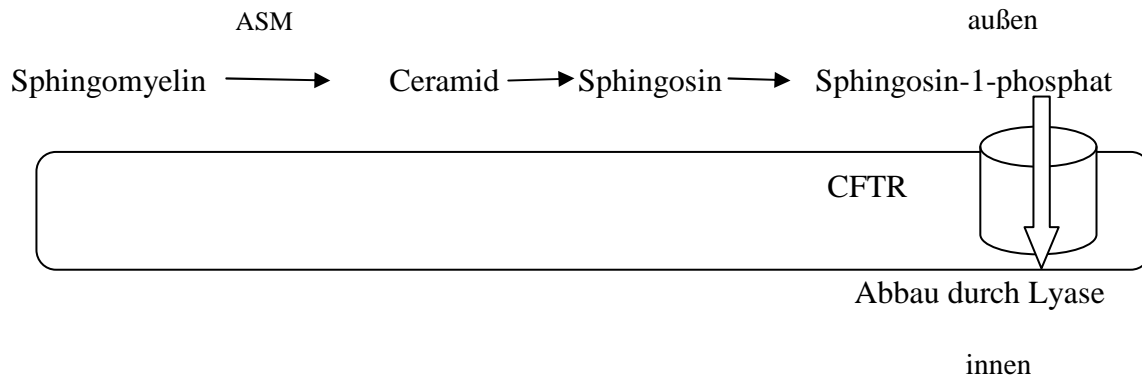


Abbildung 7: Sphingolipidstoffwechsel

Sphingomyelin wird durch die saure Sphingomyelinase (ASM) zu Ceramid abgebaut, das über die Sphingosinzwischenstufe zu Sphingosin-1-phosphat umgewandelt wird. Durch den CFTR-Kanal gelangt dieses auf die Innenseite der Membran, wo es durch eine Lyase abgebaut wird.

Abbildung nach J. Riethmüller, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen

CFTR-defiziente Mäuse weisen erhöhte Ceramidkonzentrationen in der Lunge und in der Trachea auf. Die Reduktion der Ceramidkonzentration (durch trizyklische Antidepressiva wie zum Beispiel Amitriptylin) verringert bei diesen Mäusen die Pseudomonasanfälligkeit. Bei nichtinfizierten CFTR-defizienten Mäusen wird ein veränderter alkalischer pH-Wert beobachtet. Dieser bewirkt ein Ungleichgewicht zwischen Ceramidbildung und -verbrauch, so dass es zur Ceramidanreicherung mit nachfolgender verstärkter Empfänglichkeit für *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen kommt. Trizyklische Antidepressiva wie Amitriptylin hemmen die saure Sphingomyelinase, bewirken eine Normalisierung des erhöhten Ceramidspiegels und verringern die Pseudomonasanfälligkeit bei CFTR-defizienten Mäusen (Teichgräber et al., 2008). Die genaue Wirkweise dieser Blockierung der sauren Sphingomyelinase in vivo ist noch ungeklärt, man weiß jedoch, dass Amitriptylin in vitro einen proteolytischen Abbau der sauren Sphingomyelinase mit Verminderung der Expression verursacht (Hurwitz et al., 1994).

Die Bedeutung der Ceramide für die Apoptose wurde auch von anderen Arbeitsgruppen postuliert: Seumois et al. beschreiben in einer 2007 erschienenen Publikation den Anstieg intrazellulärer Ceramide mit 16 und 24 Kohlenhydratatomen (C16 und C24-Ceramide) und der Caspasen 3, 8 und 9 mit nachfolgender Apoptose bei neutrophilen Granulozyten in Kultur.

Die Zugabe synthetischer C(16) und/oder C(24)-Ceramide zu Kulturen aus neutrophilen Granulozyten bewirken eine rasche Apoptose, die durch Zugabe von GM-CSF verhindert werden kann, was zu der Vermutung führt, dass dessen antiapoptotische Wirkung auf die Hemmung der Ceramidanhäufung zurückzuführen ist. Castillo et al. beschreiben 2007 den stimulierenden Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Apoptoseinduktion in Atemwegsepithelzellen durch Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase 2 mit nachfolgender Ceramidgeneration. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch Son et al. in seinem 2007 erschienenen Artikel. Wasserstoffperoxid erhöht den intrazellulären Ceramidspiegel und führt zur Apoptoseinduktion in HL-60-Zellen, allerdings sah diese Gruppe keine Änderung der Sphingomyelinaseaktivität, was auf einen anderen Syntheseweg für Ceramide in HL-60-Zellen schließen lässt. Auch Scheel-Toellner betont die Bedeutung der ROS-Bildung für die Ceramidanhäufung mit nachfolgender Apoptoseinduktion (Schell-Toellner et al., 2004 a).

In Abbildung 8 ist die Bedeutung der Aktivierung der sauren Sphingomyelinase durch ROS-Bildung für die Apoptose zu sehen.

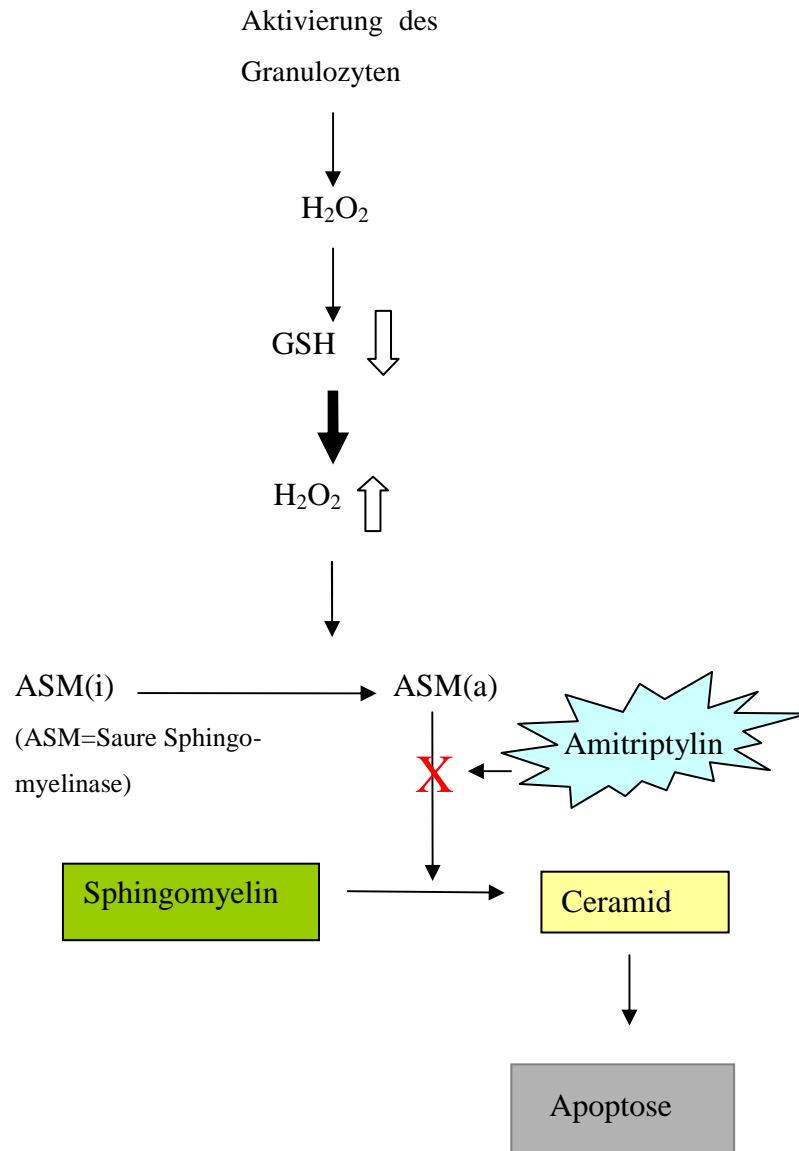


Abbildung 8: Möglicher Wirkmechanismus von Amitriptylin bei der Apoptose der Granulozyten

Nach Glutathionabfall und Anstieg reaktiver Sauerstoffverbindungen kommt es zur Aktivierung der sauren Sphingomyelinase, die Sphingomyelin in Ceramid umwandelt. Ceramid führt zur Apoptose. ASM, saure Sphingomyelinase, i= inaktiv, a= aktiv, GSH= Glutathion

Die ROS-Bildung führt zum Glutathionabfall und durch Cystein-Oxidation zu einer Aktivierung der sauren Sphingomyelinase. Diese produziert aus Sphingomyelin Ceramid, das die Apoptose auslöst. Das trizyklische Antidepressivum Amitriptylin hemmt die Ceramidbildung und kann so die Apoptose verhindern.

Das saure Sphingomyelinase-Ceramid-System spielt eine wichtige Rolle bei der Infektion von Säugetier-Zellen mit verschiedenen Krankheitserregern wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Salmonella typhimurium*. Ceramid ist von großer Bedeutung für die Induktion der Apoptose bei infizierten Endothel- und Epithelzellen, besonders nach Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* (Grassmé et al., 2008). In diesem Zusammenhang ist die Entdeckung verringerter Ceramidspiegel im Plasma von CF-Patienten im Vergleich zu Gesunden interessant (Guilbault et al., 2008) Eine mögliche Erklärung für die starke Verbreitung des mutierten CF-Allels ist, wie bereits erwähnt, der Heterozygotenvorteil durch verminderte Empfänglichkeit für Krankheiten wie Cholera und Typhus, die als Eintrittspforte in den Körper bzw. für den Ablauf des Krankheitsgeschehens den CFTR-Kanal benötigen. Allerdings könnten die verminderten Ceramidspiegel zu einer schlechteren Beseitigung der Erreger beitragen. Noch ist unklar, ob die Ceramidspiegel von Heterozygoten ebenfalls erniedrigt sind oder sich annähernd auf Normalniveau befinden. Ceramid kommt bei verschiedenen biologischen Prozessen eine Rolle zu, z.B. bei der Vermittlung von Signalwegen durch Bildung langer Domänen in der Zellmembran, die für die Reorganisation zellulärer Rezeptoren und Signalmoleküle wichtig sind, besonders bei bakteriellen Infektionen der Lunge und bei Sepsis (Becker et al., 2008).

2 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, in klinischen Studien die Rolle der Granulozyten bei zwei wichtigen Krankheitsbildern zu untersuchen. Bei Sepsis sind stark erhöhte Granulozytenzahlen im Blut zu finden und lassen daher die Vermutung zu, dass Granulozyten eine sehr wichtige Rolle für den Krankheitsverlauf spielen. Es sollten verschiedene Aspekte analysiert werden, die die Reaktivität der Granulozyten betreffen. So ist es möglich, dass Sepsisgranulozyten erst eine hyperreaktive Phase durchlaufen, in der sie die Gewebe und Organe durch anhaltende und übermäßige Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen schädigen. Hieran könnte sich eine hyporeaktive Phase anschließen, in der die Granulozyten funktionsunfähig sind und so eventuell zum Tod der Patienten beitragen. Außerdem war von Interesse, ob die in der Bevölkerung recht häufig vorkommende Myeloperoxidasedefizienz eine Rolle für den Verlauf der Sepsis spielt, obwohl sie generell klinisch unauffällig ist. In der longitudinalen GZF-Sepsis-Pilotstudie wurden Granulozyten aus dem Vollblut von 5 Sepsispatienten über mehrere Tage untersucht und mit den Granulozyten von 5 Kontrollpersonen verglichen.

Bei der Zystischen Fibrose (CF) wandern sehr viele Granulozyten in die Atemwege der Betroffenen ein und sind deshalb in bedeutenden Mengen im Sputum vorhanden. Es ist unklar, ob die Granulozyten zum schweren Verlauf der CF durch Gewebeerstörung der Lunge beitragen und warum sie nicht in der Lage sind, die Infektionen mit Erregern, vor allem *Pseudomonas aeruginosa*, zu eliminieren. Eventuell spielt eine veränderte Apoptose eine Rolle, wie sie für CF-Epithelzellen nachgewiesen wurde. In der doppelblinden, plazebokontrollierten randomisierten crossover CF-Pilotstudie APAII sollte der Einfluss eines trizyklischen Antidepressivums (Amitriptylin) auf Granulozyten untersucht werden, weil diese Substanzklasse als Apoptosehemmer bekannt ist. Granulozyten in Blut und Sputum von 18 CF-Patienten wurden auf eine Veränderung der Apoptose unter Amitriptylineinfluss untersucht. Ebenso war von Interesse, wie sich Sputumüberstand von mit Amitriptylin behandelten CF-Patienten auf gesunde Granulozyten auswirkt. Desweiteren wurde die Fähigkeit von CF-Granulozyten zur Sauerstoffradikalbildung unter Einfluss von Amitriptylin untersucht. Von einer kooperierenden Arbeitsgruppe wurde in einer Lungenfunktionsuntersuchung untersucht, ob Amitriptylin die Lungenfunktion der CF-Patienten beeinflusst und welche Cytokinzusammensetzung im Sputum und im Blut vorhanden sind.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Firma
Amitriptylin	Sigma, Taufkirchen
Cytochalasin B	Sigma, Taufkirchen
D+-Glucose	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethanol 100 %	Merck, Darmstadt
Gelatine	Merck, Darmstadt
HCl 1M	Merck, Darmstadt
Heparin Canusal, 100Units/ml, 2 ml Ampullen	CP-Pharmaceutics Ltd Werxhan UK
Histopaque 1077	Sigma, Taufkirchen
Histopaque 1119	Sigma, Taufkirchen
Low-melt Agarose	Sigma, Taufkirchen
Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dion)	Sigma, Taufkirchen
NaOH 1M	Merck, Darmstadt
N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (NfMLP)	Sigma, Taufkirchen
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma, Taufkirchen
Staurosporin	Sigma, Taufkirchen

Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Zymosan A	Sigma, Taufkirchen

3.1.2 Stammlösungen und Puffer

Stammlösungen und Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS mit Ca^{++} und Mg^{++} , ohne Natriumbicarbonat	Gibco, Berlin
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS ohne Ca^{2++} und Mg^{2++} , ohne Natriumbicarbonat =PBS spezial	Gibco, Berlin
PBS mit Ca^{++} und Mg^{++} und 5 mM D+-Glucose =PBS/Glucose	Selbst hergestellt aus PBS (Gibco, Berlin) und D+-Glucose von Sigma, Taufkirchen
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSIkubationspuffer aus Annexin V Fluos Staining KIT	Roche, Mannheim
Formaldehyd-Lösung 4 %	Universitätsapotheke, Tübingen
Giemsa-Lösung	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd-Lösung 25 %	Merck, Darmstadt
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) mit Ca^{++} und Mg^{++} , ohne Phenolrot, 1x und 10x	Biochrom, Berlin
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (Hepes) (1M)	Biochrom, Berlin
Lysepuffer Ammoniumchlorid-Puffer (0,829 w/v)	Universitätsapotheke, Tübingen
May-Grünwald-Lösung eosinsaures Methylenblau in Methanol: Glycol (2:1)	Merck, Darmstadt
Rinse (Spüllösung für FACS)	Becton Dickinson, Heidelberg
Safe (Hypochlorit zur FACSReinigung)	Becton Dickinson, Heidelberg

3.1.3 Antikörper

Antikörper	Abkürzung	Ziel	Firma
Annexin V Fluos Staining Kit: Annexin V FITC Propidiumjodid	Annexin PJ	Phosphatidylserin DNA	Roche, Mannheim
CD 11b APC	CD11b	Mac1, beta2 Integrin, Komplementrezeptor 3	Becton Dickinson, Heidelberg
CD 18 FITC	CD18	Mac1, beta 2 Integrin, Komplementrezeptor 3	Becton Dickinson, Heidelberg
CD62L (Selektin) FITC	CD62L	Leukozyten-Selektin	Becton Dickinson, Heidelberg
Phagozytose Assay Kit	FITC- markierte E. coli	Phagozyten	Molecular Probes/Invit- rogen, Karlsruhe
Toll-Like-Rezeptor 2 Antikörper PE	TLR 2	TLR2	eBioscience San Diego USA
Toll-Like-Rezeptor 4 Antikörper PE	TLR 4	TLR4	eBioscience San Diego USA
$\gamma 1/\gamma 2a$ -IgG-Maus-Isotyp FITC/PE	Isotyp	Maus	Becton Dickinson, Heidelberg

3.1.4 Geräte

Geräte	Hersteller /Vertrieb
ADVIA 120	Bayer/Siemens, Fernwald
Brutschrank, Heracell	Heraeus, London, England
Coolpix 4500 (Kamera für Mikroskop)	Nicon, Münster
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage MC1	Sartorius, Göttingen
Heizplatte mit Magnetrührfunktion	Heidolph, Kelheim
Mikroskop 473047	Zeiss, Oberkochen
pH-Meter, pH 535 MultiCal [®]	WTW, Weilheim
Sterile Werkbank, HeraSafe	Heraeus, Osterode
Tropix TR 717 Microplate Luminometer	PE Applied, Forster City, USA
Vortexer, Reax top	Heidolph, Kelheim
Waage E 400 D OHAUS	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Memmet, Schwabach
Wasserdestillationssystem zur Herstellung von Aqua bidest., Milli-Q biocel	Millipore, Schwalbach
Zentrifuge Mikro 22R (Eppendorf-Gefäße)	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge, Rotixa 50 RS	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zytozentrifuge	Thermo Shandon, Frankfurt

3.1.5 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Vertrieb
BD-Falcon 6 ml Polystyrene Round Bottom Tube (FACS-Röhrchen)	BD-Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Einwegpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml)	Costar, Fernwald
Filter für Zytocentrifuge, Probenvolumen 50	Thermo Shandon, Frankfurt
Mikrotiterplatten (96 Kammern)	Nunc, Wiesbaden
Objektträger ca. 77 x 26 mm	R. Langenbrinck, Teningen
Pipetten (10, 100, 200, 1000 µl), Pipetman	Gilson, Villiers-le Bel, Frankreich; Eppendorf Hamburg
Pipettenspitzen (10 µl)	Biozym, Hess
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Softasept N (Desinfektionsmittel)	Braun, Melsungen
Spritzen (1 ml, 5 ml, 20 ml, 50 ml)	Braun, Melsungen
Sterilfilter 40 µm	Sarstedt, Nürnberg
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Zellsieb 40 µm	BD Biosciences, Heidelberg

3.1.6 Programme

Software /Version	Verwendung	Hersteller /Vertrieb
CellQuest	FACS-Messung und Auswertung	Becton Dickinson, Heidelberg
Microsoft®-Excel 2000 Microsoft®-Word 2000	Tabellenkalkulation Textverarbeitung	Microsoft-Corporation, Redmont, USA
Winglow-Software	Chemilumineszenz	Berthold Tech, Bad Wildbad

3.2 Methoden

Im Vollblut sind unterschiedliche Leukozytenzellpopulationen vorhanden, die sich bei vielen Methoden nicht voneinander unterscheiden lassen und sich eventuell sogar gegenseitig beeinflussen. Um klare Ergebnisse hinsichtlich vieler unterschiedlicher funktioneller Parameter einzelner Zellpopulationen zu erhalten, müssen sie gesondert betrachtet werden.

Bei der longitudinalen **Sepsis-Studie GZF** unter der Leitung von PD Dr. Joachim Riethmüller wurden Granulozyten aus dem Vollblut von Sepsispatienten untersucht. Die

Studiendurchführung zur Entnahme von Laborproben und zur Verwendung der Daten wurde von der Ethikkommission genehmigt. Nach der Isolierung wurden die Granulozyten mit verschiedenen Methoden auf ihre Fähigkeit zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), zur Chemotaxis und Degranulation untersucht. Auskünfte über die morphologische Beschaffenheit der Oberflächenrezeptoren der Granulozyten gibt die FACS-Analyse, die es als einzige der hier verwendeten funktionellen Methoden erlaubt, die Populationen auseinander zu halten und deshalb in Vollblut mit anschließender Erythrozytenlyse durchgeführt werden konnte, ebenso der durchflusszytometrische Phagozytose-Test.

Studiendesign GZF-Studie: 5 Patienten über 18 Jahre (4 Männer und 1 Frau zwischen 58 und 82 Jahre, Durchschnittsalter 67 Jahre \pm 9,42) mit Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) (a) oder schwerer Sepsis (b oder c) wurden in die Studie aufgenommen. Als SIRS-Patient (a) wurde eingestuft, wer mindestens zwei der folgenden Symptome aufwies: Fieber > 38 °C oder Hypothermie < 36 °C, Herzschlag > 90 /min, Atmungsrate > 20 /min, Hyperventilation mit $\text{PaCO}_2 < 33$ mmHg, Leukozytose $> 12\,000$ Zellen/ mm^3 , Leukopenie < 4000 Zellen/ mm^3 , und mehr als 10 % unreife Granulozyten. Als Sepsispatient wurde eingestuft, bei wem (b) SIRS vorlag und eine gesicherte mikrobiologische oder klinische Infektion oder (c) eine schwere Sepsis mit Organdysfunktion: entweder kardiovaskuläre Dysfunktion (systolischer arterieller Druck < 90 mmHg oder mittlerer arterieller Druck 50 bis 70 mmHG trotz adäquatem Volumenersatz oder Vasopressoren (Dopamin $> 5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ oder Norepinephrin oder Vasopressin oder Epinephrin), renale Dysfunktion: Diurese $< 0,5$ ml/kg/h oder Kreatininanstieg $> 2\text{mg}/\text{dl}$, Thrombozytopenie $< 100\,000$ mm^3 , metabolische Dysfunktion: Basenüberschuss $> -5,0$ mmol/l oder Plasmalaktat > 3 mmol/l.

Ausschlusskriterien waren das Vorliegen von arterieller Hypotension (MAP < 50 mmHG), einer schweren Anämie (Hb $< 8\text{g}/\text{dl}$), HIV-, HBV-, HCV-Infektion oder Tuberkulose, Operationen innerhalb der letzten 7 Tage, Drogenkonsum und Schwangerschaft.

Bei der prospektiven doppelblinden plazebokontrollierten randomisierten crossover **CF-Studie APAII** (Ethikantragsnummer 129/2006AMG1) unter der Leitung von PD Dr. Joachim Riethmüller wurden die in den Sputen von CF-Patienten enthaltenen Zellen auf Objektträger geschleudert (Cytospin) und morphologisch untersucht. Die Apoptoserate der Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und ein Trypanblautest durchgeführt. Isolierte Blut-Granulozyten von CF-Patienten wurden auf den prozentualen Anteil apoptotischer Zellen untersucht und die Fähigkeit zur ROS-Bildung (mit der Chemilumineszenz-Methode) überprüft.

Die Überstände der abzentrifugierten Sputen wurden eingefroren und nach dem Auftauen mit

frisch isolierten Granulozyten gesunder Spender inkubiert. Die Apoptoserate und die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen wurden bestimmt. Zusätzlich wurde der Einfluss von Amitriptylin auf die Apoptose, die ROS-Bildung und die Degranulation gesunder Granulozyten untersucht.

Studiendesign APAII-Studie: 18 Patienten (9 Männer und 9 Frauen im Alter zwischen 18 und 47 Jahren, Durchschnittsalter $27 \pm 7,6$ Jahre) mit gesicherter Zystischer Fibrose wurden in die Studie aufgenommen. Einschlusskriterien waren das Vorliegen einer Zystischen Fibrose, Einwilligungsfähigkeit, Alter über 18 Jahre, keine akute pulmonale Begleiterkrankung (Virusinfekt) und Möglichkeit der Lungenfunktionsprüfung. Ausschlusskriterien waren Vorliegen eines Glaukoms, eines zerebralen Anfallsleidens, einer Herzinsuffizienz, einer depressiven/manischen Erkrankung sowie Vorliegen einer aktuellen pneumologischen Begleiterkrankung (z. B. Bronchus-/Trachealstenose, Tuberkulose, Thoraxtrauma, ARDS), Benötigung intravenöser Antibiotika-Therapie sowie Anzeichen für eine endotracheale oder bronchiale Blutung. Auch nicht entlasteter Pneumothorax und die Teilnahme an einer weiteren Studie waren Ausschlusskriterien.

3.2.1 Bestimmung des Differentialblutbildes am Advia 120

Prinzip:

Die einzelnen Zellpopulationen im Vollblut können aufgrund ihrer unterschiedlichen morphologischen und biochemischen Merkmale mit Hilfe eines Durchflusszytometers bestimmt werden. Hierfür gibt es unterschiedliche Systeme, die auf verschiedenen Parametermessungen basieren. Für unser Labor stand ein Advia 120-Gerät von Bayer, jetzt Siemens (Fernwald), zur Verfügung, das u. a. auf der Bestimmung des Myeloperoxidasegehalts für die Leukozytendifferenzierung beruht.

Durchführung:

Nach der Blutabnahme werden die im EDTA- Vollblut enthaltenen Zellen bestimmt und quantifiziert. Die Zellen werden anhand ihrer Peroxidaseaktivität und ihres Streulichtverhaltens analysiert. In der Peroxidase-Reaktionskammer (Abbildung 9) werden nach Erythrozytenlyse 4-Chloro-Naphtol und H_2O_2 zugegeben, die Myeloperoxidase der neutrophilen Granulozyten und Monozyten und die Peroxidase der eosinophilen Granulozyten reagieren hiermit und werden angefärbt. Sie erscheinen auf dem Leukogramm weit rechts, während die basophilen Granulozyten und die Lymphozyten keine Peroxidase besitzen und deshalb ganz links zu finden sind. Die neutrophilen Granulozyten besitzen viele Granula,

deshalb streuen sie den Lichtstrahl stark und werden weit oben auf der Streulichtskala der y-Achse abgebildet (siehe Abbildung 9a). Die eosinophilen Granulozyten sind im Leukogramm nicht ganz richtig „kleiner“ als die Neutrophilen abgebildet, weil die vielen angefärbten Vesikel ein verändertes Streulichtmuster ergeben. Im Gegensatz hierzu besitzen Lymphozyten keine Granula und sind deshalb weit unten zu finden. Die basophilen Granulozyten und die Lymphozyten befinden sich im gleichen Feld und müssen daher durch eine weitere Analyse-Methode mit Phtalsäure und HCl voneinander unterschieden werden, bei der die Plasmamembran bei allen Leukozyten außer den basophilen Granulozyten zerstört wird. Durch unterschiedliches Streuwinkelverhalten (Niedrigwinkel $2-3^\circ$ und Hochwinkel $5-15^\circ$) können die unversehrt gebliebenen basophilen Granulozyten von den restlichen Leukozyten im Nukleogramm unterschieden werden (Abbildung 9b)

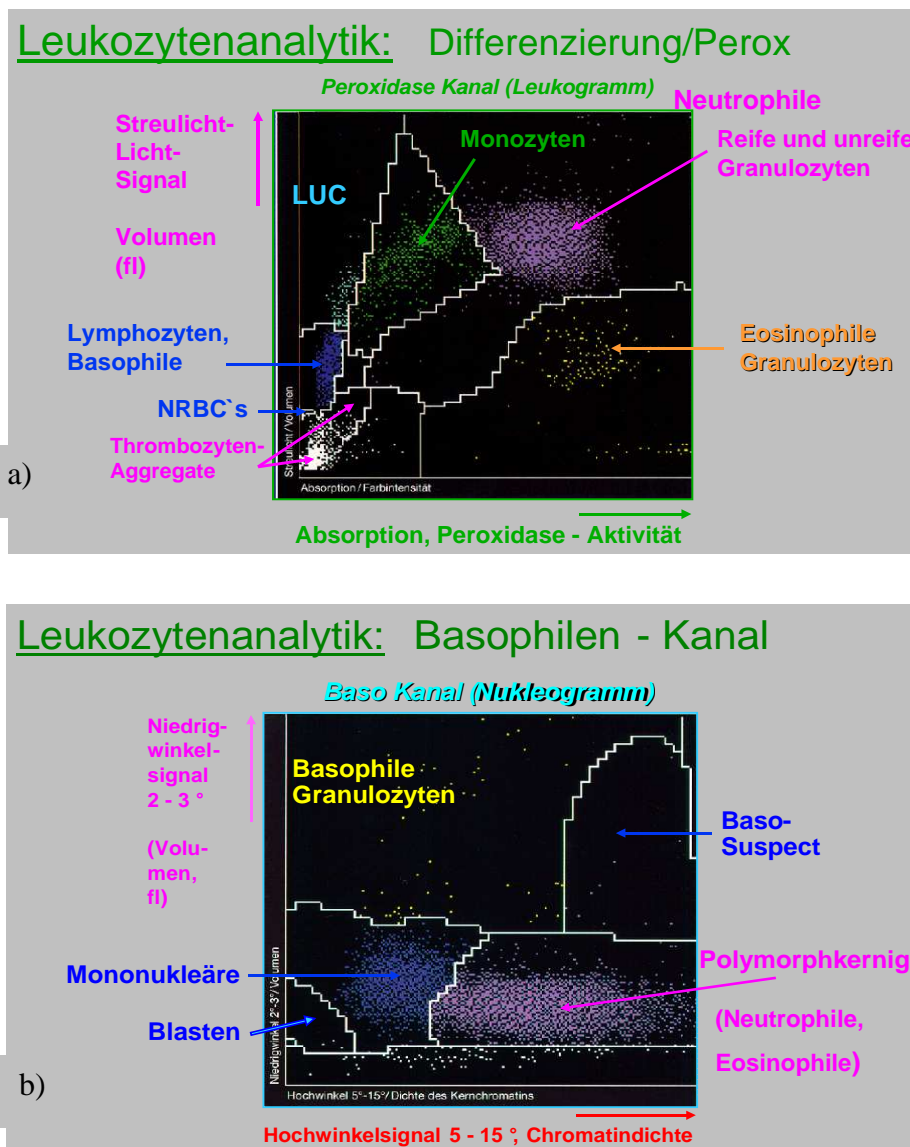


Abbildung 9: Graphische Darstellung einer ADVIA-Messung, Leukogramm von Bayer-Vital (Siemens), Fernwald
 a) Perox-Kanal, b) Baso-Kanal

Die „Perox“-Graphik (a) zeigt auf der x-Achse nach rechts ansteigend die Peroxidaseaktivität. Auf der y-Achse ist das Streulichtverhalten der Zellen zu sehen. Unten links befinden sich Trümmer, Thrombozyten und die Non Red Blood Cells (NRBCs). Darüber sind die Lymphozyten und basophilen Granulozyten zu finden. Im Feld oben links werden die großen unidentifizierten Zellen (large unstained cells, LUCs) abgebildet, rechts davon die Monozyten. Rechts oben sind die reifen neutrophilen Granulozyten zu sehen und im Feld darunter die eosinophilen Granulozyten.

Im basophilen Kanal (b) können basophile Granulozyten von Lymphozyten nach

Chemikalienbehandlung durch unterschiedliches Streuwinkelverhalten unterschieden werden. Die basophilen Granulozyten sind links oben zu erkennen, während die Lymphozyten und Monozyten im Feld darunter liegen und die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten im rechten unteren Feld.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe unterschiedlicher Diagramme, zum Beispiel wird im Dot Plot der Myeloperoxidasegehalt gegen das Streulichtverhalten aufgetragen.

3.2.2 Isolierung von Granulozyten aus Vollblut**Prinzip:**

Die unterschiedlichen Zellen des Blutes besitzen eine unterschiedliche Dichte und sammeln sich deshalb bei einer Zentrifugation mit Lösungen unterschiedlicher Dichte in den verschiedenen Schichten an und können so aufgetrennt werden.

Durchführung:

Die Isolierung von Granulozyten aus Vollblut erfolgte mit Hilfe von Histopaque-Dichtegradienten (Abb. 10). 18 ml heparinisiertes Vollblut von Sepsispatienten wurden für die Dichte-Gradienten-Zentrifugation mit 13,5 ml Histopaque 1119 und 13,5 ml Histopaque 1077 bei 633x g und 18 °C für 25 min in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) zentrifugiert. Die einzelnen Zellen des Blutes weisen eine unterschiedliche Dichte auf und sammeln sich deshalb in den beiden unterschiedlich schweren Gradientenschichten an (Abbildung 10). Periphere mononukleäre Blutzellen (Monozyten und Lymphozyten, PBMC) und Granulozyten wurden durch Absaugen geerntet und die Granulozyten zweimal mit PBS spezial (ohne $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$) gewaschen und in 3 ml PBS mit $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ (PBS) und 5 mM D-Glucose aufgenommen (PBS/Glucose). Bei CF-Blut wurden durchschnittlich 10 ml Vollblut verwendet.

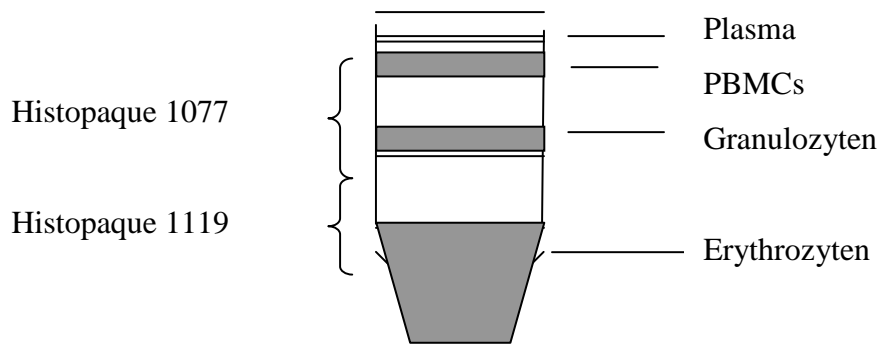


Abbildung 10: Nach Dichtezentrifugation mit Histopaque 1119 und Histopaque 1077 sammeln sich die Blutzellen entsprechend ihrer jeweiligen Schwere auf den beiden Histopaque-Zonen mit der unterschiedlichen Dichte an. Oben ist das Plasma zu sehen, darunter die Ansammlung peripherer mononuklearer Zellen (PBMCs). Darunter sammeln sich idealerweise die Granulozyten und ganz unten die Erythrozyten an.

Auswertung: Die Messung der Zellzahl erfolgte am Advia 120. Die Reinheit der Granulozyten betrug stets mindestens 98 %.

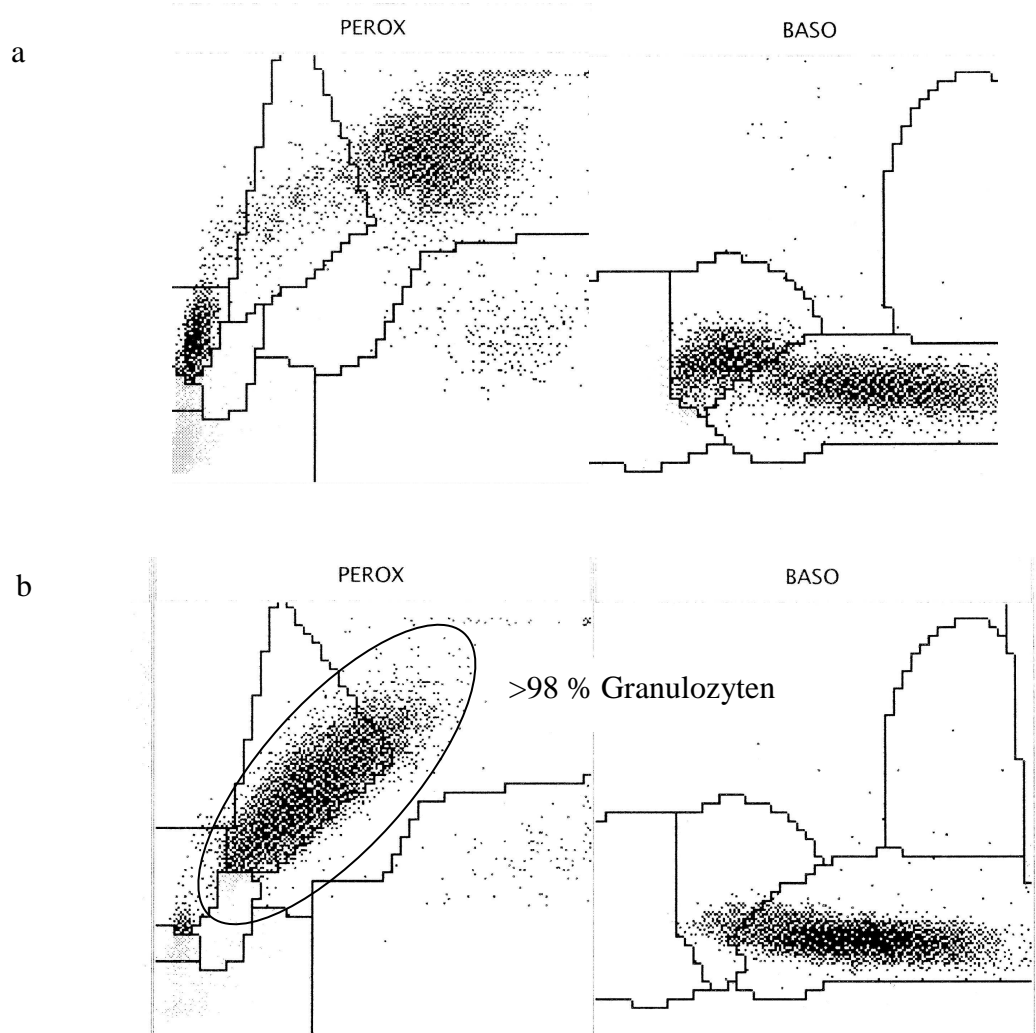


Abbildung 11: Beispiel: Vergleich der Granulozyten vor und nach Isolation
Vollblut einer Kontrollperson (a), im Vergleich hierzu sind die isolierten Granulozyten der gleichen Kontrollperson nach Dichtezentrifugation im Histopaquegradienten zu sehen (b). Dargestellt sind jeweils die Peroxidaseaktivität im Peroxidase-Histogramm (Perox) und der Basophilen-Kanal (Baso).

Beim Vergleich der Granulozytenpopulation im Vollblut und von isolierten Granulozyten im Advia 120 in Abbildung 11 fällt auf, dass die isolierten Granulozyten durch Peroxidaseverlust eine Linksverschiebung in das Monozytenfeld aufweisen. Im Basophilenfeld hingegen befindet sich der allergrößte Teil der Zellen (= isolierte Kerne) angereichert im Feld der polymorphkernigen Strukturen (Neutrophile und Eosinophile).

Durch die Dichtegradientenzentrifugation während der Isolation scheinen die Granulozyten bereits eine Aktivierung zu erfahren.

Bei der Isolierung werden neben den neutrophilen Granulozyten auch die eosinophilen Granulozyten gewonnen. Dies hat allerdings keine Auswirkung auf die Ergebnisse der Versuche, weil die neutrophilen Granulozyten weit über 90 % der Gesamtgranulozyten ausmachen.

3.2.3 Degranulation

Prinzip:

Granulozyten besitzen Granula mit Enzymen wie z.B. Myeloperoxidase. Bei Vorhandensein eines chemotaktischen Reizes (z.B. NfMLP, das von Bakterien freigesetzt wird) wird ein Teil des Inhaltes der Granula ins Außenmedium abgegeben. Die vorherige Inkubation mit Cytochalasin B erleichtert diese Freisetzung durch Veränderungen im Zytoskelett (Zerstörung durch Aktinpolymerisation). Die Granulozyten von Sepsispatienten wurden auf ihre Befähigung zur Degranulation im Vergleich zu gesunden Personen untersucht, ebenso wie der Einfluss von Sputumüberständen von CF-Patienten und von reinem Amitriptylin auf Granulozyten von gesunden Spendern.

Durchführung:

6 Millionen Granulozyten in 2 ml PBS mit $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ und 5 mM Glucose wurden für 10 Minuten bei 37 °C erst mit Cytochalasin B (2,5 mg/ml, in DMSO gelöst; 5 µl für 1000 µl Probe) und anschließend mit NfMLP 10^{-4} M in DMSO (10 µl für 1000 µl Probe, f.c. = 10^{-6} M) inkubiert. Granulozyten ohne Inkubation mit NfMLP dienten als Kontrolle.

Auswertung:

Die Degranulation wurde aufgrund der Myeloperoxidasefreisetzung im Advia 120 als Verschiebung der Granulozytenwolke nach links beobachtet, was sich in einem sogenannten Perox X-Diagramm darstellen ließ, bei dem auf der x-Achse der Gehalt an Myeloperoxidase angegeben ist.

In Abbildung 12 ist ein Beispiel einer Degranulationsuntersuchung während der Sepsisstudie zu sehen.

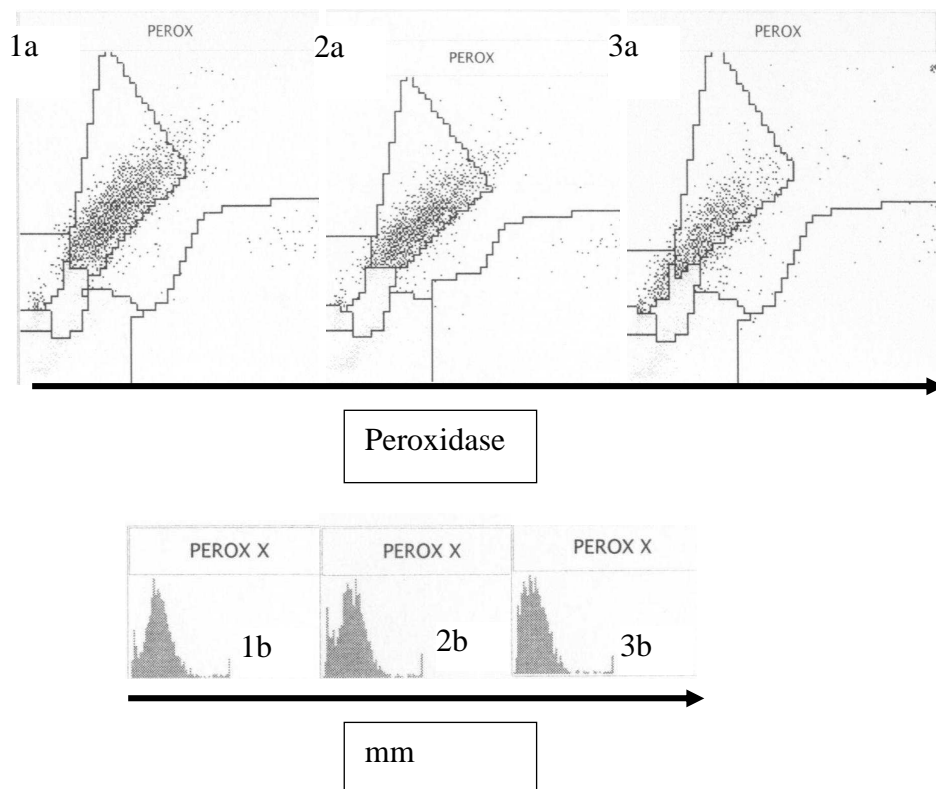


Abbildung 12: Beispiel: Degranulation bei der Sepsisstudie

3 Millionen isolierte Granulozyten pro ml PBS/Glucose einer Kontrollperson wurden im Advia 120 gemessen. Die MPO-reichen Granulozyten befinden sich auf der Peroxidase-Achse (x-Achse) im Perox-Kanal weit rechts (Adviadiagramm 1a), ebenso in der zugehörigen Peroxidase-messung (Perox X, 1b). Die Zugabe von Cytochalasin B bewirkt keine Änderung der Lage (2a, 2b). NfMLP [10^{-6} M]-Zugabe bewirkt eine Verschiebung der Granulozytenwolke nach links (Adviadiagramm 3a). Diese Linksverschiebung ist auch im Perox X-Histogramm zu sehen (3b).

1a): Advia Perox-Kanal ohne Chemikalien-Zugabe, 1b): zugehöriges Perox X-Histogramm.

2a): Advia Perox-Kanal nach Zugabe von Cytochalasin B, 2 b) zugehöriges Perox X-Histogramm.

3a): Advia Perox-Kanal nach Zugabe von NfMLP, 3b): zugehöriges Perox X-Histogramm.

3 Millionen isolierte Granulozyten pro ml PBS/Glucose (Reinheit > 98 %) einer Kontrollperson besitzen im Perox-Kanal des Advia 120 eine große Menge an Myeloperoxidase und sind daher bei Darstellung von Myeloperoxidase auf der x-Achse weit rechts zu sehen. Allerdings befindet sich ein Großteil der Granulozyten im Monozytenfeld, weil durch den mechanischen Stress während der Isolierung (Histopaque-Gradient, lange Zentrifugation) die Granulozyten teilweise degranulieren. Nach Zugabe von NfMLP werden die Granula nach vorheriger Aufweichung des Cytoskeletts durch Cytochalasin B teilweise entleert, der Myeloperoxidasegehalt der Granulozyten sinkt, und die Granulozytenwolke rutscht auf der x-Achse nach links in das Monozytenfeld. In den zugehörigen Perox X-Histogrammen kann diese Linksverschiebung graphisch genau erfasst, mit dem Lineal ausgemessen und die Differenz zwischen dem Zeitpunkt t₀ ohne Chemikalienzugabe und nach Behandlung mit NfMLP abgelesen werden (relatives Maß).

3.2.4 Aufarbeitung von frischen Sputumproben von CF-Patienten

Prinzip:

Die Sputumproben waren meist ganz frisch, weil sie auf dem Weg zur Untersuchung im PKW erst ausgehustet wurden. Allerdings wurden die Proben an einigen Tagen bereits früher am Tag produziert und dann das bereits mehrere Stunden alte Sputum zur Untersuchung mitgebracht. Die Patienten kamen aufgrund unterschiedlicher Lebenssituationen zu verschiedenen Zeiten zur Untersuchung, weil die Krankheitsausprägung unterschiedlich war und einige Patienten einer Arbeit nachgehen konnten. Zudem kamen die Patienten aus dem erweiterten Umkreis von Tübingen, zum Teil bis zu 70 km weit und waren teilweise darauf angewiesen, von den Eltern nach deren Arbeitszeit zur Untersuchung gefahren zu werden.

So kamen einige Patienten bereits vormittags, andere nachmittags und wieder andere konnten erst in den späten Abendstunden zur Untersuchung kommen. Diese Unterschiede in der Tagesperiodik könnten einen Einfluss auf die Zellzahl im Sputum, die Sputumzusammensetzung sowie weitere Parameter wie Viskosität und Apoptose haben. Um eine Änderung der Osmolarität und dadurch Reizung der Granulozyten zu vermeiden, wurde darauf verzichtet, das Sputum durch Induktion mit 5,85 M Saline zu gewinnen, und die Sputumabgabe erfolgte spontan. In Ausnahmefällen musste das Sputum allerdings induziert werden. Auf Ausnahmen wird im Ergebnisteil eingegangen.

Durchführung:

Die Sputumproben wurden gewogen und nach Zugabe von 3 Gewichtsteilen PBS spezial mit

der Pipette gut gemischt und während einer Zentrifugation bei 400 x g für 5 Minuten durch ein Zellsieb (40µm) gefiltert, um bei den nachfolgenden Messungen im Advia 120 und FACS-Gerät keine Verstopfung zu verursachen.

Auswertung:

Die Messung der Zellzahl erfolgte am Advia 120, wobei zu beachten ist, dass das Programm nicht auf Sputum ausgerichtet ist und die Angabe der Zahlenwerte bei der Differenzierung der Leukozyten in Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten nicht mit der tatsächlichen Situation übereinstimmt. Man erhält aber durch den Vergleich der Graphikwolke von Peroxidase- und Basophilenkanal Informationen über die Degranulation und kann den Anteil von Granulozyten zumindest abschätzen. Aus diesem Grund wurden Cytospins angefertigt, bei deren Auszählung genau geprüft werden kann, wie viele Granulozyten und andere Zellen (%-Verteilung) sich tatsächlich im Sputum befinden.

In Abbildung 13 sind als Beispiel Sputumzellen und isolierte Blutgranulozyten desselben CF-Patienten im Advia 120 dargestellt.

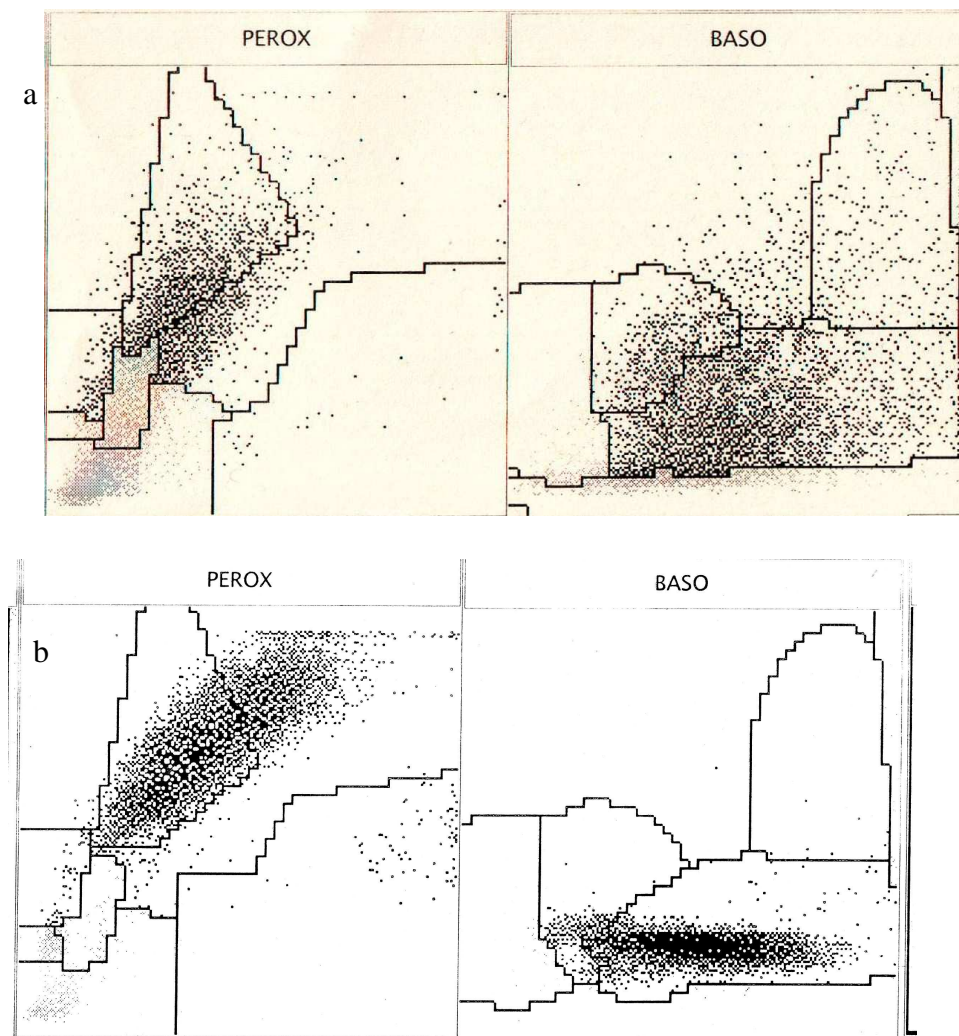


Abbildung 13: Beispiel: CF-Sputum und isolierte Blutgranulozyten im Advia 120

Die Zellen im Sputum eines Patienten wurden nach Verdünnung mit PBS und Filterung durch ein 40 µm Zellsieb im Advia 120 gemessen und sowohl im Perox-Kanal (Perox) als auch im Basophilenkanal (Baso) dargestellt (a). Zum Vergleich sind die isolierten Blutgranulozyten desselben Patienten dargestellt (b).

Die gezeigten Zellen im Sputum des Patienten bestehen zum größten Teil aus Granulozyten, wie in Abbildung 13a) ersichtlich wird. Zum Vergleich sind in Abbildung 13b) die aus dem Vollblut desselben Patienten isolierten Granulozyten zu sehen, die nach der Isolation im Histopaquegradienten bereits eine Linksverschiebung aufweisen. Die Sputumgranulozyten weisen ebenfalls eine Linksverschiebung auf, die stärker ist als bei den isolierten Blutgranulozyten. Im Basophilen-Kanal zeigen die Sputumzellen eine deutlich

uneinheitlichere Population als die Blutgranulozyten.

3.2.5 Trypanblaufärbung

Prinzip:

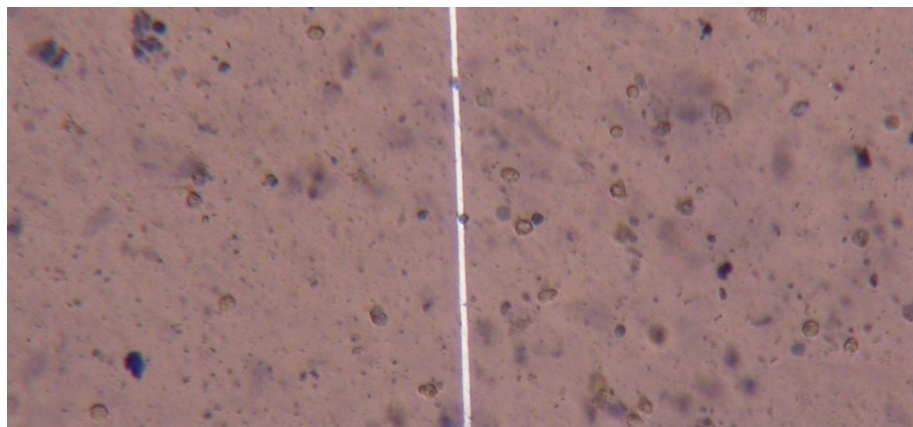
Die Trypanblaufärbung ist eine Methode zur Bestimmung der Zellvitalität, weil nur tote Zellen durch den sauren Farbstoff Trypanblau angefärbt werden.

Durchführung:

Eine Suspension aus 1 zu 4 mit PBS verdünntem Sputum wurde nach Filterung durch ein Zellsieb (40 μ m) mit einer Konzentration von mehreren Millionen Zellen pro ml (5 Millionen bis 40 Millionen, abhängig vom jeweiligen Sputum) 1 zu 2 mit Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Auswertung:

Es wurden 100 Zellen in den 16 Kleinquadraten der Neubauer-Zählkammer ausgezählt, und anschließend wurde der Prozentsatz der toten (also blau gefärbten) Zellen bestimmt.



*Abbildung 14: Beispiel: Trypanblaufärbung von Zellen im Sputum
Sputum eines CF-Patienten wurde 1 zu 2 mit Trypanblau gefärbt und im
Lichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung ausgezählt.*

Die Auszählung der toten Zellen im Sputum nach Trypanblaufärbung war wegen der vielen Trümmer im Sputum, die ebenfalls blau gefärbt waren, häufig schwierig.

3.2.6 Cytospins

Prinzip:

Da die Differenzierung der Zellen im Advia 120 in anderem Material als Vollblut nur unzureichend erfolgt, musste das Sputum in Hinblick auf seine Zusammensetzung mikroskopisch überprüft werden. Durch Zentrifugation erfolgt eine Anreicherung der Zellen, die auf einen Objektträger "geschleudert" werden. Durch Färbung nach Pappenheim kann eine mikroskopische Beurteilung erfolgen. So kann der Prozentsatz an Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und sonstigen Zellen bestimmt werden.

Durchführung:

0,05 Mio Zellen wurden 1 zu 10 in PBS spezial verdünnt und in einer Zytozentrifuge für 5 Minuten bei 800 rpm auf einen Objektträger geschleudert. Die Färbung der Cytospins erfolgte nach der Pappenheim-Methode, bei der die Cytospins zuerst 5 min in May-Grünwald-Lösung gefärbt, danach mit destilliertem Wasser gespült und nach 15 min in Giemsa-Lösung nach erneutem Spülen mit destilliertem Wasser an der Luft getrocknet und mikroskopiert wurden.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der Cytospins unter dem Mikroskop. Von 100 Zellen wurde der Prozentsatz der unterschiedlichen Zellen ermittelt.

In Abbildung 15 wird ein Beispielbild eines Cytospins gezeigt.

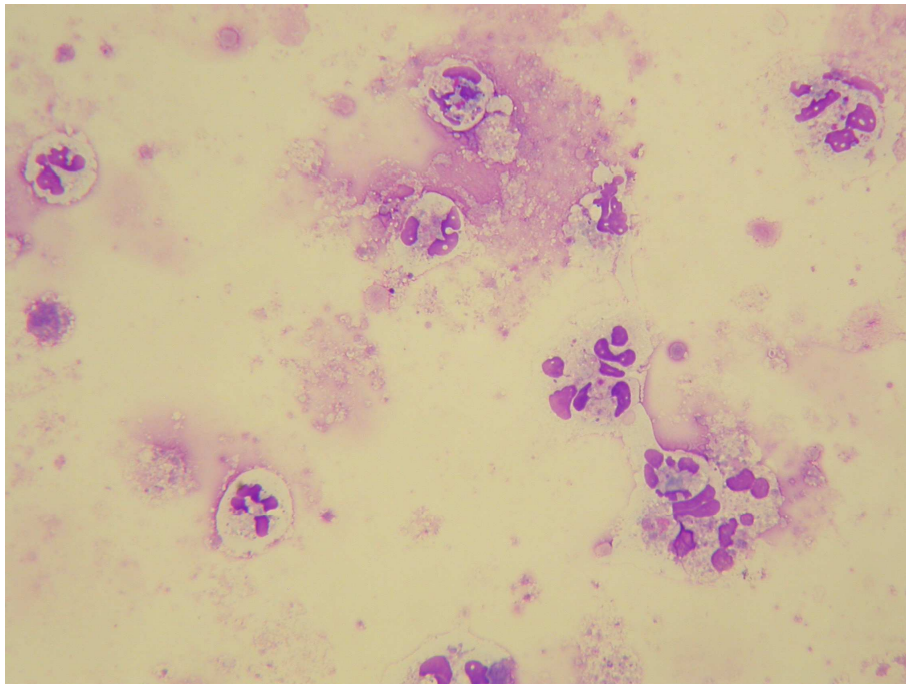


Abbildung 15: Beispiel: Cytospin mit Sputum aus der CF-Studie

Im Sputum eines Patienten sind während der Behandlung mit 50 mg Amitriptylin täglich auf dem Cytospin nach Pappenheim-Färbung bei 400facher Vergrößerung neben Schleim vor allem Granulozyten zu sehen.

Im Sputum des gezeigten Patienten sind während der Einnahme von 50 mg Amitriptylin täglich in der 400fachen Vergrößerung nach Pappenheim-Färbung vor allem Schleim und reife Granulozyten mit einer starken Unterteilung des Zellkernes zu sehen. Die Granulozyten scheinen in Schleim eingebettet zu sein. Die Zusammensetzung der einzelnen Sputen der verschiedenen Patienten war sehr unterschiedlich (siehe die Auszählung im Ergebnisteil, Kapitel 4.3.4.2).

3.2.7 Luminolabhängige Chemilumineszenz

Prinzip:

Mit Hilfe der Chemilumineszenz können reaktive Sauerstoffverbindungen nachgewiesen werden. Die zuvor mit Stimulantien wie PMA oder Zymosan A aktivierten Granulozyten produzieren ROS, die mit ungesättigten Doppelbindungen in der Zelle reagieren. Hierbei entstehen energiereiche Verbindungen wie Dioxetanderivate. Fluoreszenzfähige Moleküle der Zelle nehmen diese Energie auf und geben sie bei der Rückkehr in den Grundzustand in Form von Photonen ab. Zur Verstärkung der Photonenabgabe dient Luminol (Müller-Peddinghaus 1984).

Die Fähigkeit der Granulozyten von Sepsispatienten und von CF-Patienten zum „oxidativen Burst“ wurde überprüft. Hierzu wurde entweder der Phorbol-ester PMA zugegeben, der eine 2nd-messenger-Kaskade mit Aktivierung der Proteinkinase C auslöst, die p47 (ein cytoplasmatisches Protein der NADPH-Oxidase) phosphoryliert. Oder es erfolgte eine Zugabe von opsonisiertem Zymosan A, welches aus Zellwänden der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen und von Phagozyten wie Granulozyten durch Phagozytose aufgenommen wird und somit den „oxidativen Burst“ auslöst.

Durchführung:

Für die luminolabhängige Chemilumineszenz wurden $0,1 \times 10^6$ Zellen in 100 μ l PBS/ Glucose in einer nichttransluminenten 96-well-Platte für 30 Minuten untersucht. 25 μ l Luminol (1,75 mg/ml in DMSO, 1 zu 50 in PBS spezial verdünnt, Endkonzentration 4 μ g/ml pro well) wurden zugegeben. Die Zellen wurden bei den Sepsis-Patienten mit PMA oder opsonisiertem Zymosan A stimuliert, bei den CF-Patienten nur mit opsonisiertem Zymosan. PMA (2mg/ml) wurde in PBS/Glucose 1:2500 verdünnt, die Endkonzentration betrug 100 ng/ml pro well. Opsonisiertes Zymosan A wurde durch Inkubation des Zymosans mit AB-Serum über Nacht hergestellt (20 mg/ml), bei -20 °C aufbewahrt, und 1 zu 10 in HBSS oder PBS/Glucose verdünnt. Die Endkonzentration betrug 250 μ g/ml pro well.

Pipettierschema:

	PBS/ Glucose	Zellen	PMA	Opsonisiertes Zymosan A
Unstimuliert	75 μ l	100 μ l (1×10^6 /ml in PBS/Glucose)	-	-
stimuliert (PMA <u>oder</u> opson. Zymosan)	50 μ l	100 μ l (1×10^6 /ml in PBS/Glucose)	25 μ l (100 ng/ml f.c.)	25 μ l (250 μ g/ml f.c.)

In alle wells kommen 25 μ l Luminol, bei den unstimulierten wells ohne weiteren Zusatz, bei den stimulierten wells zusätzlich 25 μ l PMA oder 25 μ l Zymosan.

Auswertung:

Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Aufzeichnung erfolgte als Kurvenverlauf der Lichtemission während 30 Minuten. Die Fläche unter der Kurve wurde als Integral berechnet, und die Photonenemission wurde als „Relative Light Unit“ [RLU]

gemessen. Aus 3fach bzw. 6fach-Werten wurden Mittelwerte gebildet.

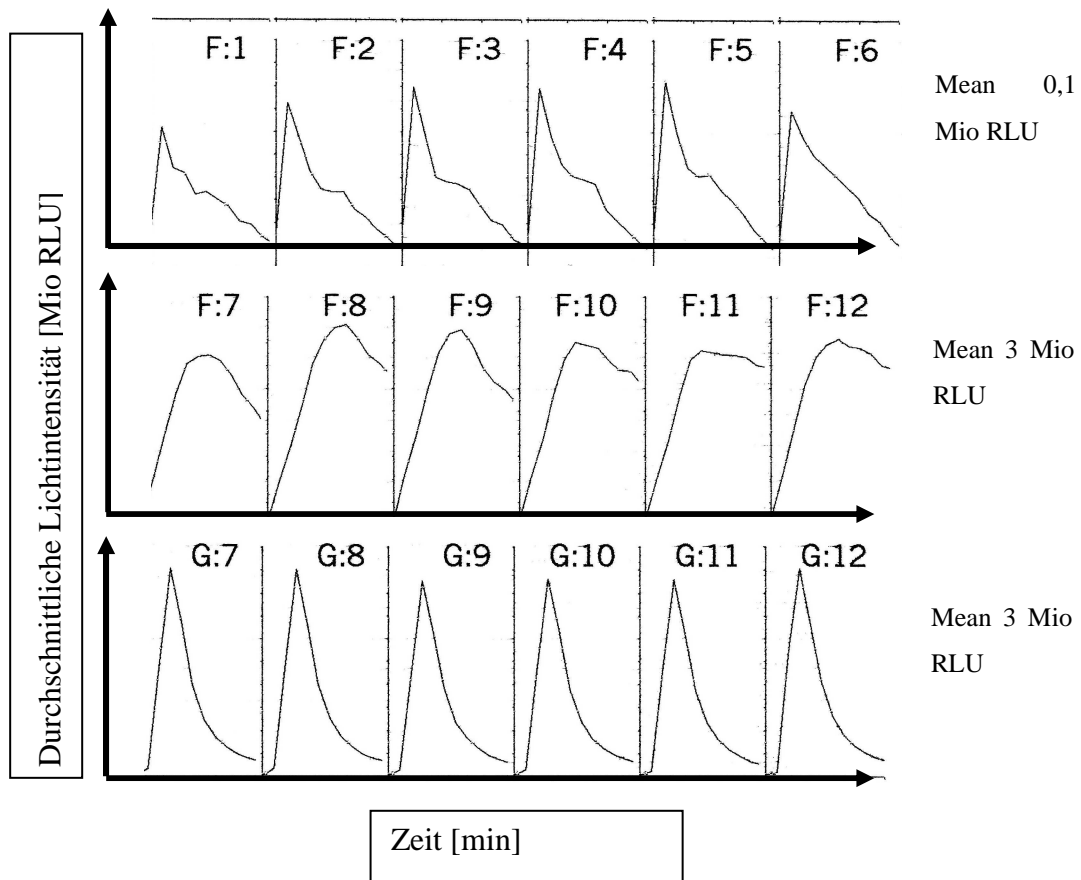


Abbildung 16: Beispiel: ROS-Produktion bei isolierten Granulozyten
 Isolierte Granulozyten wurden über 30 Minuten mit Luminol inkubiert. In den ersten 6 wells (F1 bis F6) sind unstimulierte isolierte Blutgranulozyten (1 Million/ml) zu sehen, während in den wells 7 bis 12 stimulierte Granulozyten zu sehen sind. Als Stimulanzien dienten opsonisiertes Zymosan A (Reihe F 7 bis 12) und PMA (Reihe G 7 bis 12).

Unstimulierte Granulozyten sind bereits durch die Isolation im Histopaquegradienten aktiviert und weisen eine ROS-Produktion auf, die schnell wieder absinkt. Nach Stimulation mit opsonisiertem Zymosan A (f.c. 250 µg/ml) steigt die ROS-Produktion stark an und beginnt nach ca. 30 Minuten langsam wieder abzusinken. Stimulation mit PMA (f.c. 100 ng/ml) bewirkt einen sehr steilen Anstieg, der schnell einen Höhepunkt erreicht und anschließend schnell absinkt.

3.2.8 Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)

Prinzip:

Ein Laserstrahl trifft auf eine Zelle und wird als Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) und als Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) detektiert. Mit der gemessenen FSC-Intensität kann eine Aussage über die Größe der Zelle gemacht werden. Das SSC lässt eine Aussage über die Granularität der Zelle zu. Zusätzlich zu diesem Messprinzip regt der Laserstrahl mit einer bestimmten Wellenlänge von 488 nm und/oder 633 nm die Elektronen eines über spezifische Antikörper an die Zelle gebundenen Fluoreszenzfarbstoffs zum Übergang in einen höheren Energiezustand an. Bei der Rückkehr in den Grundzustand geben die Elektronen die Energie in Form von Licht ab, das als spezifisches Emissionsspektrum detektiert werden kann.

Bei Granulozyten von Sepsispatienten wurde die Expression von Selektinen, Integrinen und Toll-Like-Rezeptoren 2 und 4 auf der Zelloberfläche untersucht sowie die Aufnahme FITC-markierter E.coli-Bakterien (Phagozytostest). Bei CF-Patienten wurde die Apoptoserate in frischem Sputum und bei Blutgranulozyten mit Hilfe von Annexin V FITC und Propidiumjodid bestimmt. Ebenso wurde die Apoptose von frisch isolierten Granulozyten von gesunden Spendern nach 5-stündiger Inkubation mit CF-Sputumüberstand und nach Inkubation mit reinem Amitriptylin untersucht.

Durchführung:

Sepsisstudie:

Die Sepsisuntersuchungen erfolgten im Vollblut. 1,5 ml heparinisiertes Vollblut wurde mit PBS ohne $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ bei 400 x g und 18 °C für 5 Minuten gewaschen und das Pellet in 1,5 ml PBS mit $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ und 5 mM D-Glucose aufgenommen.

Für die Bestimmung der Oberflächenproteine wurden 5 µl fluoreszierender Antikörper zu 100 µl Vollblut gegeben. CD18 FITC, CD62L FITC, TLR2 und 4 PE wurden unverdünnt verwendet, während CD11b APC 1 zu 10 in PBS verdünnt wurde. Die Isotypenkontrolle

diente als Negativkontrolle und erhielt 2 µl Isotyp-Antikörper. Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten bei 4 °C, anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS ohne $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ gewaschen.

Für den Phagozytoseversuch wurden 100 µl Vollblut mit 20 µl E. coli FITC (1 zu 20) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert, dann 100 µl eiskalte Trypanblaulösung (1 zu 4 in PBS mit $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ und 5 mM Glucose) zugegeben und einmal mit 3 ml PBS bei 6 °C gewaschen. Eine Probe ohne E. coli Zugabe diente als Negativkontrolle und eine auf Eis mit E.coli inkubierte Probe wurde als Eiskontrolle verwendet.

Nach Inkubation mit Antikörpern oder E. coli wurden die Erythrozyten bei allen Proben mit Ammoniumchlorid Puffer (0,829% w/v) lysiert. Die restlichen Leukozyten wurden zweimal mit PBS spezial gewaschen und dann mit Formaldehyd (2%) fixiert und bis zur Messung dunkel bei 4 °C aufbewahrt.

CF-Studie:

Die Detektion der Apoptoserate bei der CF-Studie erfolgte im Sputum und bei isolierten Blut-Granulozyten von CF-Patienten mit Annexin V FITC und Propidiumjodid. Sputum wurde 1 zu 4 mit PBS spezial verdünnt und durch Zentrifugation durch ein Zellsieb (40 µm) gefiltert. Nach Waschen mit PBS spezial wurden 0,1 Mio Zellen (Blut-Granulozyten oder Sputum-Zellen) mit 100 µl FACS-Inkubationspuffer, 2 µl AnnexinV FITC und 2 µl Propidiumjodid für 10 Minuten dunkel bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend sofort gemessen, weil es sonst zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte durch Detektion von 10000 Zellen mit dem FACSCalibur von Becton Dickinson. Es wurde ein spezieller Bereich (ein "gate") gesetzt und die Zellen wurden im Histogramm (Sepsis) oder als Quadranten (CF) ausgewertet. Beim Histogramm unterschied das Setzen eines Markers den Bereich der positiven und negativen Zellen (bis zur Fluoreszenzintensität 10^1 negativ), und so konnten der Prozentsatz fluoreszierender Zellen und die mittlere Fluoreszenzintensität einer Zelle bestimmt werden, siehe Beispiel Abb. 17. Die Quadrantenstatistik gab den jeweiligen Prozentsatz der Zellen für die 4 Quadranten an, siehe Beispiel Abb. 18. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem CellQuest Programm von Becton Dickinson.

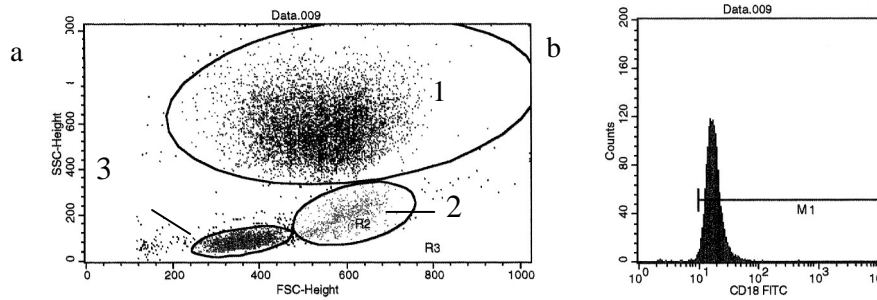


Abbildung 17: Beispiel: Integrinmessung bei der Sepsisstudie

Vollblut einer Kontrollperson wurde im FACS nach Färbung mit CD18 FITC als Dot Plot (a) aufgezeichnet. Die einzelnen Zellpopulationen wurden in drei Felder (gates) eingeteilt. 1) Granulozyten, 2) Monozyten, 3) Lymphozyten. Die Auswertung erfolgte im Histogramm (b).

In Abbildung 17 wurde Vollblut einer Kontrollperson während der Sepsis-Studie mit CD18 FITC gefärbt und nach der Erythrozyten-Lyse im FACS gemessen. Im Dot Plot wurde die Größe der Zellen (FSC) gegen ihr Streulichtverhalten (SSC) aufgetragen. Die drei Zellpopulationen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten sind auf Grund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften deutlich voneinander unterscheidbar. Das Histogramm bezieht sich auf das Granulozyten-Gate (1), der Marker wurde an der Negativkontrolle eingestellt, die mit FITC Isotyp behandelt wurde. Als Isotypen werden Antikörper aus der Maus bezeichnet, die mit humanen Zellen nicht reagieren. So konnte der Anteil CD18-positiver Zellen im Markerbereich oder die durchschnittliche Zellfluoreszenz bestimmt werden.

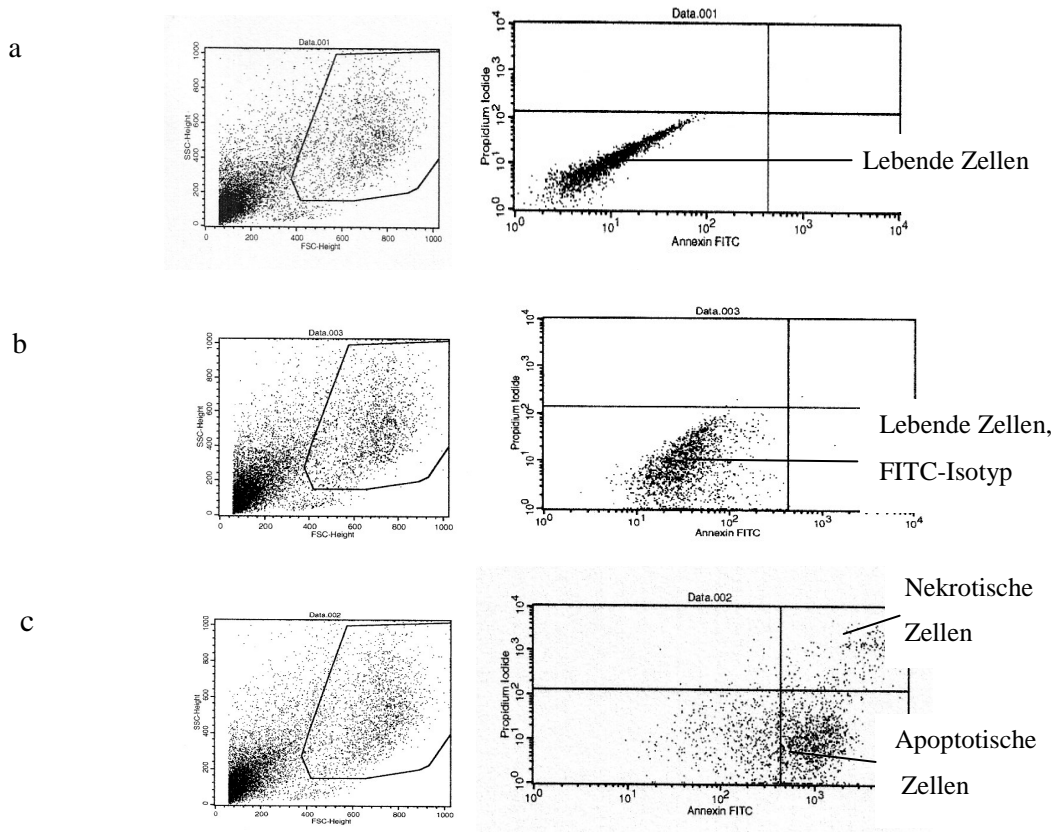


Abbildung 18: Beispiel: Bestimmung der Apoptose und Nekrose bei der CF-Studie

Das Sputum eines Patienten während der Einnahme von 25 mg Amitriptylin wurde mit Annexin V FITC und Propidiumjodid gefärbt. Gezeigt sind Dot Plots (links FSC gegen SSC, rechts Annexin gegen Propidiumjodid). a) ohne Färbung b) Negativkontrolle FITC Isotyp c) Färbung mit Annexin FITC und Propidiumjodid. Die Auswertung erfolgte durch Setzen eines Markers und Unterteilung in vier Quadranten. Unterer linker Quadrant: lebende Zellen, unterer rechter Quadrant: früh apoptotische Zellen, rechter oberer Quadrant: nekrotische und spät apoptotische Zellen.

Sputum eines CF-Patienten wurde durch ein Zellsieb (40 μm) gefiltert und nach Färbung mit Annexin V FITC und Propidiumjodid im Durchflusszytometer wie in Abbildung 18 gezeigt in einem Dot Plot dargestellt, indem die Größe jeder einzelnen Zelle (FSC) und ihr Streulichtverhalten (SSC) bestimmt und in eine Grafik eingetragen wurden. Jeder Punkt entspricht einer einzelnen Zelle. In einem weiteren Dot Plot werden Annexin FITC und Propidiumjodid gegeneinander aufgetragen. Durch Inkubation mit Annexin FITC werden die

apoptotischen Zellen angefärbt, indem sich Annexin FITC an das Phosphatidylserin anlagert, das sich eigentlich an der Innenseite der Zellmembran befindet und in einer frühen Phase der Apoptose an die Außenseite gelangt. Durch Inkubation mit Propidiumjodid werden die nekrotischen Zellen angefärbt, weil bei diesen Zellen die Zellwände angegriffen sind und das Propidiumjodid sich an die DNA im Zellkern anlagern kann. Die nekrotischen Zellen sind gleichzeitig auch Annexin-positiv, weil das sich auf der Innenseite der Zellmembran befindliche Phosphatidylserin durch die offene Zellmembran ebenfalls zugänglich wird. Die sich in einer späten Phase der Apoptose befindlichen Zellen werden ebenfalls durch Propidiumjodid angefärbt und befinden sich in der Auswertung bei den nekrotischen Zellen. Als Kontrolle dient eine Probe ohne Zusatz von Farbstoff und eine Probe mit Zusatz von FITC Isotyp, einem Antikörper, der aus der Maus stammt und mit humanen Zellen nicht reagieren dürfte. An dieser Probe wurde der Marker eingestellt, weil Annexin FITC häufig eine hohe Eigenfluoreszenz besitzt.

In der Quadrantenstatistik wird der Dot Plot durch den Marker in vier Quadranten eingeteilt und der Prozentsatz der sich im jeweiligen Quadranten befindlichen Zellen bestimmt. Links unten befinden sich die ungefärbten Zellen, rechts unten die apoptotischen Zellen der frühen Phase und rechts oben die doppelt positiven nekrotischen Zellen, die sowohl mit Annexin FITC als auch mit Propidiumjodid gefärbt sind. Hier sind auch spät apoptotische Zellen zu finden. Ebenso wird der Anteil apoptischer Zellen bei den Granulozyten von CF-Patienten im Blut bestimmt.

3.2.9 Chemotaxis

Prinzip:

Granulozyten können sich auf einem mit Gelatine beschichteten Objektträger entlang eines Gradienten auf ein chemotaktisch wirksames Stimulans zu bewegen. So kann die Befähigung der Granulozyten von Sepsispatienten zur Chemotaxis im Vergleich zu gesunden Probanden bestimmt werden.

Durchführung:

Herstellung von 10 Gelatine-Agaroseobjektträgern: 1 g Gelatine wurde in 200 ml Millipor-Wasser auf einer Heizplatte gelöst und nach Abkühlung wurden Objektträger damit überzogen. Das Kulturmedium wurde aus 5 ml HBSS (10x), 1,25 ml 1 M HEPES und 15 ml Milliporwasser hergestellt und unter Rühren mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Danach wurde auf 25 ml mit Millipor-Wasser aufgefüllt, 0,5 g Gelatine dazugegeben, bei ca. 60 °C unter

Rühren gelöst und bei 48 °C im Wasserbad warmgestellt. Nun konnte die für 15 Minuten gequollene low-melting-Agarose (1 g in 25 ml Milliporwasser) bei höchstens 80 bis 85 °C gelöst, mit dem Kulturmedium vermischt und die Gelatine-Objektträger mit dieser Agaroselösung überzogen werden.

Die so vorbereiteten Objektträger konnten in einer feuchten Kammer bis zu 10 Tagen im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt werden.

In die Agaroseschicht wurden in einer Reihe 3 Löcher gestanzt, das obere wurde mit 10 µl PBS mit Glucose, das untere mit 10 µl NfMLP 10^{-6} M gefüllt. Insgesamt wurden 3 Reihen gestanzt (siehe Stanzschema, Abb. 19). Nach einer Vorinkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer für 30 Minuten, um das Diffundieren des NfMLPs in die Agaroseschicht zu ermöglichen, wurde in das mittlere Loch 10 µl einer Granulozytensuspension in PBS mit Glucose (1 Mio) pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 3 Stunden in einer feuchten Kammer im Brutschrank, anschließend wurde mit 2,5 % Glutaraldehyd für 30 Minuten fixiert, nach 15 Minuten erfolgte ein Durchspülen der Löcher, um nicht gewanderte Granulozyten auszuspülen. Die Agaroseschicht wurde unter fließendem Wasser abgespült und die Objektträger mit der Pappenheim-Färbung gefärbt.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte mit einem Mikroskop mit Mikrometerokular. Die spontane Migration wurde von der Migration gegen den Gradienten abgezogen.

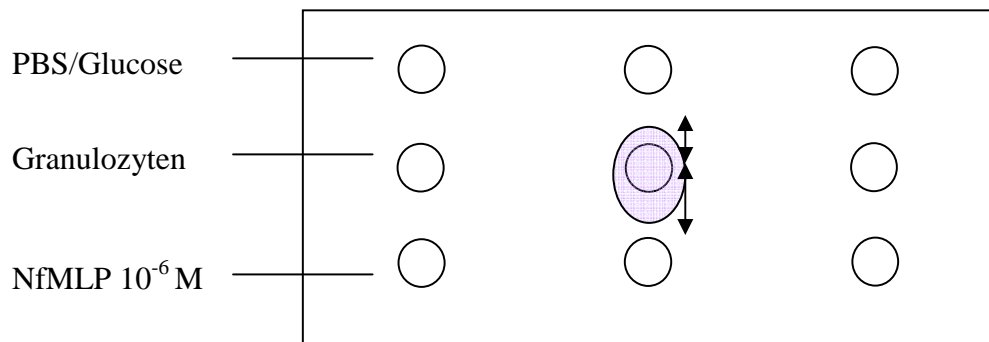
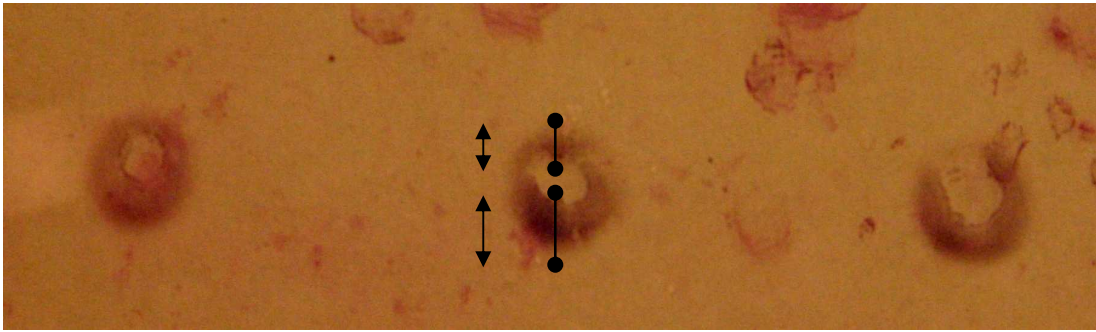
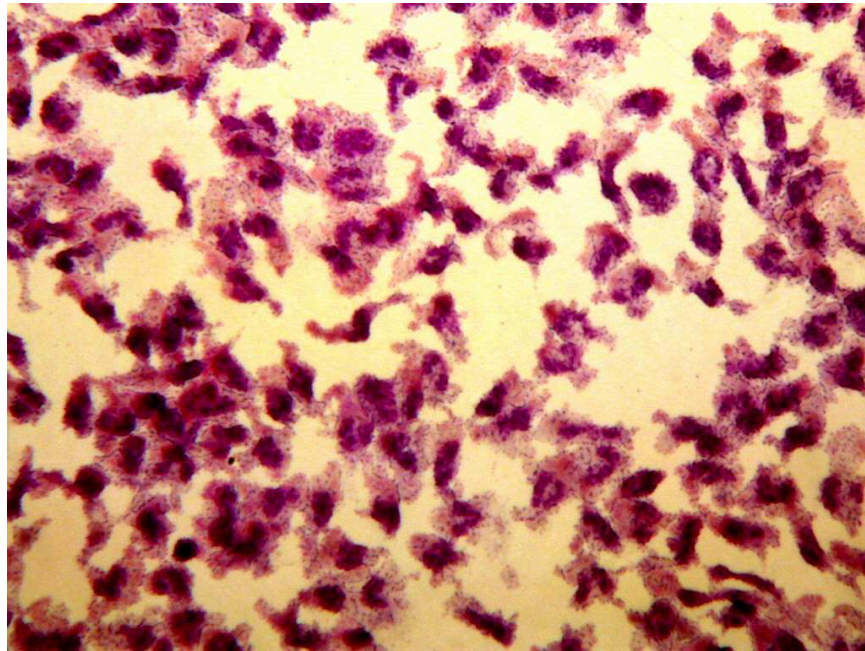


Abbildung 19: Stanzschema der Chemotaxis-Objekträger

Mit einer Metallstanze wurden vorsichtig 9 Löcher in die Agaroseschicht des Objekträgers gestanzt, ohne die darunterliegende Gelatineschicht zu beschädigen. In die obere Reihe wurden je 10 μ l PBS mit 5 mM Glucose als Kontrollösung pipettiert und in die untere Reihe je 10 μ l NfMLP [10^6 M]. Nach 30 Minuten Einwirkzeit bei 37 °C in einer feuchten Kammer wurden je 1 Million Granulozyten in 10 μ l in jedes Loch der mittleren Reihe pipettiert und für 3 Stunden in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Die lila Fläche zeigt die Laufstrecke der Granulozyten auf NfMLP zu.

a**b**

*Abbildung 20: Wandernde Granulozyten auf Chemotaxisobjektträger
Die Granulozyten wanderten zum Chemotaktikum NfMLP, wie in der
Übersichtsfotografie gezeigt (a). Bei 400facher Vergrößerung im
Lichtmikroskop aufgenommen zeigen sich weitere Details, wie eine
Veränderung des Cytoskeletts (b).*

Die Granulozyten wanderten auf das Chemotaktikum NfMLP zu. In der Vergrößerung sieht man eine Formveränderung der wandernden Granulozyten.

3.2.10 In vitro-Inkubation von gesunden Granulozyten mit Amitriptylin

Prinzip:

Amitriptylin wurde den Patienten während der CF-Studie in unterschiedlichen Mengen in Tablettenform verabreicht um zu untersuchen, ob es einen Einfluss auf die Granulozyten der CF-Patienten besitzt. Deshalb wurde Amitriptylin in drei verschiedenen Konzentrationen mit frisch isolierten Granulozyten gesunder Spender inkubiert. Untersucht wurde der Einfluss auf die Apoptose, die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen mit Hilfe der Chemilumineszenz und die Degranulation.

Durchführung:

Frisch isolierte Granulozyten gesunder Spender wurden für 4 Stunden mit Amitriptylin inkubiert. Die Amitriptylin-Gaben wurden so berechnet, dass sie in den gewählten Konzentrationen einer Tagesdosis von 25 mg Amitriptylin, 75 mg Amitriptylin oder 125 mg Amitriptylin entsprachen. Als Ausgangswert wurde eine durchschnittliche Blutmenge von 5 Litern angenommen, das entspricht bei 25 mg 15,9 μMol Amitriptylin pro Liter Blut, bei 75 mg 47,7 μMol Amitriptylin pro Liter Blut und bei 125 mg 79,6 μMol Amitriptylin pro Liter Blut.

Untersucht wurde der Einfluss von reinem Amitriptylin auf die Apoptose im Durchflusszytometer durch Färbung mit den fluoreszierenden Farbstoffen Annexin FITC und Propidiumjodid (siehe 3.2.8). Die Untersuchung der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen erfolgte mit Hilfe der Chemilumineszenzmethode (siehe 3.2.7) und die Degranulation mit Hilfe des Advia 120 (siehe 3.2.3).

Auswertung:

Ausgewertet wurde die Apoptose im Durchflusszytometer, wie in 3.2.8 beschrieben, die ROS-Bildung mit Hilfe der Chemilumineszenz nach Stimulation mit PMA oder opsonisiertem Zymosan A, wie in 3.2.7 beschrieben. Die Degranulation wurde mit Hilfe der Perox X-Histogramme des Advia 120 ausgewertet, wie in 3.2.3 beschrieben.

3.2.11 Inkubation von gesunden Granulozyten mit Sputum-Überstand aus der CF-Studie

Prinzip:

Bei der Lungenfunktionsuntersuchung konnte bei einigen Patienten unter Amitriptylinbehandlung eine Verbesserung der Lungenfunktion festgestellt werden.

Sputumüberstand wurde von jedem Patienten an jedem Versuchstag eingefroren, sofern genügend produziert wurde, und anschließend die Wirkung der Sputumüberstände, bei denen eine Lungenfunktionsverbesserung zu beobachten war, auf die Apoptose und die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen von Granulozyten gesunder Spender untersucht.

Durchführung:

Während der CF-Studie wurde bei jedem Patienten von jedem Versuchstag Sputumüberstand aus technischen Gründen teils bei -20 °C, teils bei -80°C eingefroren.

Frisch isolierte Granulozyten gesunder Spender wurden mit Sputumüberstand in PBS/Glucose inkubiert. Das Sputum wurde auf Eis gelagert, 1 zu 4 mit eiskaltem PBS spezial verdünnt und bei 12 000 x g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Hierdurch wurden Zellen und Bakterien entfernt. Der Überstand wurde abgenommen und teils bei -20 °C, teils bei -80 °C eingefroren. Es wurden das Sputum vom ersten und dritten Tag des Amitriptylinzyklus, in dem eine Lungenverbesserung zu verzeichnen war, und das entsprechende Plazebosputum verwendet. Als Plazebopräparat erhielten die Patienten Maisstärke.

Für die Untersuchung der Apoptose wurden die Granulozyten mit 20 % Sputumüberstand für 5 Stunden inkubiert, und es wurde mit Staurosporin (Endkonzentration 5 µM, in DMSO gelöst) als Positivkontrolle Apoptose induziert. Nach Zugabe von Annexin und Propidiumjodid erfolgte die Messung im Durchflusszytometer. Für die Untersuchung des oxidativen Bursts wurde direkt nach Zugabe von 10 % Sputum-überstand zu gesunden Granulozyten nach Stimulation mit PMA oder Zymosan A im Luminometer gemessen.

Auswertung:

Die Apoptose wurde mittels Quadrantenstatistik im Durchflusszytometer gemessen, so wie unter 3.2.8 beschrieben. Die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen wurde wie in 3.2.7 mit Hilfe der Chemilumineszenz gemessen und der Mittelwert aus Dreifachwerten gebildet und in der Einheit RLU aufgetragen.

3.2.12 Cytokinbestimmung in Blut und Sputum

Prinzip:

Die Bestimmung der Cytokine im Blut und im Sputum der CF-Patienten erfolgte durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. Joachim Riethmüller. Hierzu wurde bei den Blutproben das Serum abgenommen und bei -20 °C weggefroren. Ebenso wurde das Sputum bei -20 °C eingefroren. Die Sputumproben wurden mit Puffer verdünnt, wenn es erforderlich war.

Durchführung:

Die Cytokine Interleukin 1 (IL-1) sowie IL-6, IL-8 und IL-10 wurden ebenso wie das Lipopolysaccharid-bindende Protein quantitativ mit Hilfe des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Immulyte[®] der Firma DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim gemessen.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte durch die mitgelieferte Software.

3.2.13 Bestimmung der Pseudomonaszahl im Sputum**Prinzip:**

Die Pseudomonaszahl im Sputum der CF-Patienten wurde durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. Joachim Riethmüller untersucht. Es wurden verschiedene Methoden wie Koloniemorphologie, Grampräparate und zusätzliche Methoden wie Oxidase und β -Hämolyse auf Blutplatten verwendet.

Durchführung:

Die Sputumproben wurden mit Dithiothreitol (DTT, „Sputasol“, Firma Oxoid aus Wesel) 1 zu 2 verdünnt, 30 Sekunden mit dem Vortexer gemischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte mit dieser Stammlösung eine Verdünnungsreihe, bei der das Sputum-DTT-Gemisch mit einer 0,9 % NaCl-Lösung auf 10^2 , 10^4 und 10^6 verdünnt wurde. Von der Stammlösung wurden 20 μ l und von den Verdünnungen je 100 μ l auf einer Endo-Agarplatte ausplattiert und für 48 Stunden bei 36 °C im Brutschrank inkubiert.

Auswertung:

Die Bakterienkolonien wurden auf der Platte mit der höchsten Verdünnungsstufe ausgezählt, bei der die einzelnen Kolonien zu erkennen waren. Die Umrechnung der Kolonienzahl pro ml Sputum erfolgte durch Multiplikation mit dem Faktor der entsprechenden Verdünnungsstufe (x 10^2 für die Stammlösung, x 2×10^3 für die 10^2 -Verdünnung, x 2×10^5 für die 10^4 -Verdünnung und x 2×10^7 für die 10^6 -Verdünnung).

4 Ergebnisse

4.1 Einführung

Granulozyten gehören zu den Fresszellen, die Krankheitserreger eliminieren. Sie spielen eine bedeutende Rolle bei vielen Krankheiten. Bei der Sepsis fallen die enorm erhöhten Granulozytenzahlen im Blut auf, ebenso das Vorkommen stabkerniger, also unreifer Granulozyten. Im Sputum von CF-Patienten sind massive Granulozytenzahlen zu beobachten, was darauf schließen lässt, dass Granulozyten auch bei dieser Krankheit eine wichtige Rolle spielen.

Untersucht wurden verschiedene Funktionsparameter der Granulozyten, verschiedene Oberflächenmoleküle und die Apoptoserate.

4.2 Sepsis

Untersucht wurden die Granulozyten aus dem Blut von 5 Sepsispatienten der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen während des Krankheitsverlaufs an den ersten vier Tagen, am 7., am 10. und am 17. Tag. Zwei der Patienten starben.

Patient 1 war ein 58jähriger Mann, der chronischen Alkohol-Missbrauch betrieb. Er blieb für 7 Tage wegen akuter nekrotischer Pankreatitis mit Fieber, Anämie und CRP-Anstieg auf der Intensivstation, wo eine Antibiotika-Behandlung mit Ciprofloxacin begonnen wurde. Anschließend konnte er auf die Normalstation verlegt und bald entlassen werden, so dass eine Untersuchung am 17. Tag nicht mehr möglich war.

Patient 2 war eine 66jährige Frau mit akutem Nierenversagen durch Urosepsis, die für 7 Tage auf die Intensivstation musste. Symptome waren Fieber, Anämie, Kreatinin- und CRP-Anstieg. In der Urinkultur wurden *E. coli* nachgewiesen. Die Therapie mit Antibiotika bestand in der Behandlung mit Ciprofloxacin und Metronidazol. Für zwei Tage wurde die Gabe von Norepinephrin notwendig.

Patient 3 war ein 82jähriger Mann, der an Respirationsinsuffizienz bei gleichzeitigem Diabetes und Niereninsuffizienz nach Beatmung litt und für 9 Tage auf der Intensivstation war. Zwei Tage nach Beatmung traten SIRS-Symptome (Fieber, Leukozytose, CRP-Anstieg) auf. Es wurde mit den Antibiotika Cephalosporin und Aminoglycosid behandelt. Für zwei Tage wurde die Therapie mit Norepinephrin notwendig. Nach 6 Tagen konnte die Beatmung beendet und der Patient auf eine Normalstation entlassen werden. Allerdings verschlechterte sich der Zustand des Patienten kurz darauf wieder, eine erneute Beatmung wurde notwendig und der Patient verstarb trotz aller Bemühungen am 9. Tag. Der zweite Tag wurde bei diesem Patienten nicht untersucht.

Patient 4 war ein 67jähriger Mann, der an einer Pneumonie mit *Staphylococcus aureus*-Infektion und pulmonalen Abszessen litt und für 4 Tage intensivmedizinisch betreut werden musste. Anfangssymptome waren Fieber, Anämie, Leukozytose und CRP-Anstieg. Behandelt wurde mit den Antibiotika Chinolon und Aminoglycoside. Zwei Tage nach Aufnahme wurden mechanische Beatmung, Catecholaminbehandlung und Dialyse notwendig. Der Patient verstarb an einem septischen Schock-Syndrom am 4. Tag.

Patient 5 war ein 60jähriger Mann mit Urosepsis und nachgewiesener *E. coli*-Infektion. Für 3 Tage wurde ein Aufenthalt auf der Intensivstation notwendig. Anfangssymptome waren Fieber, Anämie, Leukozytose und CRP-Anstieg. Behandelt wurde mit dem Antibiotikum Chinolon.

Um den Zustand eines Intensivpatienten zu ermitteln, wird vom medizinischen Personal der Intensivstation eine Vielzahl unterschiedlicher Parameter wie Leukozytenzahl, Fieber, Herzfrequenz, Atemfrequenz etc. im sogenannten APACHE Score (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation) zur Risikoabschätzung zusammengefasst (Tabelle 1). Je höher der berechnete Wert, desto größer ist das Sterberisiko.

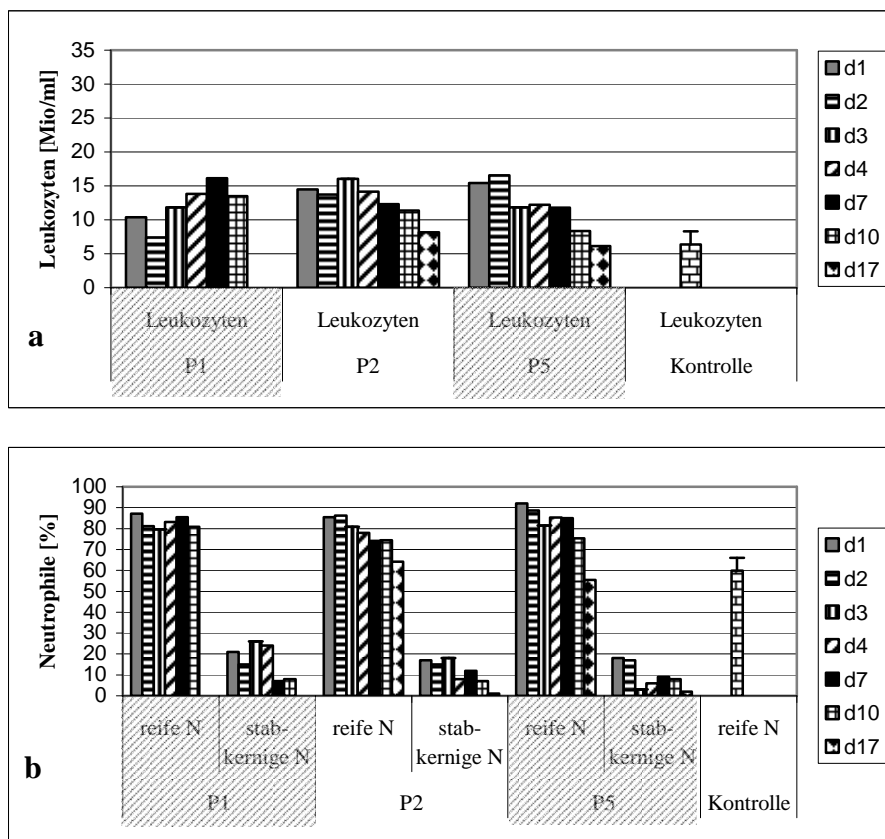
Tabelle 1: Überblick über den APACHE Score in den ersten drei Tagen nach Studienbeginn

	APACHE Score Tag 1	APACHE Score Tag 2	APACHE Score Tag 3
Patient 1	14	13	6
Patient 2	26	20	20
Patient 3 (†D9)	21	19	13
Patient 4(†D4)	30	33	37
Patient 5	17	18	11

Die Risikobewertung mit Hilfe des APACHE Scores ergibt einen Überblick über das Sterberisiko. Von 0-4 Punkten liegt das Sterberisiko bei 4 %, von 5 bis 9 Punkten bei 8 %, 10 bis 14 Punkte 15 %, 15 bis 19 Punkte 25 %, 20 bis 24 Punkte 40 %, 25 bis 29 Punkte 55 %, 30 bis 34 Punkte 75 % und mehr als 34 Punkte 85 %. Die höchste Punktzahl erreichte Patient 4, der am dritten Tag ein Sterberisiko von 85 % aufwies und tatsächlich am vierten Tag verstarb. Die niedrigste Punktzahl erreichte Patient 1, der von allen Patienten die schwächste Sepsis-Form aufwies. Bei dem ebenfalls verstorbenen Patienten 3 ergab sich für den dritten Tag ein Sterberisiko von 15 %, das sich allerdings bis zum 9. Tag geändert haben kann.

4.2.1 Untersuchung der neutrophilen Granulozyten aus dem Blut von Sepsispatienten

Aus Vollblut von Sepsispatienten wurden mittels Histopaque-Dichtegradientenzentrifugation Granulozyten isoliert. Als Kontrolle dienten fünf gesunde freiwillige Spender aus dem Umfeld der Kinderklinik (3 Frauen und 2 Männer im Alter von 23 bis 50 Jahren). Untersucht wurden die Leukozytengesamtzahl und der Prozentsatz reifer und stabkerniger neutrophiler Granulozyten.



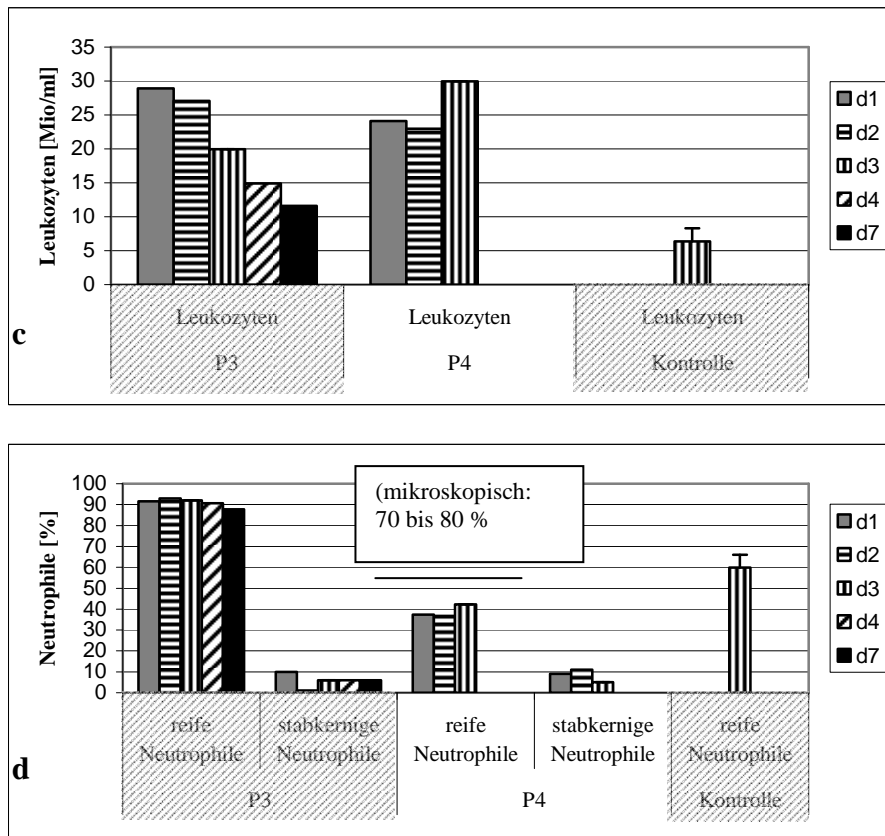


Abbildung 21: Blutbilder von Sepsispatienten im Advia 120

Die Leukozytenzahl und der Anteil reifer neutrophiler Granulozyten und stabkerniger Granulozyten wurde im zeitlichen Verlauf über mehrere Tage mit dem Advia 120 bzw. mikroskopisch verfolgt. Als Kontrolle dienten 5 gesunde Patienten. Die Kontrollwerte sind als Mittelwert, $n=5$, \pm S.D. angegeben. a) Leukozyten, Überlebende, b) Neutrophile, Überlebende, c) Leukozyten, Verstorbene, d) Neutrophile, Verstorbene.

Die gesunden Kontrollpersonen wiesen eine durchschnittliche Gesamtleukozytenzahl von 6,4 Millionen pro ml auf, davon ungefähr 60 % reife Granulozyten. Die stabkernigen unreifen Granulozyten kommen bei Gesunden kaum im Blut vor und wurden hier nicht extra von Hand ausgezählt. Die Differenzierung der neutrophilen Granulozyten im Blutaussstrich war nötig, weil der Advia nicht in der Lage ist, unreife Granulozyten zu erkennen. Der in der Literatur erwähnte Durchschnittswert liegt für gesunde Personen bei ungefähr 0-3 %.

Bei den Sepsispatienten war die Leukozytenzahl stark erhöht, bei den verstorbenen Patienten besonders stark auf bis zu 30 Millionen Leukozyten pro ml Blut. Der Anteil unreifer Neutrophiler war bei allen Patienten erhöht, wobei die überlebenden Patienten zu Beginn der Erkrankung mehr unreife Neutrophile im Blut aufwiesen als die Verstorbenen. Der Anteil

reifer Neutrophiler war bei allen Sepsispatienten erhöht, der verstorbene Patient 3 wies die höchsten Werte auf und stieg teilweise auf über 90 %. Einzig der ebenfalls verstorbene Patient 4 bildete hier eine Ausnahme und zeigte mit ungefähr 40 % erniedrigte Neutrophilenzahlen in der Adviamessung. Die Auszählung des Blutausstriches ergab allerdings erhöhte Werte reifer Neutrophiler von 70 bis 80 % (siehe Tabelle 2). Offensichtlich lag bei einem Teil der Neutrophilen des Patienten 4 eine (partielle) Myeloperoxidasedefizienz vor. Der Advia 120 erkennt Granulozyten u.a.durch die Aktivität der Myeloperoxidase. Fehlt diese partiell, werden die Zellen nicht als Granulozyten, sondern als Monozyten oder große ungefärbte Zellen (LUCs) gewertet. Falls sie ganz fehlt, können die Zellen nicht eingeordnet werden und werden als LUCs klassifiziert.

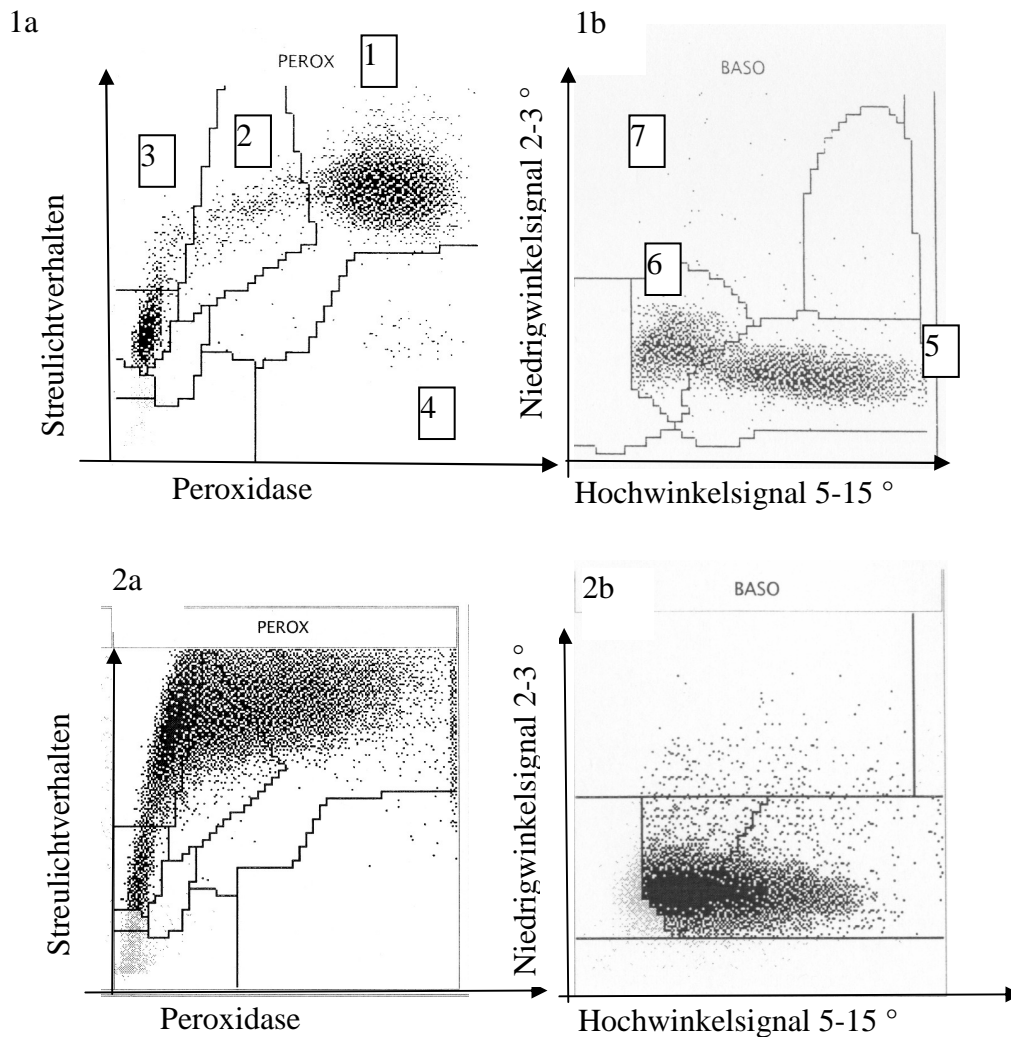


Abbildung 22: Vergleich von Vollblut von Kontrollperson 1 und Patient 4 im Advia 120.

Im Vollblut von Kontrollperson 1 (a) sind die einzelnen Populationen im Perox-Kanal deutlich voneinander abgrenzbar (1a). Die neutrophilen Granulozyten (1) sind als sehr Myeloperoxidase-reiche Zellwolke weit rechts erkennbar, die Monozyten (2) links daneben und die Lymphozyten (3) als Zellen ohne Granula und Myeloperoxidase ganz links unten. Rechts unten befinden sich die eosinophilen Granulozyten (4), die viel eosinophile Peroxidase enthalten. Auf der x-Achse ist die Peroxidase aufgetragen, auf der y-Achse das Streulichtverhalten. Im Basokanal (1b) sind die polymorphkernigen (5) und die mononukleären Leukozyten (6) sowie die basophilen Granulozyten (7) zu sehen. Bei Patient 4 (2a) lassen sich die einzelnen Zellpopulationen im Perox-Kanal nicht voneinander abgrenzen. Im Baso-Kanal (2b) sind die meisten Zellen nicht polymorphkernig, sondern im mononukleären Bereich.

Die einzelnen Zellpopulationen ließen sich im Vollblut durch den Advia 120 bei Kontrollperson 1 deutlich voneinander abgrenzen. Man erkennt die Myeloperoxidase – und granularen neutrophilen Granulozyten oben rechts, darunter die Eosinophilen Granulozyten. Links von den Granulozyten sind die Monozyten und links unten die Lymphozyten. Bei Patient 4 war eine Unterscheidung der einzelnen Zellpopulationen nicht möglich. Im Perox-Kanal ist teilweise eine massive Streuung nach rechts zu beobachten. Die Zellen im LUC-Feld können frühe Peroxidase-negative Leukämie-Vorstufen sein. Im Baso-Kanal sind bei diesem Patienten viele Zellen im Bereich der nicht-polymorphen Kernmorphologie (Monozyten, Lymphozyten und Blasten) dargestellt, was ein Hinweis auf eine myeloische Leukämie ist.

Tabelle 2: Vergleich Blutausstrichauszählung Patient 4 mit Advia 120-Messung

Patient 4	Blutausstrich	Advia 120
Tag 1		
Leukozyten gesamt	-	24,09 Mio/ml
Reife Neutrophile	68 %	37,3 %
Stabkernige Neutrophile	9 %	-
LUCs	-	36 %
Monozyten	9 %	21,4 %
Lymphozyten	9 %	4,4 %
Tag 2		
Leukozyten gesamt	-	22,95 Mio/ml
Reife Neutrophile	82 %	36,8 %
Stabkernige Neutrophile	11 %	-
LUCs	-	28,5 %
Monozyten	3 %	27,4 %
Lymphozyten	3 %	6,1 %
Tag 3		
Leukozyten gesamt	-	29,94 Mio/ml
Reife Neutrophile	81 %	42,2 %
Stabkernige Neutrophile	5%	-
LUCs	-	29,9%
Monozyten	1 %	21,6 %
Lymphozyten	12 %	5,3 %

Einige Werte wie zum Beispiel der Anteil stabkerniger (unreifer) Granulozyten können mit dem Advia 120 nicht ermittelt werden und sind mit einem Strich (-) gekennzeichnet. LUC = large unstained cells

Wie in Abbildung 21 ersichtlich, war der Anteil unreifer stabkerniger Neutrophiler bei allen Patienten erhöht und lag teilweise über 20 %, nahm aber im zeitlichen Verlauf deutlich ab. Bei der Sepsis werden auch unreife neutrophile Granulozytenformen aus dem Knochenmark ins Blut ausgeschüttet, die vom Advia 120 nicht mit Sicherheit ausgezählt werden können. Die Gesamtleukozytenzahl ermittelt der Advia nicht durch Zählung der Peroxidase-positiven

Zellen, sondern mit Hilfe des „Baso-Kanals“ durch Messung der Zellkernformen. Deshalb kann diese Zahl übernommen werden. Bei Patient 4 gab der Advia 120, wie in Tabelle 2 ausgeführt wird, den Anteil von reifen Neutrophilen an der Gesamtzellzahl am ersten Tag mit 37 % an im Gegensatz zu 68 % Neutrophilen, die bei Auszählung des Blutausstrichs am Mikroskop ermittelt wurden. Am zweiten Tag gab der Advia 120 wiederum 37 % an, obwohl die mikroskopische Untersuchung 82 % Neutrophile ergab. Am dritten Tag wurden im Advia 120 42 % Neutrophile gezählt, unter dem Mikroskop aber 81 %. Bei Patient 4 schienen also nur ungefähr 40 % der Neutrophilen „normale“ Myeloperoxidaseaktivität zu enthalten. Gleichzeitig war eine enorme Zahl von ca. 30 % LUCs (large unstained cells) zu detektieren (Normalbereich 0 bis 4,7 %). Die enorme Anzahl an großen unidentifizierten Zellen könnte ein Hinweis auf eine myeloische Leukämie sein.

Zusammenfassung: Bei den Sepsispatienten lagen im Blut erhöhte Leukozytenzahlen mit erhöhten Anteilen reifer und unreifer neutrophiler Granulozyten vor, die sich im Behandlungsverlauf bei den überlebenden Patienten zumeist wieder verringerten. Die Verstorbenen wiesen besonders hohe Leukozytenzahlen im Blut auf. Bei den Überlebenden ließen sich zu Beginn der Erkrankung mehr unreife Neutrophile im Blut beobachten als bei den Verstorbenen. Bei Patient 4 wurden durch Auszählung der Blutausstriche im Mikroskop wesentlich mehr neutrophile Granulozyten detektiert als mit dem Advia 120. Dies deutet auf eine myeloische Leukämie mit erworbener Myeloperoxidasedefizienz bei diesem Patienten hin. Das könnte mit eine Ursache für den letalen Verlauf der Erkrankung gewesen sein.

4.2.2 FACS-Untersuchungen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS-Methode)) kann die Expression bestimmter Moleküle auf der Oberfläche von Zellen durch Bindung von gegen diese Strukturen gerichteter fluoreszenzmarkierter Antikörper untersucht werden. Ausgewertet wurde entweder wie hoch der Anteil an Zellen war, die die gesuchten Moleküle auf der Oberfläche exprimierten oder wie stark die Leuchtintensität der einzelnen Zellen war, um Rückschlüsse auf die durchschnittliche Oberflächenexpression ziehen zu können. Bei der Prozentauswertung handelt es sich also eher um eine qualitative, bei der Auswertung der Leuchtintensität um eine quantitative Auswertung. Mit dem Phagozytose-Test konnte untersucht werden, wie viele der neutrophilen Granulozyten FITC-markierte E. coli durch Phagozytose aufgenommen haben (Prozentauswertung) und über die Leuchtstärke konnten Rückschlüsse auf das Ausmaß der Phagozytose der einzelnen Zelle gezogen werden (mittlere Zellfluoreszenz).

4.2.2.1 Phagozytose von fluoreszierenden E. coli

Untersuchung des Anteils fluoreszierender Zellen

Die Fähigkeit der Granulozyten zur Phagozytose wurde mit FITC-markierten E. coli-Bakterien durchflusszytometrisch untersucht und der Anteil fluoreszierender Zellen ausgewertet.

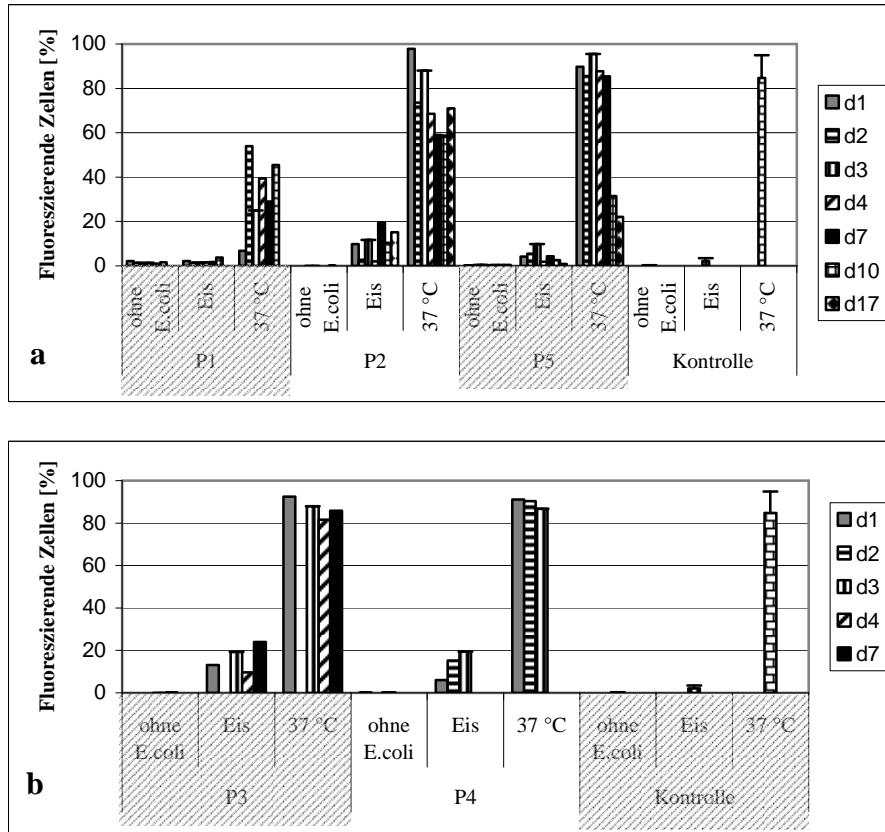


Abbildung 23: Untersuchung des Anteils phagozytierender Granulozyten. Granulozyten von Sepsispatienten wurden durch Inkubation bei 37°C mit FITC-markierten E. coli untersucht. Es wurde der Anteil fluoreszierender Zellen ermittelt. a) Überlebende, b) Verstorbene. Kontrolle: Granulozyten von 5 gesunden Spendern (n=5, MW +/- S.D). Als Negativkontrolle dienten Proben ohne Zugabe von E.coli und für die Eiskontrolle wurden die Granulozyten mit Bakterien auf Eis inkubiert. Bei Patient 3 wurde Tag 2 nicht untersucht.

Sowohl bei den Kontrollpersonen als auch bei den Sepsispatienten phagozytierten fast alle Granulozyten die FITC-markierten E.coli-Bakterien, nur der überlebende Patient 1 zeigte einen geringeren Anteil phagozytierender Zellen. Bei den Überlebenden schien der Anteil phagozytierender Zellen im Verlauf der Studie etwas abzunehmen. Ein Problem waren die Eiskontrollen, die bei einigen Patienten leider mit bis zu 20 % sehr hoch waren. Die Inkubation auf Eis sollte die Aufnahme der Bakterien durch Granulozyten stark einschränken, was bei den Kontrollgranulozyten auch stets der Fall war. Eventuell handelt es sich um ein Anlagerungsproblem, bei dem sich die fluoreszierenden Bakterien an die Granulozyten anhefteten.

Untersuchung der Leuchtintensität

Die Fähigkeit der Granulozyten zur Phagozytose wurde mit FITC-markierten E. coli-Bakterien durchflusszytometrisch untersucht und die durchschnittliche Leuchtintensität ausgewertet.

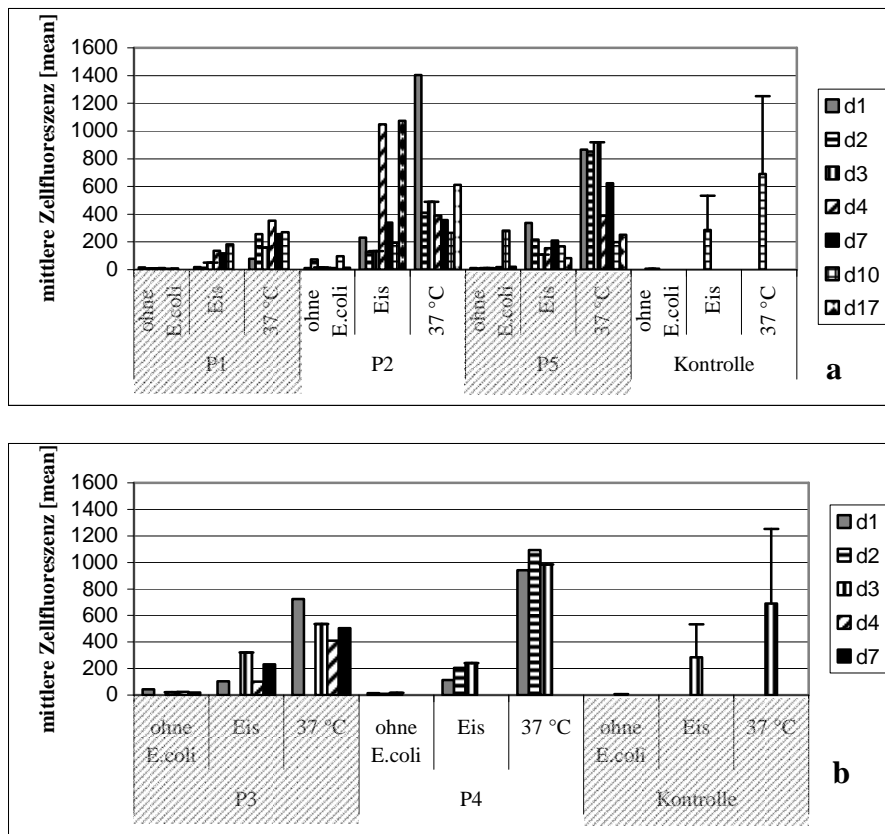


Abbildung 24: Untersuchung der Phagozytoseintensität von Granulozyten
Die Phagozytose der Granulozyten von Sepsispatienten wurde durch Inkubation bei 37°C mit FITC-markierten *E. coli* untersucht. Es wurde die Leuchtintensität ermittelt. a) Überlebende, b) Verstorbene
Kontrolle: Granulozyten von 5 gesunden Spendern ($n=5$, MW \pm S.D). Als Negativkontrolle dienten Proben ohne Zugabe von *E.coli* und für die Eiskontrolle wurden die Granulozyten mit Bakterien auf Eis inkubiert. Bei Patient 3 wurde Tag 2 nicht untersucht.

Die Aufnahme von *E. coli* in Granulozyten war bei der Untersuchung der mittleren Leuchtintensität einer Zelle bei den überlebenden Sepsispatienten ähnlich wie bei der Kontrollgruppe, wobei die Granulozyten von Patient 1 eine wesentlich verminderte Phagozytoseintensität aufwiesen. Bei den verstorbenen Patienten wiesen die Zellen von Patient 3 eine eher verminderte Phagozytoseaktivität auf, während die Granulozyten von Patient 4 eine verstärkte Phagozytoseintensität zeigten. Patient 3 verstarb am 9. Tag und wurde wie im Studienprotokoll vorgesehen zuletzt am 4. Tag untersucht, so dass keine Aussage über die Phagozytose kurz vor dem Tod getroffen werden kann.

Zusammenfassung: Sowohl bei den Sepsispatienten als auch bei den Kontrollen war der Anteil phagozytischer Granulozyten sehr hoch. Nur Patient 1 bildete mit einem geringeren Anteil phagozytischer Zellen eine Ausnahme. Im Verlauf der Studie nahm bei den meisten Patienten der Anteil phagozytischer Zellen ab, außer bei den beiden verstorbenen Patienten 3 und 4.

Die durchschnittliche Leuchtintensität, also die Menge phagozytierter E. coli- Bakterien, war bei den überlebenden Patienten ähnlich wie bei der Kontrollgruppe. Als Ausnahme wies Patient 1 eine verminderte Phagozytoseintensität auf. Bei den verstorbenen Patienten war bei Patient 3 eine niedrige Phagozytoseaktivität zu beobachten, während der verstorbene MPO-defiziente Patient 4 eine verstärkte Phagozytoseintensität aufwies.

4.2.2.2 Integrine und Selektine

Auf Leukozyten werden spezifische Oberflächenmarker exprimiert, unter anderem Adhäsionsmoleküle wie Selektine. L-Selektin (CD62L) kommt nur auf Leukozyten vor und befähigt die im Blut zirkulierenden Granulozyten zur vorübergehenden kurzen Anheftung an die Endothelzellen der Blutgefäße mit anschließendem Abrollen und erneutem Mitschwimmen im Blutstrom („Rolling“). Auf der Oberfläche von Endothelzellen wird E-Selektin exprimiert und P-Selektin kommt auf Blutplättchen vor. Im Entzündungsfall erlaubt die Bildung von Integrinen (z.B. CD 11b und CD18) den Granulozyten die feste Anheftung an die Endothelzellen. Durch Schwellung der Endothelzellen und durch Granula-Elastase lockert sich die Extrazelluläre Matrix (ECM) und die Granulozyten können sich aus der Blutbahn ins Gewebe „quetschen“. Dort folgen sie chemotaktischen Reizen entlang eines Gradienten, beispielsweise NfMLP (N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), das von Bakterien gebildet wird.

L-Selektin (CD62L)

Untersuchung des Anteils fluoreszierender Zellen

Die Expression des auf Leukozyten vorkommenden Selektins CD62L wurde durchflusszytometrisch mit FITC-markiertem Antikörper untersucht und der Anteil fluoreszierender Zellen ermittelt.

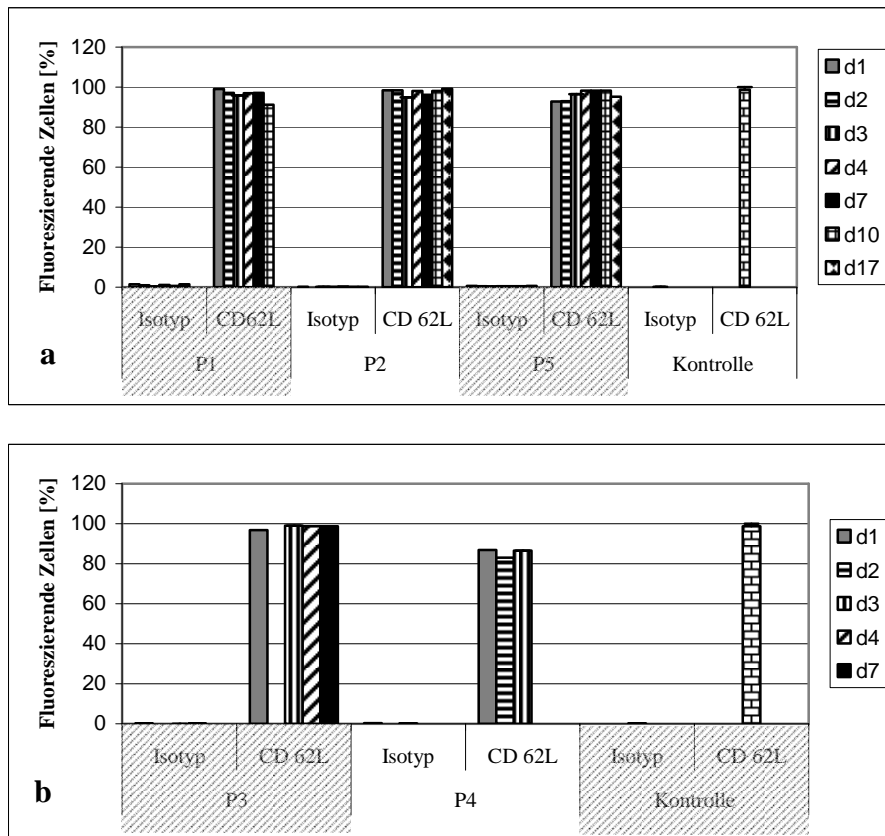


Abbildung 25: Untersuchung des Anteils L-Selektin-exprimierender Granulozyten

Die Expression von L-Selektin (CD62L) der Granulozyten von Sepsispatienten wurde durch Inkubation mit FITC-gekoppeltem Antikörper untersucht und mit Granulozyten von gesunden Spendern verglichen. Es wurde der Anteil fluoreszierender Zellen ermittelt. a) Überlebende, b) Verstorbene. Kontrolle: Granulozyten von 5 gesunden Spendern ($n=5$, MW \pm S.D). Als Negativkontrolle dienen Proben mit Zugabe von mausspezifischem Kontrollantikörper ($\gamma 1a/\gamma 2$, Isotyp). Bei Patient 3 wurde Tag 2 nicht untersucht.

Der Anteil L-Selektin-exprimierender Granulozyten war bei den Sepsispatienten ebenso hoch wie bei den Kontrollzellen und lag bei annähernd 100 %. Nur Patient 4 zeigte mit knapp über 80 % verringerte Werte an den ersten 3 Tagen der Untersuchung und verstarb am 4. Tag. Der Anteil L-Selektin-exprimierender Zellen war beim ebenfalls verstorbenen Patienten 3 nicht verringert. Die Isotyp-Kontrollen wurden mit Mausantikörper ($\gamma 1a/\gamma 2$) gefärbt, der nicht an humane Zellen binden kann. Erwartungsgemäß waren die Expressionswerte sehr gering (unter 1 %).

Untersuchung der Leuchtintensität

Die Expression des auf Leukozyten vorkommenden L-Selektins CD62L wurde durchflusszytometrisch mit FITC-markiertem Antikörper untersucht und die durchschnittliche Leuchtintensität ermittelt.

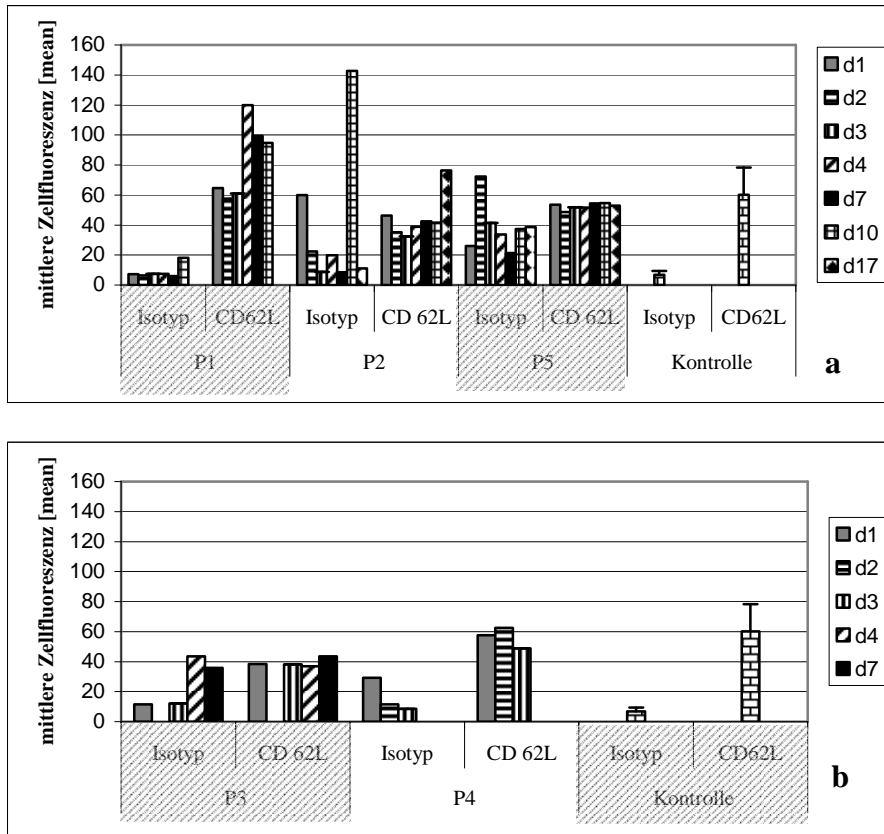


Abbildung 26: Untersuchung der L-Selektin-Expressionsintensität

Die Expression von L-Selektin (CD62L) der Granulozyten von Sepsispatienten wurde durch Inkubation mit FITC-gekoppeltem Antikörper untersucht und mit Granulozyten von gesunden Spendern verglichen. Es wurde die durchschnittliche Leuchtintensität ermittelt. a) Überlebende, b) Verstorbene. Die Kontrolle bestand aus Granulozyten von 5 gesunden Spendern ($n=5$, MW \pm S.D) und gilt für beide Gruppen von Sepsispatienten als Vergleichsgruppe. Als Negativkontrolle dienten Proben mit Zugabe von mausspezifischem Kontrollantikörper ($\gamma 1a/\gamma 2$, Isotyp). Bei Patient 3 wurde Tag 2 nicht untersucht.

Für die CD62L-Expressionsintensität ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse bei den Sepsispatienten. Die meisten Überlebenden exprimierten weniger CD62L auf der Granulozytenoberfläche als die Kontrollgranulozyten, gegen Ende des Krankheitsverlaufes stiegen die Werte oft wieder an. Patient 1 wies eine erhöhte CD62L-Expression auf. Bei den verstorbenen Patienten ließ sich bei den Granulozyten von Patient 3 eine verringerte CD62L-Expression beobachten, während bei Patient 4 keine Änderung im Vergleich zur Kontrolle festzustellen war. Nur am letzten Tag vor dem Tod fiel die Expression etwas ab. Die teilweise hohen Isotyp-Werte lassen sich vielleicht dadurch erklären, dass die Maus-Antikörper durchaus in der Lage sind, an Trümmer von humanen Zellen zu binden. Auch bei der Auswertung des Anteils sind die Werte für die Isotyp-Kontrollen niemals 0. Wenn nur einige fluoreszierende Antikörpermoleküle an wenige Zellen angelagert sind, so ergibt dies in der Prozentauswertung für die Isotypkontrolle zwar nur einen geringen Anteil fluoreszierender Zellen, aber bei der Auswertung der durchschnittlichen Fluoreszenz kann ein hoher Wert angegeben werden, weil sich an diese Trümmer viele Antikörpermoleküle unspezifisch anlagern. Eventuell ergibt sich die Fluoreszenzintensität dieser Moleküle durch Clusterbildung der Antikörpermoleküle. Bei den Granulozyten der Gesunden waren die Werte der Isotyp-Kontrollen auch bei Auswertung der durchschnittlichen Expression gering, wahrscheinlich sind bei den Granulozyten der Sepsis-Patienten teilweise mehr „Trümmer“ vorhanden.

Zusammenfassung: Der Anteil CD62L-positiver Granulozyten war bei den überlebenden Patienten unverändert im Vergleich zur Kontrolle. Beim verstorbenen MPO-defizienten Patienten 4 war der Anteil CD62L-exprimierender Granulozyten verringert.

Die durchschnittliche CD62L-Dichte auf der Zelloberfläche war bei den überlebenden Patienten im Vergleich zu den Kontrollen verringert. Nur Patient 1 exprimierte im Behandlungsverlauf mehr CD62L als die Kontrollgranulozyten. Bei den verstorbenen Patienten wies Patient 3 eine verringerte CD62L-Expression auf, während bei Patient 4 kein Unterschied zu den Kontrollgranulozyten festgestellt werden konnte. Einen Tag vor dem Tod sank die Expression etwas ab.

4.2.2.3 Integrine (CD11b und CD18)

CD11b und CD18 bilden die beiden Untereinheiten des Integrins Mac1. Im Entzündungsfall wird dieses Integrin hochreguliert.

Integrin CD11b

Untersuchung des Anteils fluoreszierender Zellen

Die CD11b-Expression wurde mit FITC-markiertem Antikörper untersucht und der Anteil fluoreszierender Granulozyten ermittelt.

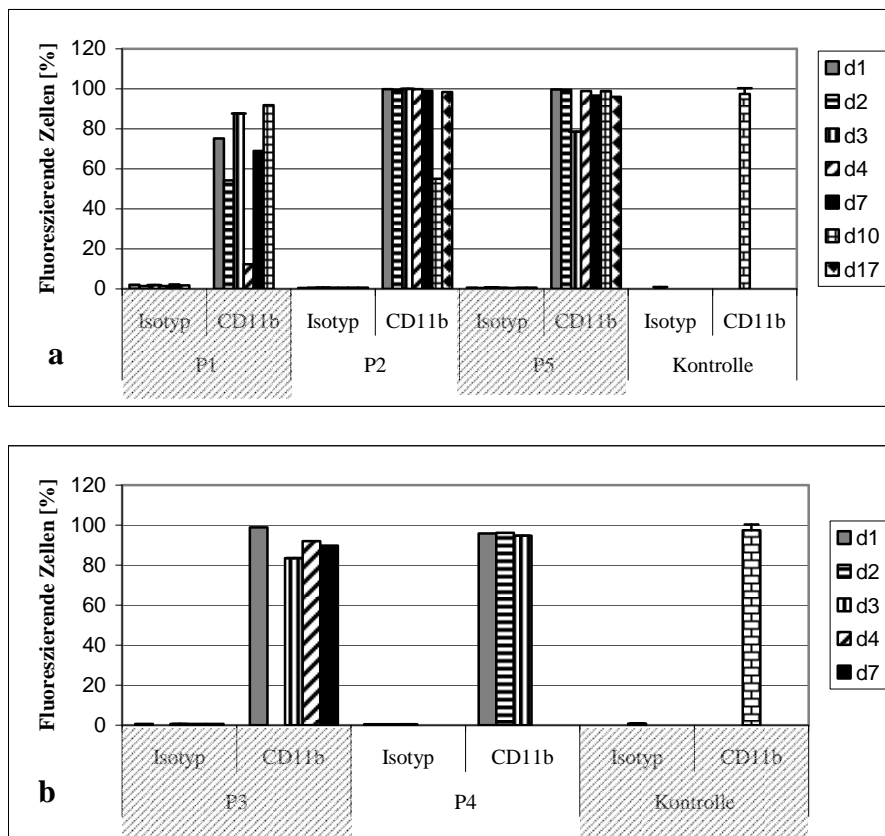


Abbildung 27: Untersuchung des Anteils CD11b-exprimierender Granulozyten

Die Expression von Integrin (CD11b) der Granulozyten von Sepsispatienten wurde durch Inkubation mit FITC-gekoppeltem Antikörper untersucht. Es wurde der Anteil fluoreszierender Zellen ermittelt. a) Überlebende, b) Verstorbene. Kontrolle: Granulozyten von 5 gesunden Spendern ($n=5$, MW \pm S.D). Als Negativkontrolle dienten Proben mit Zugabe von mausspezifischem Kontrollantikörper ($\gamma 1a/\gamma 2$, Isotyp). Bei Patient 3 wurde Tag 2 nicht untersucht.

Fast alle Kontrollgranulozyten exprimierten CD11b auf der Zelloberfläche. Bei den überlebenden Sepsispatienten war keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle festzustellen, nur bei Patient 1 exprimierte ein geringerer Anteil der Zellen CD11b.

Bei den verstorbenen Patienten war kein Unterschied zur Kontrollgruppe festzustellen.

Die Isotyp-Kontrollen waren sowohl bei den Kontrollen als auch den Sepsispatienten sehr gering, unter 1 %.

Untersuchung der Leuchtintensität

Die CD11b-Expression wurde mit FITC-markiertem Antikörper untersucht und die durchschnittliche Leuchtintensität ermittelt.

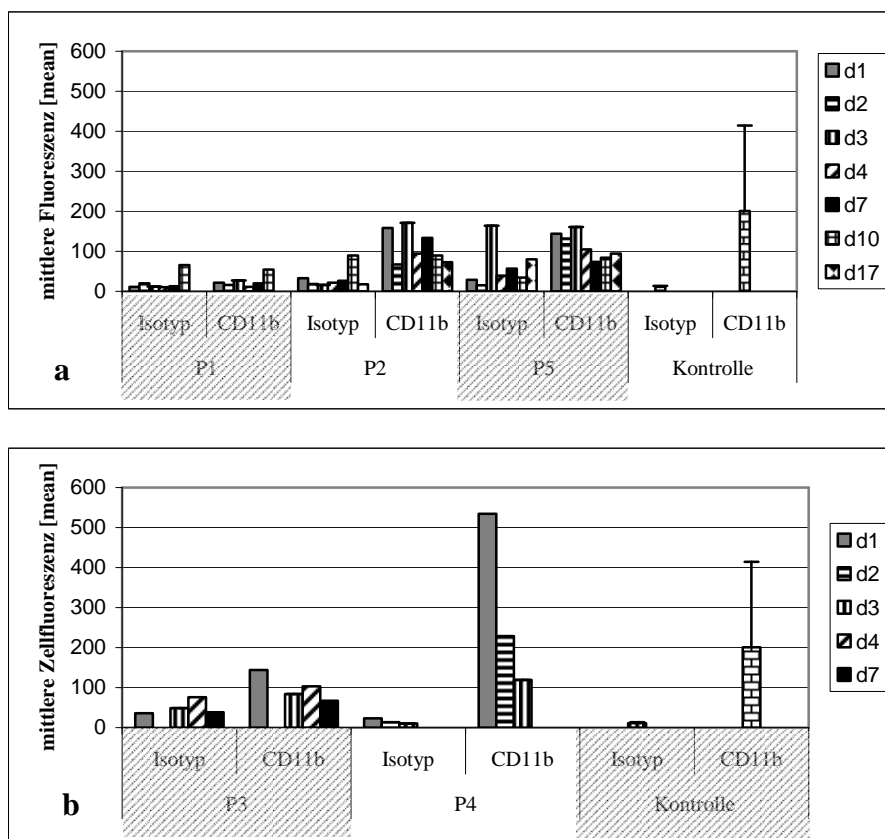


Abbildung 28: Untersuchung der CD11b-Expressionsintensität

Es wurde die durchschnittliche Leuchtintensität mit FITC-gekoppeltem CD11b-Antikörper ermittelt. a) Überlebende, b) Verstorbene. Kontrolle: Granulozyten von 5 gesunden Spendern ($n=5$, MW \pm S.D). Als Negativkontrolle dienten Proben mit Zugabe von mausspezifischem Kontrollantikörper ($\gamma 1a/\gamma 2$, Isotyp). Bei Patient 3 wurde Tag 2 nicht untersucht.

Die Kontrollen wiesen eine durchschnittliche Zellfluoreszenzintensität von ungefähr 200 auf. Die überlebenden Patienten zeigten eine geringere CD11b-Verteilung auf den Granulozyten, am wenigsten CD11b exprimierten die Zellen von Patient 1. Bei den verstorbenen Patienten wies Patient 3 ebenso wie die Überlebenden eine verringerte CD11b-Expression auf, während sich bei Patient 4 eine verstärkte CD11b-Dichte auf den Granulozyten beobachten ließ, die am Tag vor dem Tod absank. Kurz vor dem Tod wiesen die verstorbenen Patienten die niedrigsten Expressionswerte auf.

Ein Problem waren die Isotyp-Werte, die manchmal sehr hoch sind. Eventuell bindet hier der Mausantikörper unspezifisch in Clustern (siehe Erklärung bei Selektin CD62L).

Zusammenfassung: Bei den überlebenden Sepsispatienten exprimierte ein gleich großer Anteil an Granulozyten CD11b wie bei der Kontrollgruppe. Nur bei Patient 1 war der Anteil CD11b-exprimierender Zellen vermindert. Bei den verstorbenen Patienten 3 und 4 war kein Unterschied zur Kontrollgruppe zu beobachten.

Die überlebenden Sepsispatienten exprimierten weniger CD11b pro Granulozyt als die Kontrollen, ebenso der verstorbene Patient 3. Der verstorbene Patient 4 wies eine höhere CD11b-Expression auf der Zelloberfläche auf als die Kontrollzellen. Kurz vor dem Tod wiesen beide verstorbenen Patienten die niedrigsten Expressionswerte auf.

Integrin CD18

Untersuchung des Anteils fluoreszierender Zellen

Die CD18-Expression wurde mit FITC-markiertem Antikörper untersucht und der Anteil fluoreszierender Zellen ermittelt.

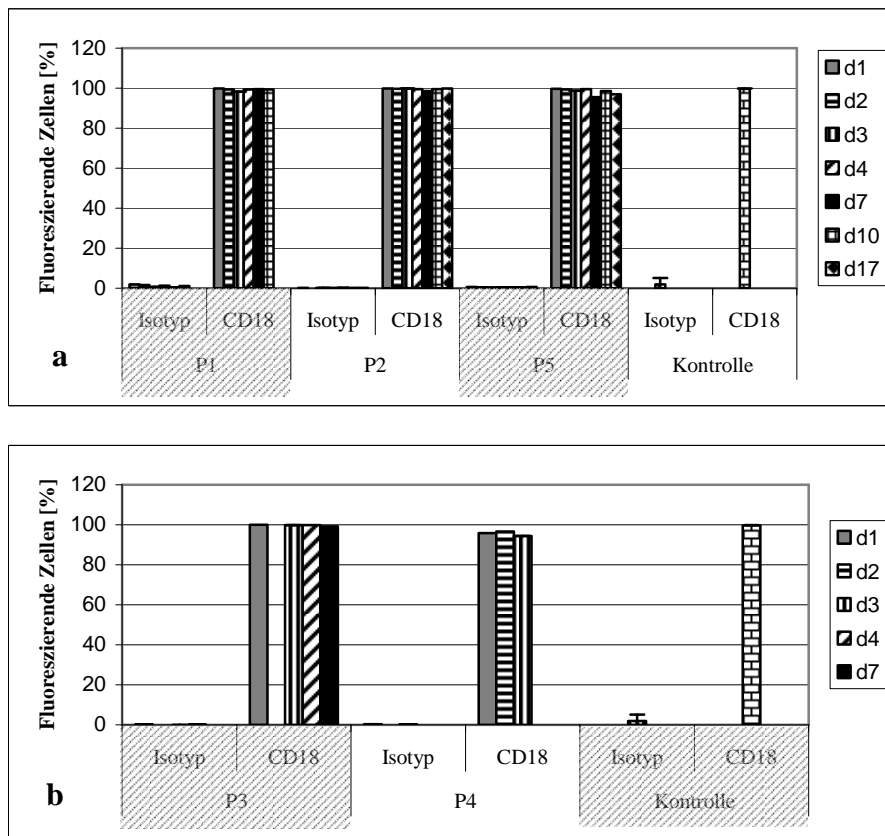


Abbildung 29: Untersuchung des Anteils CD18-exprimierender Granulozyten

Es wurde der Anteil fluoreszierender Zellen von Granulozyten von Sepsispatienten mit Hilfe eines FITC-gekoppelten CD18-Antikörpers untersucht. a) Überlebende, b) Verstorbene. Die Kontrolle bestand aus Granulozyten von 5 gesunden Spendern ($n=5$, MW \pm S.D). Als Negativkontrolle dienten Proben mit Zugabe von mausspezifischem Kontrollantikörper ($\gamma 1a/\gamma 2$, Isotyp). Bei Patient 3 wurde Tag 2 nicht untersucht.

Beim Anteil CD18-exprimierender Zellen gab es kaum Unterschiede, weder zwischen den Sepsispatienten und der Kontrollgruppe noch zwischen den überlebenden und den verstorbenen Sepsispatienten. Nur beim verstorbenen Patienten 4 zeigte sich ein minimal verringerter Anteil CD18-exprimierender Granulozyten. Allerdings waren diese Unterschiede so gering, dass sie wohl eher den natürlichen Schwankungen zuzurechnen sind.

Untersuchung der Leuchtintensität

Die CD18-Expression wurde mit FITC-markiertem Antikörper untersucht und die

durchschnittliche Leuchtintensität ermittelt.

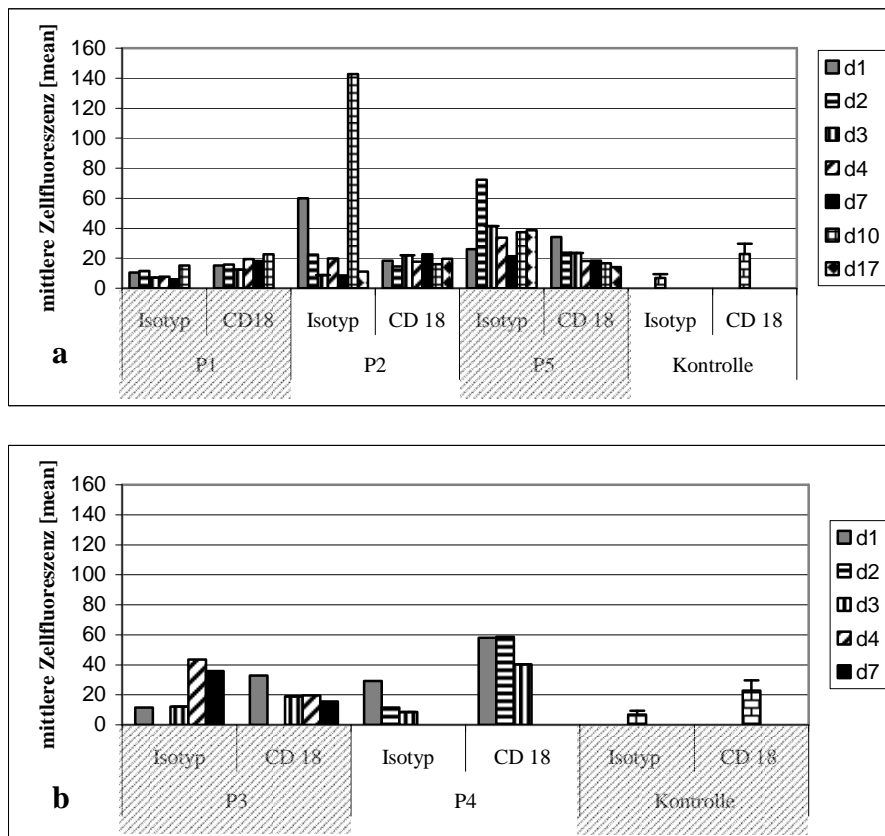


Abbildung 30: Untersuchung der CD18-Expressionsintensität

Es wurde die durchschnittliche Leuchtintensität von Granulozyten von Sepsispatienten mit FITC-gekoppeltem CD18-Antikörper untersucht. a) Überlebende, b) Verstorbene. Kontrolle: Granulozyten von 5 gesunden Spendern ($n=5$, MW \pm S.D). Als Negativkontrolle dienten Proben mit Zugabe von mausspezifischem Kontrollantikörper ($\gamma 1a/\gamma 2$, Isotyp). Bei Patient 3 wurde Tag 2 nicht untersucht.

Zwischen den überlebenden Sepsispatienten und der Kontrollgruppe ließ sich kein Unterschied im Hinblick auf die CD18-Expression der Granulozyten feststellen, nur Patient 5 besaß am ersten Untersuchungstag eine erhöhte Expression. Die Expressionsintensität war beim verstorbenen Patienten 3 genauso wie bei der Kontrollgruppe, während Patient 4 eine verstärkte CD18-Expression aufwies.

Teilweise war der Isotypwert höher als die CD18-Expression. Die erhöhten Isotypenwerte ließen sich nur bei den Sepsispatienten und nicht bei den Kontrollen feststellen. Eventuell binden die Mausantikörper an die vielleicht vermehrt bei den Sepsisgranulozyten vorkommenden Trümmer (siehe Erklärung im Abschnitt über die durchschnittliche

Leuchtintensität bei Selektin CD62L).

Zusammenfassung: Der Anteil CD18-exprimierender Granulozyten war bei allen Sepsispatienten gleich wie bei der Kontrollgruppe.

Die CD18-Expression pro Zelle war bei den Patienten und den Kontrollen gleich, nur bei Patient 4 war sie deutlich höher.

4.2.2.4 Toll-like-Rezeptor 2 und 4

Toll-like-Rezeptoren (TLR) befinden sich auf weißen Blutzellen. Sie dienen der Erkennung bestimmter bakterieller Oberflächenproteine, der sogenannten PAMPs (pathogen-associated molecular pattern). Es gibt viele verschiedene TLRs. So erkennen TLR2-Moleküle Lipoteichonsäuren in der Zellwand von Gram-positiven Bakterien wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus*. TLR4-Moleküle erkennen Lipopolysaccharid in der Zellwand von Gram-negativen Bakterien wie zum Beispiel *Escherichia coli*.

Untersuchung des Anteils fluoreszierender Zellen

Die Expression von TLR2 und 4 wurde mit PE-markiertem Antikörper untersucht und der Anteil fluoreszierender Zellen ermittelt.

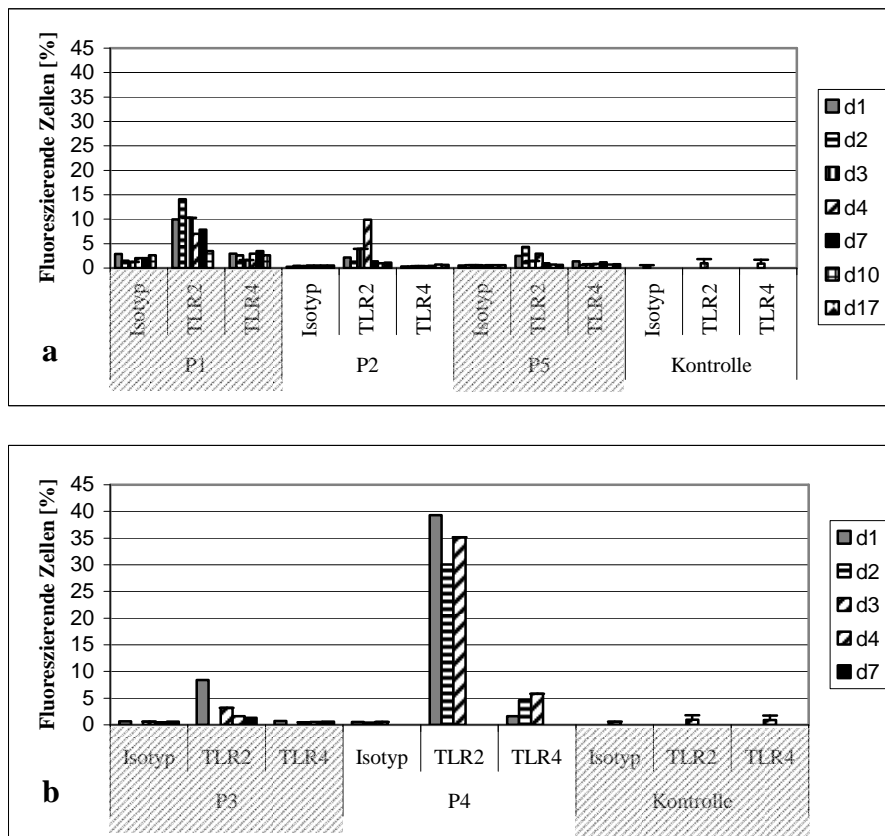


Abbildung 31: Untersuchung des Anteils an TLR-exprimierenden Granulozyten

Der Anteil TLR2- und 4- fluoreszierender Granulozyten von Sepsispatienten wurde durch Inkubation mit PE-gekoppeltem Antikörper untersucht. a) Überlebende, b) Verstorbene. Kontrolle: Granulozyten von 5 gesunden Spendern ($n=5$, MW \pm S.D). Als Negativkontrolle dienten Proben mit Zugabe von mausspezifischem Kontrollantikörper ($\gamma 1a/\gamma 2$, Isotyp). Bei Patient 3 wurde Tag 2 nicht untersucht.

Nur wenige der Kontrollgranulozyten exprimierten TLR2 und 4 auf der Oberfläche. Bei den überlebenden Patienten war der Anteil TLR2-positiver Zellen erhöht, besonders bei Patient 1, bei dem zusätzlich auch der Anteil TLR4-exprimierender Granulozyten erhöht war. Die verstorbenen Patienten wiesen ebenfalls einen hohen Anteil TLR2-exprimierender Granulozyten auf, vor allem bei Patient 4 war dieser Anteil mit 40 % sehr hoch. Allerdings war es bei diesem Patienten sehr schwer, die Granulozytenwolke von der Monozytenwolke zu trennen (siehe Abbildung 32). Dies ist deshalb von Bedeutung, weil Monozyten mehr TLR exprimieren als Granulozyten. Auch der Anteil TLR4-exprimierender Zellen ist bei diesem

Patienten erhöht.

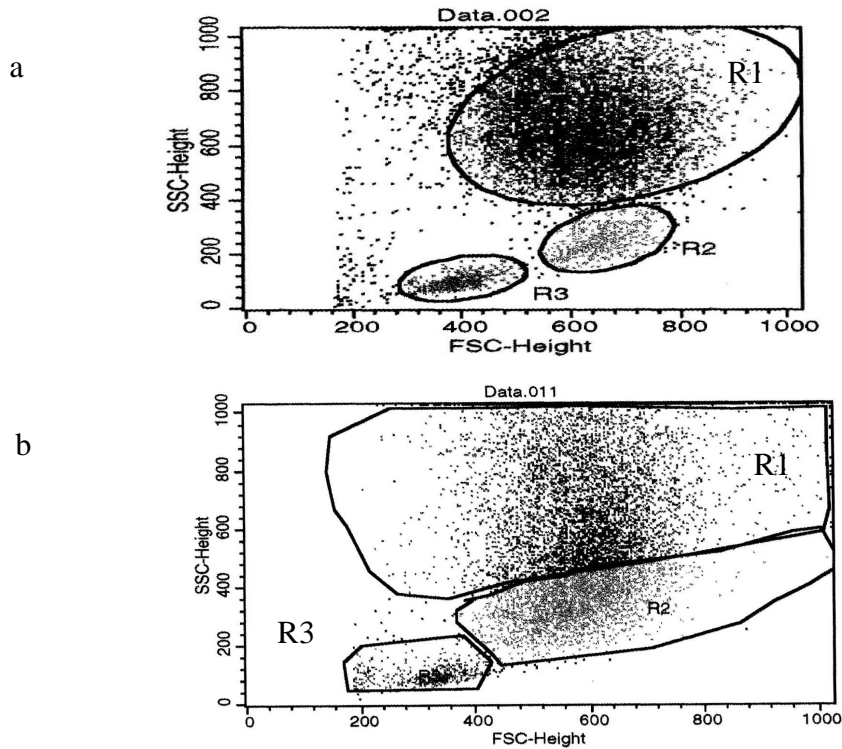


Abbildung 32: Blutzellen von Sepsispatienten im FACS

Im FACS-Dot Plot werden die Blutzellen nach Färbung mit TLR2-PE anhand von Größe (FSC) und Streuungsverhalten (SSC) in Granulozyten (R1), Monozyten (R2) und Lymphozyten (R3) unterschieden. a) Patient 1 am ersten Studientag, b) Patient 4 am ersten Studientag

Im FACS lassen sich die einzelnen Zellpopulationen weißer Blutkörperchen im Blut (Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten) im Dot Plot gut darstellen, indem die Zellgröße und das Streulichtverhalten gegeneinander aufgetragen werden. Bei Sepsispatient 1 in Abbildung 32 a) waren alle drei Populationen deutlich voneinander abgegrenzt.

Die Blutzellen von Patient 4 zeigten dagegen zwar Lymphozyten, aber die Monozyten und Granulozyten waren als eine einzige große Zellpopulation nicht voneinander abgrenzbar (siehe Abbildung 32 b).

Untersuchung der Leuchtintensität einer Zelle

Die Expression von TLR2 und 4 wurde mit PE-markiertem Antikörper untersucht und die durchschnittliche Leuchtintensität ermittelt.

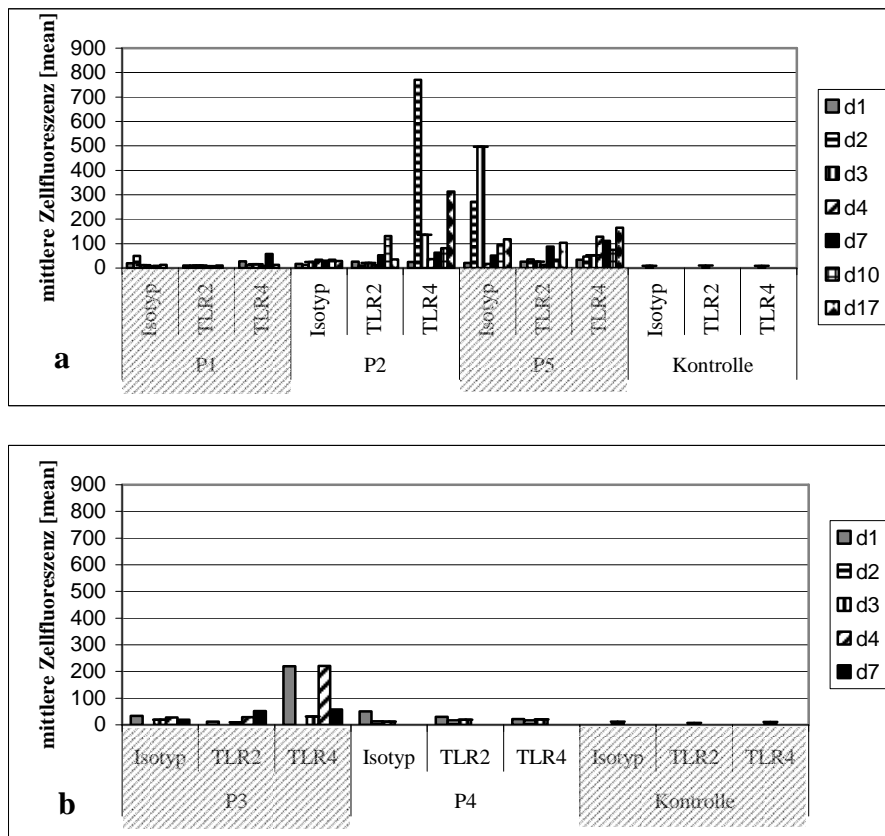


Abbildung 33: Untersuchung der TLR-Expressionsintensität

Die durchschnittliche Leuchtintensität für TLR2 und 4 auf den Granulozyten von Sepsispatienten wurde durch Inkubation mit PE-gekoppeltem Antikörper untersucht und mit Granulozyten von gesunden Spendern verglichen. a) Überlebende, b) Verstorbene. Kontrolle: Granulozyten von 5 gesunden Spendern ($n=5$, MW \pm S.D). Als Negativkontrolle dienten Proben mit Zugabe von mausspezifischem Kontrollantikörper ($\gamma 1a/\gamma 2$, Isotyp). Bei Patient 3 wurde Tag 2 nicht untersucht.

Bei den Kontrollgranulozyten war die TLR-Expression sehr gering, sowohl für TLR2 als auch für TLR4. Die Granulozyten der überlebenden Patienten zeigten eine verstärkte TLR2-Expression, nur bei Patient 1 blieb die Expression gleich. Die Expressionsintensität von TLR4 war bei allen überlebenden Patienten erhöht, besonders bei Patient 2. Bei den verstorbenen Patienten war die TLR2-Expressionsintensität erhöht, ebenso die TLR4-Rezeptordichte auf den Granulozyten, insbesondere bei Patient 3, wobei die Intensität der TLR2 und TLR4-Expression bei Patient 4 im Vergleich zu den anderen Patienten schwächer ausgeprägt war. Insgesamt war die durchschnittliche TLR4-Expression bei den Sepsispatienten stärker

ausgeprägt als die TLR2-Expression. Bei den Kontrollen gab es keinen Unterschied.

Zusammenfassung: Bei den Kontrollgranulozyten exprimierte nur ein sehr geringer Anteil TLR2 und 4 auf der Zelloberfläche und es war kein Unterschied zwischen dem Prozentsatz TLR2- und TLR4-exprimierender Granulozyten feststellbar. Bei allen Sepsispatienten exprimierte ein großer Anteil an Zellen TLR2 auf der Zelloberfläche, während der Anteil TLR4-exprimierender Zellen nur bei dem überlebenden Patienten 1 und bei dem verstorbenen MPO-defizienten Patienten 4 erhöht war.

Die Intensität der TLR2-Expression war bei den meisten überlebenden Patienten erhöht. Ebenso war die TLR4-Expression bei den Granulozyten der überlebenden Patienten erhöht, besonders bei Patient 2. Auch die Verstorbenen wiesen eine erhöhte TLR2- und TLR4-Expressionsintensität auf, wobei besonders Patient 3 viel TLR4 pro Zelle exprimierte. Insgesamt war bei den Sepsispatienten die TLR4-Expression stärker ausgeprägt als die TLR2-Expression.

Bei den Granulozyten von Sepsispatienten scheint also ein größerer Anteil der Zellen TLR2 auf der Zelloberfläche zu exprimieren, aber dafür scheint die Rezeptordichte auf diesen Zellen für TLR4 stärker zu sein.

Interessant ist hier der Zusammenhang mit den Infektionen der Patienten. Bei Patient 2 und bei Patient 5 wurde *E. coli* nachgewiesen, das als Gram-negatives Bakterium LPS besitzt und somit die hohe TLR4-Expression bei diesen Patienten induzieren kann. Bei Patient 4 wurde *Staphylococcus aureus* nachgewiesen, das als Gram-positives Bakterium Lipoteichonsäure in der Zellwand besitzt und deshalb, so wie beobachtet, die Expression von TLR2 induzieren kann.

4.2.3 Untersuchung der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen an isolierten Granulozyten

Granulozyten bilden beim oxidativen Burst reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS). Nach der bisherigen Lehrmeinung kommt es über verschiedene Zwischenstufen wie Superoxidanion und Wasserstoffperoxid zur Bildung hypochloriger Säure (HOCl), die auf Mikroorganismen stark abtötend wirkt. Nach einer neuen Theorie kommt es durch die Bildung des negativ geladenen Superoxidanions mit nachfolgendem Einstrom von positiv geladenen Ionen zur Alkalisierung des Zellmilieus und in weiterer Folge zur Aktivierung bestimmter intrazellulärer Enzyme, wie z. B. der Elastase. Diese ermöglicht den Granulozyten die Abtötung von Mikroorganismen. Eventuell sind beide Vorgänge wichtig für die effektive

Erreger-Bekämpfung.

Die Bildung der ROS kann mit Hilfe der Chemilumineszenz untersucht werden, bei der die ROS, besonders HOCl, mit der Verstärkersubstanz Luminol chemisch reagieren, die dann Licht emittiert. Isolierte Granulozyten (1 Mio/ml) wurden mit den Substanzen PMA und opsonisiertes Zymosan A stimuliert. PMA wirkt auf die NADPH-Oxidase der Granulozyten ein, Zymosan A besteht aus Hefebruchstücken und wird über Phagozytose aufgenommen.

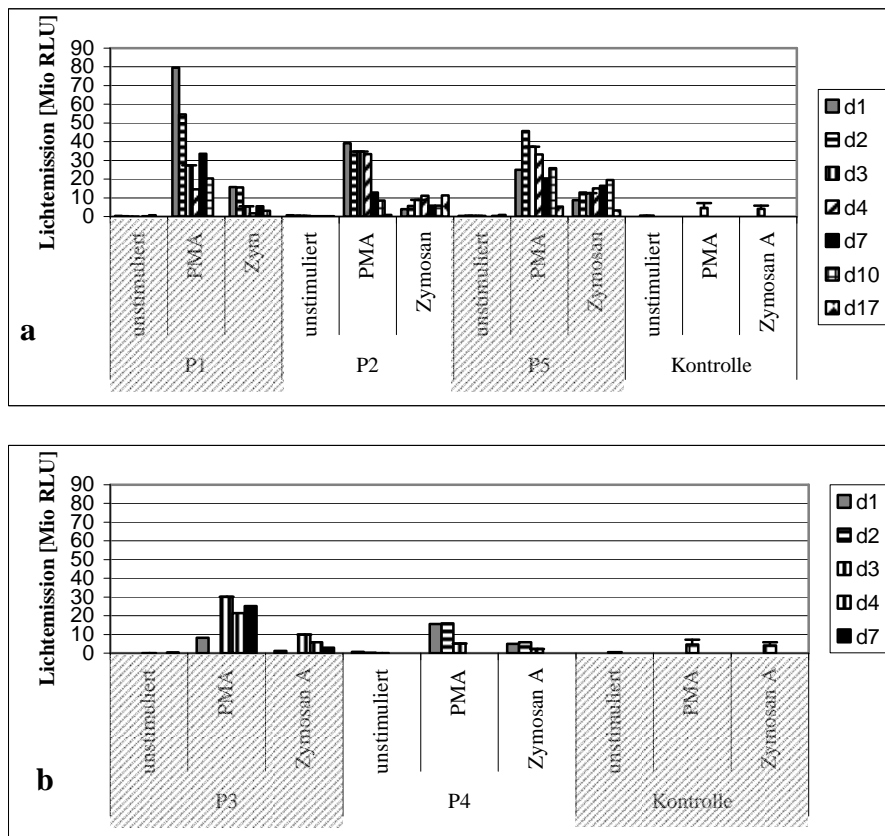


Abbildung 34: Bestimmung der ROS-Produktion

Die ROS-Produktion bei Sepsispatienten wurde mit Hilfe der Chemilumineszenz untersucht und mit Granulozyten von gesunden Spendern verglichen. Pro Ansatz wurden 1 Million Granulozyten pro ml verwendet und die während der 30minütigen Messung entstandenen Lichtteilchen als Counts in der Einheit Relative Light Units (RLUs) gezählt.

a) Überlebende, b) Verstorbene. Kontrollgruppe: Granulozyten von 5 gesunden Spendern (n=5, MW +/- S.D). Als Negativkontrolle dienten Proben ohne Zugabe von Stimulanzien. Bei Patient 3 wurde Tag 2 nicht untersucht.

Die Granulozyten der überlebenden Sepsispatienten produzierten teilweise bereits im Grundzustand wesentlich mehr reaktive Sauerstoffverbindungen als die Kontrollgranulozyten (in Abb.34 nicht ersichtlich). Die ROS-Bildung stieg nach Stimulation mit PMA um das 100 bis 300fache oder mit opsonisiertem Zymosan A um das 50fache an. Die Granulozyten der verstorbenen Patienten wiesen eine geringere Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen auf als die Granulozyten der Überlebenden, aber immer noch deutlich mehr als die Kontrollgranulozyten. Die geringste ROS-Bildung zeigten die Granulozyten von Patient 4.

Die im Vergleich mit den anderen Patienten stark verringerte ROS-Bildung könnte mit der teilweisen Myeloperoxidasedefizienz der Granulozyten von Patient 4 zusammenhängen, die aufgrund der Ergebnisse der Advia-Messung nahe liegt. Die bei der Chemilumineszenz verwendete Verstärkersubstanz Luminol reagiert vor allem mit HOCl, das erst durch die Reaktion der Myeloperoxidase mit Wasserstoffperoxid entsteht.

Zusammenfassung: Die Granulozyten der überlebenden Sepsispatienten bildeten ohne Stimulation bereits deutlich mehr reaktive Sauerstoffverbindungen und ließen sich wesentlich besser stimulieren als die Kontrollgranulozyten. Die Granulozyten der verstorbenen Sepsispatienten produzierten zwar wesentlich mehr ROS als die Kontrollgranulozyten, aber deutlich weniger als die Zellen der Überlebenden. Besonders gering war die ROS-Bildung bei dem verstorbenen MPO-defizienten Patienten 4.

4.2.4 Untersuchung der Chemotaxis

Im Fall einer Entzündung gelangen die Granulozyten aus der Blutbahn ins Gewebe. Hier folgen sie einem chemotaktischen Gradienten, der von den Erregern abgegeben wird, bis zum Ort der Entzündung. Chemotaxis beschreibt die aktive Hinbewegung zu einem Stoff. In diesem Versuch diente NfMLP als Lockstoff und PBS/Glucose als Negativkontrolle. Es wurde die Laufstrecke ausgemessen, die die Granulozyten zum Lockstoff zurücklegten und davon die Strecke abgezogen, die die Granulozyten spontan auf den PBS/Glucose-Puffer zuwanderten. In der folgenden Abbildung ist deshalb nur die „Netto“-Wanderbewegung zum Stimulans zu sehen (vgl. Material und Methoden Abb. 20).

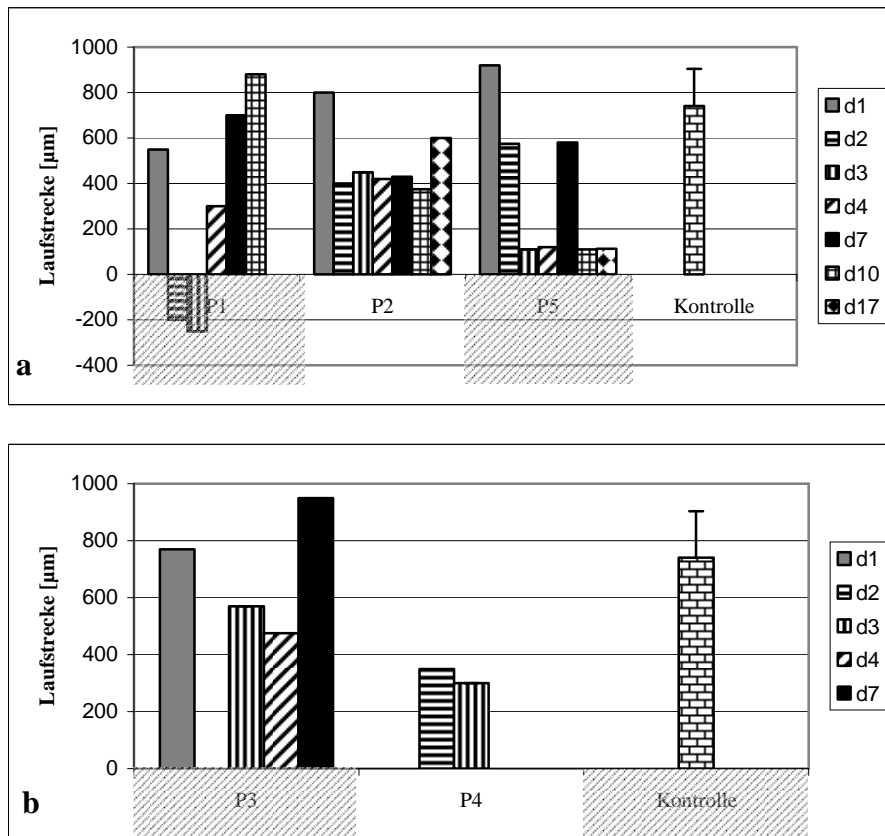


Abbildung 35: Untersuchung der Chemotaxis

Die Chemotaxis bei Sepsispatienten wurde untersucht und mit der von Granulozyten gesunder Spender verglichen. NfMLP (10^{-6} M) diente als Chemotaktikum, ein PBS/Glucose-Puffer als Kontrolle. Gezeigt wird die Differenz aus der Wanderung zum Chemotaktikum und der Wanderung zum Puffer (siehe Abbildung 20 im Material- und Methodenteil). a) Überlebende, b) Verstorbene. Kontrollgruppe: Granulozyten von 5 gesunden Spendern ($n=5$, MW \pm S.D). Bei Patient 3 wurde Tag 2 nicht untersucht.

Die Granulozyten der überlebenden Sepsispatienten zeigten im Vergleich zu den Kontrollgranulozyten meist eine verringerte Chemotaxisfähigkeit. Bei Patient 1 war an zwei Tagen die Wanderung zum Puffer rechnerisch stärker als zum Chemotaktikum NfMLP, deshalb ergab sich ein negativer Wert. Die Granulozyten des verstorbenen Patienten 3 wiesen tendentiell eine verringerte Chemotaxis auf. Die Granulozyten von Patient 4 wiesen die geringste Chemotaxis auf, am ersten untersuchten Tag wanderten die Granulozyten gar nicht.

Zusammenfassung: Bei den Sepsispatienten lässt sich im Vergleich zu den Kontrollen eine verringerte Chemotaxis beobachten. Die geringste Chemotaxis wies Patient 4 (MPO-Mangel)

auf.

4.2.5 Untersuchung der Degranulation

Granulozyten besitzen Granula mit Enzymen wie z.B. Myeloperoxidase, die im Falle einer Infektion ins Außenmedium abgegeben werden können. In diesem Versuch wurde die Degranulation der Granulozyten durch Gabe von Cytochalasin B, einem Stoffwechselprodukt aus Pilzen, vorbereitet. Darauf erfolgte eine zehnmünütige Inkubation mit dem von Bakterien abgegebenen Stoff NfMLP, worauf die Granulozyten ihre Granula entleerten. Der Advia 120 misst die in den Granulozyten enthaltene Myeloperoxidase. Bei Entleerung der Granula kommt es deshalb zu einer messbaren Linksverschiebung, die mit dem Lineal ausgemessen und somit in willkürlich gewählter Einheit („mm“) quantitativ charakterisiert werden kann. Die Lage der Granulozyten in einem Perox X-Diagramm des Advia 120 vor Chemikalienbehandlung wurde ausgemessen und davon die gemessene Lage der Granulozyten nach Vorbehandlung mit Cytochalasin B und Inkubation mit NfMLP abgezogen. So wurde die Linksverschiebung der Granulozytenwolke in mm ermittelt (siehe auch Material und Methoden, Abbildung 12).

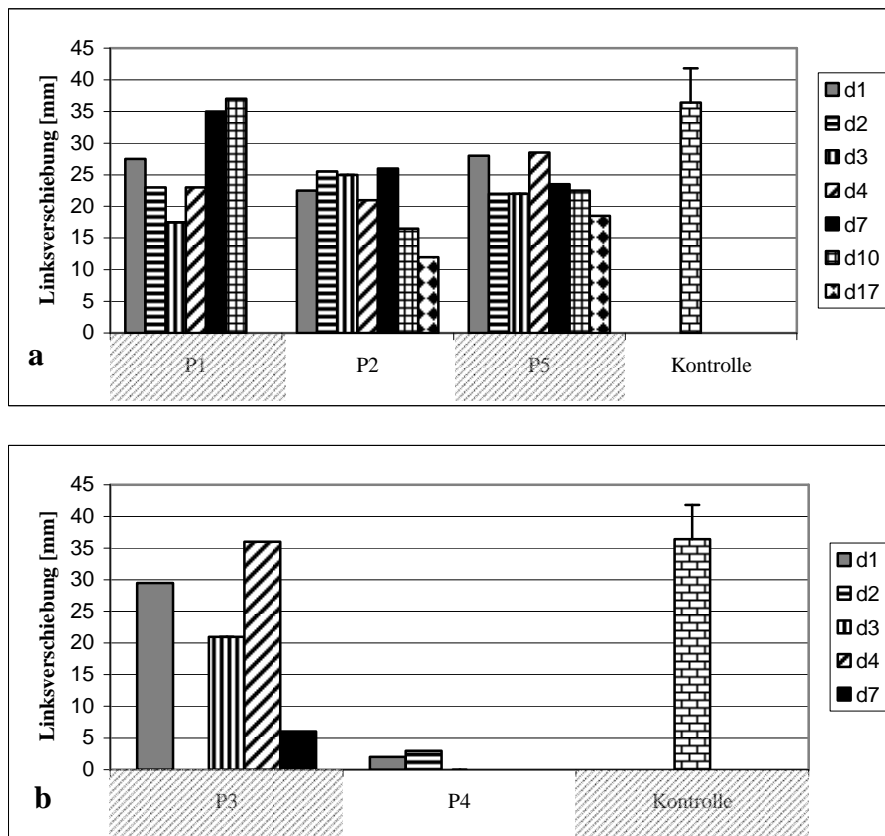


Abbildung 36: Untersuchung der Degranulation

Die Degranulation bei Sepsispatienten wurde untersucht und mit der von Granulozyten von gesunden Spendern verglichen. NfMLP diente als Stimulanz zur Abgabe der Granula und die Lage der Granulozyten vor und nach Chemikalienzugabe im Perox X-Histogramm wurde ausgemessen. Gezeigt wird die Linksverschiebung als Differenz der ausgemessenen Strecke vor und nach Zugabe von NfMLP. a) Überlebende, b) Verstorbene. Kontrollgruppe: Granulozyten von 5 gesunden Spendern ($n=5$, MW \pm S.D). Bei Patient 3 wurde Tag 2 nicht untersucht.

Die Fähigkeit zur Degranulation war bei den überlebenden Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert. Bei Patient 1 stieg sie gegen Ende des Krankheitsverlaufes wieder an. Bei den verstorbenen Patienten war die Degranulation ebenfalls verringert, besonders bei Patient 4. Die Degranulationsfähigkeit der Granulozyten von Patient 4 war nur qualitativ zu beurteilen. Bereits ohne Zugabe von NfMLP war nur eine geringe Myeloperoxidaseaktivität feststellbar (siehe Abb. 37). Wie bei der Bestimmung der Granulozytenzahl gesehen, konnte der Advia 120 bei Patient 4 nur ca. 40 % Granulozyten ermitteln, während die Auszählung

des Blutausstriches ungefähr 90 % Granulozyten ergab. Offensichtlich leidet dieser Patient an einer partiellen MPO-Defizienz. Abbildung 37 ist zu entnehmen, dass der größte Teil dieser Granulozyten ganz links angeordnet ist. Allerdings sieht man eine deutliche Granulozytenwolke auch im Monozytenfeld (2a). Nach Stimulation mit NfMLP ist diese deutlich nach links verschoben, aber quantitativ auf Grund des Übergangs der MPO-negativen Zellen schwer auszuwerten. Qualitativ lässt sich allerdings sagen, dass die Degranulation dieser MPO-defizienten Zellen durchaus nach Stimulation mit NfMLP stattfindet.

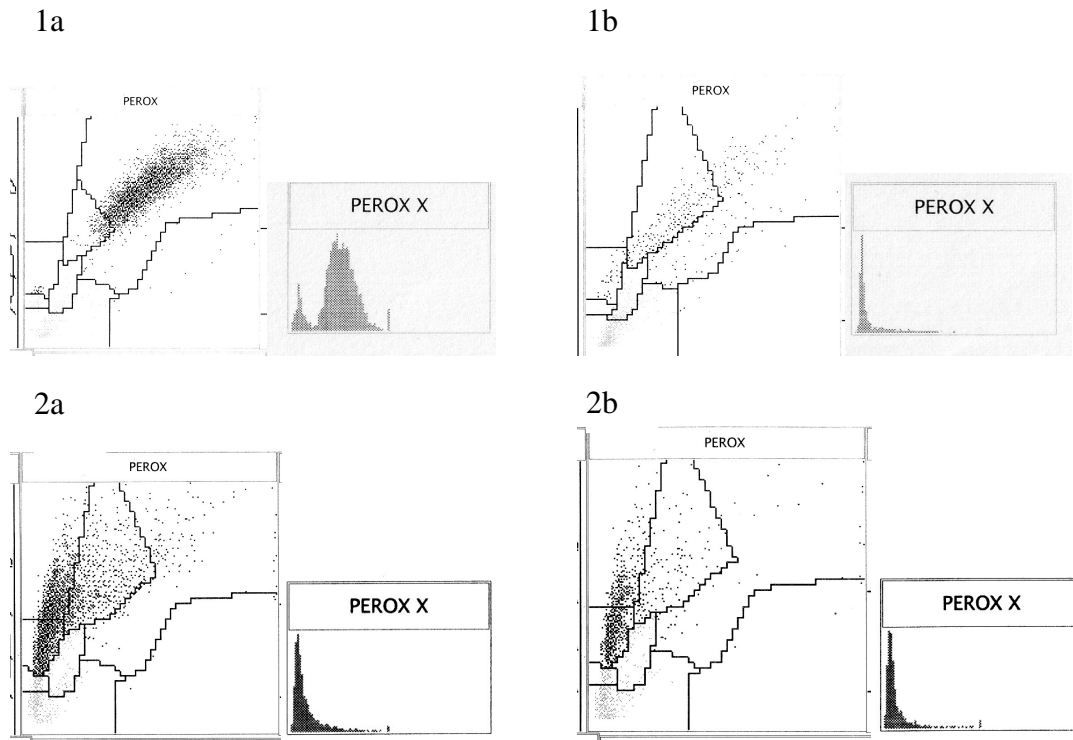


Abbildung 37: Vergleich der Degranulation von Kontrollperson 1 und Sepsispatient 4 (partielle MPO-Defizienz)

Die Kontrollgranulozyten besitzen zum Zeitpunkt t_0 vor Chemikalienzugabe viele Myeloperoxidase-Granula (1a), im Dot Plot und im Perox X-Histogramm sind die Granulozyten weit rechts auf der x-Achse. Nach Zugabe von NfMLP geben die Granulozyten ihre Inhaltstoffe (z. B. MPO) ab und es kommt zur „Linksverschiebung“ wie in Dot Plot und Perox X-Histogramm zu sehen (1b). Die Auswertung erfolgte durch Ausmessen der Lage des Peaks im Perox X-Histogramm und Berechnung der Differenz zwischen Zeitpunkt t_0 ohne Chemikalienzugabe und nach Zugabe von NfMLP.

Die Sepsisgranulozyten (P4) weisen bereits vor der Chemikalienzugabe zum Zeitpunkt t_0 eine Linksverschiebung auf, wie in Dot Plot und Perox X-Histogramm auf der Peroxidase-Achse ersichtlich wird (2a). Nach Zugabe von NfMLP sieht man auch hier eine deutliche Linksverschiebung der Granulozyten, die MPO besitzen und sich formal zu Beginn (Abbildung 2b) im Monozytenfeld befinden.

Beim Vergleich der Fähigkeit zur Degranulation in Abbildung 37 fällt sowohl im Dot Plot als auch im Histogramm auf, dass die meisten Granulozyten von Patient 4 wenig Myeloperoxidase besaßen (2a). Nach Zugabe von NfMLP war aber auch hier Degranulierung der wenigen MPO-haltigen Granulozyten zu beobachten (2b). Die Granulozyten von Kontrollperson 1 besaßen zum Zeitpunkt t_0 viel Myeloperoxidase (1a) und verloren nach

Zugabe von NfMLP durch Degranulierung sehr viel an Myeloperoxidase (1b).

Zusammenfassung: Die Granulozyten der überlebenden Sepsispatienten wiesen im Allgemeinen eine verringerte Degranulation im Vergleich zu den Kontrollgranulozyten auf. Ebenso die verstorbenen Patienten, wobei die quantitative Auswertung von Patient 4 schwierig war, da er offensichtlich einen MPO-Mangel aufwies und die Messung der Degranulation über die Peroxidase-Aktivität erfolgte.

4.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der Sepsisstudie

Um die Ergebnisse der Sepsisstudie zusammenzufassen, wurden die Ergebnisse der Kontrollpersonen als 100 % gesetzt und die Ergebnisse der Sepsispatienten darauf bezogen. Somit wird ein Vergleich der Sepsispatienten untereinander möglich.

Tabelle 3: Vergleich der Ergebnisse der Sepsispatienten, Kontrolle = 100%

Phagozytose					
Phagozytoseanteil, E. coli, 37°C	P1	P2	P3	P4	P5
D1	8%	115%	109%	108%	106%
D2	64%	87%	NU	107%	101%
D3	29%	104%	104%	102%	113%
D4	47%	81%	96%		104%
D7	35%	70%	101%		101%
D10	54%	69%			37%
D17		84%			26%
Phagozytose-intensität, E. coli, 37°C	P1	P2	P3	P4	P5
D1	11%	204%	105%	137%	125%
D2	37%	60%	NU	158%	123%
D3	23%	71%	78%	143%	133%
D4	51%	57%	59%		56%
D7	37%	52%	73%		91%
D10	39%	38%			29%
D17		89%			37%

Selektin					
CD62L Anteil	P1	P2	P3	P4	P5
D1	100%	100%	98%	88%	94%
D2	98%	100%	NU	84%	94%
D3	97%	96%	100%	88%	98%
D4	98%	99%	100%		100%
D7	99%	98%	100%		100%
D10	92%	99%			100%
D17		101%			97%
CD62L Intensität	P1	P2	P3	P4	P5
D1	107%	77%	64%	96%	89%
D2	96%	58%	NU	104%	81%
D3	101%	54%	64%	81%	86%
D4	199%	65%	61%		86%
D7	165%	71%	72%		90%
D10	157%	69%			91%
D17		127%			88%
Integrin CD11b					
CD11b Anteil	P1	P2	P3	P4	P5
D1	77%	103%	101%	98%	102%
D2	56%	102%	NU	99%	102%
D3	90%	103%	86%	97%	81%
D4	13%	102%	94%		101%
D7	71%	102%	92%		99%
D10	94%	57%			102%
D17		101%			99%

Integrin CD11b					
CD11b Intensität	P1	P2	P3	P4	P5
D1	11%	79%	72%	266%	72%
D2	8%	34%	NU	114%	66%
D3	14%	86%	42%	59%	80%
D4	6%	47%	52%		52%
D7	10%	67%	34%		37%
D10	27%	45%			42%
D17		36%			47%
CD18					
CD18 Anteil	P1	P2	P3	P4	P5
D1	100%	100%	100%	96%	100%
D2	100%	100%	NU	97%	100%
D3	99%	100%	100%	95%	99%
D4	100%	100%	100%		100%
D7	100%	99%	100%		96%
D10	100%	100%			99%
D17		100%			97%
CD18 Intensität	P1	P2	P3	P4	P5
D1	66%	80%	144%	254%	149%
D2	69%	63%	NU	257%	104%
D3	55%	96%	83%	176%	103%
D4	85%	78%	86%		79%
D7	80%	99%	68%		81%
D10	99%	70%			73%
D17		86%			61%

TLR2					
TLR2 Anteil	P1	P2	P3	P4	P5
D1	1023%	224%	864%	4024%	257%
D2	1442%	137%	NU	3078%	441%
D3	1051%	403%	328%	3605%	147%
D4	716%	1016%	165%		304%
D7	805%	140%	134%		99%
D10	356%	100%			75%
D17		112%			65%
TLR2 Intensität	P1	P2	P3	P4	P5
D1	162%	405%	181%	461%	403%
D2	161%	167%	NU	259%	529%
D3	158%	329%	139%	286%	390%
D4	119%	185%	432%		209%
D7	129%	801%	785%		1333%
D10	163%	1995%			528%
D17		544%			1569%
TLR4					
TLR4 Anteil	P1	P2	P3	P4	P5
D1	318%	38%	78%	178%	149%
D2	280%	32%	NU	497%	66%
D3	175%	44%	50%	630%	85%
D4	317%	44%	60%		94%
D7	376%	50%	64%		128%
D10	285%	74%			74%
D17		73%			85%

TLR4					
TLR4 Intensität	P1	P2	P3	P4	P5
D1	361%	321%	2890%	277%	453%
D2	154%	10106%	NU	221%	616%
D3	206%	1790%	416%	270%	684%
D4	112%	484%	2900%		1691%
D7	752%	818%	752%		1459%
D10	178%	1063%			978%
D17		4106%			2158%
Chemilumineszenz					
unstimuliert	P1	P2	P3	P4	P5
D1	118%	224%	6%	215%	83%
D2	50%	164%	NU	33%	138%
D3	25%	106%	23%	12%	94%
D4	12%	69%	24%		106%
D7	62%	68%	84%		23%
D10	220%	63%			115%
D17		52%			241%
PMA	P1	P2	P3	P4	P5
D1	1694%	834%	176%	333%	532%
D2	1161%	738%	NU	340%	972%
D3	582%	741%	643%	110%	793%
D4	309%	712%	456%		705%
D7	713%	272%	537%		433%
D10	435%	181%			551%
D17		18%			111%

Chemilumineszenz					
Zymosan	P1	P2	P3	P4	P5
D1	388%	100%	31%	123%	216%
D2	387%	140%	NU	145%	318%
D3	136%	219%	245%	56%	310%
D4	41%	277%	145%		371%
D7	137%	144%	72%		406%
D10	78%	143%			482%
D17		280%			79%
Chemotaxis	P1	P2	P3	P4	P5
D1	74%	108%	104%	Keine CT	124%
D2		54%	NU	47%	78%
D3		61%	77%	41%	148%
D4	41%	55%	101%		162%
D7	95%	58%	128%		78%
D10	119%	51%			148%
D17		81%			153%
Degranulation	P1	P2	P3	P4	P5
D1	69%	57%	74%	Quantitativ auswertbar	71%
D2	58%	64%	NU		55%
D3	44%	63%	53%		55%
D4	58%	53%	91%		72%
D7	88%	66%	15%		59%
D10	93%	42%			57%
D17		30%			47%

Durch die Berechnung der Ergebnisse der Sepsispatienten mit Bezug auf die Kontrollergebnisse, die als 100 % gesetzt wurden, ist ein Vergleich der einzelnen Patienten miteinander möglich. NU = nicht untersucht

In Tabelle 3 wurde der Durchschnitt der Kontrollergebnisse als 100 % festgelegt und die Werte der Patienten darauf bezogen. Wenn der Patient einen Wert von 150 % besitzt, dann ist der Wert im Vergleich zur Kontrolle um 50 % gestiegen. Wenn der Wert des Patienten bei 50 % liegt, dann ist der Wert im Vergleich zur Kontrolle um 50 % gesunken. Bei der

Chemilumineszenz wurde der jeweilige Kontrollwert der entsprechenden Behandlungsgruppe verwendet, die unstimulierten Granulozyten der Sepsispatienten wurden also mit den unstimulierten Zellen der Kontrollgruppe verglichen, ebenso die PMA-stimulierten Granulozyten der Sepsispatienten mit den Granulozyten der Kontrollpersonen nach PMA-Stimulation.

Der besseren Übersichtlichkeit halber wurden die einzelnen Werte noch mit + oder – beurteilt. Keine Veränderung ergibt ein ±, ab einer Zunahme von 1 % bis 50 % wird ein + vergeben, ab einem Anstieg von 51 % bis 100 % ein ++ und über 100 % ein +++. Absinken um 1 % bis 50 % wird mit einem – beurteilt, bei Abnahme um 51 % bis 100 % erfolgt die Vergabe eines - - .

Tabelle 4: Bewertung der Ergebnisse der einzelnen Patienten

Phagozytose					
Phagozytoseanteil	P1	P2	P3	P4	P5
D1	--	+	+	+	+
D2	-	-	NU	+	+
D3	--	+	+	+	+
D4	--	-	-		+
D7	--	-	+		+
D10	-	-			--
D17		-			--
Phagozytose- intensität	P1	P2	P3	P4	P5
D1	--	+++	+	+	+
D2	--	-	NU	++	+
D3	--	-	-	+	+
D4	-	-	-		-
D7	--	-	-		-
D10	--	--			--
D17		-			--

Selektin					
CD62L Anteil	P1	P2	P3	P4	P5
D1	±	±	-	-	-
D2	-	±	NU	-	-
D3	-	-	±	-	-
D4	-	-	±		±
D7	-	-	±		±
D10	-	-			±
D17		+			-
CD62L Intensität	P1	P2	P3	P4	P5
D1	+	-	-	-	-
D2	-	-	NU	+	-
D3	+	-	-	-	-
D4	++	-	-		-
D7	++	-	-		-
D10	++	-			-
D17		+			-
Integrin CD11b					
CD11b Anteil	P1	P2	P3	P4	P5
D1	-	+	+	-	+
D2	-	+	NU	-	+
D3	-	+	-	-	-
D4	--	+	-		+
D7	-	+	-		-
D10	-	-			+
D17		+			-
CD11b Intensität	P1	P2	P3	P4	P5
D1	--	-	-	+++	-
D2	--	--	NU	+	-
D3	--	-	--	-	-
D4	--	--	-		-
D7	--	-	--		--
D10	--	--			--
D17		--			--

CD18					
CD18 Anteil	P1	P2	P3	P4	P5
D1	±	±	±	-	±
D2	±	±	NU	-	±
D3	-	±	±	-	-
D4	±	±	±		±
D7	±	-	±		-
D10	±	±			-
D17		±			-
CD18 Intensität	P1	P2	P3	P4	P5
D1	-	-	+	+++	+
D2	-	-	NU	+++	+
D3	-	-	-	++	+
D4	-	-	-		-
D7	-	-	-		-
D10	-	-			-
D17		-			-
TLR2					
TLR2 Anteil	P1	P2	P3	P4	P5
D1	+++	+++	+++	+++	+++
D2	+++	+	NU	+++	+++
D3	+++	+++	+++	+++	+
D4	+++	+++	+		+++
D7	+++	+	+		-
D10	+++	±			-
D17		+			-
TLR2 Intensität	P1	P2	P3	P4	P5
D1	++	+++	++	+++	+++
D2	++	++	NU	+++	+++
D3	++	+++	+	+++	+++
D4	+	++	+++		+++
D7	+	+++	+++		+++
D10	++	+++			+++
D17		+++			+++

TLR4					
TLR4 Anteil	P1	P2	P3	P4	P5
D1	+++	--	-	++	+
D2	+++	--	NU	+++	-
D3	++	--	-	+++	-
D4	+++	--	-		-
D7	+++	-	-		+
D10	+++	-			-
D17		-			-
TLR4 Intensität	P1	P2	P3	P4	P5
D1	+++	+++	+++	+++	+++
D2	++	+++	NU	+++	+++
D3	+++	+++	+++	+++	+++
D4	+	+++	+++		+++
D7	+++	+++	+++		+++
D10	++	+++			+++
D17		+++			+++
Chemilumineszenz					
unstimuliert	P1	P2	P3	P4	P5
D1	+	+++	--	+++	-
D2	-	++	NU	--	+
D3	--	+	--	--	-
D4	--	-	--		+
D7	-	-	-		--
D10	+++	-			+
D17		-			+++
PMA	P1	P2	P3	P4	P5
D1	+++	+++	++	+++	+++
D2	+++	+++	NU	+++	+++
D3	+++	+++	+++	+	+++
D4	+++	+++	+++		+++
D7	+++	+++	+++		+++
D10	+++	++			+++
D17		--			+

Chemilumineszenz					
Zymosan	P1	P2	P3	P4	P5
D1	+++	±	--	+	+++
D2	+++	+	NU	+	+++
D3	+	+++	+++	-	+++
D4	--	+++	+		+++
D7	+	+	-		+++
D10	-	+			+++
D17		+++			-
Chemotaxis	P1	P2	P3	P4	P5
D1	-	+	+	NN	+
D2	NF	-	NU	--	-
D3	NF	-	-	--	+
D4	--	-	+		++
D7	-	-	+		-
D10	+	-			+
D17		-			++
Degranulation	P1	P2	P3	P4	P5
D1	-	-	-	Nicht quantitativ wertbar	-
D2	-	-	NU		-
D3	--	-	-		-
D4	-	-	-		-
D7	-	-	--		-
D10	-	--			-
D17		--			--

Die Ergebnisse der Sepsispatienten wurden mit einer ± - Bewertung eingeteilt. Keine Änderung im Vergleich zur Kontrolle bedeutet ±, Zunahme von 1% bis 50 % bedeutet ein +, Zunahme um 51 % bis 100 % ein ++ und Zunahme über 100 % ein +++ . Eine Abnahme zwischen 1 % und 50 % wird mit - bewertet, eine Abnahme um 51 % bis 100 % mit - - . NF=Versuch hat nicht funktioniert, NU= es wurde nicht untersucht, NN=Nicht nachweisbar, Ergebnis war 0

Zusammenfassung: Bei Patient 1 und 2 war der Anteil der phagozytierenden Granulozyten leicht verringert, während bei den verstorbenen Patienten 3 und 4 der Anteil Phagozytose-durchführender Zellen erhöht war, ebenso bei Patient 5, wobei hier der Anteil phagozytierender Zellen gegen Ende der Krankheit wieder abnahm. Die durchschnittliche

Phagozytoseintensität pro Zelle war bei Patient 1 und 2 erniedrigt, bei Patient 3 bis auf den ersten Tag auch. Patient 4 und 5 wiesen eine erhöhte durchschnittliche Anzahl aufgenommener Bakterien auf.

Der Anteil Selektin (CD62L)-positiver Zellen war bei Patient 1, 2 und 4 erniedrigt, während Patient 3 und 5 im Vergleich zur Kontrolle unveränderte bis leicht verminderte Anteile Selektin-positiver Zellen aufwiesen. Die durchschnittliche Selektinexpressionsintensität pro Zelle war bei Patient 1 im Vergleich zur Kontrolle erhöht, während sie bei den anderen Patienten verringert war. Nur Patient 2 wies am 17. und Patient 4 am zweiten Tag eine leichte Erhöhung auf.

Der Anteil Integrin-positiver Zellen war für CD11b bei Patient 2 und Patient 5 größtenteils erhöht, bei den anderen vermindert. Die Intensität war bei Patient 4 an den ersten beiden Tagen erhöht, bei den anderen Patienten vermindert. Für CD18 war der Anteil Integrin-exprimierender Zellen unverändert, nur bei Patient 4 und zum Teil bei Patient 5 war er vermindert. Patient 4 und Patient 5 wiesen eine erhöhte durchschnittliche CD18-Integrinexpression pro Zelle auf, Patient 3 nur am ersten Tag. Bei den anderen Patienten war eine leichte Verminderung zu beobachten. Für TLR2 war bei allen Patienten sowohl der Anteil positiver Zellen als auch die durchschnittliche Rezeptordichte auf der Oberfläche zumeist stark erhöht. Patient 1, 4 und zum Teil auch Patient 5 wiesen einen erhöhten Anteil TLR4-positiver Zellen auf, während Patient 2 und 3 eine Verminderung zeigten. Die Expression von TLR4 auf der Zelloberfläche war bei allen Patienten stark erhöht.

Behandlung mit PMA ergab bei allen Patienten eine starke Erhöhung der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen. Für Zymosan A ergab sich für Patient 1, 2 und 5 größtenteils eine starke Erhöhung der ROS-Produktion, bei Patient 3 war im Krankheitsverlauf ein Anstieg zu beobachten, der vor dem Tod absank. Bei Patient 4 war an den ersten beiden Tagen eine leichte Erhöhung und am letzten Tag vor dem Tod wie bei Patient 3 eine Verringerung der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen zu sehen. Bei Patient 1, 2 und 4 war die Chemotaxis verringert, während Patient 3 und 5 eher eine Erhöhung zeigten. Die Granulozyten der Sepsispatienten wiesen eine verringerte Degranulation auf.

4.2.7 Cytokine

Von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Joachim Riethmüller wurde der Cytokingehalt im Plasma der Sepsispatienten mit Hilfe eines ELISA-Tests ermittelt.

Tabelle 5: Cytokingehalt im Plasma der Sepsispatienten

Patient 1	IL1b(pg/ml)	IL6(pg/ml)	IL8(pg/ml)	IL10(pg/ml)	LBP(ng/ml)
D1	<5	172	17,6	6,9	106350
D2	<5	114	15,7	<5	91197
D3	<5	79,4	14,5	<5	77995
D4	<5	81,3	15,2	<5	61226
D5	<5	73,6	13,8	<5	84677
D6	<5	59	13,5	<5	82738
D7	<5	43,6	14,7	<5	58969
D10	<5	18,8	18,4	<5	42087
Patient 2	IL1b(pg/ml)	IL6(pg/ml)	IL8(pg/ml)	IL10(pg/ml)	LBP(ng/ml)
D1	<5	799	23,2	8,1	86515
D2	<5	578	13,4	6	91618
D3	<5	313	8,4	<5	92665
D4	<5	129	11,3	<5	95196
D5	<5	61,5	<5	<5	60833
D6	<5	41,1	11,9	<5	37938
D7	<5	26,4	15,9	<5	33102
D10	<5	22,7	14,9	<5	24419
D17	<5	16,8	12,4	<5	17734
Patient 3	IL1b(pg/ml)	IL6(pg/ml)	IL8(pg/ml)	IL10(pg/ml)	LBP(ng/ml)
D1	6,2	15200	140	118	113040
D2	<5	10160	86,2	58,8	92390
D3	<5	6560	70,1	46,4	88625
D4	<5	8240	77,5	37,7	74200
D5	<5	7000	88,3	72,1	94574
D6	<5	5200	70,1	38,4	70375
D7	<5	4160	75,9	38,2	52916
Patient 4	IL1b(pg/ml)	IL6(pg/ml)	IL8(pg/ml)	IL10(pg/ml)	LBP(ng/ml)
D1	22,4	3332	50,1	62	>200000
D2	27,2	2760	60,8	42,6	169399
D3	107	>40000	213	133	150589

Patient 5	IL1b(pg/ml)	IL6(pg/ml)	IL8(pg/ml)	IL10(pg/ml)	LBP(ng/ml)
D1	-	34,9	54,2	35,1	62324
D2	-	465	38,8	61,1	43542
D3	-	132	20,8	20	43467
D	-	172	14,4	15,6	34363
D5	-	79,7	8,5	11,9	35895
D6	-	90,8	11	11,6	34888
D7	-	80,6	10,9	12,7	32351
D10	-	32,8	13,6	7,4	21082
D17	-	8,1	17,5	10,2	12437

Von den Sepsispatienten wurde an den ersten 7 Tagen und an Tag 10 und 17 der Cytokingehalt im Blut mit Hilfe eines ELISAs ermittelt. LBP = Lipopolysaccharid-bindendes Protein

Der Cytokingehalt wurde von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Joachim Riethmüller im Plasma der Sepsispatienten während der ersten 7 Tage und an den Tagen 10 und 17 mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Bei allen Patienten verminderte sich im Sepsiverlauf der Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP)-Wert. Die proinflammatorischen Cytokine IL1b und IL6 waren bei den beiden verstorbenen Patienten 3 und 4 erhöht, besonders bei dem Myeloperoxidasedefizienten Patienten 4, ebenso das für die Chemotaxis verantwortliche IL8. Das antiinflammatorische Cytokin IL10 war allerdings ebenfalls bei den verstorbenen Patienten erhöht.

Patient 3 wies von allen Patienten den höchsten IL8-Spiegel im Plasma auf und zeigte eine verstärkte Chemotaxis im Vergleich zu den Kontrollen.

Trotz des erhöhten IL8-Gehalts im Plasma war die Chemotaxis bei Patient 4 nicht erhöht, sondern sogar vermindert. Möglicherweise spielen hier weitere Faktoren wie die Freisetzung antiinflammatorischer Cytokine eine Rolle, weil die IL10-Konzentration im Plasma sehr hoch war.

4.3 Zystische Fibrose (CF)

In einer kleinen Pilotstudie mit vier CF-Patienten wurde die Wirksamkeit des trizyklischen Antidepressivums Amitriptylin auf die Verbesserung der Lungenfunktion und die Verringerung der Empfänglichkeit für *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen nachgewiesen (Riethmüller et al., 2009). Dieses Ergebnis sollte in einer randomisierten, doppel-blinden, Plazebo-kontrollierten Cross-over-Studie der Phase II systematisch an 19 Patienten mit zystischer Fibrose überprüft werden. Bei allen Patienten war das Atemwegssystem chronisch mit unterschiedlichen Keimen, wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) oder anderen bakteriellen Pathogenen besiedelt (Zusammensetzung der Patienten und Infektionen siehe Tabelle 6). Die Gabe von Amitriptylin erfolgte in unterschiedlichen Mengen von 25, 50 oder 75 mg täglich in 3 Zyklen, wobei in einem der Zyklen statt Amitriptylin ein Plazebo (Maisstärke) gegeben wurde. Pro Zyklus gab es 4 Untersuchungstage (Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 28). Zwischen den einzelnen Zyklen gab es eine vierwöchige Pause („Auswaschphase“). Bei manchen Patienten wurde wegen infektdingter Ausfälle ein vierter Zyklus notwendig. Bei allen untersuchten Patienten wurde Sputum gewonnen (Messung von Leukozyten und prozentualem Anteil an Zellen sowie Apoptose) und bei der Hälfte der Patienten die Apoptose der aus Vollblut isolierten Granulozyten, ebenso wurde die Fähigkeit der Granulozyten zur Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) als Funktionsparameter bestimmt. Das Sputum wurde nativ verwendet, das heißt, es wurde auf eine Induktion mit 5,85 M NaCl-Spray verzichtet, weil die Änderung der Osmolarität eventuell schon einen Einfluss auf die Zellen im Sputum hat. Einige der Patienten produzierten kaum Sputum, so dass weder Apoptose noch ROS-Bildung untersucht werden konnten. Von der die Studie leitenden Arbeitsgruppe (AG Riethmüller) wurden zusätzlich die Lungenfunktion, die Besiedelung der Lunge mit Mikroorganismen, der DNA-Gehalt im Sputum und die Cytokine in Blut und Sputum bestimmt. Leider verzögerte sich der ursprünglich für den Frühsommer vorgesehene Studienbeginn, so dass erst im Herbst begonnen werden konnte und viele Patienten wegen Infektionen zu einigen Untersuchungsterminen nicht erscheinen konnten. Abbildung 38 gibt einen Überblick über das Studiendesign.

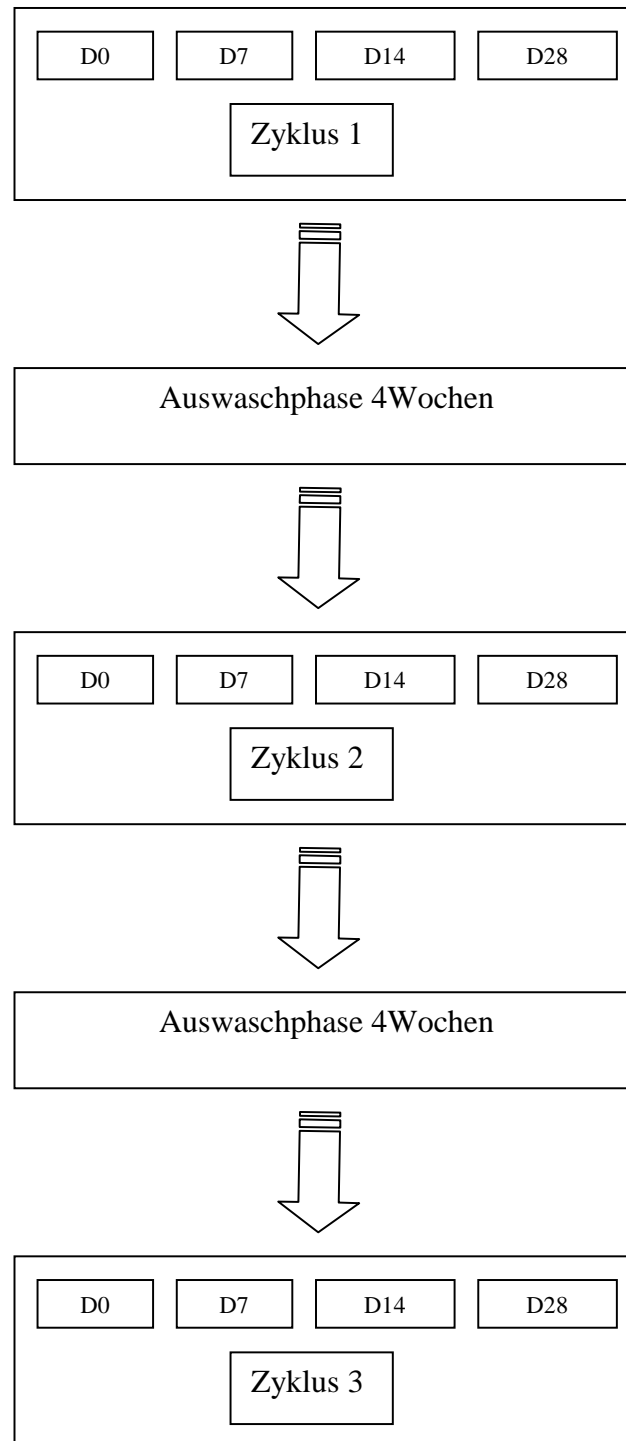


Abbildung 38: Übersicht über das Studiendesign

Gezeigt ist der Ablauf der Studie mit 3 Zyklen und dazwischen jeweils vierwöchiger Auswaschphase ohne Gabe des Medikaments. D=Versuchstag, Auswaschphase= ohne Einnahme des Prüfpräparates bzw. des Placebos

4.3.1 Übersicht über die Patientenmedikation

Die Patienten bekamen während der drei Zyklen der Studie in zufälliger Reihenfolge 25, 50 oder 75 mg Amitriptylin pro Tag oder das Plazebopräparat. Zwischen den einzelnen Zyklen erfolgte eine vierwöchige Auswaschphase ohne Medikamentengabe.

Tabelle 6: Übersicht über die Patienten und die Medikation

Patient	Ge- schlecht	Alter (Jahre)	Z1	Z2	Z3	Z4	Chronische Infektion	FEV ₁ (%)	
1	W	28	Plazebo	50 mg	25 mg		Burk/Pseu/S	48	
2	W	20	Plazebo	75 mg	50 mg		Pseu/MRSA	74	
3	W	29	Plazebo	25 mg	75 mg		Burk	33	
4	M	20	25 mg	Plazebo	75 mg		Sp	102	
5	W	21	75 mg	Plazebo	25 mg		Pseu	80	
6	M	22	Plazebo	25 mg	50 mg		Pseu	20	
7	W	24	50 mg	Plazebo	25 mg		Pseu,St	71	
8	M	22	25 mg	75 mg	Plazebo	25 mg	Pseu/MRSA	51	
9	W	32	75 mg	Plazebo	50 mg	50 mg	Pseu	28	
10	M	25	Patient brach die Studie ab					Pseu, Sp	76
11	M	28	25 mg	50 mg	Plazebo		Pseu	37	
12	M	22	Plazebo	75 mg	25 mg		C, K	86	
13	M	47	50 mg	Plazebo	75 mg		St	56	
14	W	25	50 mg	75 mg	Plazebo	50 mg	Sp	82	
15	M	37	Plazebo	50 mg	75 mg		Pseu, Sp	39	
16	M	37	25 mg	Plazebo	50 mg		Pseu	52	
17	M	29	75 mg	25 mg	Plazebo	75 mg	Pr	72	
18	W	18	75 mg	50 mg	Plazebo		Pseu/MRSA	50	
19	W	20	-	25 mg	Plazebo		Pseu/MRSA	90	

Patient 1 bis 19 wurden in der Studie untersucht, wobei Patient 10, 13, 18 und 19 so gut wie kein Sputum produzierten und deshalb für diesen Studienteil nicht weiter untersucht werden konnten. Die Patienten wiesen unterschiedliche chronische bakterielle Keimbesiedelung und unterschiedliche Lungenfunktion auf (FEV₁= forciertes expiratorisches Volumen pro Sekunde).

Burk = *Burkholderia cepacia*, MRSA = *Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus*, Pseu = *Pseudomonas aeruginosa*, S = *Serratia marcescens*, Sp = *Sphingomonas spec*, St = *Stenotrophomonas maltophilia*, C = *Citrobacter spec*, Pr = *Proteus vulgaris*, K = *Klebsiella pneumoniae*. *Pseudomonas*- oder *Burkholderia*-infizierte Patienten sind grau hinterlegt.

Die Patienten waren zu Beginn der Studie zwischen 18 und 47 Jahre alt, neun waren weiblich und neun männlich. Ein Patient brach die Studie ab und wird deshalb hier nicht aufgeführt. Die Patienten 13, 18 und 19 produzierten so gut wie kein Sputum und konnten in diesem Studienteil nicht weiter untersucht werden.

Die Patienten waren chronisch mit unterschiedlichen bakteriellen Krankheitserregern infiziert. 13 der Patienten waren mit *Pseudomonas aeruginosa*, dem bei CF häufigsten Erreger, infiziert. Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* steigt mit zunehmendem Alter der CF-Patienten an (Stern et al., 2002). Zwei Patienten waren mit *Burkholderia cepacia* infiziert und vier mit MRSA (einige Patienten wiesen Besiedelungen mit mehreren Erregern gleichzeitig auf). Die restlichen Patienten waren chronisch mit anderen bakteriellen Erregern wie *Sphingomonas spec.*, *Citrobacter spec.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens* oder *Stenotrophomonas maltophilia* infiziert, die für den Krankheitsverlauf keine solch schwerwiegenden Folgen bewirken wie die anderen Erreger. Diese Patienten produzierten meist deutlich weniger Sputum als die mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* oder MRSA besiedelten CF-Patienten und wiesen in der spirometrischen Untersuchung meist eine bessere Lungenfunktion auf (FEV_1 = forciertes expiratorisches Volumen pro Sekunde, Einsekundenkapazität). In Tabelle 6 sind die Lungenfunktionsdaten zu Beginn der Studie gezeigt.

In den meisten Fällen wurde das Sputum ohne vorherige Induktion kurz vor der Untersuchung auf dem Weg in die Klinik produziert, so dass das Sputum bis zum Versuchsbeginn nicht älter als zwei bis vier Stunden war. Die Patienten kamen aufgrund unterschiedlicher Lebenssituationen zu sehr unterschiedlichen Tageszeitpunkten zur Untersuchung, was auch die Laboruntersuchungen teilweise etwas kompliziert gestaltete. Bei einigen Patienten musste das Sputum doch induziert werden oder die Sputumprobe wurde bereits im Lauf des Tages einige Stunden vor der Untersuchung produziert. Einen Überblick über die Ausnahmen gibt Tabelle 7.

Tabelle 7: Übersicht über die Ausnahmen bei den Sputumproben

P1	Plazebo, D28	25 mg, D7		
	4,5 h	5,5 h		
P2	50 mg, D14			
	6,5 h			
P4	25 mg, D0	25 mg, D14		
	induziert	11 h		
P9	Plazebo, D14			
	10 h			
P12	Plazebo, D0	Plazebo, D7	Plazebo, D14	Plazebo, D28
	induziert	8 h	8 h	4,5 h
	25 mg, Do	75 mg, D7		
	induziert, 5 h	5,5 h		
P14	50 mg, D0	50 mg, D7	50 mg, D28	75mg, D0 + D7
	induziert	induziert	induziert	induziert
P15	50 mg, D14			
	4,5 h			
P16	Plazebo, D0	50 mg, D7		
	induziert	7 h		
P17	Plazebo, D7			
	induziert			

4.3.2 In vitro-Versuche mit Amitriptylin

Vor Beginn der eigentlichen Studie wurde Amitriptylin mit Granulozyten von gesunden Spendern inkubiert, um zu sehen, ob eine Wirkung erzielt werden konnte.

Granulozyten von gesunden Spendern wurden mit Amitriptylin in drei verschiedenen Konzentrationen behandelt. Untersucht wurde der Einfluss auf die Apoptose, die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale und die Degranulation. Die Amitriptylingaben wurden so berechnet, dass sie in den gewählten Konzentrationen einer Tagesdosis von 25 mg Amitriptylin, 75 mg Amitriptylin oder 125 mg Amitriptylin entsprachen. Als Ausgangswert wurde eine durchschnittliche Blutmenge von 5 Litern angenommen, das entspricht bei 25 mg Amitriptylin pro Tag 15,9 μMol pro Liter Blut, bei 75 mg 47,7 μMol und bei 125 mg 79,6 μMol Amitriptylin pro Liter Blut.

4.3.2.1 Einfluss von Amitriptylin auf die Apoptose/Nekrose

Der Einfluss von Amitriptylin auf die Apoptose und Nekrose wurde durch Inkubation mit Amitriptylin in drei Konzentrationen mit Granulozyten Gesunder und mit anschließender Annexin-Messung im FACS untersucht (Abbildung 39).

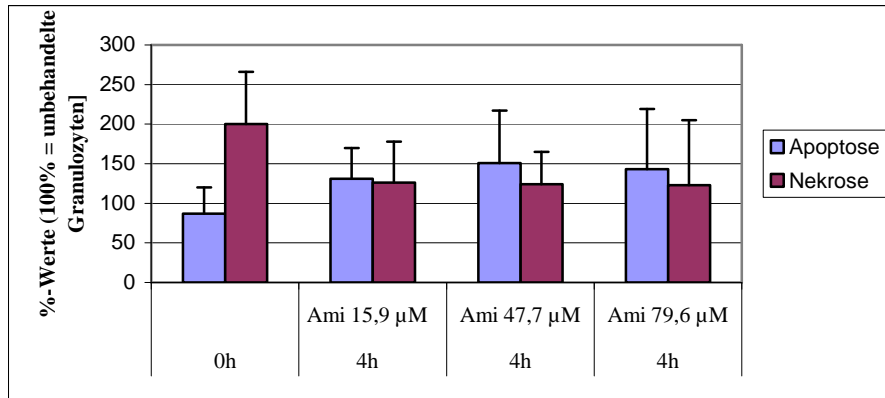


Abbildung 39: Einfluss von Amitriptylin auf die Apoptose und Nekrose von Granulozyten gesunder Spender

Amitriptylin wurde in drei Konzentrationen (f.c. 15,9 µMol pro Liter, 47,7 µMol pro Liter und 79,6 µMol pro Liter) mit isolierten Granulozyten von gesunden Spendern für 4h inkubiert.

t_0 = Granulozyten direkt nach der Isolierung. Der Apoptose- und Nekrosetest wurde im Durchflusszytometer mit Annexin und Propidiumjodid durchgeführt (siehe Material und Methoden). Der Anteil Annexin-positiver Zellen ergibt den Apoptose-Wert, doppelt-positive Zellen (sowohl Annexin- als auch Propidiumjodid-positive) werden als nekrotisch erfasst. Granulozyten ohne Behandlung wurden ebenso wie die mit Amitriptylin behandelten Proben 4h inkubiert und als Referenzwert für diese verwendet, indem sie als 100% gesetzt wurden. $n=3$, $\pm S.D$

Zu sehen sind die Ergebnisse aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Als Referenzwert wurden die Granulozyten nach 4stündiger Inkubation ohne Amitriptylin als 100% gesetzt und die anderen Werte im prozentualen Verhältnis hierzu berechnet. Frisch isolierte Granulozyten gesunder Spender wurden für 4 Stunden bei 37 °C mit Amitriptylin in einer Endkonzentration von 15,9 µMol pro Liter, 47,7 µMol pro Liter und 79,6 µMol pro Liter inkubiert, was einer Amitriptylingesamt-Tagesdosis von 25 mg, 75 mg oder 125 mg entspricht. Direkt nach der Isolation (t_0) wiesen die Granulozyten gesunder Spender eine um 20 % niedrigere Apoptose auf als 4 h später. Die Nekrose war zum Zeitpunkt t_0 um 100 % erhöht und damit doppelt so hoch wie bei den 4h alten Granulozyten.

Die 4stündige Inkubation mit Amitriptylin in drei verschiedenen Konzentrationen bewirkte im Vergleich zu den ohne Amitriptylin inkubierten Granulozyten eine Erhöhung der Apoptose um 30 bis 50 %. Die höchste Apoptoserate war mit 47,7 μM Amitriptylin zu beobachten. Die Nekrose sank während der Amitriptylininkubation um ca. 80 %. Für jeden Versuch wurden die Granulozyten eines anderen Spenders verwendet, das Apoptoseniveau unterschied sich bei Granulozyten von verschiedenen Spendern, wodurch sich die hohen Standardabweichungen ergeben.

4.3.2.2 Einfluss von Amitriptylin auf die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen

Der Einfluss von Amitriptylin auf die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale wurde durch Inkubation mit Amitriptylin in drei Konzentrationen mit Granulozyten Gesunder und mit anschließender Chemilumineszenz (CL)-Messung untersucht. Für die Auswertung wurde der Wert der Granulozyten, die ohne Amitriptylin inkubiert wurden, als 100 % gesetzt (Abbildung 40).

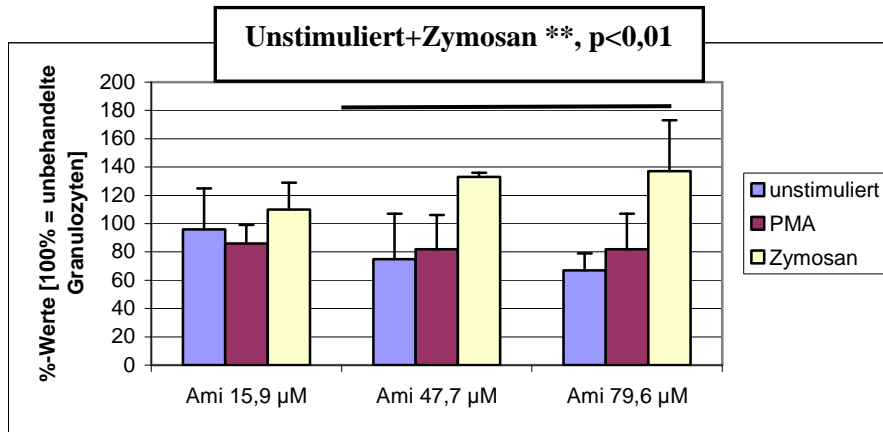


Abbildung 40: Wirkung von Amitriptylin auf die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (Luminol vermittelte CL-Messung)

Amitriptylin wurde in drei verschiedenen Konzentrationen (f.c. 15,9 µMol pro Liter, 47,7 µMol pro Liter und 79,6 µMol pro Liter) mit frisch isolierten Granulozyten gesunder Spender inkubiert. Granulozyten ohne Behandlung wurden ebenso wie die mit Amitriptylin behandelten Proben 4h inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen mit PMA oder Zymosan A stimuliert, unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Chemilumineszenz-Messung erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C im Luminometer. Als Referenzwert für die Amitriptylin-behandelten Zellen dienten die unbehandelten Granulozyten, die als 100% gesetzt wurden. $n=3, \pm S.D$

Zu sehen sind die Ergebnisse aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle und wurden als Referenzwert (100 %) verwendet und die anderen Werte im prozentualen Verhältnis hierzu berechnet. Frisch isolierte Granulozyten (1 Mio/ml) gesunder Spender wurden für 4 Stunden bei 37 °C mit Amitriptylin in einer Endkonzentration von 15,9 µMol pro Liter, 47,7 µMol pro Liter und 79,6 µMol pro Liter inkubiert, was einer Amitriptylingesamt-Tagesdosis von 25 mg, 75 mg oder 125 mg entspricht. Nach Stimulation mit PMA oder Zymosan A wurde für eine halbe Stunde bei 37 °C die Chemilumineszenz-Messung im Luminometer durchgeführt. Ohne Stimulation sank die ROS-Bildung mit steigender Amitriptylinkonzentration im Vergleich zu den unbehandelten Granulozyten stets weiter ab. Mit 79,6 µM sank die ROS-Bildung im Vergleich zu unbehandelten Granulozyten signifikant ($p<0,01$). Die Stimulation mit PMA (100 ng/ml) führte im Vergleich zu den unbehandelten Granulozyten zu einer Verringerung der ROS-Bildung um 25 %. Mit Zymosan A (250 µg/ml) war ein mit steigender Amitriptylinkonzentration wachsender teils signifikanter Anstieg der ROS-Produktion zu beobachten ($p<0,01$).

4.3.2.3 Einfluss von Amitriptylin auf die Degranulation

Der Einfluss von Amitriptylin auf die Fähigkeit frisch isolierter Granulozyten zur Degranulation wurde nach Inkubation mit Amitriptylin untersucht, indem Cytochalasin B und NfMLP zugegeben wurde. Cytochalasin B hemmt die Aktinanlagerung und zerstört so das Cytoskelett. Nach NfMLP-Stimulus können die Granulozyten die Inhaltsstoffe der Granula teilweise abgeben. Für die Auswertung wurde der Wert der Granulozyten, die ohne Amitriptylin inkubiert wurden, als 100 % gesetzt (Abbildung 41).

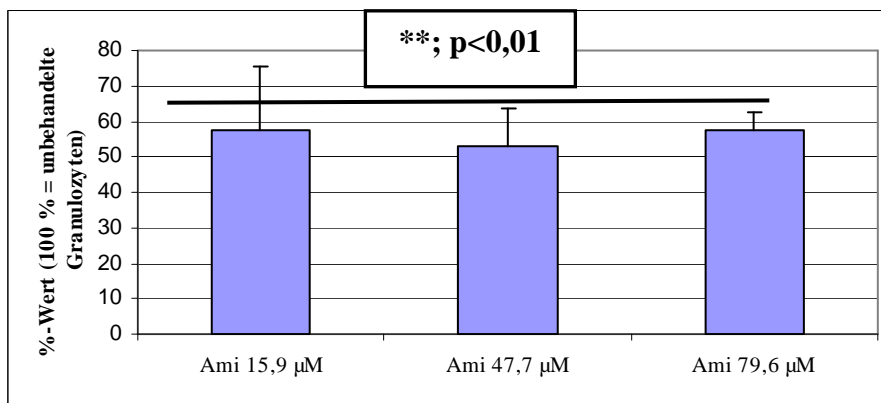


Abbildung 41: Wirkung von Amitriptylin auf die Degranulation

Frisch isolierte Granulozyten (3 Mio/ml in PBS/Glucose) wurden für 4 Stunden bei 37 °C mit drei unterschiedlichen Konzentrationen Amitriptylin inkubiert (f.c. 15,9 µMol pro Liter, 47,7 µMol pro Liter und 79,6 µMol pro Liter). Die Linksverschiebung der Granulozytenwolke nach Behandlung mit NfMLP wurde im Perox X-Histogramm des Advia 120 ausgemessen. Granulozyten ohne Behandlung dienten als Kontrolle und wurden ebenso wie die mit Amitriptylin behandelten Proben 4h inkubiert und als Referenzwert für diese verwendet, indem sie als 100% gesetzt wurden. $n=3$, \pm S.D.

Zu sehen sind die Ergebnisse aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Unbehandelte Granulozyten dienten als Kontrolle und wurden als Referenzwert (100%) gesetzt und die anderen Werte im prozentualen Verhältnis hierzu berechnet.

Die Degranulation wurde unter dem Einfluss von drei unterschiedlichen Amitriptylin-Konzentrationen (f.c. 15,9 µMol pro Liter, 47,7 µMol pro Liter und 79,6 µMol pro Liter, entsprechend einer Tagesdosis von 25 mg, 75 mg und 125 mg Amitriptylin) vor und nach Zugabe von Cytochalasin B und NfMLP untersucht, indem die Linksverschiebung der Granulozytenwolke durch Ausmessen des Perox X-Histogramms des Advia 120 bestimmt

wurde. Amitriptylin hemmte die Fähigkeit der Granulozyten zur Abgabe der Granula ins Außenmedium signifikant um ca. 40 bis 50 % im Vergleich zu unbehandelten Granulozyten ohne Amitriptylinbehandlung ($p < 0,01$). Zwischen den verschiedenen Konzentrationen ließen sich keine Unterschiede feststellen.

Zusammenfassung: Amitriptylin verstärkte die Apoptose und bewirkte eine Verminderung der Nekrose.

Amitriptylin hemmte die ROS-Produktion signifikant. Stimulation mit PMA verringerte die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen, wohingegen Stimulation mit Zymosan A zu einer teilweise signifikanten konzentrationsabhängigen Verstärkung der Bildung von ROS führte. Amitriptylin hemmte die Degranulation der Granulozyten signifikant, unabhängig von der Konzentration.

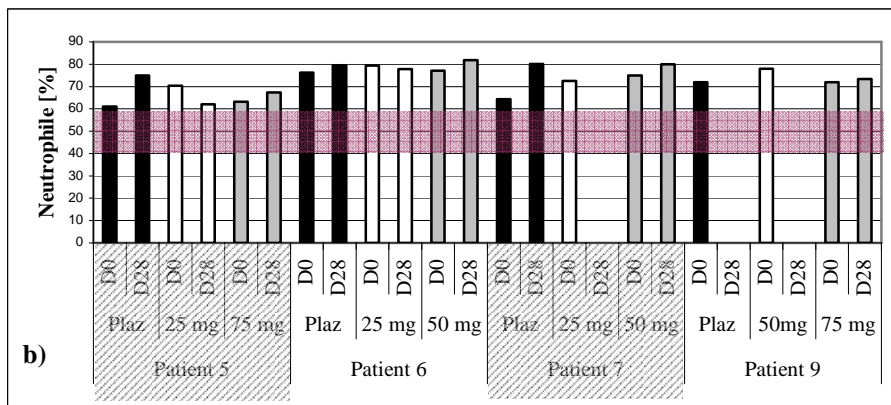
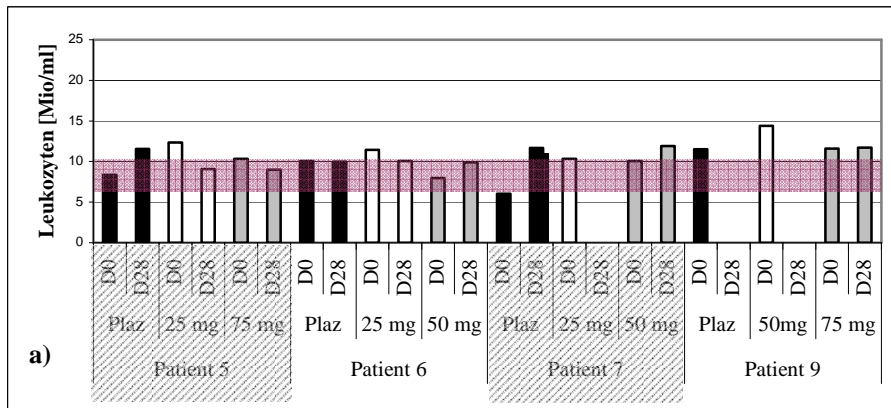
4.3.3 Untersuchungen in CF- Blut

Es ist bekannt, dass im Sputum von CF-Patienten die Granulozytenzahl erhöht ist (Tirouvanziam et al., 2000). Manche der Patienten sind chronisch mit verschiedenen problematischen Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* oder MRSA infiziert. Andere hingegen weisen eine chronische Grundinfektion mit anderen CF-typischen bakteriellen Erregern wie *Sphingomonas spec*, *Citrobacter spec*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* oder *Stenotrophomonas maltophilia* auf. Es sollte untersucht werden, welche Leukozytenzahlen die unterschiedlich infizierten CF-Patienten im Blut aufwiesen und wie die Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen war.

4.3.3.1 Leukozytenzahl im Vollblut

In EDTA-Vollblut von CF-Patienten wurden mit Hilfe des Advia 120 die Zellzahlen bestimmt und sind im Folgenden in die 3 Infektionsgruppen *Pseudomonas*, *Burkholderia* oder MRSA und andere bakterielle Erreger eingeteilt. Für jeden Patienten sind innerhalb dieser Gruppen die Ergebnisse nach der Amitriptylinkonzentration dargestellt (erst Plazebo, dann die niedrige und danach die hohe Amitriptylinkonzentration). Der Übersichtlichkeit halber sind die Ergebnisbalken der Plazebogabe schwarz gefärbt, der niedrigen Amitriptylinkonzentration weiß und der hohen Amitriptylinkonzentration grau. Es konnte nicht an allen Tagen Blut abgenommen werden. Die entsprechenden Tage wurden ohne Wert dargestellt.

Patienten mit chronischer *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion wiesen folgende Leukozytenzahlen im Blut auf (Abbildung 42):



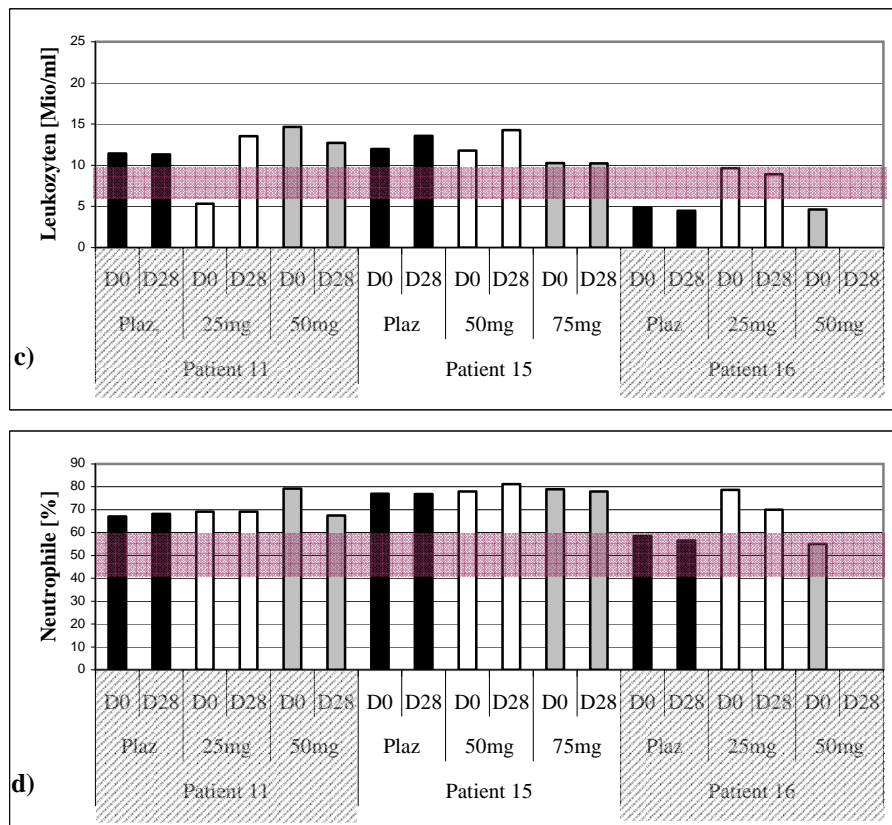


Abbildung 42: Gesamtleukozyten und Anteil an neutrophilen Granulozyten im Blut von CF-Patienten mit chronischer Pseudomonas-Infektion

In EDTA-Vollblut wurde die Gesamtzahl an Leukozyten und der Anteil neutrophiler Granulozyten untersucht. Zum Vergleich ist der jeweilige Referenzbereich an Leukozyten und neutrophilen Granulozyten bei Gesunden waagrecht gezeigt. a) und c) Leukozyten, b) und d) Neutrophile.

D = Tag, Z = Zyklus, Plaz = Plazebo. Ohne Wert = kein Blut

Im Blut von chronisch mit *Pseudomonas aeruginosa*-infizierten CF-Patienten war im Vergleich zu Gesunden (waagrechter Bereich) eine erhöhte Anzahl an Leukozyten (5 bis 14 Mio/ml) und eine deutlich erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten (60 bis 80 %) feststellbar. Es war kein Zusammenhang mit der Gabe von Amitriptylin zu beobachten.

Im Vergleich hierzu in Abbildung 43 die Leukozytenzahlen im Blut von mit Burkholderia cepacia oder MRSA infizierten Patienten:

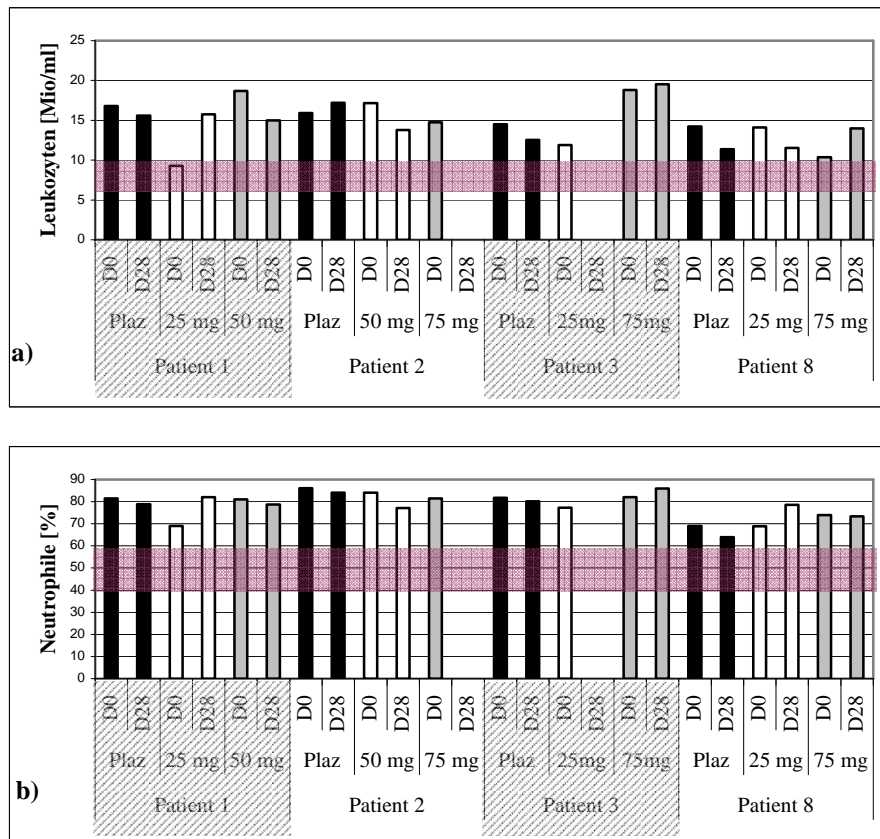


Abbildung 43: Gesamtleukozyten und Anteil an neutrophilen Granulozyten im Blut von CF-Patienten mit chronischer *Burkholderia cepacia*- oder MRSA- Infektion

In EDTA-Vollblut wurde die Gesamtzahl an Leukozyten und der Anteil neutrophiler Granulozyten untersucht. Zum Vergleich ist der jeweilige Referenzbereich an Leukozyten und neutrophilen Granulozyten bei Gesunden waagrecht gezeigt. *Burkholderia* (Patient 1 und 3), MRSA (Patient 2 und 8.)

a) Leukozyten, b) Neutrophile. D = Tag, Z = Zyklus, Plaz = Plazeb. Ohne Wert = kein Blut

Chronisch mit *Burkholderia cepacia* (Patient 1 und 3) oder MRSA (Patient 2 und 8) infizierte CF-Patienten wiesen im Vergleich zu Gesunden eine stark erhöhte Leukozytenzahl im Blut auf (ca. 8 bis 15 Mio/ml), ebenso war der Anteil neutrophiler Granulozyten sehr hoch (zwischen 70 und 86 %). Patient 2 und 8 wiesen zusätzlich eine Pseudomonasinfektion auf. Es war kein Zusammenhang mit der Amitriptylinmedikation feststellbar.

Mit anderen bakteriellen Erregern besiedelte CF-Patienten zeigten folgende Leukozytenzahlen im Blut:

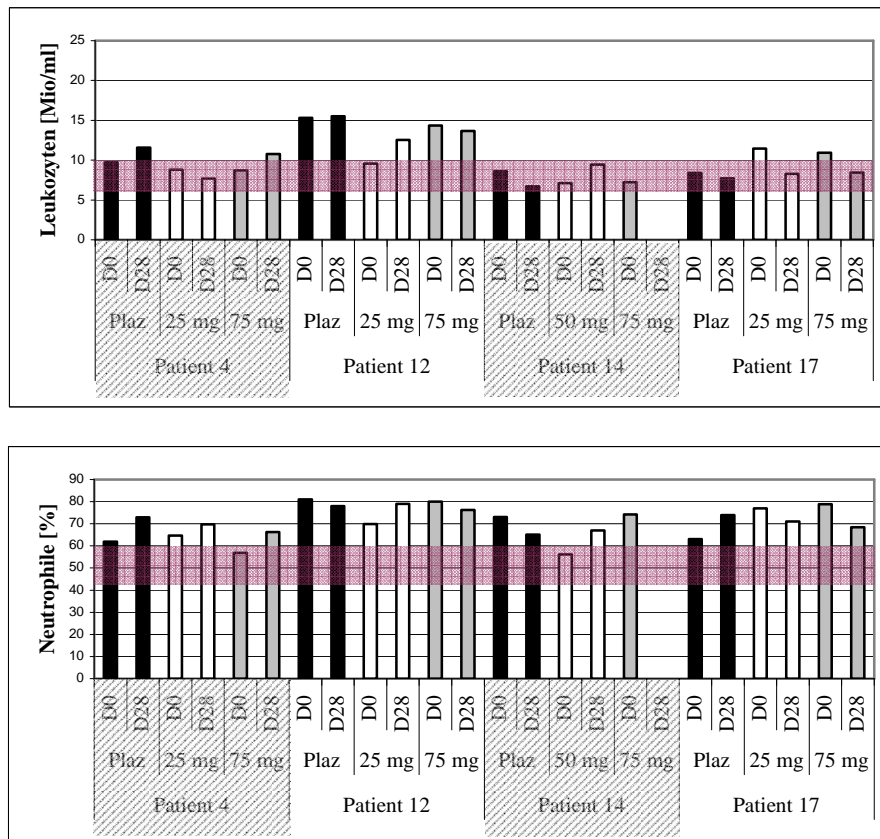


Abbildung 44: Gesamtleukozyten und Anteil an neutrophilen Granulozyten im Blut von CF-Patienten mit anderen bakteriellen Erregern

In EDTA-Vollblut wurde die Gesamtzahl an Leukozyten und der Anteil neutrophiler Granulozyten untersucht. Zum Vergleich ist der jeweilige Referenzbereich an Leukozyten und neutrophilen Granulozyten bei Gesunden waagrecht dargestellt. a) Leukozyten, b) Neutrophile. D = Tag, Z = Zyklus, Plaz = Plazebo. Ohne Wert = kein Blut

In Abbildung 44 sind bei mit anderen bakteriellen Erregern infizierten CF-Patienten teilweise im Vergleich zu den Werten Gesunder im Blut sowohl erhöhte Leukozytenzahlen als auch eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten zu erkennen (Leukozyten 7 bis 16 Mio/ml, Neutrophile 55 bis 80 %). Es war kein Zusammenhang mit der Gabe von Amitriptylin zu beobachten. Im Vergleich zu den CF-Patienten der anderen Infektionsgruppen wiesen besonders die Burkholderia- oder MRSA-infizierten Patienten höhere Leukozytenzahlen auf. Der Anteil Neutrophiler war bei der Burkholderia/MRSA Gruppe ebenso wie bei den Patienten mit Pseudomonasinfektion deutlich erhöht.

Zusammenfassung: Im Vollblut von CF-Patienten waren sowohl die Leukozytenzahl als auch

der Anteil neutrophiler Granulozyten erhöht, besonders stark bei Patienten mit Burkholderia- oder MRSA- Infektion. Es war kein Zusammenhang mit der Amitriptylinbehandlung festzustellen.

4.3.3.2 Apoptose und Nekrose der Granulozyten im Blut von CF-Patienten

Granulozyten wurden aus heparinisiertem Vollblut von CF-Patienten mithilfe eines Histopaque-Gradienten isoliert. Die Untersuchung der Apoptose der Blutgranulozyten erfolgte durch eine Färbung der Zellen mit Annexin V FITC und Propidiumjodid. Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer, die Auswertung durch die Einteilung in 4 Quadranten mit Hilfe der Quadrantenstatistik durch Erfassen des Prozentsatzes an Zellen in den jeweiligen Feldern (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2.8, Abb. 18). Die Bestimmung der Apoptose und Nekrose bei Granulozyten wurde bei ungefähr der Hälfte der Patienten durchgeführt. Es konnte nicht an allen Tagen Blut abgenommen werden, die entsprechenden Tage wurden ohne Wert dargestellt.

Aufgrund von Durchführungsproblemen bei der Apoptose-Bestimmung im ersten Zyklus sind die Ergebnisse dieses Zyklus nicht gezeigt.

Die frisch isolierten Granulozyten gesunder Spender wiesen einen durchschnittlichen Anteil apoptotischer Zellen von ca. 5 % auf, siehe Kapitel 4.3.5 (Untersuchung der Wirkung von CF-Sputumüberständen auf isolierte Granulozyten von gesunden Spendern). Durch die Isolation im Histopaquegradienten wurden die Granulozyten bereits mechanisch gestresst, was an der deutlichen Linksverschiebung der Granulozytenwolke am Advia 120 sichtbar wurde (Indikator für Degranulation, siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2.2, Abbildung 11, Granulozyten von Kontrollperson 5 vor und nach Isolation) und gehen deshalb eventuell leichter in die Apoptose.

In Abbildung 45 sind die Apoptose und Nekrose bei Granulozyten von CF-Patienten mit chronischer *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion aufgeführt.

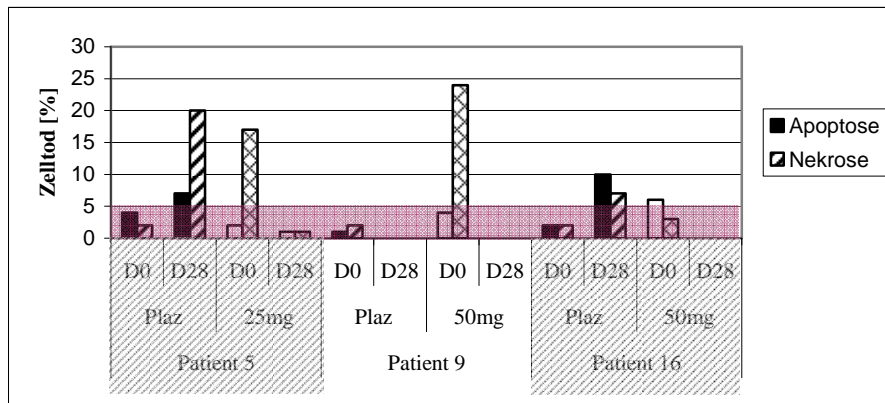


Abbildung 45: Übersicht über die Apoptose und Nekrose von Blutgranulozyten bei CF-Patienten mit Pseudomonasinfection

Granulozyten wurden aus Vollblut isoliert, mit Annexin V FITC und Propidiumjodid gefärbt und so die apoptotischen und nekrotischen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die waagrechte Fläche zeigt den durchschnittlichen Anteil apoptotischer Zellen bei frisch isolierten Granulozyten gesunder Kontrollpersonen. Die Ergebnisbalken der Apoptose sind einfarbig dargestellt (Plazebo schwarz, Amitriptylin weiß), die Nekroseergebnisse gemustert (Plazebo schwarz gemustert, Amitriptylin weiß gemustert). Plaz = Plazebo. Ohne Wert = kein Blut

Patienten mit Pseudomonasinfection wiesen meist eine eher niedrige Apoptose der Blutgranulozyten von ungefähr 5 % oder darunter auf. Die Nekrose war bei einigen Patienten mit bis zu 25 % sehr hoch. Es war weder für die Apoptose noch für die Nekrose ein Zusammenhang mit der Einnahme von Amitriptylin feststellbar.

Im Vergleich hierzu sind in Abbildung 46 die Apoptose und Nekrose bei Blutgranulozyten von CF-Patienten mit Burkholderia- oder MRSA-Infektion dargestellt.

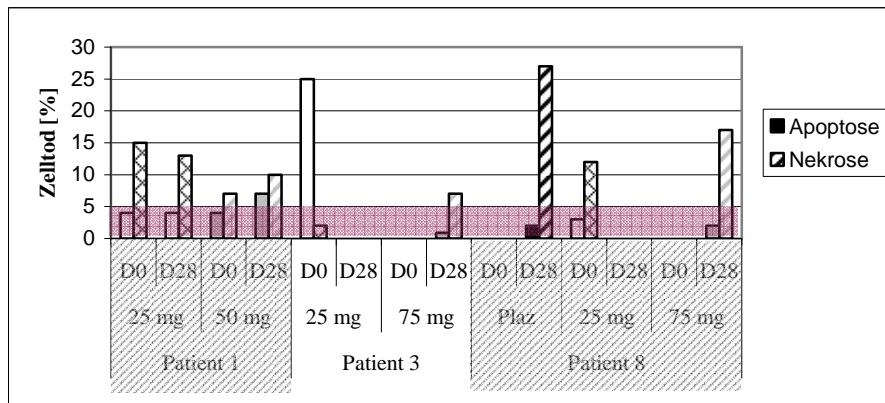


Abbildung 46: Übersicht über die Apoptose und Nekrose von Blutgranulozyten bei CF-Patienten mit Burkholderia- oder MRSA-Infektion

Granulozyten wurden aus Vollblut isoliert, mit Annexin-V-FITC und Propidiumjodid gefärbt und so die apoptotischen und nekrotischen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die waagrechte Fläche zeigt den durchschnittlichen Anteil apoptotischer Zellen bei frisch isolierten Granulozyten gesunder Kontrollpersonen. Die Ergebnisbalken der Apoptose sind einfarbig dargestellt (Plazebo schwarz, Amitriptylin weiß bzw. grau), die Nekroseergebnisse gemustert (Plazebo schwarz gemustert, Amitriptylin weiß bzw. grau gemustert). Burkholderia (Patient 1 und 3), MRSA (Patient 8.) Plaz = Plazebo. Ohne Wert = kein Blut

Bei Patienten mit Burkholderia (Patient 1 und 3)– oder MRSA (Patient 8)- Infektion lag die Apoptose ebenso wie bei Patienten mit Pseudomonasinfektion meist um 5 % oder darunter, bei einem Patienten erreichte die Apoptose bis zu 25 %. Die Nekrose war bei einigen Patienten mit bis zu 27 % sehr hoch. Leider konnte bei den Burkholderia-infizierten Patienten kein Plazebozyklus zur Auswertung kommen. Patient 8 wies eine Doppelinfektion (Pseudomonas und MRSA) auf.

Es schien weder bei Apoptose noch bei Nekrose einen Zusammenhang zur Amitriptylinbehandlung zu geben.

In Abbildung 47 ist die Apoptose und Nekrose bei Blutgranulozyten von mit anderen bakteriellen Erregern infizierten CF-Patienten dargestellt.

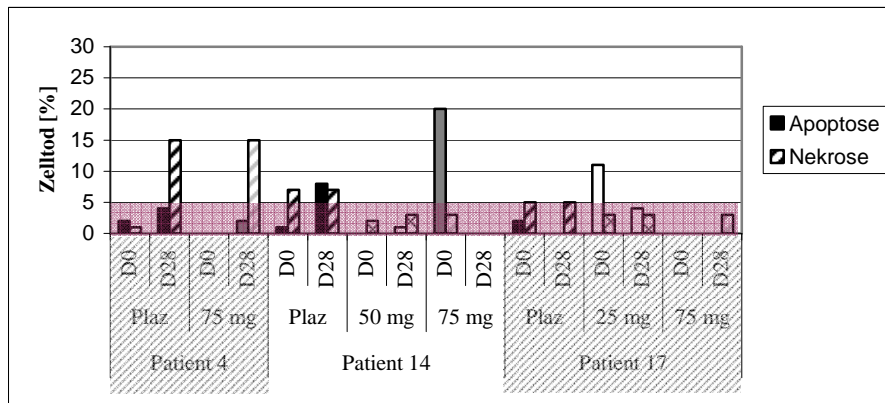


Abbildung 47: Übersicht über die Apoptose von Blutgranulozyten bei CF-Patienten mit anderen bakteriellen Erregern

Granulozyten wurden aus Vollblut isoliert, mit Annexin V FITC und Propidiumjodid gefärbt und so die apoptotischen und nekrotischen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die waagrechte Fläche zeigt den durchschnittlichen Anteil apoptotischer Zellen bei frisch isolierten Granulozyten gesunder Kontrollpersonen. Die Ergebnism Balken der Apoptose sind einfarbig dargestellt (Plazebo schwarz, Amitriptylin weiß bzw. grau), die Nekroseergebnisse gemustert (Plazebo schwarz gemustert, Amitriptylin weiß bzw. grau gemustert). Plaz = Plazebo. Ohne Wert = kein Blut

Bei Patienten mit anderen bakteriellen Erregern war der Anteil apoptotischer Blutgranulozyten eher niedrig und lag, wie bei den Kontrollgranulozyten gesunder Spender und den beiden anderen Infektionsgruppen, um 5 %. Ein Patient wies im Vergleich zu den anderen Patienten dieser Gruppe eine erhöhte Apoptose von bis zu 20 % auf. Die höchste Nekroserate lag bei 15 %. Es war weder bei der Apoptose noch bei der Nekrose ein Zusammenhang zur Amitriptylineinnahme feststellbar.

Zusammenfassung: Die Apoptose war generell bei den CF-Blutgranulozyten unverändert im Vergleich zu den Granulozyten Gesunder. Viele CF-Blutgranulozyten wiesen eine hohe Nekrose auf. Es war weder für die Apoptose noch für die Nekrose ein Zusammenhang mit der Amitriptylinbehandlung festzustellen.

4.3.3.3 Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen von CF-Blutgranulozyten

Granulozyten wurden aus heparinisiertem Vollblut von CF-Patienten mithilfe eines Histopaque-Gradienten isoliert. Die Messung reaktiver Sauerstoffverbindungen erfolgte mittels Chemilumineszenzmessungen nach Stimulation von 1 Mio Granulozyten pro ml mit opsonisiertem Zymosan A. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Luminol wird als Verstärkersubstanz eingesetzt, die mit beim oxidativen Burst gebildeten Sauerstoffverbindungen (vor allem HOCl) reagieren, dabei in einen angeregten Zustand versetzt werden und bei ihrer Rückkehr in den Grundzustand Photonen emittieren. Die Emission von Licht wird 30 Minuten lang gemessen und die Durchschnittswerte aus 3 gleichen Proben als Kurve aufgezeichnet. Die Fläche unter der Kurve wird als Integral berechnet und in relativen Lichteinheiten (Relative Light Units, RLUs) gemessen. Bei der Hälfte der Patienten wurden Blutproben abgenommen. Es konnte nicht an allen Tagen Blut abgenommen werden, die entsprechenden Tage wurden ohne Wert dargestellt.

In Abbildung 48 ist die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen bei Granulozyten von CF-Patienten mit chronischer *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion aufgeführt.

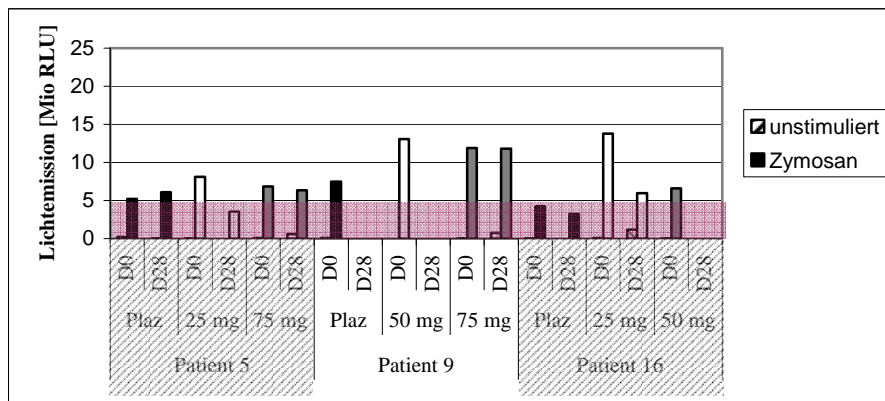


Abbildung 48: Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen von CF-Granulozyten bei Patienten mit Pseudomonasinfektion

Granulozyten wurden aus Vollblut isoliert und mit Hilfe der Chemilumineszenz-Methode wurden bei 1 Mio/ml Granulozyten die Bildung von ROS mit der Verstärkersubstanz Luminol gemessen und in der Einheit relative Lichteinheiten RLU angegeben, wobei die Skala in Millionen RLU dargestellt ist. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit opsonisiertem Zymosan A. Als Kontrolle müssen unstimulierte und stimulierte Zellen von Gesunden verwendet werden (der Kontrollwert nach Stimulation mit Zymosan A ist als waagrechte Fläche eingezeichnet). Die Ergebnisbalken mit Stimulation sind einfarbig dargestellt (Plazebo schwarz, Amitriptylin weiß bzw. grau), ohne Stimulation gemustert (Plazebo schwarz gemustert, Amitriptylin weiß bzw. grau gemustert). Plaz = Plazebo. Ohne Wert = kein Blut

Die Blutgranulozyten von mit Pseudomonas infizierten CF-Patienten produzierten im Grundzustand meist weniger ROS als die Granulozyten Gesunder (Werte in Abb. 48 nicht erkennbar). Sie zeigten meist eine deutlich verstärkte ROS-Bildung nach Stimulation mit Zymosan A im Vergleich zu Kontrollgranulozyten (5 bis 13 Mio RLU). Die Behandlung mit Amitriptylin bewirkte im Vergleich zur Plazebobehandlung eine erhöhte ROS-Produktion.

In Abbildung 49 ist die Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen bei Blutgranulozyten von CF-Patienten mit Burkholderia- oder MRSA-Infektion dargestellt.

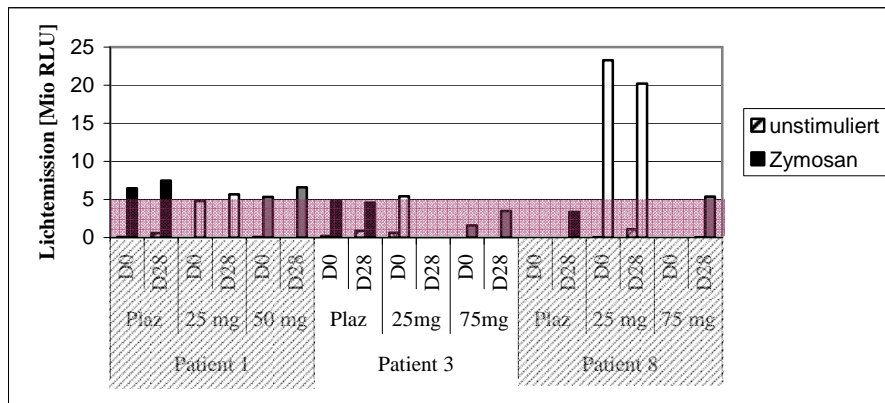


Abbildung 49: Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen von CF-Granulozyten bei Patienten mit *Burkholderia*- oder *MRSA*-Infektion

Granulozyten wurden aus Vollblut isoliert und mit Hilfe der Chemilumineszenz-Methode wurden bei 1 Mio/ml Granulozyten die Bildung von ROS mit der Verstärkersubstanz Luminol gemessen und in der Einheit relative Lichteinheiten (RLU) angegeben, wobei die Skala in Millionen RLU dargestellt ist. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit opsonisiertem Zymosan A. Als Kontrolle müssen unstimulierte und stimulierte Zellen von Gesunden verwendet werden, werden (der Kontrollwert nach Stimulation mit Zymosan A ist als waagrechte Fläche eingezeichnet). Die Ergebnisbalken mit Stimulation sind einfarbig dargestellt (Plazebo schwarz, Amitriptylin weiß bzw. grau), ohne Stimulation gemustert (Plazebo schwarz gemustert, Amitriptylin weiß bzw. grau gemustert). *Burkholderia* (Patient 1 und 3), *MRSA* (Patient 8). Plaz = Plazebo. Ohne Wert = kein Blut

Patienten mit *Burkholderia* (Patient 1 und 3)- oder *MRSA* (Patient 8)- Infektion produzierten im Grundzustand meist weniger ROS als die Granulozyten Gesunder (Werte in Abbildung 49 nicht erkennbar). Sie wiesen, ebenso wie Patienten mit *Pseudomonas*besiedelung, nach Stimulation eine vermehrte ROS-Produktion im Vergleich zu Gesunden auf (5 bis 23 Mio RLU). Bei Patienten mit *Burkholderia*infektion schien Amitriptylinbehandlung die ROS-Produktion eher zu verringern, der *MRSA*-infizierte Patient wies eine erhöhte ROS-Bildung auf.

In Abbildung 50 ist die ROS-Produktion bei Blutgranulozyten von mit anderen bakteriellen Erregern infizierten CF-Patienten dargestellt.

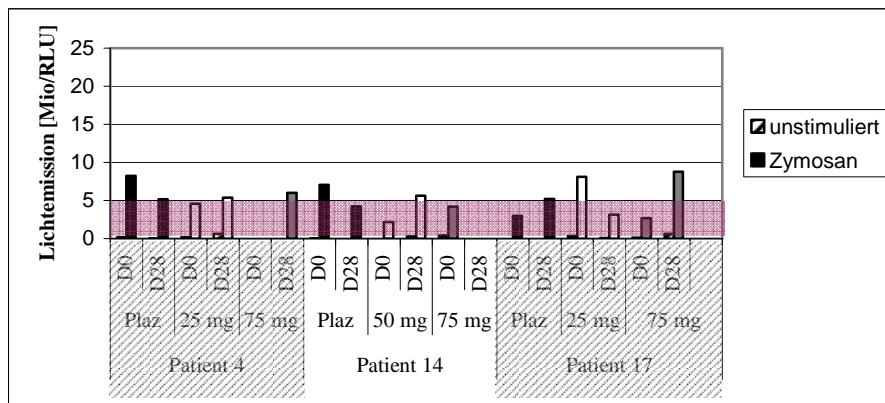


Abbildung 50: Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen von CF-Granulozyten bei Patienten mit anderen bakteriellen Erregern

Granulozyten wurden aus Vollblut von CF-Patienten isoliert und mit Hilfe der Chemilumineszenz-Methode wurden bei 1 Mio Granulozyten/ml die Bildung von ROS mit der Verstärkersubstanz Luminol gemessen und in der Einheit [RLU] angegeben, wobei die Skala in Millionen RLU dargestellt ist. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit opsonisiertem Zymosan A. Als Kontrolle müssen unstimulierte sowie stimulierte Granulozyten von Gesunden verwendet werden (der Kontrollwert nach Stimulation mit Zymosan A ist als waagrechte Fläche eingezeichnet). Die Ergebnisbalken mit Stimulation sind einfarbig dargestellt (Plazebo schwarz, Amitriptylin weiß bzw. grau), ohne Stimulation gemustert (Plazebo schwarz gemustert, Amitriptylin weiß bzw. grau gemustert). Plaz = Plazebo. Ohne Wert = kein Blut

Patienten mit anderen bakteriellen Erregern produzierten im Grundzustand weniger ROS als die Granulozyten Gesunder (Werte in Abbildung 50 nicht erkennbar). Die meisten der mit anderen bakteriellen Erregern besiedelten Patienten wiesen nach Stimulation eine erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen im Vergleich zu Granulozyten gesunder Spender auf (3 bis 9 Mio RLU), die allerdings weniger als die Produktion der beiden anderen Infektionsgruppen betrug. Die Behandlung mit Amitriptylin schien keinen eindeutigen Einfluss auf die ROS-Bildung zu besitzen.

Zusammenfassung: Die Granulozyten von CF-Patienten produzierten im Grundzustand meist weniger reaktive Sauerstoffverbindungen als die gesunder Kontrollpersonen. Nach Stimulation konnte eine vermehrte ROS-Produktion im Vergleich zu diesen beobachtet werden. Patienten mit Pseudomonasinfektion oder MRSA-Infektion wiesen nach Stimulation

die höchste ROS-Bildung auf. Bei diesen Patienten schien Amitriptylin eine verstärkende Wirkung auf die ROS-Produktion zu besitzen. Bei Patienten mit Burkholderiainfektion war die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen im Vergleich zu Patienten mit anderer bakterieller Keimbeseidung nicht erhöht und Amitriptylin schien möglicherweise eine hemmende Wirkung auf die ROS-Bildung zu besitzen.

4.3.4 Untersuchungen in CF-Sputum

Vorbemerkungen: Bei der Arbeit mit CF-Sputum müssen einige Dinge beachtet werden: Der Advia 120 ist nur für die Analyse von Blutproben ausgestattet und daher ist die Auswertung von Sputumproben ungenau. Desweiteren sind keine Angaben über die Dauer möglich, wie lange sich die Zellen (meist Granulozyten) bereits im Sputum vor dessen Gewinnung befanden. Auch ist generell nichts über die Stabilität der Zellen im Sputum bekannt. All dieses muss bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden.

In diesem Kapitel werden die Zellen des Sputums nach folgenden Kriterien charakterisiert:

4.3.4.1 Gesamtleukozytenzahl

4.3.4.2 Zusammensetzung der Leukozyten im Sputum (Cytospin)

4.3.4.3 Bestimmung toter Zellen (Trypanblau)

4.3.4.4 Charakterisierung apoptotischer und nekrotischer Zellen

4.3.4.4.1 Vergleich der Plazebogruppe mit Patienten nach Amitriptylinbehandlung

Dabei wurde jeweils folgende etwas willkürliche Einteilung vorgenommen:

Patienten mit Pseudomonasinfektion

Patienten mit Burkholderia – oder MRSA-Infektion

Patienten mit anderen bakteriellen Erregern

4.3.4.1 Gesamtleukozytenzahl im Sputum

Da der Advia 120 die Leukozytenzahlen u.a. auf der Basis der Peroxidase-Aktivität bestimmt und die sich im Sputum befindlichen Granulozyten größtenteils degranuliert bzw. teilweise auch abgestorben sind, kann kein richtiges Differentialblutbild erstellt werden. Da aber die Gesamtleukozytenzahl in einem zweiten, Peroxidase-unabhängigen Kanal („Baso-Kanal“) über die Kernform nach dem „cytoplasmatic stripping“ ermittelt wird, wird die Gesamtzahl der Leukozyten richtig bestimmt. In Abb. 51 sind exemplarisch die Advia-Bilder einer

Sputumprobe und einer Vollblutprobe eines Patienten gegenübergestellt.

Sputum von CF-Patienten wurde gewogen und eine 1 zu 4 Verdünnung mit PBS hergestellt, indem zu einem Teil Sputum die dreifache Menge an PBS gegeben wurde. Um eine Verstopfung des Advia 120 zu vermeiden, wurde das Sputum durch ein 40 µm-Zellsieb gefiltert. Der Advia ist eigentlich nur für Vollblut ausgelegt, deshalb wird nur die Gesamtleukozytenzahl (= Gesamtzellzahl) im Sputum angegeben und nicht die weitere Differenzierung in die verschiedenen Zelltypen. Eine genauere morphologische Auswertung wird im nächsten Kapitel durch die Auszählung von Cytospins dargestellt. Ein Problem war die Konsistenz der Sputumproben, die vor allem bei Patienten mit schwerer Infektion (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *MRSA*) wesentlich zäher und fester war als bei Proben von CF-Patienten mit anderen bakteriellen Erregern.

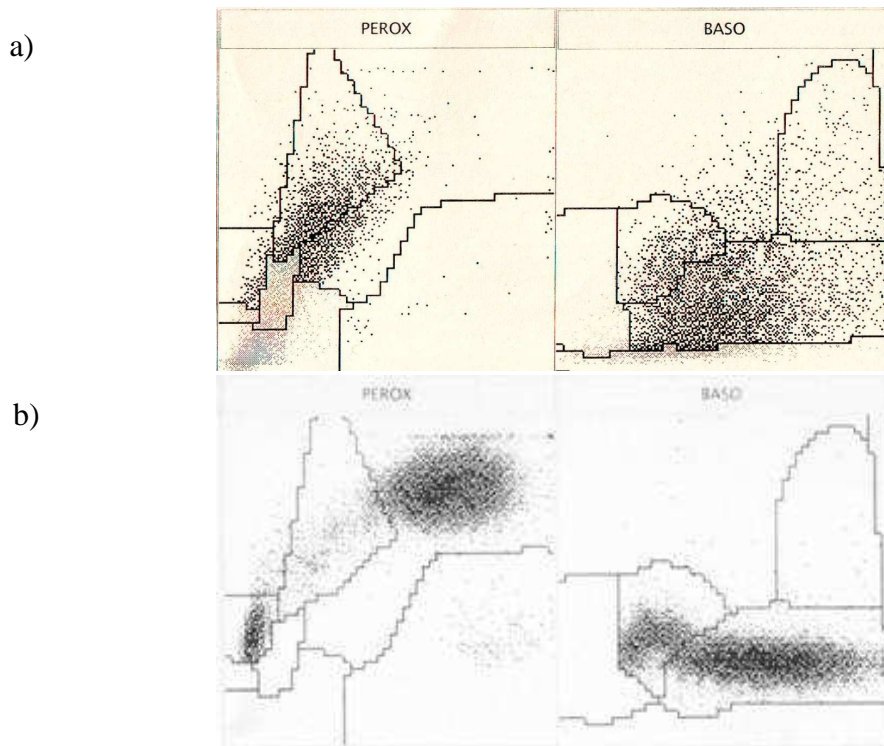


Abbildung 51: Beispiel: Sputum eines CF-Patienten im Advia 120 und zum Vergleich die Blutprobe desselben Patienten

a) Sputum von Patient 3 wurde nach 1 zu 7-Verdünnung im Advia 120 gemessen.

b) Analyse des Vollbluts von Patient 3 im Advia 120

CF-Sputum wurde nach Verdünnung im Advia 120 gemessen, es sind sehr viele Trümmer zu sehen. Die mikroskopische Auszählung der Zellen ergab zu 100 % neutrophile Granulozyten,

wie in Kapitel 4.3.4.2 gezeigt. Die numerisierten Angaben bezüglich des Prozentsatzes an Neutrophilen im Advia stimmen wegen der Degranulation nicht. Im Vergleich zu Blutgranulozyten gesunder Kontrollpersonen zeigt sich in Abbildung 51 bereits eine deutliche Linksverschiebung, siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2.4 (Aufarbeitung von frischen Sputumproben von CF-Patienten, Abbildung 13). Dies zeigt eine bereits erfolgte Degranulation der Granulozyten. Generell ist die Unterscheidung zwischen Granulozyten und Monozyten im Sputum im Advia 120 deshalb sehr schwierig. Es konnte nicht an allen Tagen Sputum produziert werden, die entsprechenden Tage wurden ohne Wert dargestellt.

In Abbildung 52 ist die Leukozytenzahl im Sputum von CF-Patienten mit chronischer Pseudomonasinfektion dargestellt.

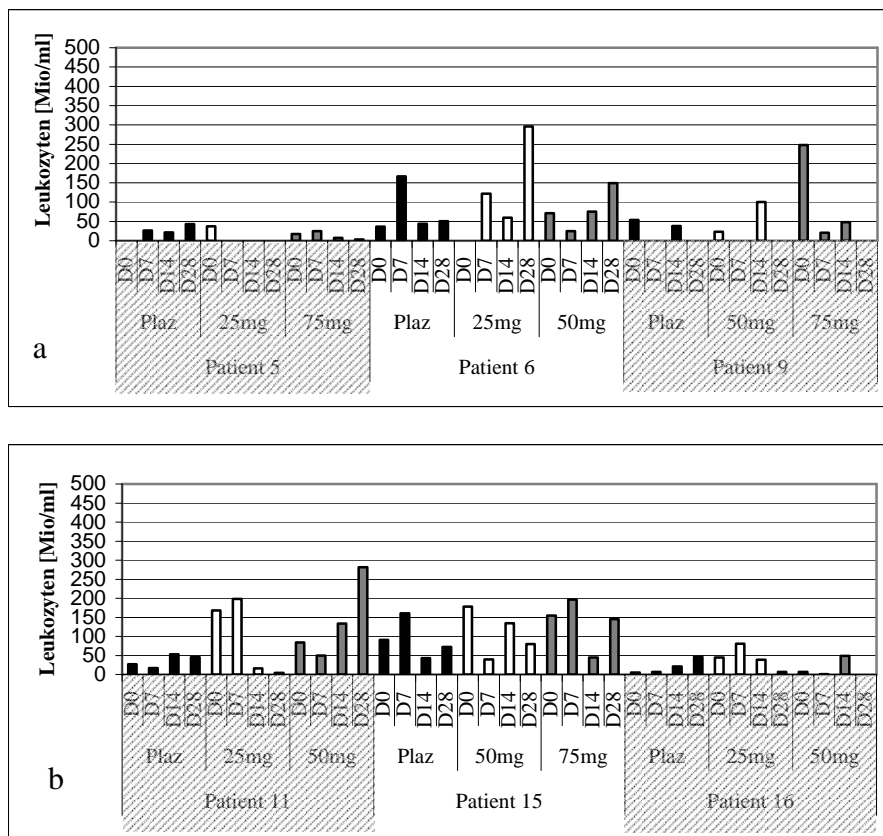


Abbildung 52: Leukozytenzahlen bei CF-Patienten mit Pseudomonasinfektion

Im CF-Sputum wurden die Leukozytenzahlen im Advia 120 bestimmt.

a) Patient 5, 6, 9, b) Patient 11, 15, 16. Plaz= Plazebo. Ohne Wert = kein Sputum

Mit Pseudomonas infizierte CF-Patienten wiesen Leukozytenzahlen im Sputum von bis zu 300 Mio/ml auf. Amitriptylin schien keinen eindeutigen Einfluss auf die Leukozytenzahl im

Sputum zu besitzen.

In Abbildung 53 sind die Ergebnisse der Leukozytenbestimmung im Sputum bei Patienten mit Burkholderia – oder MRSA-Infektion abgebildet.

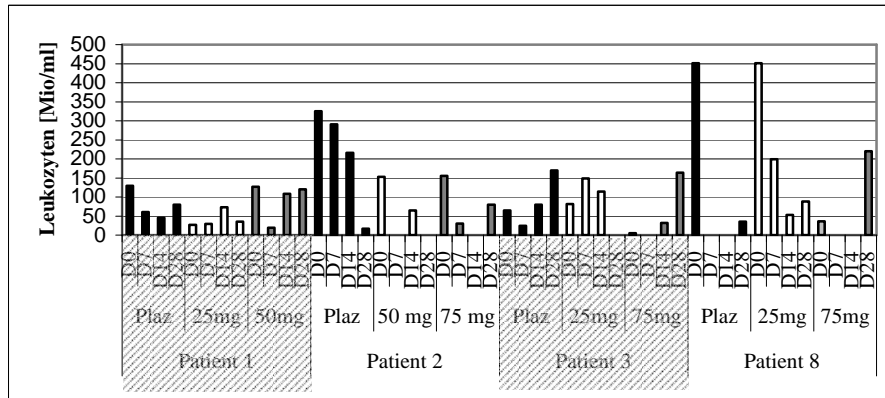


Abbildung 53: Leukozytenzahl im Sputum von CF-Patienten mit Burkholderia- oder MRSA-Infektion

Die Leukozytenzahlen wurden im Advia 120 gemessen. Burkholderia (Patient 1 und 3), MRSA (Patient 2 und 8). Plaz= Plazebo. Ohne Wert = kein Sputum

Aus Abbildung 53 wird ersichtlich, dass die Leukozytenzahl im Sputum von Patienten mit Burkholderiainfektion (Patient 1 und 3) geringer als bei Patienten mit Pseudomonasinfektion war. Amitriptylin schien keine eindeutige Wirkung auf die Leukozytenzahl im Sputum zu besitzen. Die Leukozytenzahl im Sputum von CF-Patienten, die mit MRSA besiedelt waren (Patient 2 und 8), schien ungefähr so hoch zu sein wie bei Patienten mit Pseudomonasinfektion. Beide Patienten waren zusätzlich mit Pseudomonas besiedelt. Hier schien Amitriptylin eine Verringerung der Leukozytenzahl im Sputum zu bewirken.

Die Leukozytenzahl im Sputum von Patienten mit anderen bakteriellen Erregern ist in Abbildung 54 dargestellt.

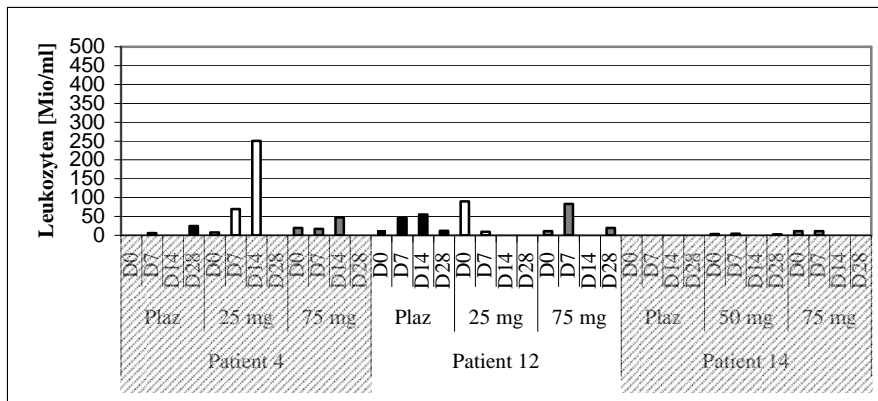


Abbildung 54: Leukozytenzahl im Sputum von CF-Patienten mit anderen bakteriellen Erregern

Im Sputum wurden die Leukozytenzahlen im Advia 120 gemessen. Plaz= Plazebo. Ohne Wert = kein Sputum

Bei Patienten mit einer Besiedelung mit anderen bakteriellen Erregern lag die Leukozytenzahl im Sputum selten über 50 Millionen pro ml. Amitriptylin schien bei manchen Patienten eine Erhöhung der Leukozytenzahl im Sputum zu bewirken.

Die Zahl an Leukozyten im Sputum von Patienten mit anderen bakteriellen Erregern war im Vergleich zu Patienten der anderen Infektionsgruppen insgesamt gering, besonders bei Patient 14. Hier ist zu beachten, dass das Sputum von Patient 14 immer induziert war (siehe Tabelle 7).

Zusammenfassung: Im Sputum war die Leukozytenzahl bei Patienten mit Pseudomonas-Burkholderia- oder MRSA-Infektion im Vergleich zu Patienten mit anderen bakteriellen Erregern erhöht. Nach Behandlung mit Amitriptylin verringerte sich bei Patienten mit MRSA-Infektion, die zusätzlich mit Pseudomonas besiedelt waren, die Zahl der Leukozyten im Sputum.

4.3.4.2 Zusammensetzung der Leukozyten im Sputum (Cytospin)

Auszählung der im Sputum enthaltenen Zellen mit Hilfe von Cytospins

CF-Sputum aus der APA II-Studie wurde mit PBS verdünnt und durch ein 40 µm-Zellsieb gefiltert. 50 000 Zellen aus dem Sputum wurden für 5 Minuten bei 800 rpm mit Hilfe der Zytocentrifuge von Shandon auf einen Objektträger geschleudert. Nach May-Grünwald/Giemsa-Färbung wurden die Zellen unter dem Mikroskop in der 400fachen Vergrößerung ausgezählt, indem 100 Zellen ermittelt und die prozentualen Anteile der jeweiligen Zellsorten bestimmt wurden. Die Cytospins wurden für jeden Patienten am ersten und am letzten Tag der 3 Zyklen ausgezählt. War von dem jeweiligen Tag kein Sputum vorhanden, wurde der Cytospin von Tag 7 oder Tag 14 ausgezählt. Ausgewählte Cytospins wurden im Mikroskop in einer 400fachen Vergrößerung fotografiert.

Die Ergebnisse sind wieder nach Infektionen unterteilt, erst werden die Patienten mit Pseudomonasinfektion betrachtet, deren Ergebnisse in Tabelle 8 dargestellt sind.

Tabelle 8: Auszählung der Cytospins von CF-Patienten mit Pseudomonasinfektion

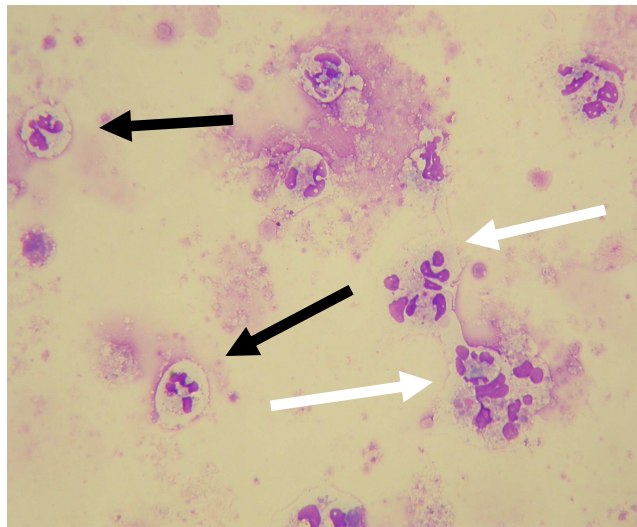
Patient 5	Plazebo, D7	Plazebo, D14	25 mg, D0	25 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D28
Neutrophile	98	99	98	KeinSputum	98	99
Epithelzellen	1	1	1			
Speicherzellen					1	1
Lymphozyten	1				1	
Monozyten			1			
Patient 6	Plazebo, D0	Plazebo, D28	25 mg, D7	25 mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D28
Neutrophile	99	100	99	100	100	100
Lymphozyten	1					
Myelozyt			1			
Patient 9	Plazebo, D0	Plazebo, D14	50 mg, D0	50 mg, D14	75 mg, D0	75 mg, D14
Neutrophile	97	61	100	99	100	90
Epithelzellen	3	38				7
Speicherzellen				1		
Eosinophile		1				3

Patient 11	Plazebo, D0	Plazebo, D28	25 mg, D0	25 mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D28
Neutrophile	100	96	100	99	100	98
Epithelzellen		3				1
Lymphozyten		1				1
Eosinophile				1		
Patient 15	Plazebo, D0	Plazebo, D28	50 mg, D0	50 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D28
Neutrophile	100	100	100	100	99	100
Epithelzellen					1	
Patient 16	Plazebo, D0	Plazebo, D28	25 mg, D0	25 mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D14
Neutrophile	93	92	100	100	100	94
Epithelzellen	7	8				6

Die Cytospins von mit Pseudomonas infizierten CF-Patienten wurden nach Färbung mit May-Grünwald/Giemsa im Mikroskop bei 400facher Vergrößerung ausgezählt und der prozentuale Anteil der jeweiligen Zelltypen ermittelt.

Patienten mit Pseudomonasbesiedelung wiesen fast nur Neutrophile im Sputum auf. Amitriptylin schien keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des Sputums zu besitzen.

In Abbildung 55 ist ein typisches Mikroskopbild zu sehen.



*Abbildung 55: Sputum eines Patienten mit Pseudomonasinfektion, 400fache Vergrößerung
Neben Schleim sind vor allem neutrophile Granulozyten einzeln (schwarze Pfeile) oder in Gruppen (weiße Pfeile) im Sputum zu finden. Die Probe zeigt spontanes Sputum aus dem Plazebozyklus.*

Die mikroskopische Betrachtung der Sputumproben von Patienten mit Pseudomonasinfektion ergab fast nur Neutrophile, die entweder einzeln oder in Gruppen vorkamen und größtenteils in Schleim eingebettet waren, wodurch die Zellabgrenzung deutlich sichtbar wurde.

Die Auszählung der Cytospins von Patienten mit Burkholderia- oder MRSA-Infektion ergab folgende Ergebnisse, die in Tabelle 9 dargestellt sind.

Tabelle 9: Auszählung der Cytospins von Patienten mit Burkholderia – oder MRSA-Infektion

Patient 1	Plazebo, D0	Plazebo, D28	25 mg, D0	25 mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D28
Neutrophile	99	99	98	100	100	95
Epithelzellen			2			3
Speicherzellen						1
Lymphozyten	1	1				1
Patient 2	Plazebo, D0	Plazebo, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	75 mg, D0	75 mg, D28
Neutrophile	98	100	97	92	95	100
Epithelzellen	1			8	4	
Speicherzellen	1				1	
Monozyten			3			
Patient 3	Plazebo, D0	Plazebo, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	75 mg, D0	75 mg, D28
Neutrophile	99	98	100	100	100	100
Epithelzellen		1				
Speicherzellen	1	1				
Patient 8	Plazebo, D0	Plazebo, D28	25 mg, D0	25 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D28
Neutrophile	100	99	NurSchleim	98	93	100
Epithelzellen				1	5	
Speicherzellen				1		
Lymphozyten					2	
Monozyten		1				

Die Cytospins von mit Burkholderia- (Patient 1 und 3) oder MRSA (Patient 2 und 8)-infizierten Patienten wurden nach Färbung mit May-Grünwald/Giemsa im Mikroskop bei 400facher Vergrößerung ausgezählt und der prozentuale Anteil der jeweiligen Zelltypen ermittelt.

Patienten mit Burkholderia (Patient 1 und 3)- oder MRSA (Patient 2 und 8)-Infektion wiesen fast nur Neutrophile im Sputum auf. Zusätzlich konnten vor allem Epithelzellen und Speicherzellen beobachtet werden. Die beiden MRSA-Patienten wiesen zusätzlich eine Pseudomonasinfektion auf. Teilweise wurden unter Amitriptylinbehandlung mehr Epithelzellen gezählt.

In Abbildung 56 ist ein typisches Mikroskopbild dargestellt.

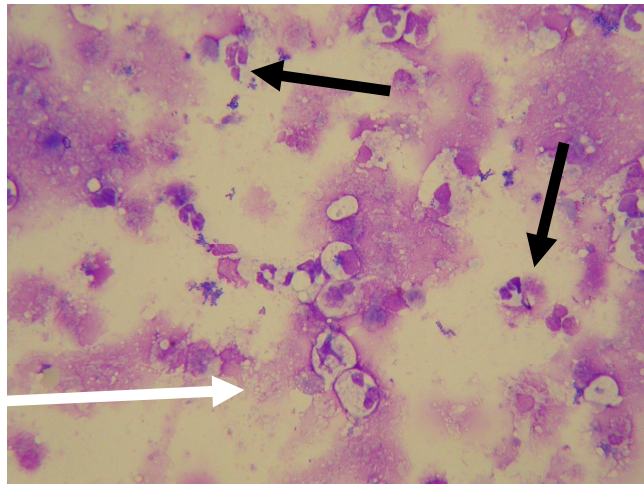


Abbildung 56: Sputum eines Patienten mit MRSA-Infektion, 400fache Vergrößerung

Neben Schleim sind vor allem neutrophile Granulozyten einzeln (schwarze Pfeile) oder in Gruppen (weißer Pfeil) im Sputum zu finden.

Die Probe zeigt spontanes Sputum aus dem Plazebozyklus.

Bei dem Patienten mit MRSA-Infektion waren Neutrophile, Schleim und Trümmer zu erkennen. Die Neutrophilen sind in die Schleimschicht eingebettet.

Patienten mit anderen bakteriellen Erregern wiesen die in Tabelle 10 dargestellten Ergebnisse auf.

Tabelle 10: Auszählung der Cytospins von Patienten mit anderen bakteriellen Erregern

Patient 4	Plazebo, D8	Plazebo, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	75 mg, D0	75 mg, D14
Neutrophile	46	77	83	59	58	74
Epithelzellen	45	13	17	40	42	24
Speicherzellen	7					2
Lymphozyten	1	10				
Monozyten				1		
Promyelozyt	1					
Patient 12	Plazebo, D0	Plazebo, D28	25 mg, D0	25 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D28
Neutrophile	56	54	63	Kein Sputum	95	14
Epithelzellen	44	38	26		1	86
Speicherzellen			10		2	
Lymphozyten		8	1		2	
Patient 14	Plazebo, D0	Plazebo, D28	50 mg, D0	50 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D7
Neutrophile	Kein Sputum	Kein Sputum	52	58	94	43
Epithelzellen			2		1	1
Speicherzellen			31	42	4	54
Lymphozyten			15			
Monozyten					1	1
Eosinophile						1
Patient 17	Plazebo, D7	Plazebo, D28	25 mg, D7	25 mg, D28	75mg, D0	75 mg, D14
Neutrophile	71	47	18	95	94	93
Epithelzellen	28	52	80	4	6	7
Speicherzellen	1		2	1		
Lymphozyten		1				

Die Cytospins von Patientensputum wurden nach Färbung mit May-Grünwald/Giemsa im Mikroskop bei 400facher Vergrößerung ausgezählt und der prozentuale Anteil der jeweiligen Zelltypen ermittelt.

Bei Patienten mit anderen bakteriellen Erregern waren sehr viele abgeschilferte Epithelzellen im Sputum zu finden, ebenso viele Neutrophile und Speicherzellen. Patient 14 wies besonders viele Speicherzellen auf. Bei diesem Patienten musste das Sputum immer induziert werden.

Es ist kein Zusammenhang zur Amitriptylinbehandlung festzustellen. In Abbildung 57 ist ein typisches Mikroskopbild zu sehen, im Vergleich hierzu ist in Abbildung 58 ein Mikroskopbild von Patient 14 (viele Speicherzellen) dargestellt.

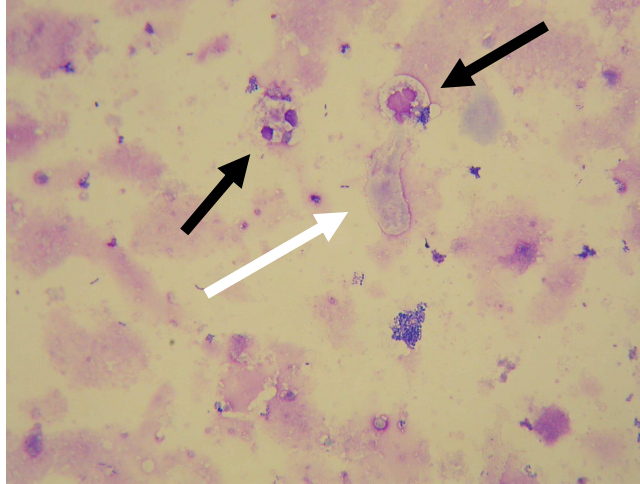
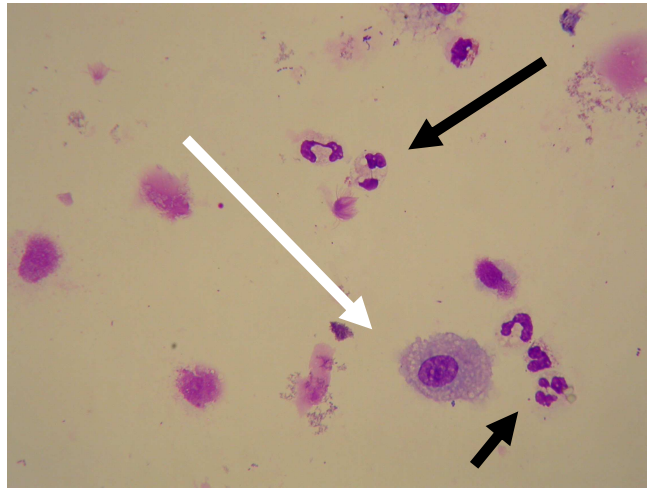


Abbildung 57: Sputum eines Patienten mit anderen bakteriellen Erregern, 400fache Vergrößerung

Neben Schleim, Trümmern und abgeschilferten Zellen (weißer Pfeil) sind neutrophile Granulozyten (schwarze Pfeile) im Sputum zu finden. Die Probe zeigt induziertes Sputum aus dem Plazebozyklus.

Im Sputum eines Patienten mit Besiedelung mit anderen bakteriellen Erregern fielen neben Neutrophilen, Schleim und abgeschilferten Epithelzellen die vielen Trümmer auf. Das Sputum musste an diesem Tag induziert werden. Generell war die Induktion des Sputums bei Patienten mit Besiedelung mit anderen bakteriellen Erregern viel häufiger notwendig als bei den anderen Gruppen. Bei Patient 14 musste das Sputum immer induziert werden und enthielt sehr viele Speicherzellen (Abbildung 58).



*Abbildung 58: Sputum mit Speicherzellen (Patient 14), 400fache Vergrößerung
Neben Neutrophilen (schwarze Pfeile), Schleim, Trümmern und abgeschilferten Zellen sind Speicherzellen (weißer Pfeil) im Sputum zu finden. Die Probe zeigt induziertes Sputum während der Behandlung mit 50 mg Amitriptylin.*

Das Sputum von Patient 14 wies neben Neutrophilen und abgeschilferten Zellen sehr viele Speicherzellen auf.

Zusammenfassung:

Patienten mit Pseudomonas-, Burkholderia- oder MRSA-Infektion wiesen fast nur Neutrophile im Sputum auf. Bei Patienten mit anderen bakteriellen Erregern bestand das Sputum oft aus Neutrophilen und Epithelzellen. Bei Patient 14, dessen Sputum immer induziert werden musste, waren sehr viele Speicherzellen zu beobachten. Bei einigen Burkholderia- und MRSA-Patienten schien Amitriptylin die Anzahl an Epithelzellen im Sputum zu erhöhen.

4.3.4.3 Bestimmung toter Zellen (Trypanblau)

Natives CF-Sputum aus der APA II-Studie wurde 1 zu 4 mit PBS verdünnt und durch ein 40 µm-Zellsieb gefiltert. Die Zellen aus dem Sputum wurden 1:2 mit Trypanblau gemischt und in einer Neubauerzählkammer wurde der Prozentsatz der gefärbten blauen, also toten Zellen bestimmt. Es konnte nicht an allen Tagen Sputum produziert werden. Diese Tage wurden ohne Wert dargestellt. Von einigen ausgewählten Proben wurde exemplarisch ein Mikroskopbild gemacht.

In Abbildung 59 sind die Ergebnisse der Trypanblauauswertung im Sputum bei Patienten mit Pseudomonasinfection dargestellt.

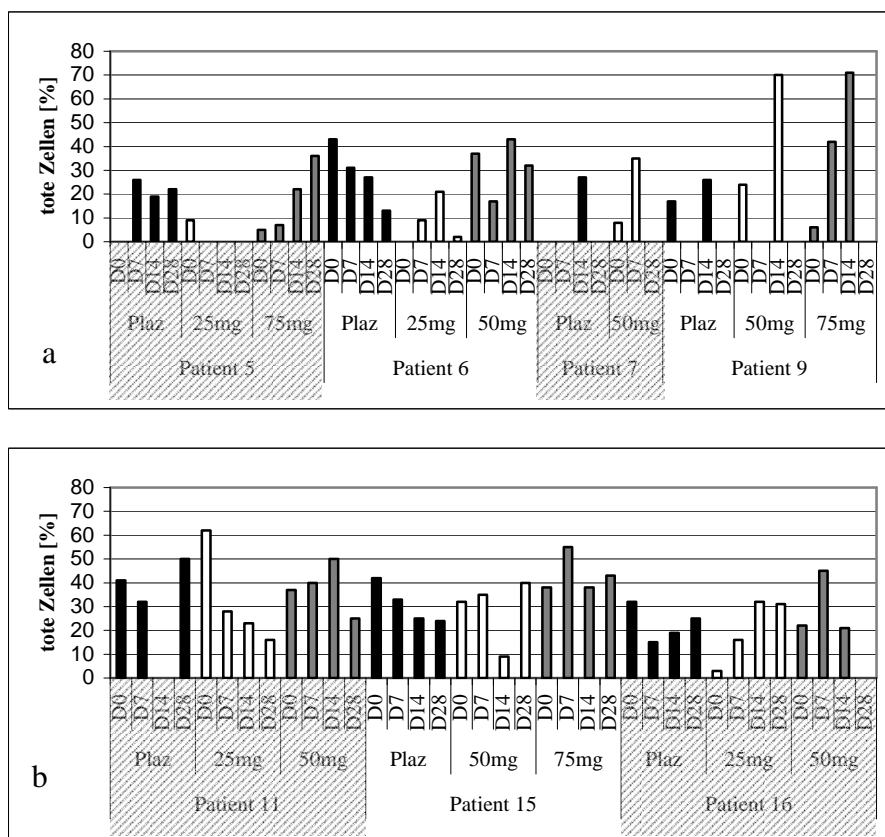


Abbildung 59: Übersicht über den prozentualen Anteil toter Zellen im Sputum bei CF-Patienten mit Pseudomonasinfection

Plaz = Plazebo, ohne Wert = kein Sputum

Der Anteil der toten Zellen im Sputum pseudomonasinfizierter Patienten lag durchschnittlich bei ungefähr 20 bis 45 %. Es scheint sich bei einigen Patienten ein Trend zur Zunahme der toten Zellen während der Amitriptylinbehandlung abzuzeichnen. Bei Patient 16 wies das bereits 7 Stunden alte Sputum des siebten Tages des Behandlungszyklus mit 50 mg

Amitriptylin eine besonders hohe Anzahl toter Zellen auf.

In Abbildung 60 ist eine typische Mikroskopaufnahme zu sehen.

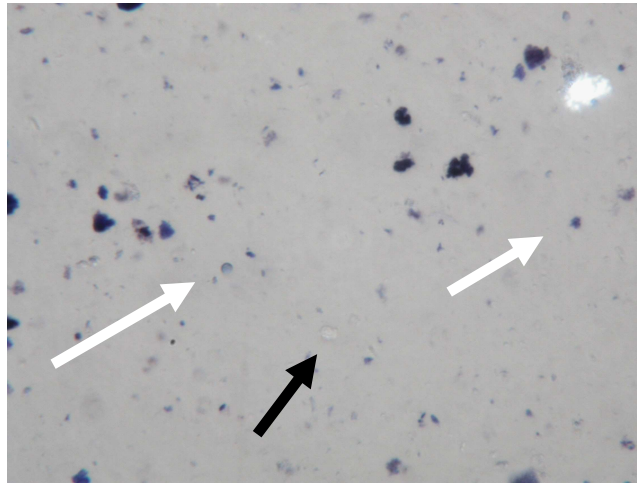


Abbildung 60: Trypanblaufärbung von *Pseudomonas*sputum, 100fache Vergrößerung

CF-Sputum wurde 1 zu 2 mit Trypanblau gefärbt. Lebende Zellen sind weiß (schwarzer Pfeil). Tote Zellen sind blau (weißer Pfeil).

Bei dem in Abbildung 60 gezeigten *Pseudomonas*sputum sind nur wenige Zellen zu erkennen. Die lebenden Zellen sind weiß, die toten vom Trypanblau blau gefärbt. Es sind sehr viele Trümmer zu erkennen, bei denen es sich eventuell teilweise um Aggregate toter Zellen handelt.

In Abbildung 61 ist der Prozentsatz toter Zellen von CF-Patienten mit *Burkholderia* – oder MRSA-Infektion gezeigt.

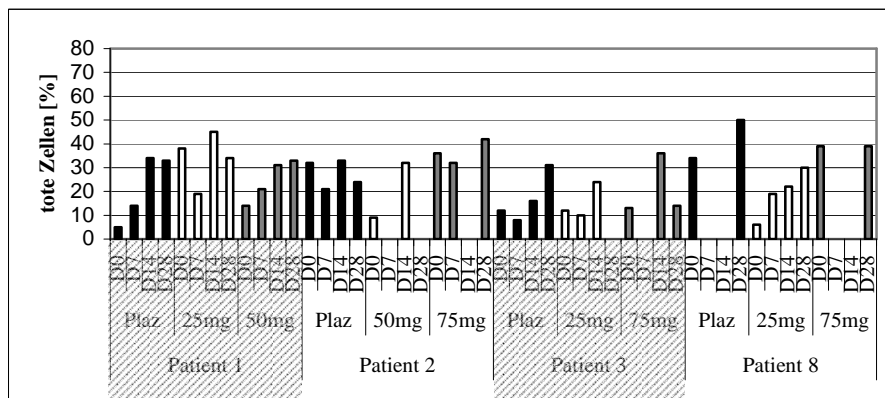
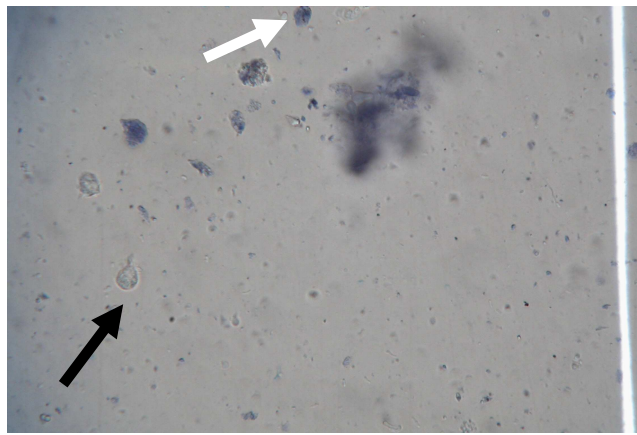


Abbildung 61: Übersicht über den prozentualen Anteil toter Zellen im Sputum bei CF-Patienten mit *Burkholderia* (Patient 1 und 3)- oder MRSA (Patient 2 und 8)-Infektion.

Plaz = Plazebo, ohne Wert = kein Sputum

Der Anteil toter Zellen im Sputum von Patienten mit anderen bakteriellen Erregern liegt durchschnittlich bei ungefähr 20 bis 40 %. Es schien sich bei einigen Patienten ein Trend zu einer erhöhten Anzahl toter Zellen während der Amitriptylineinnahme abzuzeichnen. Bei Patient 4 wies das 11 Stunden alte Sputum des 14. Tages des Behandlungszyklus mit 25 mg Amitriptylin eine sehr hohe Anzahl toter Zellen auf.



*Abbildung 64: Trypanblaufärbung von Sputum mit anderen bakteriellen Erregern, 100fache Vergrößerung
CF-Sputum wurde 1 zu 2 mit Trypanblau gefärbt. Lebende Zellen sind weiß (schwarzer Pfeil). Tote Zellen sind blau (weißer Pfeil).*

Bei dem in Abbildung 64 gezeigten Sputum mit anderen bakteriellen Erregern sind lebende und tote Zellen zu sehen, ebenso einige Trümmer.

Zusammenfassung: Durchschnittlich ergab die Trypanblauauszählung einen Anteil von ungefähr 20 bis 45 % toter Zellen im CF-Sputum. Es konnte bei einigen Patienten eine erhöhte Anzahl toter Zellen während der Amitriptylinbehandlung festgestellt werden.

4.3.4.4 Charakterisierung apoptotischer und nekrotischer Zellen im Sputum

Die Apoptose im Sputum wurde bestimmt, indem natives Sputum mit PBS verdünnt wurde. Anschließend erfolgte eine Filterung durch ein 40µm-Zellsieb, um das empfindliche FACS-Gerät nicht zu verstopfen. Die Untersuchung der Apoptose und Nekrose der Zellen im Sputum erfolgte durch eine Färbung der Zellen mit Annexin V FITC und Propidiumjodid. Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer des Gerätetyps FACSCalibur, die Auswertung durch die Einteilung in 4 Quadranten mit Hilfe der Quadrantenstatistik durch Erfassen des Prozentsatzes an Zellen in den jeweiligen Feldern. Wegen Durchführungsproblemen im ersten Zyklus bei der Apoptosebestimmung sind die Ergebnisse dieses Zyklus nicht gezeigt. Es

konnte nicht an allen Tagen Sputum produziert werden. Die entsprechenden Tage wurden ohne Wert dargestellt.

In Abbildung 65 ist der Anteil apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen im Sputum von CF-Patienten mit Pseudomonasinfektion gezeigt.

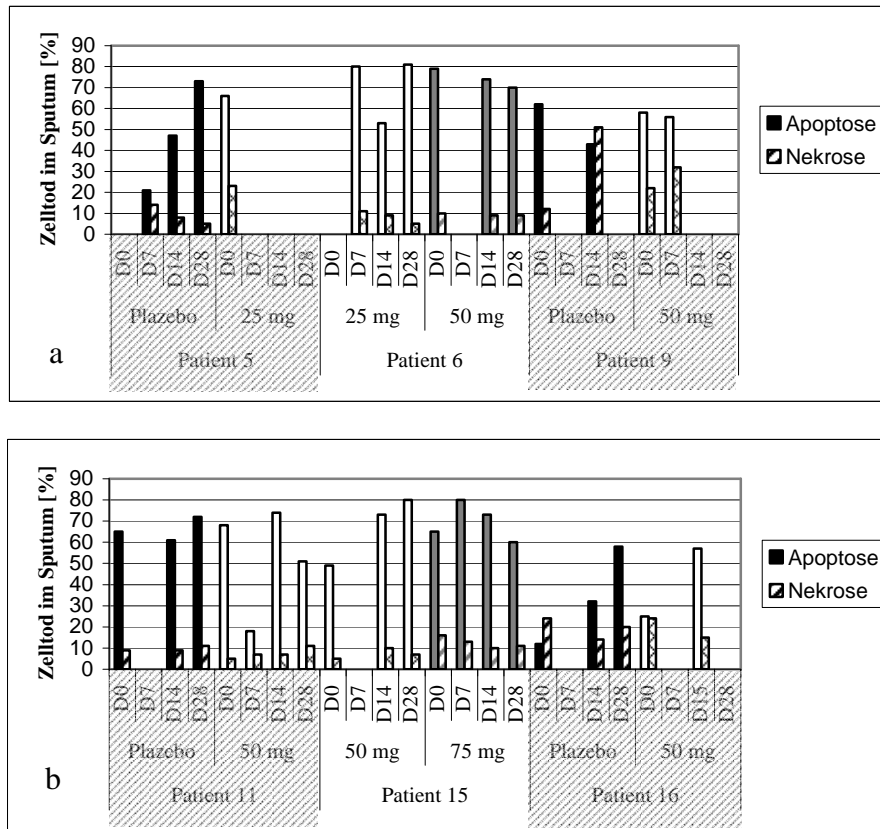


Abbildung 65: Übersicht über den Prozentsatz apoptotischer und nekrotischer Zellen im Sputum bei CF-Patienten mit Pseudomonasinfektion

Die Ergebnisbalken der Apoptose sind einfarbig dargestellt (Placebo schwarz, Amitriptylin weiß bzw. grau), die Nekroseergebnisse gemustert (Placebo schwarz gemustert, Amitriptylin weiß bzw. grau gemustert).

Plaz = Placebo, ohne Wert = kein Sputum

Die Patienten mit Pseudomonasbesiedelung wiesen einen hohen Anteil apoptotischer Zellen von 20 bis 80 % auf. Der Prozentsatz nekrotischer Zellen lag zwischen 10 und 50 %. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Behandlung mit Amitriptylin und der Änderung der Apoptose und Nekrose beobachtet werden.

Abbildung 66 zeigt die Anteile apoptotischer und nekrotischer Zellen im Sputum von Burkholderia- oder MRSA-Patienten.

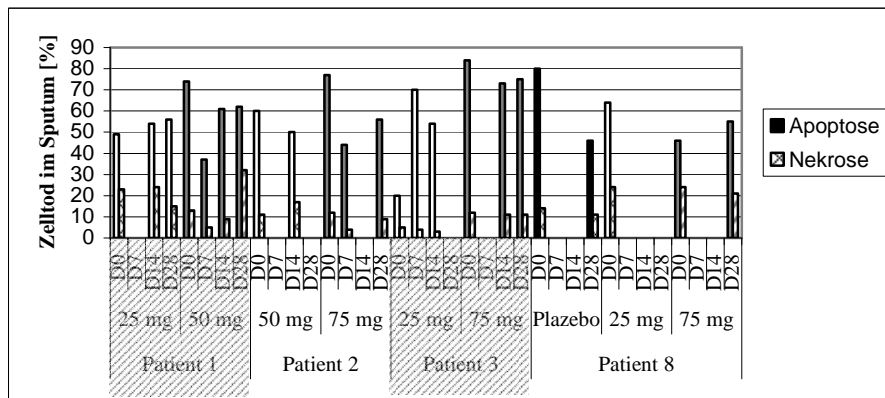


Abbildung 66: Übersicht über den Prozentsatz apoptotischer und nekrotischer Zellen im Sputum bei CF-Patienten mit Burkholderia- oder MRSA-Infektion

Die Ergebnisbalken der Apoptose sind einfarbig dargestellt (Plazebo schwarz, Amitriptylin weiß bzw. grau), die Nekroseergebnisse gemustert (Plazebo schwarz gemustert, Amitriptylin weiß bzw. grau gemustert).

Plaz = Plazebo, ohne Wert = kein Sputum

Die Patienten mit Burkholderia- oder MRSA-Infektion wiesen eine hohe Apoptose zwischen 45 und 85 % auf. Der Anteil nekrotischer Zellen lag bei 5 bis 35 %. Patient 2 und 8 wiesen zusätzlich eine Pseudomonasinfektion auf. Es konnte kein Zusammenhang zur Amitriptylinbehandlung hergestellt werden.

In Abbildung 67 sind die Ergebnisse der Patienten mit anderen bakteriellen Erregern zu sehen.

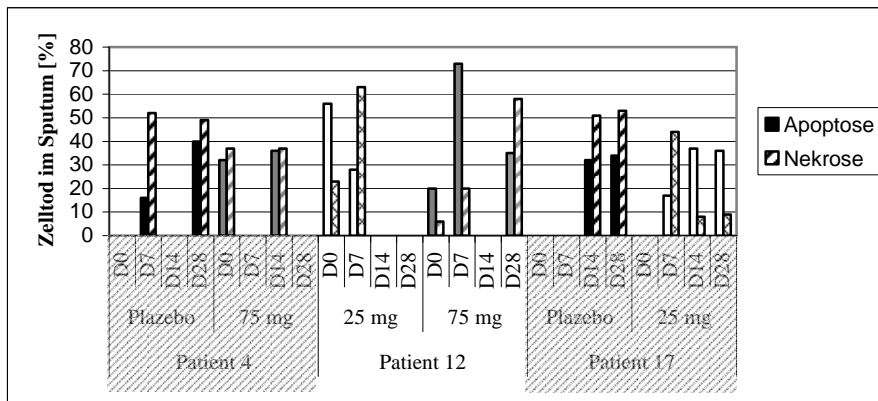


Abbildung 67: Übersicht über den Prozentsatz apoptotischer und nekrotischer Zellen im Sputum bei CF-Patienten mit anderen bakteriellen Erregern

Die Ergebnisbalken der Apoptose sind einfarbig dargestellt (Plazebo schwarz, Amitriptylin weiß bzw. grau), die Nekroseergebnisse gemustert (Plazebo schwarz gemustert, Amitriptylin weiß bzw. grau gemustert).

Plaz = Plazebo, ohne Wert = kein Sputum

Im Sputum von CF-Patienten mit anderen bakteriellen Erregern lag die Apoptose bei 10 bis 75 % (durchschnittlich 20 bis 50 %). Die Nekrose lag höher als bei den anderen Gruppen (zwischen 5 und 65 %, durchschnittlich 10 bis 50 %). Es konnte kein Zusammenhang zur Amitriptylinbehandlung festgestellt werden. Das Sputum von Patient 12 war am ersten Tag des Behandlungszyklus mit 25 mg Amitriptylin sowohl induziert als auch 5 Stunden alt und wies viele apoptotische Zellen auf, ebenso war das spontane Sputum des 7. Tages des 75 mg-Zyklus fast 6 Stunden alt und enthielt viele apoptotische Zellen.

Zusammenfassung: Der Anteil apoptotischer Zellen war bei Patienten mit Pseudomonas, Burkholderia oder MRSA im Vergleich zu Patienten mit anderen bakteriellen Erregern sehr hoch, während die Nekrose verringert zu sein schien. Es war kein Zusammenhang zur Amitriptylinbehandlung festzustellen.

Im Folgenden werden Apoptose und Nekrose im Sputum bei den Patienten gezeigt, bei denen der Plazebozyklus in die Wertung aufgenommen werden konnte. Dies war nur für CF-Patienten mit Pseudomonasinfektion und Infektion mit MRSA oder anderen bakteriellen Erregern möglich.

4.3.4.4.1 Vergleich der Placebogruppe mit Patienten nach Amitriptylinbehandlung

Der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen des ersten Tages des Placebozyklus wurde als 100% gesetzt und die anderen Zyklen darauf bezogen. In Abbildung 68 ist die prozentuale Auswertung für CF-Patienten mit Pseudomonasinfektion dargestellt.

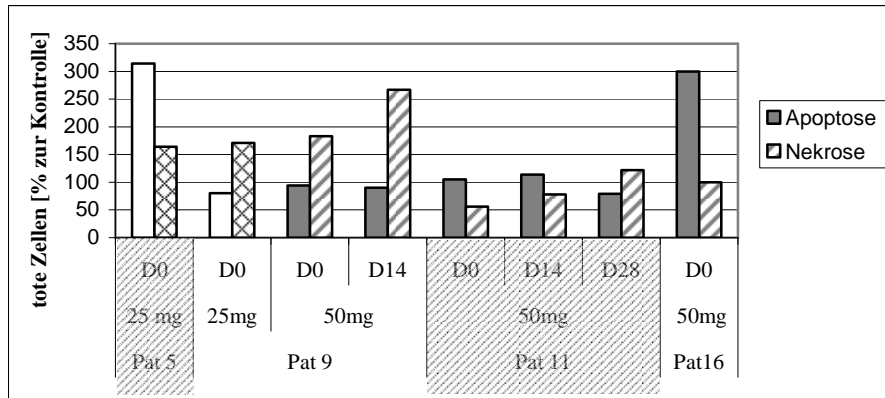


Abbildung 68: Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen im Sputum von CF-Patienten mit Pseudomonasinfektion nach Amitriptylinbehandlung im Vergleich zur Placebokontrolle (= 100 %)

Der Wert des ersten Tages des Placebozyklus wurde mit 100% als Referenzwert gesetzt und die Werte der Amitriptylinzyklen darauf bezogen. Pat = Patient. Die Ergebnisbalken der Apoptose sind einfarbig dargestellt (weiß bzw. grau), die Nekroseergebnisse gemustert (weiß bzw. grau gemustert).

2 CF-Patienten mit Pseudomonasinfektion zeigten während der Einnahme von Amitriptylin eine Verstärkung der Apoptose um 200 %. Bei den anderen beiden Patienten war keine Änderung bzw. eine leichte Verringerung festzustellen. Die Nekrose stieg unter Amitriptylineinfluss bei 2 Patienten um ca. 50 bis 150 % an. Bei einem Patienten war eine leichte Verringerung zu beobachten.

In Abbildung 69 ist der Vergleich von Placebosputum mit Sputum während der Amitriptylinbehandlung bei Patienten mit anderen bakteriellen Erregern oder MRSA dargestellt.

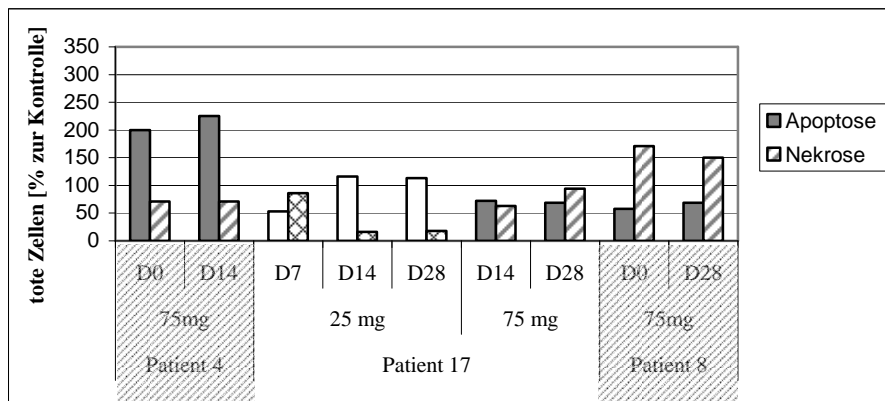


Abbildung 69: Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen im Sputum von CF-Patienten mit anderen bakteriellen Erregern oder MRSA nach Amitriptylinbehandlung im Vergleich zur Plazebokontrolle (= 100 %).

Der Wert des ersten Tages des Plazebozyklus wurde mit 100% als Referenzwert gesetzt und die Werte der Amitriptylinzyklen darauf bezogen.

Die Ergebnisbalken der Apoptose sind einfarbig dargestellt (weiß bzw. grau), die Nekroseergebnisse gemustert (weiß bzw. grau gemustert).

Patient 4 und 17: andere bakterielle Erreger, Patient 8: MRSA

Ein CF-Patient mit anderen bakteriellen Erregern zeigte während der Einnahme von Amitriptylin einen Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen um 100 % im Vergleich zur Plazebogruppe, ein weiterer sowie der MRSA-infizierte Patient eine Verringerung. Der Anteil nekrotischer Zellen fiel unter Amitriptylineinfluss zum Teil stark ab, nur der MRSA-infizierte Patient zeigte einen Anstieg um 50 %.

Zusammenfassung: Bei einigen Patienten mit Pseudomonasinfektion war während der Behandlung mit Amitriptylin ein Anstieg der Apoptose und der Nekrose zu beobachten. Bei Patienten mit anderen bakteriellen Erregern war unter Amitriptylineinfluss eine Verringerung der Nekrose zu beobachten, der MRSA-Patient zeigte ein Absinken der Apoptose und einen Anstieg der Nekrose.

4.3.4.4.2 Vergleich des Zelltods im Sputum durch Apoptose/Nekrosebestimmung oder Trypanblauauszählung

Einen Vergleich zwischen dem mit unterschiedlichen Methoden (Apoptose/Nekrose oder Trypanblau) untersuchten Zelltod im Sputum gibt Tabelle 11. Zur besseren Übersichtlichkeit ist auch der Prozentsatz an neutrophilen Granulozyten aus der Cytospinauszählung angegeben.

Tabelle 11: Übersicht über den Zelltod im Sputum von CF-Patienten

	Neutrophile, Cytospin, Plazebozyklus	Apoptose/Nekrose=Gesamt D0 Plazebozyklus	Trypanblau, D0 Plazebozyklus
Pseudomonas			
Patient 5	98%	21%/14% = 35%	26%
Patient 6	99%	14%/2% = 16%	43%
Patient 9	97%	62%/12% = 74%	17%
Patient 11	100%	65%/9% = 74%	41%
Patient 16	93%	12%/24% = 36%	32%
MRSA			
Patient 8	100%	80%/14% = 94%	34%
Andere			
Patient 4	46%	16%/52% = 68%	31%
Patient 17	71%	32%/51% = 83%	46%

Bei dieser Methode wurden generell bei der Apoptose-Untersuchung mit Annexin (FACS) höhere Werte gefunden als bei der Trypanblauauszählung im Mikroskop. Nur in 2 Fällen stimmte der in der Apoptoseuntersuchung ermittelte Anteil sterbender Zellen (Apoptose und Nekrose) mit dem in der Trypanblauzählung ermittelten Anteil toter Zellen überein. Durchschnittlich ergab sich ein um 30% niedrigerer Anteil toter Zellen bei der Auszählung.

4.3.5 Untersuchung der Wirkung von Sputumüberstand auf frisch isolierte Granulozyten gesunder Personen

Die Untersuchungen zum Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen im Sputum von Patienten sind nur von begrenztem Aussagewert, da keine Angaben darüber verfügbar sind, wie lange sich die betreffenden Zellen (d.h. die eingewanderten Granulozyten) bereits vor Ort aufhielten und sich dadurch auch ohne besondere Anlässe auf dem „natürlichen“ Weg zur

Apoptose befanden. Um der Frage nachzugehen, ob die Zusammensetzung des Sputums einen Einfluss auf die Apoptose bzw. auf die Funktionalität der Granulozyten hat, wurden Granulozyten gesunder Spender mit zellfreien Sputumproben von Patienten der APA II-Studie inkubiert und deren Einfluss auf die Apoptose und die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (Auslösung des oxidativen Bursts) untersucht.

4.3.5.1 Wirkung von CF-Sputumüberstand auf die Apoptose und Nekrose gesunder Granulozyten

Während der APA II-Studie wurden aus dem Sputum von CF-Patienten, die entweder mit unterschiedlichen Konzentrationen Amitriptylin oder einem Plazebo behandelt wurden, durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 12000 x g Überstände gewonnen und bei – 80 °C bzw. – 20 °C eingefroren. Sie wurden später aufgetaut und 20 % Sputumüberstand wurde für 5 Stunden bei 37 °C mit frisch isolierten Granulozyten gesunder Spender inkubiert. Es konnten nur die Patienten untersucht werden, bei denen Sputum vom ersten und dritten Tag vorlag, sowohl aus dem Zyklus in dem sie mit Amitriptylin als auch aus dem Zyklus in dem sie mit einem Plazebo behandelt wurden. Dies war nur bei 6 Patienten mit Pseudomonas-, Burkholderia- oder MRSA-Infektion möglich, weil diese ausreichend Sputum produzierten (4 Patienten mit Pseudomonas (Abbildung 70), 1 Patient mit Burkholderia und 1 Patient mit MRSA (Abbildung 71)). Staurosporin diente als Positivkontrolle, es wurde jeweils alleine und zusammen mit Sputumüberstand auf seine Apoptose auslösende Wirkung überprüft. Es wurde in DMSO gelöst, das deshalb ebenfalls auf seine Apoptose-verursachende Wirkung getestet wurde. Abbildung 70a/71a zeigt die Ergebnisse in Abwesenheit von Staurosporin, Abbildung 70b/71b in dessen Gegenwart.

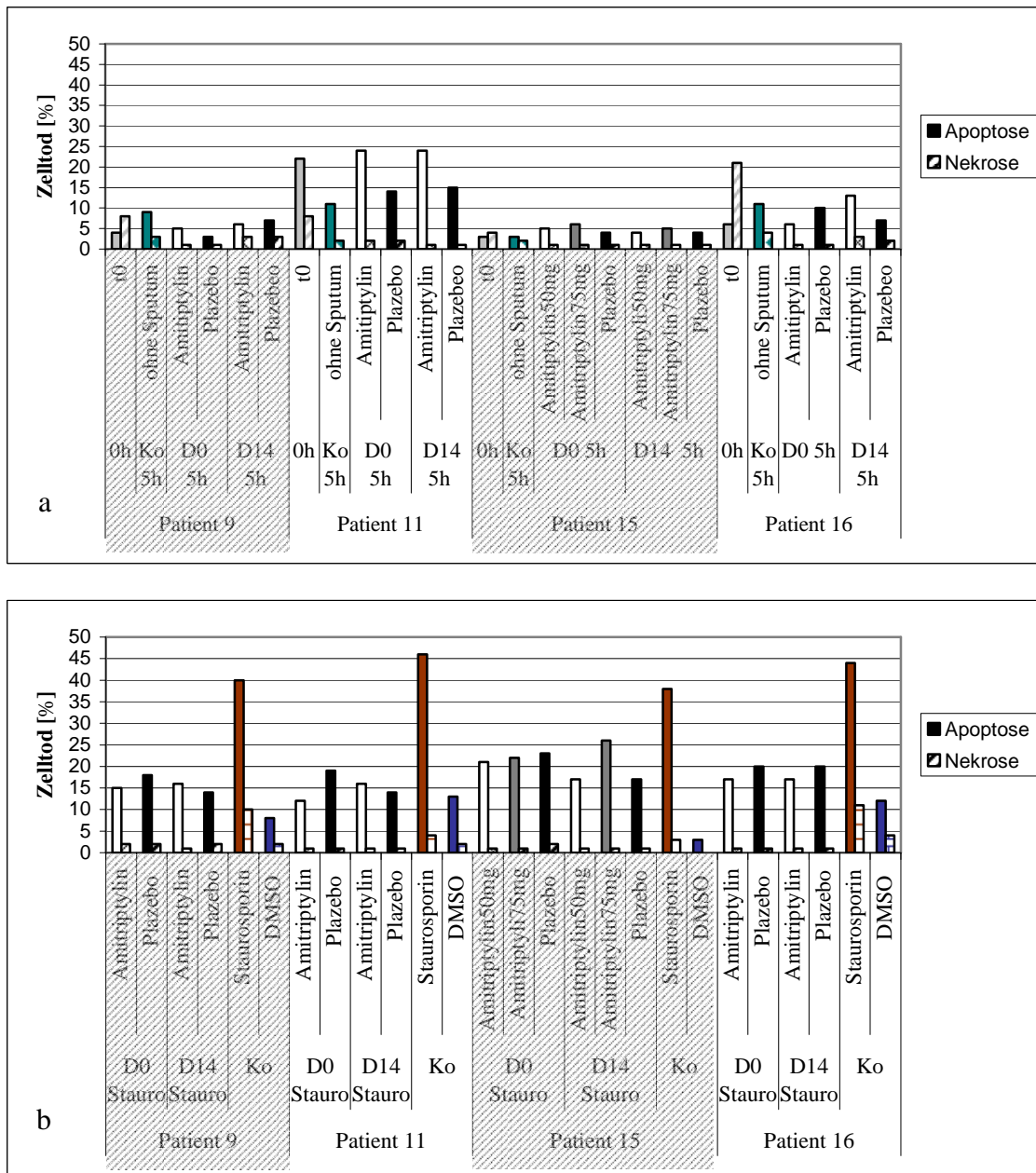


Abbildung 70: Apoptose und Nekrose nach 5-stündiger Inkubation von gesunden Granulozyten mit Sputumüberständen von CF-Patienten mit Pseudomonasinfection
 Frisch isolierte Granulozyten von gesunden Spendern wurden 5 Stunden mit 20 % CF-Sputumüberständen aus der APA II-Studie bei 37 °C inkubiert. Verglichen wurden die Überstände des ersten und dritten Tages des Amitriptylinzyklus, der eine Lungenfunktionsverbesserung erbracht hatte, mit dem Plazebozyklus. Als Vergleich dient die Apoptosemessung der jeweiligen Granulozyten zum Zeitpunkt t0 (direkt nach Isolation) und nach 5 h ohne Sputumüberstand. Staurosporin (Stauro) diente als Positivkontrolle und wurde beim unteren Schaubild zeitgleich mit dem Sputumüberstand inkubiert. Die apoptotischen und nekrotischen Zellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt und mit Hilfe der Quadrantenstatistik ausgewertet. Ko=Kontrolle. Die Ergebnisbalken der Apoptose sind einfarbig dargestellt, die Nekroseergebnisse gemustert. a) ohne Staurosporin; b) mit Staurosporin

Die Inkubation von Sputumüberstand von Patienten mit Pseudomonas (Abbildung 70) bewirkte in einigen Fällen bereits eine Erhöhung der Apoptose bei Blutneutrophilen gesunder Spender. Die Inkubation mit Sputumüberstand, der während der Amitriptylinbehandlung gewonnen wurde, bewirkte teilweise eine Erhöhung der Apoptose im Vergleich zum entsprechenden Sputumüberstand, der während einer Plazebobehandlung produziert wurde. Die jeweiligen Schaubilder gehören zusammen und pro Patient wurden sowohl als Positivkontrolle Staurosporin sowie dessen Lösungsmittel DMSO mitgeführt. Vor allem zum Zeitpunkt t0 war eine hohe Nekroserate zu beobachten.

Staurosporin wurde in einer Konzentration von 5 μ M mitgeführt und löste bei allen Proben Apoptose aus. DMSO wurde in einer entsprechenden Menge eingesetzt, weil darin das Staurosporin gelöst wurde. Es löste keine Apoptose aus. Nach gleichzeitiger Inkubation der Granulozyten mit Sputumüberstand und Staurosporin war die Apoptose bei allen Proben höher. Bei den meisten Proben fiel die Apoptose bei gleichzeitiger Inkubation von Sputumüberstand nach Amitriptylinbehandlung und Staurosporin im Gegensatz zur Inkubation mit Plazebosputum und Staurosporin ab.

In Abbildung 71 sind die Ergebnisse der Inkubation von Granulozyten Gesunder mit Sputumüberstand von Burkholderia – bzw. MRSA-Patienten gezeigt.

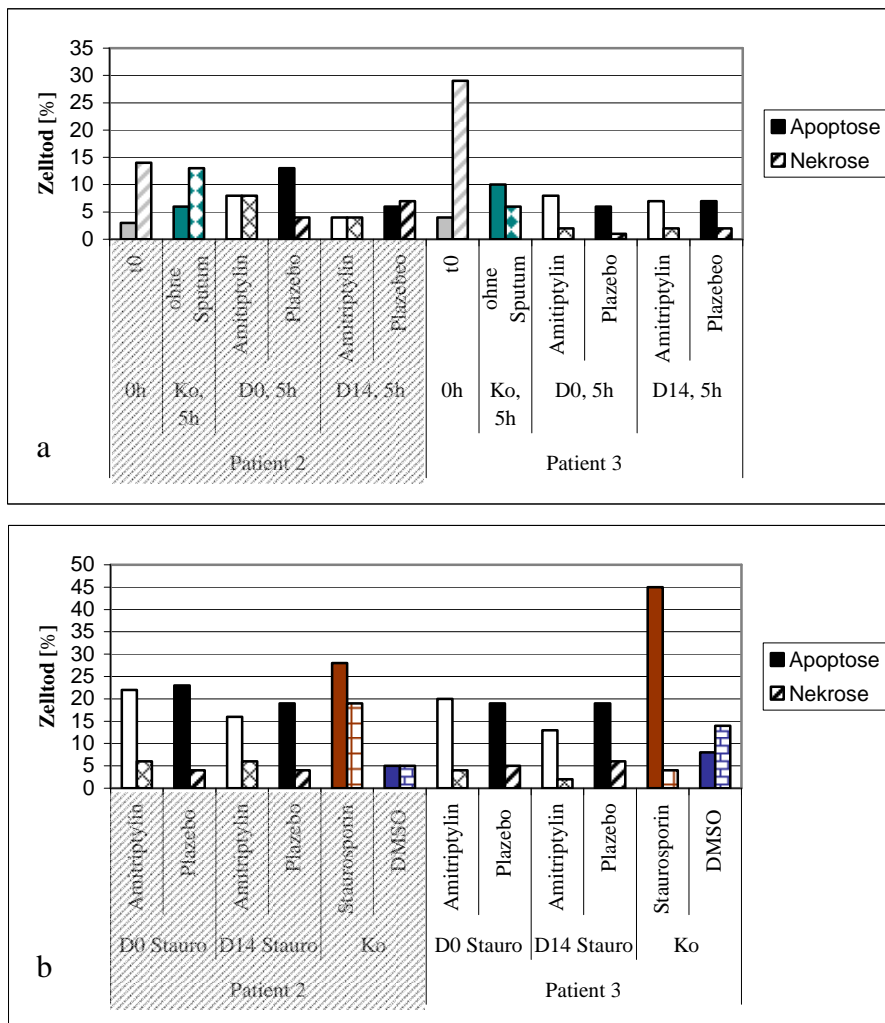


Abbildung 71: Apoptose und Nekrose nach 5-stündiger Inkubation von gesunden Granulozyten mit Sputumüberständen von CF-Patienten mit *Burkholderia*- oder *MRSA*-Infektion

Frisch isolierte Granulozyten von gesunden Spendern wurden 5 Stunden mit 20 % CF-Sputumüberständen aus der APA II-Studie bei 37 °C inkubiert. Verglichen wurden die Überstände des ersten und dritten Tages des Amitriptylinzyklus, der eine Lungenfunktionsverbesserung erbracht hatte, mit dem Plazebozyklus. Als Vergleich dient die Apoptosemessung der jeweiligen Granulozyten zum Zeitpunkt 0 (direkt nach Isolation) und nach 5 h ohne Sputumüberstand. Staurosporin diente als Positivkontrolle und wurde beim unteren Schaubild zeitgleich mit dem Sputumüberstand inkubiert. Die apoptotischen und nekrotischen Zellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt und mit Hilfe der Quadrantenstatistik ausgewertet. Ko=Kontrolle. P2 MRSA, P3 *Burkholderia*

a) ohne Staurosporin; b) mit Staurosporin

Auch bei Inkubation mit Sputumüberstand von einem MRSA-CF-Patienten (Abbildung 71, Patient 2) erhöhte sich meist die Apoptose der Blutneutrophilen von Gesunden. Sputumüberstand eines Amitriptylin-behandelten MRSA-Patienten ergab eine Verringerung der Apoptose im Vergleich zum Plazebosputum, während für Burkholderiasputum (Patient 3) eher ein Anstieg der Apoptose bzw. keine Änderung zu beobachten war. Vor allem zum Zeitpunkt t0 war eine hohe Nekroserate zu beobachten.

Bei gleichzeitiger Inkubation mit Sputumüberstand und Staurosporin zeigte sich eine generelle Erhöhung der Apoptose. Inkubation mit Sputumüberstand, der während der Behandlung mit Amitriptylin gewonnen wurde, bewirkte eine Verringerung der Apoptose im Vergleich zu Plazebo-Sputumüberstand.

Zusammenfassung: Bei manchen Patienten erhöhte die Inkubation mit Sputumüberstand generell die Apoptose. Bei Inkubation mit Amitriptylin-Sputumüberstand stieg der Anteil apoptotischer Zellen bei manchen Pseudomonas-Patienten an. Gleichzeitige Inkubation der Granulozyten mit Staurosporin und Sputumüberstand bewirkte bei allen Proben eine verstärkte Apoptose.

In der folgenden Abbildung 72 ist der durchschnittliche Wert für Apoptose und Nekrose aller in dieser Versuchsreihe untersuchten Patienten (4 Pseudomonas, 1 Burkholderia, 1 MRSA, n = 6) dargestellt, sowohl ohne (Abbildung 72a) als auch mit Staurosporin (Abbildung 72b). Die Werte sind auf die Probe ohne Sputumüberstand normiert.

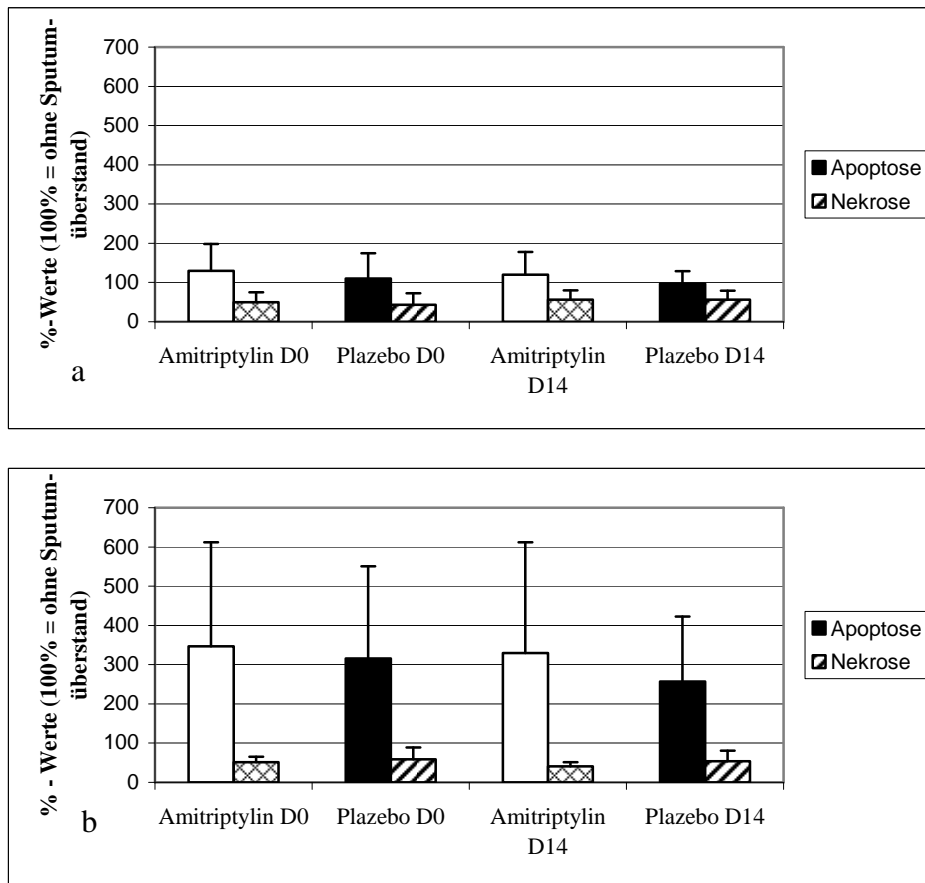


Abbildung 72: Apoptose und Nekrose nach 5-stündiger Inkubation von gesunden Granulozyten mit Sputumüberständen von CF-Patienten, jeweils bezogen auf den Wert ohne Sputumüberstand

Frisch isolierte Granulozyten von gesunden Spendern wurden mit CF-Sputumüberständen aus der APA II-Studie inkubiert. Die Zelltodeswerte nach Inkubation mit Überständen des ersten und dritten Tages des wirksamsten Amitriptylinzyklus sowie des Plazebozyklus wurden auf den Wert ohne Sputumüberstände bezogen, der als 100% gesetzt wurde. Die apoptotischen und nekrotischen Zellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt und mit Hilfe der Quadrantenstatistik ausgewertet.

a) ohne Staurosporin; b) mit Staurosporin, $n=6$, \pm S.D.

In der auf den Wert ohne Sputumüberstand normierten Gesamtauswertung aller Patienten zeigte sich eine leicht verstärkte Apoptose der Blutneutrophilen gesunder Spender im Vergleich zur Inkubation mit Plazebosputumüberstand. Die Nekrose war bei Inkubation mit Plazebosputumüberstand des ersten Tages stark verringert. Bei gleichzeitiger Inkubation mit Staurosporin zeigte sich eine ungefähr 3fach so hohe Apoptose, die durch Amitriptylinsputumüberstand verstärkt wurde.

4.3.5.2 Wirkung von CF-Sputumüberständen auf die ROS-Produktion gesunder Granulozyten

Die Wirkung von Sputumüberstand aus der CF-Studie auf gesunde Granulozyten wurde untersucht. Hierzu wurden die Sputumüberstände von chronisch mit *Pseudomonas* besiedelten CF-Patienten während der Studie frisch bei 12 000 x g zentrifugiert, die Überstände abgenommen und eingefroren (siehe 4.3.5.1). Später wurden Granulozyten (1 Mio/ml) hiermit versetzt (es wurden 20 µl Sputumüberstand zu 80 µl PBS/Glucose gegeben).

Die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen wurde in Gegenwart und Abwesenheit der Sputumüberstände nach Aktivierung der Granulozyten mit PMA bzw. opsonisiertem Zymosan A über die Messung der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz über einen Zeitraum von 30 Minuten gemessen (Abbildung 73 bis 75). In Abbildung 73 sind die Ergebnisse für Patienten mit *Pseudomonas*-infektion dargestellt.

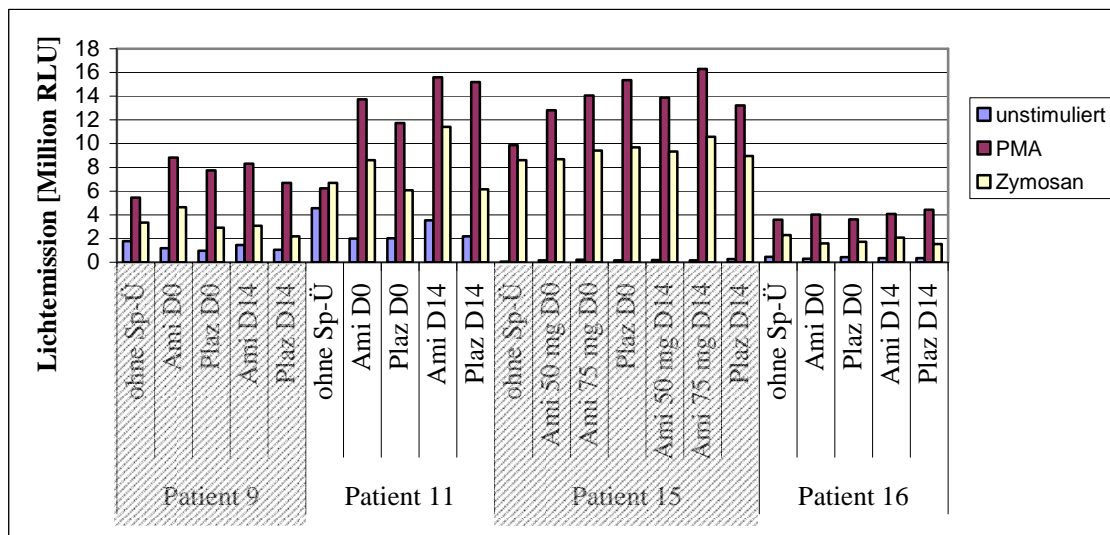


Abbildung 73: Wirkung von *Pseudomonas*-Sputumüberstand auf den oxidativen Burst von Granulozyten gesunder Spender

Die Sputumüberstände von CF-Patienten mit chronischer *Pseudomonas*-infektion wurden mit Granulozyten gesunder Personen inkubiert und die ROS-Bildung anschließend über 30 min in einem Luminometer gemessen. Zur Stimulation wurden PMA (f.c. 100 ng/ml) und opsonisiertes Zymosan A (250 µg/ml) verwendet. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Angegeben ist die Summe der emittierten Photonen über 30 Minuten in der Einheit Relative Lichteinheit (RLU).

Sputumüberstand von mit Amitriptylin behandelten Pseudomonas besiedelten Patienten schien bei stimulierten Neutrophilen gesunder Spender in vielen Fällen eine höhere ROS-Produktion im Vergleich zu Plazebosputum zu bewirken. Bei zwei Patienten wiesen die Neutrophilen bereits in unstimulierten Zustand ohne Inkubation mit Sputumüberstand eine hohe ROS-Produktion auf, die durch Inkubation mit Sputumüberstand absank.

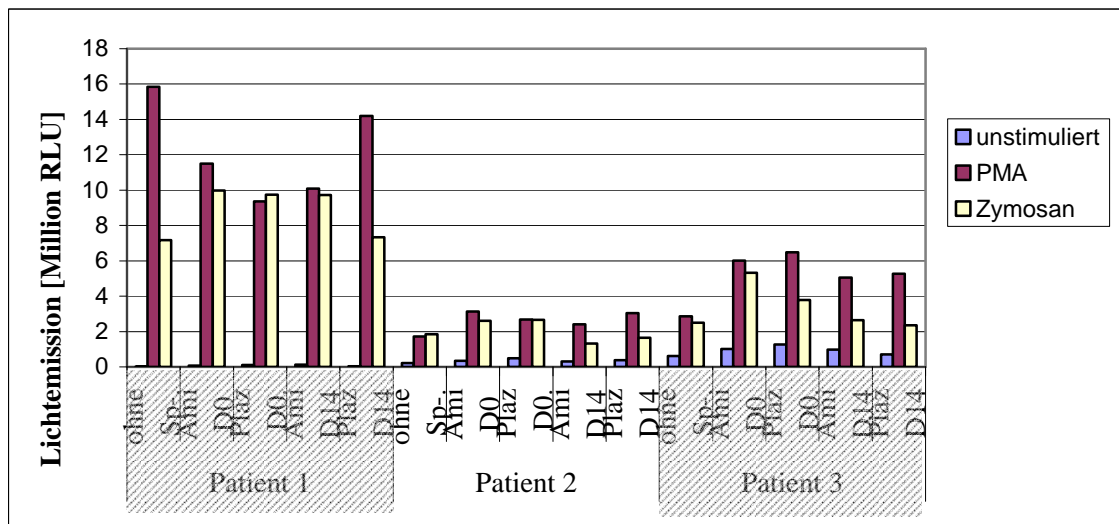


Abbildung 74: Wirkung von Burkholderia- oder MRSA-Sputumüberstand auf den oxidativen Burst von Granulozyten gesunder Spender

Die Sputumüberstände von CF-Patienten mit MRSA (Patient 2)- oder Burkholderia (Patient 1 und 3)-Infektion wurden mit Granulozyten gesunder Personen inkubiert und die ROS-Bildung anschließend über 30 min in einem Luminometer gemessen. Zur Stimulation wurden PMA (f.c. 100 ng/ml) und opsonisiertes Zymosan A (f.c. 250 µg/ml) verwendet. Unstimulierte Zellen dienen als Kontrolle. Angegeben ist die Summe der emittierten Photonen über 30 Minuten in der Einheit Relative Lichteinheit (RLU).

Inkubation mit Sputumüberstand von MRSA (Patient 2)- und Burkholderia (Patient 1 und 3) - infizierten Patienten ergab eine durchschnittlich geringere ROS-Bildung als die Inkubation mit Pseudomonassputumüberstand, wobei die Inkubation mit burkholderiainfiziertem Sputumüberstand generell eine höhere Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen bewirkte als die Inkubation mit MRSA-Sputumüberstand. Besonders das Sputum von Patient 1 induzierte eine starke ROS-Produktion. Patient 1 war zusätzlich mit Pseudomonas infiziert. Die Inkubation mit amitriptylinbehandeltem Sputumüberstand dieser Patienten ergab keine veränderte bzw. eine verringerte ROS-Produktion.

Zusammenfassung: Inkubation mit Sputumüberstand bewirkte eine starke ROS-Bildung. Die höchste Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen erfolgte nach Inkubation mit Sputumüberstand von Pseudomonasinfizierten. Amitriptylin-behandelter Pseudomonasputumüberstand bewirkte meist eine erhöhte ROS-Bildung bei stimulierten Neutrophilen gesunder Spender.

In Abbildung 75 ist die Wirkung von Sputumüberständen von 7 Patienten mit Pseudomonas-, Burkholderia- oder MRSA- Infektion auf die Basiswerte bzw. den mit PMA und opsonisiertem Zymosan A induzierten oxidativen Burst (Chemilumineszenz) dargestellt. Als 100 %-Wert wurden dabei die jeweiligen Werte von Granulozyten verwendet, die anstelle von Sputumüberstand mit PBS inkubiert wurden.

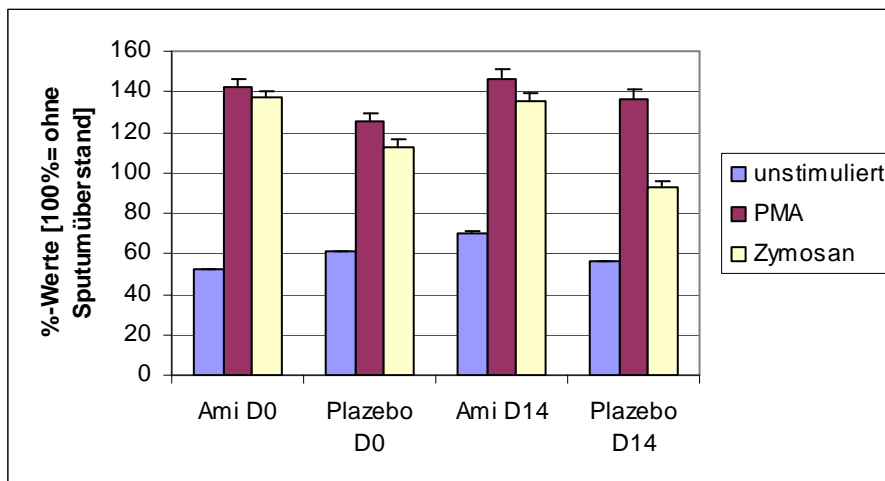


Abbildung 75: Wirkung von Sputumüberstand auf den oxidativen Burst von Granulozyten gesunder Spender, bezogen auf den Absolutwert der Probe ohne Sputumüberstand.

Die Sputumüberstände von CF-Patienten mit chronischer Pseudomonas-, Burkholderia- und MRSA-Infektion wurden mit Granulozyten gesunder Personen inkubiert und die ROS-Bildung anschließend über 30 min in einem Luminometer gemessen. Zur Stimulation wurden PMA (f.c. 100 ng/ml) und opsonisiertes Zymosan A (f.c. 250 µg/ml) verwendet. Unstimulierte Zellen dienen als Kontrolle. Angegeben ist die Summe der emittierten Photonen über 30 Minuten in der Einheit Relative Lichteinheit (RLU). $n = 7, \pm S.D.$

Sputumüberstand von CF-Patienten aus der CF-Studie bewirkte bei Granulozyten gesunder Spender im Grundzustand eine verringerte Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen,

während bei mit PMA oder opsonisiertem Zymosan A stimulierten Granulozyten eine vermehrte ROS-Bildung zu beobachten war. Inkubation mit Amitriptylinbehandeltem Sputumüberstand führte unter Stimulation mit PMA oder opsonisiertem Zymosan A zu einer höheren Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen als bei Inkubation mit Sputumüberstand aus einem Plazebozyklus.

4.3.5.3 Wirkung von CF-Sputumüberständen auf die Degranulation gesunder Granulozyten

Die Degranulation gesunder Granulozyten wurde nach 2stündiger Inkubation mit Sputumüberstand von CF-Patienten untersucht. Leider konnte aus Mangel an Sputum kein CF-Sputumüberstand aus der APA II-Studie verwendet werden, weshalb Sputum aus der CF-Ambulanz der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen untersucht wurde. Frisch isolierte Granulozyten gesunder Spender wurden mit Sputumüberstand inkubiert und vor und nach Zugabe von Cytochalasin B und NfMLP untersucht, indem die Linksverschiebung der Granulozytenwolke durch Ausmessen des Perox X-Histogramms des Advia 120 bestimmt wurde. In Abbildung 76 sind die Ergebnisse von 3 Degranulationsversuchen dargestellt.

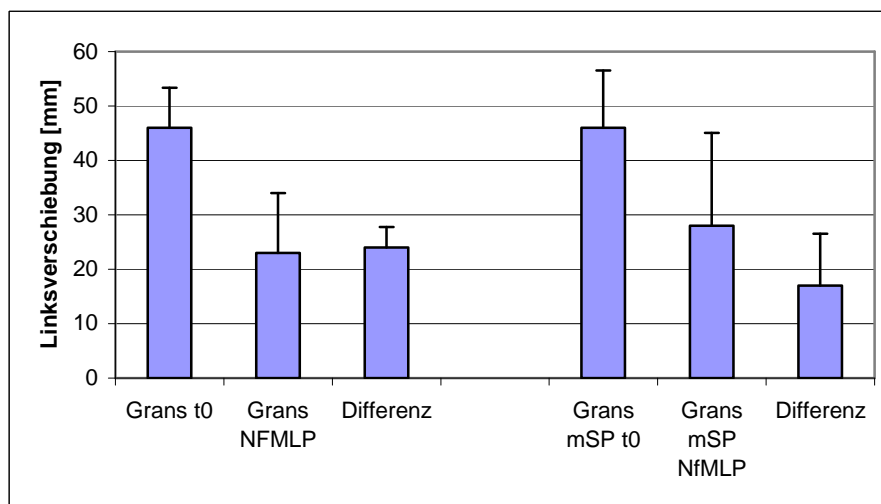


Abbildung 76: Wirkung von Sputumüberstand auf die Degranulation von Granulozyten gesunder Spender

Die Sputumüberstände von CF-Patienten wurden mit Granulozyten gesunder Personen inkubiert und die Degranulation entsprechend der Linksverschiebung ausgemessen. $n = 3, \pm S.D.$

Sputumüberstand verminderte die Degranulation von Granulozyten gesunder Spender. Die

hohen Standardabweichungen der Proben mit Sputumüberstand können aufgrund der unbekanntem Infektionslage und der Heterogenität der aus der CF-Ambulanz stammenden Sputumproben erklärt werden.

4.3.6 Korrelation der Leukozytenparameter mit einer Verbesserung der Lungenfunktion durch Amitriptylinbehandlung

Während der APA II-Studie wurde die Lungenfunktion der CF-Patienten während der Einnahme von Amitriptylin untersucht. Bei den meisten Patienten konnte während der Behandlung mit 25 mg Amitriptylin nach 14 Tagen eine relative Verbesserung der Lungenfunktion festgestellt werden (Riethmüller et al., 2009). Dies galt vor allem für mit *Pseudomonas* infizierte Patienten.

In Tabelle 12 sind die verschiedenen leukozytenspezifischen Parameter der Patienten zu sehen, die während der Amitriptylineinnahme nach 14 Tagen eine relative Verbesserung der Lungenfunktion aufwiesen.

Tabelle 12: Übersicht über die relative Änderung verschiedener Parameter bei CF-Patienten mit einer Verbesserung der Lungenfunktion durch Amitriptylin

	Blut Leukos (Mio/ml)/ Neutros (%)	Blut ROS (Zymosan) (Mio RLU)	Sputum Zellzahl (Mio/ml)	Sputum Apoptose (%)	Sputum- Überstand Apoptose (%)	Sputum- Überstand ROS (Zymosan) (Mio RLU)
Patient 5 (25 mg)	-3/-0,08	-5	Kein Sputum	Kein Sputum	Kein Sputum	Kein Sputum
Patient 6 (25 mg)	-1,38/-0,02	Keine CI	-63	-27	Zu wenig Sp-Ü	Zu wenig Sp-Ü
Patient 9 (75 mg)	Infektion (Leukoanstieg)	-0,1	-200	Kein FACS	1	-1,6
Patient 11 (50 mg)	-2/-0,12	Keine CI	197	6	0	2,8
Patient 15 (50mg)	2,5/3,3	Keine CI	-98	24	1	0,7
Patient 15 (75mg)	-0,04/-0,9	Keine CI	-9	8	-1	1,2
Patient 16 (50 mg)	Infektion (Leukoanstieg)	Keine CI	42	32	7	0,5
Patient 1	Infektion	0,88	8	5 (nw)	nu	- 0,24
Patient 2	-3,35/-6,9	Keine CI	-88	-10 (nw)	-4	-1,3
Patient 3	2,55/kein Leuko-Diff	1,87	159	-11 (nw)	-1	-2

Es wurde die Differenz nach mehrwöchiger Amitriptylineinnahme (meist nach 4 Wochen) berechnet und so die relative Änderung untersucht.

Leuko-Diff: Differenzierung der Leukozyten, nw = nicht gewertet, nu = nicht untersucht, Sp-Ü = Sputumüberstand

Die Untersuchung der Auswirkung der auf die Lungenfunktion positiv wirkenden Amitriptylinkonzentration auf die Granulozytenparameter ergab folgende Ergebnisse:

Bei Patienten mit Pseudomonasinfektion (Patient 5, 6, 9, 11, 15, 16) verringerte Amitriptylin die Anzahl der Leukozyten sowie des Anteils Neutrophiler im Blut. Über die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen durch die Blutneutrophilen unter Amitriptylineinfluss lässt sich aufgrund zu weniger Daten keine Aussage treffen. Die Gesamtzellzahl im Sputum (das fast nur aus Neutrophilen bestand, siehe Kap. 4.3.4.2 Sputumzusammensetzung) sank ab, die Apoptose der Sputumzellen stieg an. Sputumüberstand nach Amitriptylineinnahme bewirkte

eine verstärkte ROS-Bildung bei Neutrophilen Gesunder. Diese Effekte konnten bei Patienten mit Burkholderia- oder MRSA-Infektion (Patient 1, 2 3) nicht beobachtet werden.

Zusammenfassung: Die Korrelation der Granulozytenparameter mit den Ergebnissen der Lungenfunktionsuntersuchung ergab für pseudomonasinfizierte Patienten während der Amitriptylineinnahme eine Verringerung der Neutrophilenzahl in Blut und Sputum. Die Apoptose im Sputum stieg bei diesen Patienten an, ebenso bewirkte Inkubation mit Sputumüberstand einen Anstieg der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen.

4.3.7 Cytokinkonzentrationen im Serum und Sputum von CF-Patienten

In der vorliegenden, von PD Dr. Joachim Riethmüller geleiteten Studie wurde von dessen Arbeitsgruppe auch die Bestimmung der Cytokinspiegel im Serum und in den Sputen durchgeführt, die hier der Vollständigkeit halber in den folgenden Tabellen (Tabelle 13 bis 16) zusammengefasst dargestellt sind. Dabei werden zuerst die Serumspiegel und dann die Konzentrationen im Sputum dargestellt, wobei wie üblich die Einteilung a) mit Pseudomonasinfektion, b) mit Burkholderia- oder MRSA-Infektion und c) Infektion mit anderen bakteriellen Erregern erfolgte. Die dabei gemessenen Cytokine umfassen die proinflammatorischen Cytokine IL1, IL6 und das Chemotaxis-induzierende IL8. TNF alpha bewirkt Apoptose. Zu den antiinflammatorischen Cytokinen zählen GM-CSF und IL10.

4.3.7.1 Cytokinkonzentrationen im Serum

In den Tabellen 13 bis 15 werden die Ergebnisse der Cytokinmessung im Serum der CF-Patienten dargestellt. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse für Patienten mit Pseudomonasinfektion zu sehen.

Tabelle 13: Serumcytokine bei CF-Patienten mit Pseudomonasinfektion

P 5	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL6 (pg/ml)	4,77	4,35	5,61	17,88	5,11	-	2,6	1,85	-
IL8 (pg/ml)	7,67	15,67	12,99	10,84	8,06	-	5,8	5,8	-
IL10 (pg/ml)	0	0	0	1,24	1,34	-	0	0	-
TNF α (pg/ml)	0,43	0,43	0,43	1,29	3,96	-	1,8	0	-

P 6	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28
IL6 (pg/ml)	30,4	8,48	9,41	16,68	10,6	38,23	12,93	-	18,12
IL8 (pg/ml)	10,78	9,44	9,25	14,16	10,78	14,16	10,69	-	8,45
IL10 (pg/ml)	0	0	0	1,36	0	0,93	2,41	-	8,12
TNF α (pg/ml)	0	0,43	1,8	13,91	1,8	0	2,19	-	1,29
P 7	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28
IL6 (pg/ml)	15,91	2,75	24,35	6,69	0,95	-	9,94	6,17	16,81
IL8 (pg/ml)	19,28	11,43	14,08	7,98	10,61	-	13,54	11,43	21,12
IL10 (pg/ml)	1,44	0	9,93	1,29	1,4	-	0	0	1,36
TNF α (pg/ml)	0,43	0	0	2,19	0,37	-	0	0	1,8
P 9	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL6 (pg/ml)	46,59	31,63	-	31,37	-	-	31,88	11	-
IL8 (pg/ml)	18,09	16,71	-	14,1	-	-	17,92	11,15	-
IL10 (pg/ml)	0	0	-	1,4	-	-	0	0	-
TNF α (pg/ml)	0	0,43	-	0,37	-	-	1,8	0	-
P 11	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28
IL6 (pg/ml)	4,66	12	8,75	8,07	6,17	8,88	4,49	7,8	10,37
IL8 (pg/ml)	56,24	15,08	106,63	19,45	22,94	12,81	9,44	15,49	17,62
IL10 (pg/ml)	1,51	1,67	1,29	0	0,48	0	0	0	1,51
TNF α (pg/ml)	0	0,37	0	0,43	0	0	0	0	0,37

P 15	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL6 (pg/ml)	4,49	2,75	7,4	5,33	-	13,75	1,8	16,22	4,43
IL8 (pg/ml)	10,97	7,06	16,11	8,45	-	9,46	4,08	7,28	12,67
IL10 (pg/ml)	0	0,66	1,53	1,18	-	2,87	1,4	1,95	1,73
TNF α (pg/ml)	2,43	1,8	1,8	0,37	-	0,37	0,37	0,37	0,37
P 16	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28
IL6 (pg/ml)	1,8	10,48	6,46	32,37	15,4	7,8	1,58	2,23	-
IL8 (pg/ml)	12,52	16,5	18,07	17,32	15,76	10,68	18,67	13,27	-
IL10 (pg/ml)	2,41	2,18	2,41	0,29	0	0	1,95	1,29	-
TNF α (pg/ml)	0,37	0,37	0	5,38	0,43	0	0	0	-

In Tabelle 14 sind die Serumcytokine bei Patienten mit Burkholderia- oder MRSA-Infektion dargestellt.

Tabelle 14: Serumcytokine bei CF-Patienten mit Burkholderia- oder MRSA-Infektion

P 1	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28
IL6 (pg/ml)	10,07	7,13	15,66	7,15	-	-	7,53	2,15	5,89
IL8 (pg/ml)	5,36	8,27	7,06	7,43	-	-	3,29	3,05	3,89
IL10 (pg/ml)	0	0	0	1,07	-	-	0	0	0
TNF α (pg/ml)	0,43	0,43	0,43	1,29	-	-	0,43	0	0

P 2	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL6 (pg/ml)	7,13	6,72	28,43	17,88	27	31,01	6,72	18,46	-
IL8 (pg/ml)	6,43	6,85	14,7	9,22	12,21	13,57	11,15	12,36	-
IL10 (pg/ml)	1,69	0	0,29	1,73	1,73	2,64	0	0,48	-
TNF α (pg/ml)	0	0,43	1,8	0,37	0,83	0	0,43	0	-
P 3	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL6 (pg/ml)	17,95	12,82	10,47	10,87	-	-	16,7	28,7	18,71
IL8 (pg/ml)	11,25	13,18	15,32	10,87	-	-	13,57	18,29	14,63
IL10 (pg/ml)	0,39	0	0	0	-	-	5,78	45,33	8,05
TNF α (pg/ml)	3,04	3,64	0,43	1,8	-	-	0,37	1,29	0,37
P 8	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL6 (pg/ml)	20,15	9,44	16,11	19,97	-	-	36,52	36,16	-
IL8 (pg/ml)	378,22	15,01	9,46	16,45	-	-	20,29	13,9	
IL10 (pg/ml)	1,62	5,34	1,84	1,86	-	-	1,02	0,48	
TNF α (pg/ml)	0,37	0,37	0,37	3,64	-	-	0,43	0	

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse für Patienten mit anderen bakteriellen Erregern dargestellt.

Tabelle 15: Serumcytokine bei CF-Patienten mit anderen bakteriellen Erregern

P 4	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25mg, D0	25mg, D14	25mg, D28	75mg, D0	75mg, D14	75mg, D28
IL6 (pg/ml)	2,45	0,18	6,72	6,72	6,17	3,2	5,11	2,01	-
IL8 (pg/ml)	0	0	0	0	0	0	17,25	1,71	-
IL10 (pg/ml)	1,36	0,75	3,3	6,97	0,84	2,91	4,67	9,21	-
TNF α (pg/ml)	1,8	1,8	0,43	8,68	1,8	1,8	0,37	2,19	-
P 12	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL6 (pg/ml)	4,21	1,85	5,05	0,95	0,53	2,23	8,75	8,29	13,63
IL8 (pg/ml)	0	3,29	4,58	6,96	3,83	6,65	6,01	6,65	10
IL10 (pg/ml)	0	0	0,29	1,95	1,79	1,84	2,41	1,51	3,82
TNF α (pg/ml)	0,43	0,43	0,43	0,37	1,29	2,19	0	0,37	1,29
P 14	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL6 (pg/ml)	0	0,33	3,21	0	-	-	0,43	-	-
IL8 (pg/ml)	1,36	3,67	2,58	0,19	-	-	3,25	-	-
IL10 (pg/ml)	0,86	0,81	0,76	0	-	-	1,18	-	-
TNF α (pg/ml)	0	0,37	0	0,43	-	-	0,37	-	-

P 17	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL6 (pg/ml)	0,53	-	0,74	3,21	34,31	2,66	24,97	-	-
IL8 (pg/ml)	9,07	-	5,37	9,38	7,04	5,05	4,24	-	-
IL10 (pg/ml)	1,18	-	1,07	1,29	1,62	1,07	0	-	-
TNF α (pg/ml)	0,37	-	0,37	0,37	0,37	0,37	7,6	-	-

Im Serum von CF-Patienten wurden sowohl die proinflammatorischen Cytokine IL6 und IL8 als auch das antiinflammatorische Cytokin IL10 nachgewiesen, ebenso das Apoptose induzierende TNF alpha.

Bei einigen Patienten konnte unter Amitriptylineinfluss eine Verminderung der proinflammatorischen Cytokine und ein Anstieg des antiinflammatorischen Cytokins beobachtet werden.

4.3.7.2 Cytokinkonzentrationen im Sputum

Die pro- und antiinflammatorischen Cytokine wurden auch im Sputum der CF-Patienten bestimmt und sind in den Tabellen 16 bis 18 zu sehen. In Tabelle 16 sind die Ergebnisse für pseudomonasinfizierte CF-Patienten dargestellt.

Tabelle 16: Sputumcytokine bei CF-Patienten mit Pseudomonasinfektion

P 5	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL1beta (pg/ml)	-	-	-	4654,42	43300,8	0	2603,27	6160,56	-
IL6 (pg/ml)	-	-	-	0	0	0	0	0	-
IL8 (pg/ml)	-	-	-	14798,9	176645	0	103647	109790	-
IL10 (pg/ml)				6,02	17,58	0	15,56	15,56	-
GM-CSF (pg/ml)	-	-	-	0	147,17	0	22,44	45,9	-
TNF α (pg/ml)	-	-	-	125,41	777,79	0	60,21	156,39	-
P 6	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28
IL1beta (pg/ml)	158337	69115,6	63344,1	43693,6	350700	111803	0	-	128610
IL6 (pg/ml)	162,04	90,93	61,4	60,12	320,74	171,3	0	-	79,12
IL8 (pg/ml)	293633	346585	192413	41976,8	428451	490260	0	-	339395
IL10 (pg/ml)	15,56	30,68	16,99	7,99	25,48	15,34	0	-	22,79
GM-CSF (pg/ml)	623,32	453,37	340,73	192,95	982,94	449,62	0	-	524,71
TNF α (pg/ml)	1881,48	1276,14	1109,85	971,97	5770,96	3285,13	0	-	2467,72

P 7	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28
IL1beta (pg/ml)	7147,13	16609,7	13554,6	25830,8	20944,3	-	18352,9	20305,7	28285,8
IL6 (pg/ml)	0	0	0	0	0	-	0	0	0
IL8 (pg/ml)	39553,5	74945,3	54889,7	64622,6	70270,7	-	91579,5	50474,4	71690,2
IL10 (pg/ml)	17,4	10,65	10,53	43,17	19,26	-	17,4	25,93	30,68
GM-CSF (pg/ml)	45,82	119,82	89,86	0	0	-	148,07	131,84	196,46
TNF α (pg/ml)	178,92	346,65	245,18	377,52	421,17	-	386,13	334,63	524,35
P 9	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL1beta (pg/ml)	5227,26	4366,46	-	62172,5	-	-	61990,9	5594,05	-
IL6 (pg/ml)	0	8,68	-	0	-	-	52,81	0	-
IL8 (pg/ml)	10663,4	9378,06	-	74151,6	-	-	264807	19641,6	-
IL10 (pg/ml)	31,66	18,09	-	34,51	-	-	27,38	13,69	-
GM-CSF (pg/ml)	0	0	-	133,54	-	-	343,23	52,74	-
TNF α (pg/ml)	92,1	120,44	-	1333,65	-	-	1068,15	143,72	-
P 11	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28
IL1beta (pg/ml)	-	43551,5	104714	52532,9	189487	32792,8	38386,1	52777,9	14245,4
IL6 (pg/ml)	-	0	0	66,18	135,93	35,42	45,94	107,82	12,51
IL8 (pg/ml)	-	41948,1	38879,4	203355	155273	74106,8	169520	274100	39065,3
IL10 (pg/ml)	-	31,09	41,45	13,05	27,38	18,05	23,76	21,26	27,19
GM-CSF (pg/ml)	-	147,17	315,17	272,12	618,62	212,94	314,71	459,08	81,33
TNF α (pg/ml)	-	800,19	1440,55	808,54	1474,42	689,78	967,94	1385,29	469,6

P 15	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL1beta (pg/ml)	187891					28639,9	36034,2	77625,2	233659
IL6 (pg/ml)	168,35					20,32	27,09	125,02	213,78
IL8 (pg/ml)	259609					75409	84307,5	183289	255063
IL10 (pg/ml)	41,08	-	-	-	-	22,63	33,17	39,19	45,24
GM-CSF (pg/ml)	975,11	-	-	-	-	272,58	314,27	665,11	1201,18
TNF α (pg/ml)	2762,62	-	-	-	-	729,93	904,75	1879,16	3439,52
P 16	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28
IL1beta (pg/ml)	2766,47	4600,02	27462,1	50363,8	-	-	12729,8	25040,5	-
IL6 (pg/ml)	1,41	0	64,31	49,93	-	-	0	85,74	-
IL8 (pg/ml)	17386,5	16565,1	43275,7	212529	-	-	25506,8	84010,5	-
IL10 (pg/ml)	11,37	15,94	22,63	15,56	-	-	21,26	27,19	-
GM-CSF (pg/ml)	0	0	204,32	364,05	-	-	38,39	229,58	-
TNF α (pg/ml)	108,99	128,42	715,29	882,8	-	-	395,21	825,83	-

Die Ergebnisse der Bestimmung der Cytokine im Sputum von CF-Patienten mit Burkholderia- oder MRSA-Infektion sind in Tabelle 17 gezeigt.

Tabelle 17: Bestimmung der Sputumcytokine bei Patienten mit Burkholderia-oder MRSA

P 1	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28
IL1beta (pg/ml)	119708	30393,3	95772	69431,4	150815	-	61683,1	156581	50644,5
IL6 (pg/ml)	113,69	30,2	56,06	0	0	0	18,59	148,99	12,4
IL8 (pg/ml)	75593,6	65456,9	95043,2	61002,6	129385	-	86926,5	164387	94108,3
IL10 (pg/ml)	23,01	24,07	31,62	24,86	35,92	-	26,11	30,68	30,68
GM-CSF (pg/ml)	623,32	243,87	421,32	259,88	323,01	-	304,92	675,18	297,17
TNF α (pg/ml)	2001,18	741,71	1195,11	1153,24	1730,61	-	934,69	6437,84	998,86
P 2	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL1beta (pg/ml)	45310,8	114992	-	41019	24363	-	57965	12045,7	-
IL6 (pg/ml)	4,56	88,14	-	0	0	-	37,75	6,2	-
IL8 (pg/ml)	96724,5	216957	-	91222,3	86129,8	-	208416	146000	-
IL10 (pg/ml)	26,71	30,4	-	28,88	44,21	-	28,01	8,7	-
GM-CSF (pg/ml)	172,8	581,36	-	59,27	0	-	387,98	74,03	-
TNF α (pg/ml)	363,64	1582,67	-	1420,56	600,27	-	1248,58	281,93	-
P 3	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL1beta (pg/ml)	129425	85368,2	60303,9	57062,4	-	-	243596	230460	579756
IL6 (pg/ml)	103,91	107,83	41,61	58,1	-	-	1,43	97,27	163,37
IL8 (pg/ml)	225014	273810	412585	226513	-	-	76321,9	137179	252707
IL10 (pg/ml)	0,4	25,48	33,97	18,05	-	-	30,05	26,94	45,59
GM-CSF (pg/ml)	595,36	435,56	388,84	277	-	-	677,07	861,25	1582
TNF α (pg/ml)	1866,53	1344,05	1305,87	882,8	-	-	4164,26	13707,9	25393,4

P 8	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL1beta (pg/ml)	85131,6	66706,4	33944	24203,3	-	-	15891	52334,9	-
IL6 (pg/ml)	0	0	0	6,08	-	-	0	44,16	-
IL8 (pg/ml)	158949	127082	144408	209985	-	-	30779,4	150783	-
IL10 (pg/ml)	44,09	60,75	43,17	20,75	-	-	17,4	21,26	-
GM-CSF (pg/ml)	0	275,8	0	189,61	-	-	68,74	330,78	-
TNF α (pg/ml)	1283,5	1066,92	672,03	544,1	-	-	326,91	943,95	-

Die Ergebnisse der Bestimmung der Cytokine im Sputum von Patienten mit anderen bakteriellen Erregern sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Bestimmung der Sputumcytokine bei Patienten mit anderen bakteriellen Erregern

P 4	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL1beta (pg/ml)	11563,2	40525,2	603,63	1085,67	10924,4	27350	8178,64	32419	-
IL6 (pg/ml)	26,4	80,2	20,81	278,47	58,34	90,93	0	249,95	-
IL8 (pg/ml)	19451,4	79974,3	5544,84	5643,62	70509,4	115160	15599,3	120206	-
IL10 (pg/ml)	7,02	10,53	0	0	10,65	7,22	5,42	7,08	-
GM-CSF (pg/ml)	101,64	272,12	1,88	0	105,47	257,27	0	42,49	-
TNF α (pg/ml)	242,42	964,54	25,35	69,73	326,91	801,03	194,49	829,99	-
P 12	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL1beta (pg/ml)	115341	17232,4	-	1224,66	2771,46	5437,35	23005,1	4562,84	3044
IL6 (pg/ml)	223,48	39,6	-	58,18	25,48	0	60,63	82,71	5,24
IL8 (pg/ml)	240961	52597,2	-	7207,12	10572,7	70827,9	23191,1	18377,4	4188,06
IL10 (pg/ml)	26,11	7,99	-	4,01	12,35	12,41	18,16	14,84	15,38
GM-CSF (pg/ml)	699,29	137,06	-	0	0	0	185,14	0	0
TNF α (pg/ml)	1854,76	341,42	-	54,27	72,39	151,01	715,29	154,81	71,71
P 14	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL1beta (pg/ml)	-	-	-	1057,13	-	-	6542,13	-	-
IL6 (pg/ml)	-	-	-	428,86	-	-	784,98	-	-
IL8 (pg/ml)	-	-	-	27096,8	-	-	41322,2	-	-
IL10 (pg/ml)	-	-	-	0,05	-	-	4,07	-	-
GM-CSF (pg/ml)	-	-	-	28,46	-	-	35,52	-	-
TNF α (pg/ml)	-	-	-	112	-	-	322,64	-	-

P 17	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
IL1beta (pg/ml)	213,06	147,03	3567,79	602,67	4109,73	3131,25	7565,86	-	-
IL6 (pg/ml)	25,74	20,32	0	56,96	0	1,41	0	-	-
IL8 (pg/ml)	3350,37	17677,5	21481,1	16974,5	12478,6	4929,73	53905,8	-	-
IL 10 (pg/ml)	1,94	13,73	7,69	73,2	15,94	7,69	13,05	-	-
GM-CSF (pg/ml)	0	0	0	0	0	0	57,16	-	-
TNF α (pg/ml)	0	110,45	108,99	53,78	92,1	91,52	171,18	-	-

Im Sputum von CF-Patienten waren sowohl pro- als auch antiinflammatorische Cytokine nachweisbar. Während der Behandlung mit Amitriptylin schien bei manchen Patienten eine Erhöhung des Entzündungen entgegenwirkenden IL10 zu beobachten sein. Auch der Spiegel des Chemotaxis induzierenden IL8 stieg bei einigen Patienten unter Amitriptylineinfluss an. Bei manchen Patienten ließ sich durch Amitriptylin ein Absenken der entzündungsfördernden Cytokine wie IL1beta und IL6 beobachten.

4.3.8 Bestimmung von Pseudomonas im Sputum von CF-Patienten

Die Pseudomonaszahl im Sputum der CF-Patienten wurde von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Joachim Riethmüller untersucht und die Ergebnisse sind in den Tabellen 19 bis 21 dargestellt. In Tabelle 19 sind die Ergebnisse für pseudomonasinfizierte CF-Patienten dargestellt.

Tabelle 19: Pseudomonaszahl im Sputum von Patienten mit Pseudomonasbesiedelung

P 5	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
Pseu- domo- nas	3,2E+08	7,9E+07	5,6E+07		1,6E+08	1,5E+08	75000	2,5E+08	
P 6	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28
Pseu- domo- nas	5,8E+07	2,3E+07	1E+08	-	8,7E+07	1,9E+07	1,5E+07	-	4166666
P 7	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28
Pseu- domo- nas	2E+08	2,7E+08	3,1E+08	1,3E+08	1,3E+08	-	7466667	2,8E+07	-
P 9	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
Pseu- domo- nas	8,9E+08	1,7E+09	-	2,3E+09	-	-	7,9E+08	2,8E+08	-
P 11	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28
Pseu- domo- nas	3,3E+07	1,4E+08	8,4E+07	3,4E+07	1,1E+08	6,9E+07	6,5E+07	8,5E+07	6,5E+07
P 15	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
Pseu- domo- nas	1,8E+08	8,6E+07	1,5E+08	9737842	208416	1733333	5E+07	3,6E+07	2,3E+07
P 16	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28
Pseu- domo- nas	4,4E+07	1,2E+08	1,2E+09	9,8E+07	5,5E+07	1,6E+08	1,9E+09	1,7E+09	-

In Tabelle 20 sind die Ergebnisse für Burkholderia- oder MRSA-infizierte CF-Patienten dargestellt.

Tabelle 20: Pseudomonaszahl im Sputum von Patienten mit Burkholderia- oder MRSA-Infektion

P 1	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	50mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28
Pseu- domo- nas	4,8E+07	6,7E+07	-	1,7E+08	3,7E+07	-	3,4E+08	3,9E+08	7,4E+08
P 2	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	50 mg, D0	50 mg, D14	50 mg, D28	75mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
Pseu- domo- nas	6,7E+08	1,1E+08	1,8E+08	1,9E+08	2,8E+08	-	1,4E+08	-	-
P 3	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	75mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
Pseu- domo- nas	1,9E+08	4,6E+07	3,7E+07	2,5E+08	-	-	3,3E+08	5,6E+08	3,4E+08
P 8	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25 mg, D14	25 mg, D28	75mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
Pseu- domo- nas	4,3E+08	2,5E+08	3,9E+08	4E+08	-	-	8,9E+08	1,9E+09	-

In Tabelle 21 sind die Ergebnisse für CF-Patienten mit anderen bakteriellen Erregern dargestellt.

Tabelle 21: Pseudomonaszahl im Sputum von Patienten mit anderen bakteriellen Erregern

P 4	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25mg, D14	25 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
Pseu- domo- nas	-	52000	16778	1278	408333	2917	66667	35333	-
P 12	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25mg, D14	25 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
Pseu- domo- nas	1000000	875000	106316	7,1E+07	4,5E+07	2,3E+07	738889	50889	275000
P 14	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	50 mg, D0	50mg, D14	50 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
Pseu- domo- nas	-	-	-	0	-	-	389	-	-

P 17	Plaz, D0	Plaz, D14	Plaz, D28	25 mg, D0	25mg, D14	25 mg, D28	75 mg, D0	75 mg, D14	75 mg, D28
Pseu- domo- nas	300000	2,5E+07	13111111	108333	258333	166667	1,3E+07	-	-

Patienten mit Pseudomonasinfektion wiesen eine hohe Pseudomonaskeimzahl im Sputum auf. Patienten mit Burkholderia- oder MRSA-Infektion wiesen ebenfalls viele Pseudomonaskeime auf. Die mit MRSA infizierten Patienten waren zusätzlich mit Pseudomonas infiziert.

Auch Patienten mit anderen bakteriellen Erregern wiesen Pseudomonas im Sputum auf, aber in weit geringeren Mengen als die Patienten der anderen Gruppen.

Bei Patienten mit Pseudomonasinfektion nahm die Pseudomonasbesiedelung während der Einnahme von Amitriptylin teilweise ab.

Zusammenfassung: Amitriptylin verstärkte bei manchen Patienten die IL8-Konzentration und das antiinflammatorische Cytokin IL10 in Blut und Sputum, während manchmal eine Verringerung der proinflammatorischen Cytokine IL1beta und IL6 beobachtet wurde. Die Pseudomonasbesiedelung nahm bei manchen Pseudomonaspatienten während der Behandlung mit Amitriptylin ab.

5 Diskussion

5.1 Einleitung

In der nun folgenden Diskussion sollen die Ergebnisse dieser Arbeit in Bezug auf die Rolle der Granulozyten bei Sepsis und Zystischer Fibrose beleuchtet werden. Hierzu sollen zuerst die **Sepsis** (Kapitel 5.2) und anschließend die **Zystische Fibrose** (Kapitel 5.3) genauer besprochen werden. Erst wird auf eigene Ergebnisse eingegangen, um dann Korrelationen zu Ergebnissen aus der Literatur aufzuzeigen.

5.2 Sepsis

5 Sepsispatienten (4 Männer und 1 Frau, Alter von 58 bis 82 Jahre) wurden über einen Verlaufszeitraum von insgesamt 17 Tagen untersucht. Die Messungen erfolgten an den ersten vier Tagen, an Tag 7, Tag 10 und Tag 17. Zwei Patienten verstarben während der Studie, Patient 3 am neunten Tag und Patient 4 am vierten Tag.

5.2.1 Bestimmung des Blutbildes

Von allen Sepsispatienten wurde an jedem Untersuchungstag EDTA-Vollblut sowohl mit dem Advia 120 gemessen als auch ein Blutaussstrich angefertigt. Die Leukozyten und besonders der Granulozytenanteil und der Anteil unreifer stabkerniger Granulozyten waren bei allen Sepsispatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe, die aus 5 gesunden freiwilligen Spendern bestand (2 Männer und 3 Frauen, Alter 24 bis 50 Jahre), stark erhöht. Bei einigen Patienten normalisierten sich die Zellzahlen und der Anteil unreifer Granulozyten zum Ende des Sepsisverlaufes wieder.

Die zwei verstorbenen Sepsispatienten wiesen besonders hohe Leukozytenzahlen im Blut auf. Einer der beiden verstorbenen Patienten hatte offensichtlich eine akute myeloische Leukämie mit erworbener partieller MPO-Defizienz, bei der nur etwa 40 % der Granulozyten aktive Myeloperoxidase besaßen. Früher dachte man, dass diese sehr reaktive Verbindung im Körper entscheidend zur Bekämpfung von Krankheitserregern beiträgt, aber seit Einsatz der durchflusszytometrischen Systeme zur Blutbilddifferenzierung weiß man, dass ungefähr jeder 2000. bis 4000. Gesunde an einer MPO-Defizienz leidet, ohne klinische Symptome aufzuweisen (Nauseef 1988). Hierzu passt die Entdeckung von Reeves et al., die 2002 über die wichtige Rolle des Superoxidanions berichteten, das über einen Ladungsausgleich einen Einstrom positiv geladener Ionen (wie von Essin et al. 2009 berichtet anscheinend nicht K^+ ,

sondern Protonen) bewirkt und somit durch Aktivierung der Elastase eine weitere Möglichkeit zur Abtötung von Krankheitserregern eröffnet und nicht notwendigerweise der Sequenz $O_2^- \rightarrow H_2O_2 \rightarrow HOCl$ eine so große Bedeutung zumisst. Allerdings wird der MPO unter extremen Bedingungen, wie z.B. während einer Sepsis, durchaus eine Rolle bei der Bekämpfung der Mikroorganismen zugestanden. Ob die MPO-Defizienz ursächlich mit dem Ableben des Patienten in Zusammenhang stand, lässt sich natürlich nicht beurteilen.

5.2.2 Selektine/Integrine und Toll-like-Rezeptoren

Sowohl bei den überlebenden Sepsispatienten als auch bei den Kontrollgranulozyten besaßen fast alle Granulozyten L-Selektin auf der Oberfläche. Bei dem verstorbenen Patienten mit MPO-Defizienz ergab sich ein verminderter Anteil Selektin-exprimierender Granulozyten.

Die durchschnittliche Intensität der Selektinexpression pro Granulozyt (mittlere Zellfluoreszenz) war sowohl bei den überlebenden als auch bei den verstorbenen Sepsispatienten verringert. In der Literatur wird bei Sepsispatienten generell eher von einer CD62L-Abnahme berichtet. Bei Schockpatienten und schwerer Sepsis ist in den ersten drei bis 4 Stunden ein L-Selektin-Anstieg zu beobachten, danach fällt die L-Selektin-Expression stark ab. Bei schwächeren Formen der Sepsis ist nur eine geringe CD62L-Änderung zu beobachten (Maekawa et al., 1998). Nach Endotoxin-Infusion wurde bei 6 Freiwilligen eine Abnahme der durchschnittlichen L-Selektin-Expression beobachtet (Solomkin et al., 1994). Die Selektinabnahme ist sinnvoll, weil bei einer Infektion die Expression von Integrinen den Granulozyten die feste Anlagerung an die Endothelzellen ermöglicht, um ins Gewebe auswandern zu können. Antikörper gegen CD62L tragen zur Verbesserung des Sepsisverlaufes bei (Lewis et al., 2009).

Für die Untersuchung des β -Integrins CD11b/CD18 (Mac-1) ergaben sich folgende zu diskutierende Ergebnisse. So gut wie alle Granulozyten der Sepsispatienten und Kontrollen exprimierten CD11b und CD18 auf der Zelloberfläche (Anteil fluoreszierender Zellen). Die überlebenden Sepsispatienten exprimierten ebenso wie einer der verstorbenen Patienten weniger CD11b auf der Zelloberfläche als die Kontrollpersonen, während der verstorbene MPO-defiziente Patient durchschnittlich mehr CD11b und CD18 auf den Granulozyten exprimierte (mittlere Zellfluoreszenz). Bei beiden verstorbenen Patienten sank die CD11b- und CD18-Expression kurz vor dem Tod. In der Literatur wird sowohl erhöhte CD11b-Expression bei Sepsispatienten (Chishti et al., 2004, Russwurm et al., 2002) als auch verringerte CD11b-Expression erwähnt (Nakae et al., 1996), abhängig vom Schweregrad der Sepsis und dem Verlauf.

Bei einigen wenigen Proben waren bei der Untersuchung der Fluoreszenzintensität erhöhte Kontrollwerte zu beobachten. Bei der Prozentauswertung sind die Kontrollen stets negativ. Hierbei wird nur die Anzahl der Zellen, die sich innerhalb des Markerbereiches befinden, gewertet. Bei Auswertung der mittleren Fluoreszenz spielt die Leuchtintensität der Zellen die entscheidende Rolle, so dass sich zwar nur wenige Zellen im negativen Bereich befinden, diese aber stark leuchten können. Bei den Kontrollgranulozyten gab es dieses Problem nicht, so dass vermutet werden könnte, dass bei den Sepsisgranulozyten viele Trümmer vorliegen und der Maus-Antikörper auch an Trümmer humaner Zellen binden kann.

Toll-like-Rezeptoren (TLR) erkennen spezifische Oberflächenstrukturen auf Bakterien (PAMPs, pathogen associated molecular pattern). TLR2 erkennt Lipoteichonsäuren auf der Oberfläche von Gram-positiven Bakterien wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus*. TLR4-Moleküle erkennen Lipopolysaccharid (LPS) in der Zellwand von Gram-negativen Bakterien, wie zum Beispiel *Escherichia coli*. TLR2 bewirkt bei Infektion mit *Aspergillus fumigatus*, einem häufigen Pneumoniereger nach Knochenmarkstransplantation, die Aktivierung von oxidativen Signalwegen durch Freisetzung von Gelatinase und proinflammatorischen Cytokinen, wohingegen TLR4 nach LPS-Kontakt die Freisetzung von Myeloperoxidase und antiinflammatorischen Cytokinen wie IL10 bewirkt (Bellocchio et al., 2004).

Bei den Sepsispatienten exprimierte bei allen ein gewisser Anteil der Granulozyten TLR2, zu einem besonders hohen Prozentsatz (30 bis 40 %) die Granulozyten des mit Gram-positiven *Staphylococcus aureus* infizierten MPO-defizienten Patienten. Bei diesem Patienten waren die Granulozyten und Monozyten sowohl im Advia 120 als auch im Fluoreszenzdurchflusszytometer kaum voneinander abzugrenzen (siehe Ergebnisse, Abbildung 32). Die Intensität der TLR2-Expression (mittlere Fluoreszenz) war bei $\frac{2}{3}$ der überlebenden Patienten erhöht. Die TLR4-Expressionsintensität war bei mit Gram-negativen *E. coli*- infizierten Überlebenden und dem nicht-MPO-defizienten Verstorbenen stark erhöht. Beim mit Gram-positivem MRSA Infizierten MPO-Defizienten war die Expressionsintensität von TLR2 und 4 leicht erhöht.

5.2.3 Phagozytose und oxidativer Burst

Die durchflusszytometrischen Messungen ergaben sowohl für die Granulozyten der überlebenden als auch der verstorbenen Sepsispatienten einen etwa genauso hohen Anteil phagozytosefähiger Granulozyten im Vergleich zu den Kontrollen.

Die Phagozytoseaktivität, also die durchschnittliche *E. coli*-Aufnahme pro Granulozyt

(mittlere Zellfluoreszenz), war bei den überlebenden Patienten ähnlich ausgeprägt wie bei den Kontrollgranulozyten. Bei den zwei verstorbenen Patienten zeigten die Granulozyten des einen eine verringerte Phagozytoseaktivität, während die Granulozyten des MPO-defizienten Patienten eine verstärkte Phagozytoseaktivität aufwiesen. Die bei diesem verstärkte Phagozytoseintensität könnte auf eine Kompensationsreaktion der mangelnden Bildung von HOCl hindeuten, indem die verstärkte Phagozytose die Abtötung der Erreger durch das nichtoxidative System mit Enzymen wie Lysozymen und Defensinen ermöglicht. Eine verstärkte Phagozytoseaktivität bei MPO-defizienten Granulozyten wurde bereits 1996 von Gerber et al. beschrieben.

Die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen wurde mit der luminolabhängigen Chemilumineszenz sowohl im Grundzustand als auch nach Stimulation gemessen.

Die Granulozyten der überlebenden Sepsispatienten bildeten ohne Stimulation bereits deutlich mehr reaktive Sauerstoffverbindungen und ließen sich wesentlich besser stimulieren als die der gesunden Kontrollpersonen. PMA (100 ng/ml pro well) bewirkte eine deutlich stärkere Stimulation als opsonisiertes Zymosan A (250 µg/ml pro well), während dieser Unterschied bei den Kontrollgranulozyten nicht feststellbar war. In der Literatur wurde bei Sepsispatienten ebenfalls eine erhöhte ROS-Bildung sowohl im Grundzustand als auch nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen beschrieben (Martins et al., 2008).

Die verstorbenen Sepsispatienten wiesen eine niedrigere CL-Bildung als die überlebenden Patienten auf, besonders der MPO-defiziente Patient, was mit der teilweisen MPO-Defizienz der Granulozyten zusammenhängt, da die bei der Chemilumineszenz verwendete Verstärkersubstanz Luminol vor allem mit HOCl reagiert, das erst durch die Reaktion der Myeloperoxidase mit Wasserstoffperoxid entsteht.

5.2.4 Chemotaxis und Degranulation

Die Granulozyten der Sepsispatienten wiesen im Vergleich zur Normalkontrolle eine schwächere Chemotaxis auf. Diese verminderte Chemotaxis wird auch in der Literatur beschrieben (Alves-Filho et al., 2008). Bei Patienten mit septischem Schock konnte eine verminderte Chemotaxis gegen IL8 beobachtet werden (Chishti et al., 2004). Wenn *Staphylococcus aureus* in den Wirt eindringt, löst er die Komplementkaskade mit Bildung von C5a aus. Immunzellen verfügen über Rezeptoren für C5a und für formylierte Peptide (C5aR und FPR). IL8 wird über die Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 erkannt (de Haas et al., 2004). Derselbe Autor berichtet über die Existenz eines Chemotaxis-hemmenden Proteins, über das *Staphylococcus aureus* verfügt. Dieses Chemotaxis Inhibitory Protein (CHIPS) wird

in mehr als 60 % aller klinischen Isolate gefunden. Es hemmte die Wanderung zu den zuerst gebildeten Chemoattraktoren NfMLP und C5a von murinen neutrophilen Granulozyten in einem Maus-Peritonitis-Modell, aber nicht die Chemotaxis zu dem später produzierten IL8 (de Haas et al., 2004). Dies korrelierte mit der Entdeckung einer Zeitverzögerung von zwei Stunden bei der Wanderung von Leukozyten zum Ort der Infektion mit einem virulenten *Staphylococcus aureus*-Stamm (Agarwal, 1967). Der MPO-defiziente Patient war mit *Staphylococcus aureus* infiziert, eventuell nahm dieser Einfluss auf die Fähigkeit der neutrophilen Granulozyten des Patienten zur Chemotaxis. Allerdings trägt CHIPS vor allem zur erfolgreichen Kolonisation zu Beginn einer Infektion bei und wird vor allem zu Beginn der Infektion benötigt. Es wird von weiteren Chemotaxis-inhibierenden Proteinen bei *Staphylococcus aureus* wie dem Extracellular Adherence Protein (EAP) berichtet (Chavakis et al, 2002).

Die mit Enzymen gefüllten Granula der Granulozyten werden im Falle einer Infektion teilweise nach außen abgegeben. In dieser Arbeit wurde die Degranulation der Granulozyten durch Gabe von Cytochalasin B, einem Stoffwechselprodukt aus Pilzen, vorbereitet. Cytochalasin B bindet an Aktinfilamente und hemmt die weitere Anlagerung von Aktin. Das Zytoskelett wird zerstört. Darauf erfolgte eine zehnminütige Inkubation mit dem von Bakterien abgegebenen Stoff NfMLP, wodurch die Granulozyten ihre Granula teilweise entleerten. Der Advia 120 misst die in den Granula enthaltene Myeloperoxidase. Bei Entleerung der Granula kommt es deshalb zu einer messbaren Verschiebung der Granulozyten nach links (X-Achse: Peroxidaseaktivität) (siehe Ergebnisteil, Kapitel 4.2.5, Abb. 36 und 37). Die Lage der Granulozyten in einem Perox X-Diagramm des Advia 120 vor Chemikalienbehandlung wurde ausgemessen und davon die gemessene Lage der Granulozyten nach Vorbehandlung mit Cytochalasin B und Inkubation mit NfMLP abgezogen. So wurde die Verschiebung der Granulozytenwolke nach links in relativen Einheiten ermittelt (siehe auch Material und Methoden, Kapitel 3.2.3).

Die Granulozyten der Patienten wiesen im Vergleich mit der Normalgruppe eine verringerte Degranulation auf.

5.2.5 Cytokine im Sepsisblut

Bei allen 5 Patienten wurden von der AG Riethmüller die Cytokine Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP), die proinflammatorischen Cytokine IL1beta und IL6 sowie das Chemotaxis-induzierende IL8 und antiinflammatorisches IL10 untersucht. LBP bindet an LPS, präsentiert es CD14-Rezeptor-tragenden Immunzellen und trägt so zum LPS-Abbau bei.

Bei allen Patienten verringerte sich LBP während des Sepsisverlaufes. Bei allen Patienten mit Ausnahme des MPO-defizienten sanken im Krankheitsverlauf LBP, IL6, IL8 und IL10 ab. Der verstorbene MPO-defiziente Patient wies zwar eine LBP-Verringerung auf, aber alle anderen untersuchten Cytokine, auch IL1beta, stiegen im Krankheitsverlauf an, was auf eine massive Entzündungsreaktion hinweist.

5.2.6 Die mögliche Bedeutung der MPO-Defizienz bei Sepsis

Es wäre eventuell sinnvoll gewesen, für die Auswertung die Ergebnisse der überlebenden Patienten als Mittelwert zusammenzufassen und diese den zusammengefassten Ergebnissen der verstorbenen Patienten gegenüberzustellen. Aber die einzelnen Patienten sind aufgrund des MPO-defizienten Patienten nicht wirklich vergleichbar.

Myeloperoxidasedefizienz kommt bei ungefähr jedem 2000. bis 4000. Menschen vor, wie man seit der Entwicklung durchflusszytometrischer Systeme in der Hämatologie weiß, die die Blutzellen auf Grund ihres Peroxidasegehaltes differenzieren (Nauseef 1988). Allerdings arbeitet nur der Advia 120 mit diesem Peroxidasesystem, andere hämatologische Durchflusszytometer wie Sysmex nicht und somit kann dieses auch keine Myeloperoxidasedefizienz detektieren. Die MPO-Defizienz ist klinisch meist unauffällig, was sehr überrascht, denn ursprünglich ging man davon aus, dass die durch die Myeloperoxidase produzierte HOCl für die Abtötung der Mikroorganismen zuständig und essentiell ist (Gaut et al., 2001) und eine Defizienz ebensolche massiven gesundheitlichen Folgen hervorruft wie die Septische Granulomatose. Diese ist eine rezessive Erbkrankheit, bei der die NADPH-Oxidase defekt ist, was die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen verhindert und massive gesundheitliche Auswirkungen wie Anfälligkeit für Infektionen mit vor allem katalasepositiven Krankheitserregern sowie Pilzen (z. B. Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia und Aspergillus niger) und Granulombildung bewirkt. Die Abtötung katalasenegativer Erreger wie Streptococcus pneumoniae bereitet kaum Probleme. Anscheinend wird von diesen Erregern genügend eigenes Wasserstoffperoxid gebildet. Die neutrophilen Granulozyten von Patienten mit chronischer Granulomatose weisen ein abgeschwächtes Apoptoseverhalten auf, was die Beteiligung von ROS bei diesem Prozess nahe legt (Ottonello et al., 2001).

Bei der MPO-Defizienz gibt es eine erbliche und eine erworbene Form. Der Schweregrad ist unterschiedlich und reicht von teilweisem Mangel unterschiedlicher Ausprägung bis zu vollständiger Defizienz. Die erworbene Form wird häufig mit hämatopoetischen Störungen

wie z.B. akuter myeloischer Leukämie in Verbindung gebracht (Grossl et al., 1993).

Der MPO-defiziente Patient wies sowohl im Advia 120 als auch im FACSCalibur eine sehr ungewöhnliche Zellpopulation mit Merkmalen von Monozyten und Granulozyten gleichzeitig auf (siehe Ergebnisteil, Kapitel 4.2.1, Abb. 22 und Kapitel 4.2.2.3, Abb 32). Die Messung im Advia 120 zeigt Blastenverdacht und viele große unidentifizierte Zellen (LUCs), was auf eine myeloische Leukämie hinweist. Aus der Blutausstrichauszählung von Patient 4 im Vergleich zur Advia 120-Messung ist bekannt, dass nur ungefähr die Hälfte der Granulozyten aktive Myeloperoxidase besitzt, was auf eine partielle Myeloperoxidasedefizienz hinweist. Der FACSCalibur misst die Granularität der Zellen mit Hilfe des SSC-Streulichtverhaltens. Eventuell ist die fehlende bzw. inaktive MPO, die in Granula gespeichert wird, verantwortlich für das seltsame morphologische Bild, weil die Granulozyten weniger Granula als normal besitzen. Die Granulozyten wiesen eine verstärkte Phagozytoseaktivität bei verminderter Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen auf, wie sie auch Gerber et al. 1996 bei MPO-defizienten Granulozyten beobachteten.

Bereits im Grundzustand schienen die Granulozyten des Sepsispatienten stark degranuliert zu sein. Der Advia 120 detektiert Granulozyten auf Grund ihres Peroxidasegehaltes, was eine Erklärung für die starke Degranulation sein könnte. Die Granulozyten sind nicht degranuliert, sie erscheinen aber so.

Dieser partielle MPO-Mangel ist normalerweise klinisch unauffällig, weil Krankheitserreger auch ohne Myeloperoxidase effektiv abgetötet werden, wie Reeves et al. 2002 berichteten. ROS-Bildung und MPO-Aktivität alleine sind für das Abtöten von Erregern nicht ausreichend. Durch die NADPH-Oxidase wird aus Sauerstoff negativ geladenes Superoxid gebildet, das einen Ladungsausgleich durch Einstrom positiver Ionen, wahrscheinlich Protonen (Essin et al., 2009), in die Phagozytenvakuole bewirkt. Durch Anstieg des pH-Wertes werden die an saure Glycoproteane gebundenen Proteasen wie z.B. Elastase und Cathepsin G aktiviert. Andere Wissenschaftler bringen ebenfalls Bedenken gegen die zentrale Bedeutung der reaktiven Sauerstoffverbindungen wie HOCl bei der Abtötung der Mikroorganismen vor (Segal 2005, Rüggeberg et al., 2002).

Die Bedeutung der Enzyme für die Abtötung von Krankheitserregern erklärt die Abwesenheit klinischer Symptome bei der MPO-Defizienz. Allerdings weisen einige wenige Personen mit MPO-Defizienz eine vermehrte Anfälligkeit für Infektionen auf (Lehrer et al., 1969) und bei MPO-defizienten-Mäusen werden häufige Infektionen mit *Candida albicans* beobachtet (Aratani et al., 1999). Kalinski et al. beschreiben 2007 den Fall einer schwangeren Frau mit Präeklampsie und Myeloperoxidasedefizienz, die eine tödliche Candidasepsis entwickelte.

Anscheinend besitzen MPO-defiziente Granulozyten auch eine gestörte bakterizide Wirkung gegen *Staphylococcus aureus* und eine gestörte Degranulation (Breton-Gorius et al., 1975). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass bei dem MPO-defizienten Patienten als einzigem der 5 Sepsispatienten eine Infektion mit *Staphylococcus aureus* nachgewiesen wurde.

Im Gegensatz hierzu konnte bei Neutrophilen-Elastase-defizienten Mäusen keine vermehrte Empfänglichkeit für Infektionen mit *Staphylococcus aureus* beobachtet werden, dafür aber mit Gram-negativen Erregern, wie *Klebsiella pneumoniae* und *Escherichia coli* (Belaouaj et al., 1998). Dieselbe Gruppe weist 2005 die gleichzeitige Bedeutung der Myeloperoxidase nach, denn auch MPO-defiziente Mäuse sind empfänglich für *Klebsiella pneumoniae* (Hirche et al., 2005).

Interessant sind die Experimente von Clauditz et al., die 2006 bei *Staphylococcus aureus* ein Carotinoid namens Staphyloxanthin in der Zellwand entdeckten, das eine Resistenz gegen reaktive Sauerstoffmetabolite wie Wasserstoffperoxid, Superoxid Radikal, Hydroxyl Radikal und Hypochlorit vermittelt und vor neutrophilem Killing schützt. Eventuell deutet die Existenz dieses Schutzmechanismus auf die durchaus vorhandene Bedeutung der ROS für die Mikrobenabwehr hin. Zusätzlich wurde vor kurzem entdeckt, dass eine Änderung der Teichonsäurezusammensetzung in der Zellmembran durch D-Alanylierung Gram-positive Bakterien gegen die meisten antimikrobiell wirksamen Substanzen wie z. B. Defensine oder Myeloperoxidase schützt. So sind bei *Staphylococcus aureus* die GraRS-Regulationsgene für die D-Alanylierung zuständig und schützen vor Abtötung durch neutrophile Granulozyten (Kraus et al., 2008). Wenn Krankheitserreger Mechanismen sowohl zum Schutz vor den aggressiven Sauerstoffverbindungen als auch vor antimikrobiell wirksamen Enzymen entwickelt haben, scheinen beide eine Rolle bei der Erregerabwehr zu spielen.

Besonders wichtig könnte das Zusammenspiel beider Systeme bei schweren Krankheiten sein, bei denen das Immunsystem an seine Grenzen stößt. Hier könnte ein Mangel an MPO eine Auswirkung auf den schweren Sepsisverlauf haben, weil in dieser Extremsituation auch auf die MPO zurückgegriffen werden muss. Der schnelle Tod des MPO-defizienten Sepsispatienten scheint darauf hinzuweisen, dass in solchen Extremsituationen die MPO und ihr Produkt, die HOCl, eine bedeutende Rolle spielen, eventuell durch direkte Erregerbekämpfung oder durch die Rückwirkung auf die NADPH-Oxidase mit nachfolgender Hemmung der ROS-Bildung, um Gewebsschädigung und Organversagen zu vermeiden.

5.2.7 Zusammenfassung Sepsis

Die untersuchten Sepsispatienten wiesen eine stark erhöhte Anzahl an Leukozyten mit einem erhöhten Anteil reifer und unreifer Neutrophiler im Blut auf. Die Verstorbenen wiesen besonders hohe Leukozytenzahlen auf. Bei den Überlebenden ließen sich zu Beginn der Erkrankung mehr unreife Neutrophile im Blut beobachten. Bei einem der verstorbenen Patienten wurden durch Auszählung der Blutausstriche im Mikroskop wesentlich mehr neutrophile Granulozyten detektiert als mit dem Advia 120, zugleich eine enorme Anzahl an großen unidentifizierten Zellen, was auf eine akute myeloische Leukämie mit erworbener MPO-Defizienz hindeutet.

Die Neutrophilen von Sepsispatienten wiesen keine veränderte Phagozytose auf, nur der eventuell MPO-defiziente Patient zeigte eine verstärkte Phagozytoseintensität.

Die Sepsispatienten wiesen zumeist eine verringerte Selektin (CD62L)-Dichte auf der Zelloberfläche auf. Bei dem MPO-defizienten Patienten war der Anteil Selektin-exprimierender Granulozyten verringert, während die Integrinexpression (CD11b/CD18) verstärkt war.

Die TLR2 und 4-Expression war bei allen Sepsispatienten verstärkt. Bei dem mit Gram-positiven *Staphylococcus aureus* infizierten MPO-defizienten Patienten wurde erwartungsgemäß wegen der Lipoteichonsäure eine sehr starke TLR2-Expression festgestellt, während zwei mit Gram-negativen *Escherichia coli* infizierte überlebende Patienten aufgrund des LPS eine deutlich verstärkte TLR4-Expression aufwiesen.

Die Granulozyten von Sepsispatienten bildeten sowohl im Grundzustand als auch nach Stimulation mehr ROS als die Kontrollgranulozyten, wobei die Granulozyten der verstorbenen Patienten weniger ROS als die Granulozyten der Überlebenden bildeten. Besonders gering war die ROS-Bildung bei dem verstorbenen MPO-defizienten Patienten. Bei den Sepsispatienten ließ sich im Vergleich zu den Kontrollen eine verringerte Chemotaxis beobachten, wobei der MPO-defiziente Patient die geringste Chemotaxis aufwies.

Die Granulozyten der überlebenden Sepsispatienten wiesen eine verringerte Degranulation im Vergleich zu den Kontrollgranulozyten auf. Ebenso die verstorbenen Patienten, wobei die extrem geringe Degranulation des einen Patienten eventuell auf eine akute myeloische Leukämie mit einer teilweisen Myeloperoxidasedefizienz zurückgeht, weil im Blutausstrich wesentlich mehr Granulozyten ausgezählt wurden als vom Advia 120 angegeben. Auch die verminderte ROS-Produktion weist in diese Richtung. Die für die Chemilumineszenz verwendete Verstärkersubstanz Luminol reagiert vor allem mit HOCl, das erst durch die MPO aus H₂O₂ gebildet wird.

Bei den Granulozyten der Sepsispatienten konnte teilweise für die Phagozytose, das Integrin CD11b und die Chemotaxis gegen Ende der Untersuchung eine hyporeaktive Phase festgestellt werden, zumeist bei überlebenden Patienten.

Bei allen Patienten verminderte sich im Sepsisverlauf der LBP-Wert. Die proinflammatorischen Cytokine IL1b und IL6 waren bei den verstorbenen Patienten erhöht, besonders bei dem MPO-defizienten Patienten. Beide Verstorbene wiesen hohe Werte des für die Chemotaxis verantwortlichen IL8 auf. Das antiinflammatorische Cytokin IL10 war allerdings ebenfalls bei den verstorbenen Patienten erhöht.

Besonderes Augenmerk sollte in zukünftigen Untersuchungen auf die Ermittlung des MPO-Status gelegt werden, ob MPO-Defizienz bei Sepsispatienten gehäuft vorkommt und zu einem negativen Krankheitsverlauf beiträgt. In dieser Studie sind die Fallzahlen sehr gering. Von fünf untersuchten Patienten starben zwei, was auf die Gefährlichkeit der Sepsis und den dringenden Forschungsbedarf hinweist. Diese Studie sollte auf jeden Fall mit mehr Patienten wiederholt werden. Zusätzlich zum MPO-Status sollte die Apoptose untersucht werden, weil in der Literatur über die Bedeutung der Apoptose bei Sepsis berichtet wird. So ist bei Patienten mit schwerer Sepsis eine verringerte Apoptose der Granulozyten zu beobachten (Weiss et al., 2003) ebenso wie veränderte Leukozyten- und Endothelapoptose (Wesche et al., 2005). Taneja et al. finden 2004 eine verzögerte Neutrophilenapoptose bei Sepsispatienten, beruhend auf verlängerter Aktivierung der NFkB und verminderten Caspase-3-Spiegeln. Fialkow et al. berichten in einer 2006 erschienenen Publikation von einer umgekehrt proportionalen Korrelation der Neutrophilenapoptose zur Schwere der Sepsis. Eine verlängerte Lebensspanne könnte mit vermehrter Gewebsschädigung zusammenhängen. Delogu et al. fanden 1999 erhöhte Ceramid- und TNF alpha-Spiegel bei Sepsispatienten mit Multiorganversagen. TNF scheint den Sphingomyelin-Signalweg mit Ceramidbildung zu aktivieren und zu einer verstärkten Apoptose beizutragen. Granulozyten, die mit dem Poren bildenden Toxin Streptolysin O permeabilisiert wurden, spalten L-Selektin von der Oberfläche ab und weisen eine erhöhte Ceramidbildung durch Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase auf (Walev et al., 2000). Patienten mit schwerer Sepsis weisen eine erhöhte Sphingomyelinaseaktivität mit verstärkter Ceramidansammlung und nachfolgender Apoptose mit Organversagen auf. ROS bewirken eine posttranslationale Modifikation der Sphingomyelinaseaktivität (Claus et al., 2005).

Auch die Erythrozytenapoptose („Eryptose“) ist bei Sepsispatienten verstärkt, was sich in der bei den meisten Sepsispatienten vorhandenen Anämie äußert. Die Inkubation von Erythrozyten Gesunder mit Sepsisplasma oder mit Überständen von Sepsis auslösenden

Erregern führt zu Sphingomyelinaseaktivierung und Ceramidbildung und letztlich zu Apoptose (Kempe et al., 2007).

Trotz all dieser interessanten Funde zur Bedeutung der Apoptose bei Sepsis konnte dieser Parameter aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Studie nicht untersucht werden. Es wurde später vergeblich versucht, Sepsisblut für Apoptosemessungen zu erhalten. In zukünftigen Versuchen und Studien sollte auf jeden Fall die Apoptose im Verlauf der Sepsis näher untersucht werden.

5.3 Zystische Fibrose

Für die CF-Studie wurden insgesamt 18 CF-Patienten (9 Männer und 9 Frauen, Alter von 18 bis 47 Jahre) mit unterschiedlicher Krankheitsausprägung untersucht. Vier der 18 Patienten produzierten kein oder nur sehr wenig Sputum. Das Sputum wurde fast immer frisch vor Versuchsbeginn ohne vorherige Induktion durch inhalierte Kochsalzlösung gewonnen, um eine Beeinflussung der Granulozyten durch Veränderung der Osmolarität zu verhindern. Die meisten Patienten sind chronisch mit unterschiedlichen Erregern wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* oder Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) infiziert.

Bereits 2003 entdeckten Grassmé et al. die Bedeutung von Ceramid für die Apoptoseinduktion und die Regulation der Cytokinantwort in pseudomonasinfizierten Zellen. Zur Verbesserung der Lungenfunktion wurde deshalb Amitriptylin, ein Hemmstoff der Ceramidbildung aus der Substanzklasse der trizyklischen Antidepressiva, eingesetzt. Die Wirkweise von Amitriptylin liegt im proteolytischen Abbau der sauren Sphingomyelinase begründet, die Sphingomyelin zu Ceramid spaltet (Becker et al., 2010). Durch Amitriptylin wird weniger Ceramid gebildet, welches sonst die Ansammlung von CD95 auf der Zelloberfläche bewirkt. Durch diese „Todescluster“ kommt es zur Anlagerung von Fas-Ligand mit nachfolgender Apoptose (Grassmé et al., 2008). Dieselbe Arbeitsgruppe um Erich Gulbins publizierte 2008 eine weitere Arbeit, in der sie auf die Bedeutung des erhöhten pH-Wertes bei nichtinfizierten CFTR-defizienten Mäusen hinweist. Dieser bewirkt ein Ungleichgewicht zwischen Ceramidbildung und -verbrauch, so dass es zur Ceramidanreicherung mit nachfolgender verstärkter Empfänglichkeit für *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen kommt. Die Behandlung mit Amitriptylin bewirkt eine Normalisierung des erhöhten Ceramidspiegels, eine Verringerung des verstärkten Epithelzellsterbens und verringert die Empfänglichkeit für die Infektion mit Krankheitserregern (Teichgräber et al., 2008).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Amitriptylin in vitro auf Granulozyten gesunder Spender, in vivo auf die Sputumzusammensetzung und verschiedene Granulozytenparameter untersucht, wie die Apoptose und die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen bei CF-Patienten. Zusätzlich wurde von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Joachim Riethmüller der Cytokingehalt in Blut und Sputum und die Erregeranzahl im Sputum ermittelt.

5.3.1 Einfluss von Amitriptylin auf Granulozyten gesunder Probanden

Amitriptylin wurde als Amitriptylin-Hydrochlorid in Pulverform in drei Konzentrationen (25 mg, entsprechen 16 $\mu\text{Mol/l}$ Vollblut, 75 mg, entsprechen 48 $\mu\text{Mol/l}$ Vollblut, 125 mg, entsprechen 80 $\mu\text{Mol/l}$ Vollblut) für 4 Stunden zu isolierten Granulozyten gesunder freiwilliger Spender gegeben und die Apoptose, die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen und die Degranulation untersucht.

Amitriptylin bewirkte eine Verstärkung der Apoptose um bis zu 50 % im Vergleich zur spontanen Apoptose, besonders mit einer Konzentration von 48 μM . Dies steht im Gegensatz zur Theorie, dass Amitriptylin durch Hemmung der sauren Sphingomyelinase die Bildung von Ceramid und somit die Apoptose verringert. Die Nekrose wurde durch Amitriptylin leicht erhöht.

Eine Inkubation von Amitriptylin mit frisch isolierten Granulozyten gesunder Spender bewirkte im Vergleich zur spontanen ROS-Bildung eine Verringerung um bis zu 30 %, die mit der höchsten Amitriptylinkonzentration von 80 μM signifikant war ($p < 0,01$). Nach PMA-Gabe war eine Verminderung der ROS-Produktion unter Amitriptylineinfluss im Vergleich zur spontanen Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen um ca. 20 % zu beobachten. Die Zugabe von opsonisiertem Zymosan A führte zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen und teils signifikanten Steigerung der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen um bis zu 40 %. Opsonisiertes Zymosan A wird über Phagozytose aufgenommen, möglicherweise trägt Amitriptylin zur Verstärkung der Phagozytoseaktivität bei.

Die Degranulation wurde unter dem Einfluss von drei unterschiedlichen Amitriptylinkonzentrationen ohne und nach Zugabe von Cytochalasin B und NfMLP untersucht. Amitriptylin hemmte die Fähigkeit der Granulozyten zur Abgabe des Granulainhaltes ins Außenmedium in allen Konzentrationen signifikant ($p < 0,01$). Zwischen den verschiedenen Konzentrationen ließen sich keine Unterschiede feststellen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Amitriptylin deutliche in-vitro-Effekte auf die Granulozyten zeigte. Amitriptylin bewirkte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verringerte

Abgabe von Granula sowie eine niedrigere ROS-Produktion. Hierzu passt die durch Hemmung der sauren Sphingomyelinase mit nachfolgend geringerer Ceramidbildung erhöhte Apoptose. All diese Faktoren können dazu beitragen, die Atemwege vor allzu aggressiven Stoffwechselprodukten der Granulozyten zu schützen. Allerdings kann die verringerte Abgabe des mikrobiziden Granulainhalts ins Phago lysosom auch zu einer schlechteren Eliminierung von phagozytierten Krankheitserregern beitragen. Die verstärkte Apoptose der Granulozyten könnte langfristig zu einer Verflüssigung des Sputums führen, weil weniger Granulozyten in den Atemwegen bei ihrem Zerfall weniger DNA freisetzen, die stark zur Verfestigung des Sputums beiträgt.

5.3.2 Zellzahl und Apoptose im Blut der CF-Patienten

Im Vollblut von CF-Patienten waren die Leukozytenzahl und der Anteil neutrophiler Granulozyten erhöht, besonders bei Patienten mit Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* und MRSA. Der Anteil an apoptotischen Granulozyten nach deren Isolierung aus dem Blut erwies sich meist als genauso gering wie bei den Granulozyten Gesunder. In der Literatur wird ebenfalls kein Unterschied in der Apoptoserate zwischen Blutgranulozyten von CF-Patienten und Gesunden festgestellt (Adib-Conquy et al., 2008). Manche CF-Blutneutrophile wiesen eine erhöhte Nekrose im Vergleich zu Gesunden auf. Es war weder für die Apoptose noch für die Nekrose ein Zusammenhang mit der Amitriptylinbehandlung festzustellen.

5.3.3 Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen bei Blutgranulozyten von CF-Patienten

Die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen durch Blutgranulozyten konnte bei ungefähr der Hälfte der CF-Patienten untersucht werden. Die Granulozyten von CF-Patienten produzierten im Grundzustand (d.h. ohne Aktivierung) weniger ROS als die gesunder Kontrollpersonen, unabhängig von der Art der Infektion und der Amitriptylingabe. Die ROS-Bildung war nach Stimulation mit opsonisiertem Zymosan A (250 µg/ml) bei den meisten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen erhöht, besonders bei Patienten mit *Pseudomonas*- oder MRSA-Infektion. Auch in der Literatur wurde bei CF-Blutgranulozyten nach Stimulation mit opsonisiertem Zymosan eine verstärkte oxidative Aktivität beobachtet (Adib-Conquy et al., 2008). Amitriptylin schien die ROS-Produktion bei Patienten mit *Pseudomonas*- oder MRSA-Infektion noch zu steigern.

Die verstärkte ROS-Bildung bei den CF-Patienten durch die Granulozyten könnte eine

schädigende Wirkung auf das Lungen- und Bronchialgewebe der Patienten bewirken. Andererseits können ROS in Neutrophilen über Ceramidproduktion mit CD95-Clustern Caspase-8 aktivieren und sind so an der Auslösung der Apoptose beteiligt, was wiederum eine schützende Wirkung auf die Atemwege haben könnte (Sato et al., 2004, Scheel-Toellner et al., 2004 a). Auch Glutathion spielt eine wichtige Rolle. In alternden neutrophilen Granulozyten wird die Apoptoseinduktion durch verringerte Glutathionspiegel begünstigt. Zudem wirkt Glutathion der ROS-Bildung entgegen (Scheel-Toellner et al., 2004 b).

Andererseits könnte die gesteigerte ROS-Produktion zu einer verbesserten Bekämpfung der Erreger bei chronischer Besiedelung beitragen. Die verringerte Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen bei CF-Granulozyten im Grundzustand könnte eine Erklärung für die mangelnde Bekämpfung der Erreger im Lungen- und Bronchialgewebe sein. Eventuell liegt auch eine Änderung der Phagozytosefähigkeit vor. Oponisiertes Zymosan wird durch Phagozytose aufgenommen. Die verstärkte ROS-Bildung nach Zymosangabe könnte auf einer erhöhten Phagozytosefähigkeit beruhen, denn der beta2-Integrin-Rezeptor Mac-1 (CD11b/CD18) ist ein Komplement-Bindungsrezeptor auf Granulozyten und Monozyten, der für die Phagozytose von opsonisiertem Zymosan benötigt wird und zugleich den Phagozyten die feste Adhäsion an das Endothel ermöglicht (Ross et Vetvicka, 1993). Auch für die Apoptose spielen die Phagozytose und der Mac-1-Rezeptor eine wichtige Rolle, da über eine Mac-1-vermittelte Phagozytose-induzierte ROS-Bildung über die Aktivierung von Caspase-8 und -3 der extrinsische Weg der Apoptose ausgelöst wird (Zhang et al., 2003). Zugleich geht eine verstärkte Mac-1-Expression mit einer verstärkten Chemotaxisbefähigung einher (Liles et al., 2001).

5.3.4 Zusammensetzung des Sputums und Apoptose der Zellen im Sputum von CF-Patienten

Die Messung der Zellzahl, insbesondere aber der Apoptose und Nekrose im Sputum ist grundsätzlich problematisch, weil zum Zeitpunkt der Sputumentnahme nicht bestimmt werden kann, wie lange sich die Granulozyten bereits in den Atemwegen befanden.

Außerdem kann mit dem Advia 120 nur der Gesamtwert an Leukozyten bestimmt werden. Allerdings kann bei Betrachtung der Graphik (siehe Abbildung 9, Material und Methoden) ein gewisser Rückschluss auf die Zusammensetzung der Leukozyten und die Qualität der Granulozyten gezogen werden, z.B. im Hinblick auf die Degranulation. Das Differentialblutbild des Sputums wurde durch Auszählung der zeitgleich angefertigten Cytospins bestimmt.

Die Bestimmung der Apoptose und Nekrose im Sputum ist an sich problematisch, weil das Sputum kein standardisiertes System ist und die Zuverlässigkeit der verfügbaren Apoptose- und Nekrose Assays unter diesen Umständen schwierig einzuschätzen ist. Auf diese analytische Problematik wird im Kapitel 5.3.4.1 noch ausführlich eingegangen.

Im Sputum war die Zellzahl bei Patienten mit *Pseudomonas aeruginosa*-, *Burkholderia cepacia*- oder MRSA-Infektion im Vergleich zu Patienten mit anderen bakteriellen Erregern erhöht.

Die Zellzusammensetzung des Sputums war bei den einzelnen Patienten unterschiedlich, bei den mit *Pseudomonas*-, *Burkholderia*-, MRSA-Keimen besiedelten Patienten bestand es nur aus Granulozyten, bei Patienten mit Besiedelung durch andere bakterielle Erreger auch zu einem großen Teil aus Epithelzellen und Speicherzellen. Bei Patient 14 (weiblich, 25 Jahre, besiedelt mit *Sphingomonas spec.*) musste das Sputum immer durch Inhalation von 5,85 M Kochsalzlösung induziert werden. Das Sputum wies eine große Anzahl Speicherzellen und anderer Zelltypen (Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile) auf. Die Salzlösung scheint einen großen Einfluss auf die Sputumzusammensetzung zu haben, was nicht verwunderlich ist, weil sich durch die Induktion die Viskosität des Sputums von sehr zäh zu dünnflüssig ändert. Diese optische Änderung kann auch Auswirkungen auf die enthaltenen Zelltypen haben. Wahrscheinlich kommt das induzierte Sputum tiefer aus den Bronchien als natives Sputum.

Bei einigen Patienten schien Amitriptylin die Anzahl an Epithelzellen im Sputum zu erhöhen und gleichzeitig die Granulozytenzahl zu senken. Epithelzellen lösen sich nur im abgestorbenen Zustand aus dem Epithelverband und sind dann im Sputum zu finden. Dies scheint im Widerspruch zur Theorie zu stehen, dass Amitriptylin eine Hemmung der Apoptose der Epithelzellen bewirkt. Allerdings ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ein konzentrationsabhängiger Mechanismus wirksam, denn Ceramid wird für die Zellerhaltung benötigt und darf nicht vollständig entfernt werden. 75 mg Amitriptylin könnte bereits zu hoch dosiert sein. Man weiß, dass Amitriptylin in hoher Konzentration, wie zur Behandlung von Depressionen verwendet, in seltenen Fällen Neutropenie auslösen kann.

Die Cytospins wurden ebenso wie die Zellzahlbestimmung im Advia 120 und die Apoptosemessung mit Sputum, das nach Verdünnung mit PBS durch ein 40 µm Zellsieb gefiltert wurde, durchgeführt. Dies war für die Messungen mit Durchflusszytometern (Advia 120, FACSCalibur) zwingend notwendig, um ein Verstopfen dieser empfindlichen Geräte zu vermeiden. Für die Cytospins wäre dies nicht unbedingt notwendig, aber bei Vorversuchen mit ungefiltertem Sputum zeigte sich, dass die Cytospins aufgrund der großen Menge Schleims nur eingeschränkt auszählbar waren. Allerdings bleiben im Zellsieb, abhängig von

der Sputumviskosität, unterschiedliche Sputummengen zurück, so dass diese Methode nicht wirklich standardisierbar ist. Für den Vergleich zwischen Advia-120-Messung und Auszählung von Cytospins eines Patienten am selben Tag spielt dieses Problem aber keine Rolle, weil beide Male dasselbe gefilterte Sputum verwendet wird. Einmal mehr zeigt dieses Vorgehen generell die Einschränkung der Aussagen bezüglich einer genauen Analytik der Sputumproben. Es liegt in der Natur der Sache, dass die Analytik nicht so genau und standardisiert durchgeführt werden kann wie z.B. mit Blutproben. Die „quantitativ“ ermittelten Werte können also realistischerweise lediglich als „Trendwerte“ angesehen werden.

Die Auszählung des Sputums nach Trypanblaufärbung ergab einen durchschnittlichen Anteil von ungefähr 20 bis 45 % toter Zellen im Sputum. Insgesamt schwankten die Zahlen, was aber mit der schwierigen Situation im Sputum zusammenhängen kann: Es ist teilweise sehr schwer, zwischen Trümmern und deformierten noch lebenden Zellen zu unterscheiden. Amitriptylin schien bei einigen Patienten eine Erhöhung der Anzahl toter Zellen zu bewirken. Der mit Trypanblaufärbung bestimmte Anteil toter Zellen im Sputum ließ sich nicht mit dem Anteil apoptotischer Zellen im Sputum korrelieren.

Patienten mit Pseudomonas-, Burkholderia- oder MRSA-Infektion wiesen eine hohe Apoptoserate im Sputum von bis zu 80 % auf, bei Patienten mit anderen bakteriellen Erregern war sie geringer. Amitriptylin bewirkte bei Normierung auf die Plazebowerte bei einigen Patienten mit Pseudomonas-Infektion einen Anstieg der Apoptose.

Die starke Ausprägung der Apoptose könnte durch die Abgabe von Exotoxinen der die Atemwege besiedelnden Bakterien bewirkt werden (Usher et al., 2002).

Bei manchen Patienten, vor allem mit Besiedelung durch andere bakterielle Erreger, trat eine hohe Nekroserate auf, die während der Amitriptylinbehandlung meist geringer wurde. Die Nekrose ist nicht unproblematisch, weil sie Entzündungsreaktionen hervorruft.

5.3.4.1 Generelle Probleme der Sputumanalyse

Grundsätzliche methodische Probleme:

Grundsätzlich musste zuerst entschieden werden, ob natives oder induziertes Sputum verwendet werden soll. Natives Sputum gibt den natürlichen Zustand in den Atemwegen wieder, ist aber sehr zäh. Auch erhebt sich die Frage, ob das Sputum mit Dithiothreitol (DTT) verflüssigt werden soll. DTT kann eine Veränderung des Glutathionspiegels und eine Aktivierung der Neutrophilen bewirken (Tirouvanziam et al., 2008). In dieser Studie entschieden wir uns für natives Sputum, das frisch untersucht und nicht mit DTT behandelt

wurde. Allerdings musste in Ausnahmefällen induziertes Sputum verwendet werden. Manchmal waren die Sputumproben bereits mehrere Stunden zuvor produziert worden. Diese Ausnahmen sind im Ergebnisteil in Tabelle 7 dargestellt. Als zusätzliches Problem kamen die Patienten aufgrund unterschiedlicher Lebenssituationen zu völlig unterschiedlichen Zeitpunkten im Tagesverlauf zur Untersuchung (morgens, mittags, nachmittags oder erst in den späten Abendstunden), so dass ein gewisser Einfluss der Tagesperiodik auf das Sputum und die Sputumzusammensetzung nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Bestimmung der Apoptose der Zellen im Sputum ist problematisch, weil nicht bekannt ist, wann die Granulozyten in die Lungen und Bronchien einwandern und wie lange die Zellen bereits dort verweilen. Nicht induziertes Sputum kommt häufig aus den Bronchien. Es ist unbekannt, ob die Granulozyten in festen zeitlichen Zyklen oder kontinuierlich einwandern. Deshalb ist es schwierig zu klären, ob die Granulozyten generell im Sputum von CF-Patienten eine verzögerte oder eine verlängerte Apoptose aufweisen. Auch die verfügbaren Analysemethoden zur Ermittlung apoptotischer oder nekrotischer Zellen sind nicht auf Sputum ausgelegt und somit ist unklar, inwieweit man sich auf die Aussagekraft dieser Testsysteme im Sputum verlassen kann. Hinzu kommt die generelle Problematik der Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Zellen, weil mit dem hier verwendeten Annexin-Nachweis nur frühapoptotische Zellen als apoptotisch gewertet werden, während spätapoptotische Zellen gemeinsam mit nekrotischen Zellen erfasst werden.

Auch gibt es in neuester Zeit Hinweise darauf, dass die Vorgänge in der Zelle nicht so eindeutig sind wie bislang angenommen. Es wurde eine Zwischenform zwischen Apoptose und Nekrose entdeckt, die sogenannte Nekroptose (Hitomi et al., 2008). Hierbei handelt es sich um eine Unterform der Nekrose bzw. eine Mischung aus Apoptose und Nekrose, die ebenso wie die Apoptose gezielt induzierbar ist. Möglicherweise ist die Entscheidung, ob eine Zelle apoptotisch oder nekrotisch ist, also gar nicht so eindeutig zu treffen.

Ein weiteres Problem ist die Konsistenz des Sputums. Bei den meisten in der Literatur veröffentlichten Studien wird induziertes Sputum verwendet. In dieser Studie wurde natives Sputum verwendet, um die Granulozyten so wenig wie möglich durch Veränderung der Osmolarität zu beeinflussen. Allerdings wurde festgestellt, dass natives Sputum sehr unterschiedlich in der Konsistenz und der Zusammensetzung ist. Weil die Konsistenz sowohl zwischen den Patienten als auch an einzelnen Tagen bei demselben Patienten stark schwankt, sollte in Zukunft über weitere Möglichkeiten nachgedacht werden.

In der Literatur veröffentlichte Daten:

Apoptose: In der Literatur gibt es mittlerweile viele Daten zum Zellsterben im Sputum, wobei allerdings generell auf die Problematik der Apoptosebestimmung im Sputum kaum eingegangen wird. Es gibt Publikationen, die der Ansicht sind, dass bei CF eine beschleunigte Apoptose der neutrophilen Granulozyten vorliegt. So weist Sputum von CF-Patienten mit Pseudomonas- oder Burkholderiainfektion viele apoptotische Granulozyten auf (Watt et al., Thorax, 2005), wobei allerdings unklar ist, wann die Granulozyten verstorben sind und seit wann sie sich in den Atemwegen befanden. Zudem verstärkt das Pseudomonas-Exotoxin Pyocyanin die Apoptose von normalen neutrophilen Granulozyten (Usher et al., 2002).

Allerdings scheint das Sputum auch einen schützenden Effekt auf die Granulozyten zu haben und die Apoptose zu verzögern. Die Abschwächung der Apoptose wird auf die Interaktion mit CF-Epithelzellen zurückgeführt (Adib-Conquy et al., 2008). So gibt das CF-Epithel Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) ab, der die Neutrophilenapoptose verzögert (Saba et al., 2002.). Auch wurden bei CF-Patienten erhöhte Plasmaspiegel des Macrophage migration inhibitory factor (MIF) entdeckt, der die Neutrophilen-Apoptose verzögert (Baumann et al., 2003). Der Glutathiongehalt spielt eine wichtige Rolle für die Apoptose und ist bei CF-Epithelzellen erhöht, während der Ceramidspiegel erniedrigt ist. Hierdurch wird die Apoptose verzögert (Vilela et al., 2006). Im Gegensatz hierzu berichten Tirouvanziam et al. 2008 von einer Verringerung des intrazellulären GSH-Spiegels bei lebenden Zellen im Sputum im Vergleich zu Blutneutrophilen. Dies könnte die Apoptoseinduktion erleichtern. Zugleich wurde eine verstärkte CD11b-Expression auf der Oberfläche von Sputumneutrophilen im Vergleich zu Blutgranulozyten beobachtet. Diese Unterschiede zwischen Blut- und Atemwegsneutrophilen wurden aber auch bei Gesunden beobachtet. Eventuell ist dies eine notwendige Anpassung an die Umgebung der Atemwege. Dieselbe Gruppe berichtet über eine negative Korrelation der Anzahl lebender Neutrophiler im Sputum mit der Lungenfunktion.

Unsere eigenen Ergebnisse scheinen auf eine bei CF mit bis zu 80 % stark ausgeprägte Apoptose im Sputum bei Patienten mit Pseudomonas-, Burkholderia- oder MRSA-Infektion hinzuweisen. Apoptose ist ein wichtiger Prozess zur Beherrschung von Entzündungsreaktionen. So führt eine Unfähigkeit zur Bildung von ceramidreichen Membranplattformen zu einer mangelnden Apoptose, was sich in einer ständigen Entzündungsreaktion mit massiver IL1-Freisetzung und Entwicklung einer Sepsis bei Mäusen bemerkbar macht (Grassmé et al., 2003).

Ceramid spielt eine wichtige Rolle bei bakteriellen Infektionen (besonders der Lunge) und bei

Sepsis, insbesondere mit den Erregern *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* (Becker et al., 2008). Bei CF-Patienten wurden im Plasma niedrigere Ceramidspiegel als bei Gesunden entdeckt. Bei CFTR-Knockout-Mäusen sind ebenfalls erniedrigte Ceramidlevel in von CF betroffenen Organen, wie Lunge, Bauchspeicheldrüse, Ileum und Plasma, nachweisbar. Fenretinid [N-(4-hydroxyphenyl) Retinamid, 4-HPR] ist ein synthetisch hergestelltes Retinoid (Vitamin A-Derivat) und besitzt antiproliferative Eigenschaften. Es ist weniger toxisch als all-trans-Retinsäure und kann wie diese eine Redifferenzierung von Tumorzellen bewirken. Die Behandlung mit Fenretinid erhöhte den Ceramidspiegel und ermöglichte den Mäusen eine verbesserte Bekämpfung von *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen (Guilbault et al., 2008). Allerdings stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu denen der Arbeitsgruppe von Erich Gulbins, die eine erhöhte Ceramidkonzentration bei CFTR-defizienten-Mäusen fanden. Die Gulbins-Gruppe erklärt die erniedrigten Ceramidwerte von Guilbault mit der Verwendung vollkommen CFTR-defizienter Mäuse, die eine spezielle Diät einhalten müssen, um nicht an Darmverschluss zu sterben. Diese Diät bewirkt einen Cholesterolanstieg und hierdurch wird die Aktivität der sauren Sphingomyelinase reduziert (Teichgräber et al., 2008). Auch gibt es Hinweise, dass die von Guilbault verwendeten Testsysteme neben Ceramid auch Dihydroceramid detektierten. Fenretinid hemmt dessen Umwandlung zu Ceramid, wodurch sich die erniedrigten Ceramidspiegel erklären lassen (Becker et al., 2010).

5.3.5 Cytokine, Lungenfunktion und Ceramidkonzentration

Cytokine und Interleukine: Im Sputum von CF-Patienten wurden in der Literatur apoptoseinduzierende Cytokine wie TNF alpha und proinflammatorische Interleukine wie IL1, IL6 und IL8 gefunden. Aber ebenso sind antiinflammatorische, wie GM-CSF und IL10, zu detektieren, die einen hemmenden Einfluss auf die Apoptose ausüben können. Adib-Conquy et al. verglichen in einer 2008 erschienenen Veröffentlichung 1065 Gene von neutrophilen Blut- und Atemwegsgranulozyten von CF-Patienten, die keine Infektion mit *Pseudomonas* aufwiesen, mit den Granulozyten von Gesunden. Die Blutgranulozyten von CF-Patienten weisen eine Hochregulation von IL3, IL8, IL10 und GM-CSF auf. Bei den CF-Granulozyten aus spontanem Sputum sind 6 Gene hochreguliert, darunter G-CSF, IL10R alpha, TNF-Rezeptor und Caspase-1.

Petit-Bertron et al. verglichen 2008 Blut- und Sputumgranulozyten von CF-Patienten mit den jeweiligen Granulozyten gesunder Spender und entdeckten eine Veränderung der Oberflächenmarker (z.B. Toll-like-Rezeptoren) sowie der IL8-Sekretion und stellten fest, dass

die Granulozyten aus dem Sputum nicht auf rekombinantes IL10 reagieren und somit unempfindlich für antiinflammatorische Signale zu sein scheinen.

Die Arbeitsgruppe von PD Dr. Joachim Riethmüller hat während dieser CF-Studie die Cytokinspiegel in Blut und Sputum sowie die Pseudomonaszahlen im Sputum untersucht. Die Spiegel der Entzündungscytokine IL1beta und IL6 sanken bei einigen Patienten unter Gabe von Amitriptylin. Amitriptylin schien in einigen Fällen den Spiegel des für die Chemotaxis wichtigen Cytokins IL8 in Blut und Sputum zu erhöhen.

Das Cytokin IL8 scheint auch eine wichtige Rolle bei der Apoptose zu spielen. So bewirkt die Behandlung von CF-Epithelzellen mit dem Apoptoseauslöser TNF eine starke IL8-Produktion, die durch Fenretinid gesenkt werden kann. Fenretinid löst bei CF-Epithelzellen keine Apoptose aus, während bei Epithelzellen von Gesunden eine verstärkte Apoptose, aber keine Verringerung der TNF-induzierten IL8-Produktion beobachtet wird (Vilela et al., 2006).

Die Untersuchung der Pseudomonaszahl im Sputum als Nachweis einer chronischen Besiedelung ergab bei Patienten mit Pseudomonasinfektion wie erwartet eine hohe Zahl an Pseudomonas aeruginosa, auch bei Patienten mit Burkholderia – oder MRSA-Infektion. Bei einigen pseudomonasinfizierten Patienten schien die Zahl im Sputum während der Behandlung mit Amitriptylin etwas zu sinken.

Lungenfunktion und Ceramidkonzentration in Nasenepithelzellen

Die Überprüfung der Lungenfunktion erfolgte durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. Joachim Riethmüller. Nach Behandlung mit Amitriptylin, vor allem in der niedrigsten Dosis von 25 mg täglich, verbesserte sich bei einigen Patienten die Lungenfunktion signifikant. Die Arbeitsgruppe von Professor Erich Gulbins untersuchte die Ceramidspiegel in nasalen Epithelzellen der CF-Patienten. Unter Amitriptylineinfluss war eine signifikante Reduktion der Ceramidkonzentration in nasalen Epithelzellen von CF-Patienten nachweisbar (Riethmüller et al., 2009).

5.3.6 Einfluss zellfreier Sputen von CF-Patienten auf die Funktion von Granulozyten gesunder Probanden

Während der Studie wurde an jedem Untersuchungstag Sputum bei -80°C bzw. -20°C weggefroren, wenn der Patient genügend Sputum produziert hatte. Die Wirkung der Sputen wurde bei den Patienten näher untersucht, bei denen sich aus der spirometrischen Untersuchung eine Verbesserung der Lungenfunktion ergab. Es wurden nur die Ergebnisse

des ersten und dritten Untersuchungstages des entsprechenden Amitriptylinzyklus verwendet, weil viele Patienten am vierten Tag aus Krankheitsgründen nicht gewertet werden konnten. Es konnten nur Sputumüberstände von Patienten mit Pseudomonas- oder MRSA-Infektion verwendet werden, weil nur bei diesen Patienten genügend Sputum vorhanden war.

a) Apoptose

Das zellfreie Sputum wurde durch Zentrifugation frischen nativen Sputums bei 12000 x g für 15 Minuten gewonnen, indem der Überstand abgenommen und eingefroren wurde. Die Auswertung der Einzelergebnisse ergab, dass Sputumüberstand an sich bei manchen Patienten die Apoptose gesunder Granulozyten erhöhte. Gleichzeitige Inkubation der Granulozyten mit dem Apoptoseinduktor Staurosporin und Sputumüberstand bewirkte bei allen Proben eine verstärkte Apoptose.

In der auf den Wert ohne Sputumüberstand normierten Gesamtauswertung aller Patienten zeigte sich im Vergleich mit Plazebosputumüberstand eine leicht verstärkte Apoptose der Blutneutrophilen gesunder Spender bei Inkubation mit Amitriptylinsputumüberstand.

b) Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen

Die ROS-Bildung „gesunder Granulozyten“ verringerte sich im Grundzustand ohne Stimulation unter Einwirkung von Sputumüberstand.

Die Inkubation von mit PMA oder opsonisiertem Zymosan A stimulierten Granulozyten gesunder Spender mit Sputumüberstand bewirkte eine starke ROS-Produktion, besonders mit Überstand von Pseudomonasinfizierten. In der Literatur ist ebenfalls eine verstärkte ROS-Bildung bei gesunden Granulozyten durch Inkubation mit CF-Sputumüberstand beschrieben. Verantwortlich sind eventuell bakterielle Endotoxine oder Immunkomplexe (Kharazmi et al., 1987).

Die Auswertung der auf die Probe ohne Sputumzugabe normierten Messung ergab, dass die Inkubation mit amitriptylinbehandeltem Sputumüberstand von CF-Patienten aus der CF-Studie bei Neutrophilen gesunder Spender unter Stimulation mit PMA oder opsonisiertem Zymosan A eine stärkere Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen als bei Inkubation mit Sputumüberstand aus einem Plazebozyklus bewirkte.

c) Degranulation

Die Granulozyten von gesunden Probanden wurden mit CF-Sputumüberständen von 3 Patienten ohne Amitriptylinbehandlung inkubiert und Degranulationsuntersuchungen

durchgeführt. Hierbei hemmten die Sputumüberstände die Degranulation, was im Widerspruch zur Literatur steht, nach der Elastase-reiches-CF-Sputum eosinophile Blutgranulozyten gesunder Spender degranulieren lässt (Liu et al., 1999). Ebenso wird in der Literatur von einer verstärkten Degranulation bei CF-Blut-Granulozyten (Eosinophile und Neutrophile) berichtet (Tirouvanziam et al., 2008, Koller et al., 1995).

5.3.7 Wirt-Erreger-Interaktion

Die Interaktion zwischen Neutrophilen und Krankheitserregern ist ein sehr komplexer Prozess voller Wechselwirkungen. So produzieren Krankheitserreger eine Vielzahl von Faktoren, die Einfluss auf das Immunsystem nehmen, während die Neutrophilen ihrerseits Stoffe gegen die Mikroorganismen bilden.

Die Virulenz Gram-negativer Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* liegt in der Produktion von Endotoxinen und Lipopolysaccharid (LPS) auf der Außenseite der Membran (Giamarellos-Bourboulis et al., 2004). LPS gehört zu den sogenannten Modulinen. Auch Gram-positive Erreger besitzen diese Module. *Staphylococcus aureus* bildet das Phenol-lösliche-Modulin (Phenol-Soluble-Modulin, PSM), das durch den Formyl-Peptid-Rezeptor 2 (FPR2) erkannt wird (Rautenberg et al., 2010). Durch Interaktion mit dem TLR2-Molekül bewirken PSM Entzündungsprozesse durch Aktivierung von NFκB sowie Cytokinbildung (vor allem von TNF alpha, IL1beta und IL6). Neben einer verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen wird gleichzeitig die Apoptose gehemmt (Liles et al., 2001). Ein weiteres Protein von *Staphylococcus aureus*, das Staphylococcal virulence factor protein A, interagiert mit dem TNF-Rezeptor-1 im Atemwegsepithel und löst, ebenso wie TNF, Apoptose aus (Fournier und Philpott, 2005). Eine Änderung der Teichonsäurezusammensetzung in der Zellmembran durch D-Alanylierung schützt Gram-positive Bakterien gegen die meisten antimikrobiell wirksamen Substanzen wie z. B. Defensine oder Myeloperoxidase. So bewirkt bei *Staphylococcus aureus* D-Alanylierung der Teichonsäuren einen Schutz vor Abtötung durch neutrophile Granulozyten (Kraus et al., 2008).

Auch andere Faktoren tragen zur Virulenz dieser Krankheitserreger bei. So stellten Berlutti et al. 2005 eine Eisenüberladung im CF-Sputum fest, die bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cepacia* die Biofilmbildung begünstigt und so das Anheften an Epithelzellen erleichtert. In Gegenwart von reduzierten Eisen-Ionen (Fe^{2+}) kann in der Fenton-Reaktion durch Neutrophile Hydroxylradikal gebildet werden, das ceramidfreisetzende Enzyme, wie die saure Sphingomyelinase, aktiviert (Scheel-Toellner et al., 2004 b). Das Hydroxylradikal

kann zur Gewebeschädigung beitragen. All diese Faktoren deuten darauf hin, dass sowohl die Krankheitserreger als auch das Immunsystem selbst zu pathologischen Prozessen wie permanenten Entzündungsreaktionen an Zellmembranen und Geweben bei CF beitragen. Eventuell kann Amitriptylin durch seine Wirkung auf neutrophile Granulozyten einen Beitrag zur Milderung der Symptomatik bei CF leisten, indem die Neutrophilen vermehrt in Apoptose gehen und die Atemwegsepithelien stabilisiert werden. Die verstärkte ROS-Bildung durch die stimulierten Granulozyten könnte zu einer effektiveren Abtötung der Krankheitserreger führen.

5.3.8 Zusammenfassung CF-Studie

I. In-vitro-Untersuchungen

Bei methodisch klar zu standardisierenden Untersuchungen der Wirkung von Amitriptylin auf Granulozyten gesunder Spender wurde eine deutliche Wirkung auf Apoptose, Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen und die Degranulation festgestellt:

a) Apoptose: Amitriptylin bewirkte eine Verstärkung der Apoptose um bis zu 50 % im Vergleich zur spontanen Apoptose, besonders mit einer Konzentration von 48 μM . Dies steht im Gegensatz zur Theorie, dass Amitriptylin durch Hemmung der sauren Sphingomyelinase die Bildung von Ceramid und somit die Apoptose verringert. Die Nekrose wurde durch Amitriptylin leicht erhöht.

b) ROS-Bildung: Inkubation von Amitriptylin mit frisch isolierten Granulozyten gesunder Spender bewirkte im Vergleich zur spontanen ROS-Bildung eine Verringerung um bis zu 30 %, die mit der höchsten Amitriptylinkonzentration von 80 μM signifikant war ($p < 0,01$). Nach PMA-Gabe war eine Verminderung der ROS-Produktion unter Amitriptylineinfluss im Vergleich zur spontanen Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen um ca. 20 % zu beobachten. Zugabe von opsonisiertem Zymosan A führte zu einer deutlichen, teils signifikanten konzentrationsabhängigen Steigerung der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen um bis zu 40 %. Opsonisiertes Zymosan A wird über Phagozytose aufgenommen, möglicherweise trägt Amitriptylin zur Verstärkung der Phagozytoseaktivität bei.

c) Degranulation: Amitriptylin hemmte die Fähigkeit der Granulozyten zur Abgabe des Granulainhaltes ins Außenmedium in allen Konzentrationen signifikant ($p < 0,01$). Zwischen

den verschiedenen Konzentrationen ließen sich keine Unterschiede feststellen.

II. Untersuchungen an CF-Patienten

a) Lungenfunktion und Ceramidspiegel in nasalen Epithelzellen:

Die Lungenfunktion der Patienten verbesserte sich signifikant unter Einnahme von 25 mg Amitriptylin täglich im Mittel um $4,0 \pm 7\%$, ($p=0,048$). Auch mit Konzentrationen von 50 und 75 mg Amitriptylin täglich war eine Verbesserung der Lungenfunktion ersichtlich. Eine von der Arbeitsgruppe von Professor Gulbins in Essen durchgeführte Untersuchung der Ceramidkonzentration der nasalen Epithelzellen der CF-Patienten der APAII-Studie mittels Fluoreszenzmikroskopie ergab eine signifikant verringerte Ceramidkonzentration unter Amitriptylinbehandlung (Plazebogruppe: $MW \pm S.D. 2,0 \pm 1,55$ relative Fluoreszenzintensität, Amitriptylin $0,92 \pm 0,67$ relative Fluoreszenzintensität, $p=0,042$) (Riethmüller et al., 2009).

b) Sputumzusammensetzung, Erregerzahl und Apoptose:

Sputumzusammensetzung und Erregerzahl: CF-Patienten mit schwerwiegender chronischer Infektion (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus*) wiesen erhöhte Leukozytenzahlen mit erhöhtem Granulozytenanteil im Blut auf. Im Sputum waren enorme Mengen an Zellen vorhanden. Bei Patienten mit *Pseudomonas*-, *Burkholderia*- oder *MRSA*-Infektion setzte sich das Sputum fast nur aus Granulozyten zusammen. Bei einigen Patienten mit anderen bakteriellen Erregern kamen viele Speicherzellen und Epithelzellen vor. Fast alle mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* oder *Staphylococcus aureus* besiedelten Patienten wiesen eine zeitgleiche Besiedelung mit *Pseudomonas* auf. Diesem Keim kommt eine besondere Bedeutung im CF-Krankheitsgeschehen zu, weil CF-Sputumneutrophile kaum in der Lage sind, *Pseudomonas aeruginosa* abzutöten. Die *Pseudomonas*zahlen im Sputum *Pseudomonas*infizierter sanken unter Amitriptylineinfluss oft ab.

Apoptose und Nekrose:

Der Anteil apoptotischer Granulozyten war im Sputum der CF-Patienten mit 40 bis 80 % hoch, vor allem bei Patienten mit *Pseudomonas*-, *Burkholderia*- oder *MRSA*-Besiedelung. Vergleich mit der Plazebocinnahme ergab für die Behandlung mit Amitriptylin bei manchen *Pseudomonas*-Patienten eine erhöhte Apoptose und Nekrose. Bei Patienten mit anderen bakteriellen Erregern führte die Einnahme von Amitriptylin zu einem Absinken der Nekrose.

Allerdings ist die Bestimmung der Apoptose bzw. Nekrose im Sputum problematisch, weil nicht klar ist, seit wann die in die Atemwege eingewanderten Granulozyten sich bereits dort befinden und eine Standardisierung deshalb schwierig ist.

CF-Blutneutrophile wiesen erwartungsgemäß eine wesentlich niedrigere Apoptose als Sputumneutrophile auf, die im Normalbereich bis zu 5 % lag.

Bei Granulozyten gesunder Spender erhöhte die Inkubation mit Überstand von Sputumproben aus der CF-Studie oft die Apoptose. Bei Inkubation mit Amitriptylin-Sputumüberstand stieg der Anteil apoptotischer Zellen bei manchen Pseudomonas- Patienten an. Gleichzeitige Inkubation der Granulozyten mit Staurosporin und Sputumüberstand bewirkte bei allen Proben eine verstärkte Apoptose. In der auf den Wert ohne Sputumüberstand normierten Gesamtauswertung aller Patienten zeigte sich im Vergleich mit Plazebosputumüberstand eine leicht verstärkte Apoptose der Blutneutrophilen gesunder Spender bei Inkubation mit Amitriptylinsputumüberstand.

c) ROS-Bildung und Degranulation:

ROS-Bildung: Die ROS-Bildung der Blutgranulozyten war bei CF-Patienten im Grundzustand verringert und nach Stimulation mit Zymosan A vor allem bei mit Pseudomonas- oder MRSA- besiedelten Patienten verstärkt. Die Einnahme von Amitriptylin verstärkte die ROS-Bildung bei pseudomonasbesiedelten Patienten.

Überstand von während der CF-Studie gewonnenen Sputumproben bewirkte bei Granulozyten gesunder Spender im Grundzustand ohne Stimulation eine Verringerung der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen. Inkubation von mit PMA oder opsonisiertem Zymosan A stimulierten Granulozyten gesunder Spender mit Sputumüberstand führte zu einer starken ROS-Produktion. Die Inkubation mit amitriptylinbehandeltem Sputumüberstand von CF-Patienten aus der CF-Studie bewirkte bei Neutrophilen gesunder Spender unter Stimulation mit PMA oder opsonisiertem Zymosan A eine stärkere Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen als bei Inkubation mit Sputumüberstand aus einem Plazebozyklus.

Degranulation: Sputumüberstand von nicht mit Amitriptylin behandelten CF-Patienten bewirkte eine Hemmung der Degranulation bei Granulozyten gesunder Spender.

d) Cytokine: Patienten, die mit Amitriptylin behandelt wurden, zeigten erhöhte Werte des Chemotaxis-induzierenden Cytokins IL8 und des antiinflammatorischen Cytokins IL10 in Blut und Sputum. Bei manchen mit Amitriptylin behandelten Patienten wurde eine

Verringerung der proinflammatorischen Cytokine IL1beta und IL6 im Behandlungsverlauf beobachtet.

Amitriptylin bewirkte eine Verbesserung der Lungenfunktion bei vielen Patienten.

Die Korrelation der Granulozytenparameter mit den Ergebnissen der Lungenfunktionsuntersuchung ergab für pseudomonasinfizierte Patienten während der Amitriptylineinnahme eine Verringerung der Neutrophilenzahl in Blut und Sputum. Gleichzeitig stieg die Apoptose im Sputum an. Dies kann auf eine Schutzwirkung von Amitriptylin für die Atemwege hinweisen. Indem weniger Granulozyten in der Lunge vorhanden sind, weil die vorhandenen Granulozyten in Apoptose gehen, kann die Schädigung der Atemwege verringert werden.

Aufgrund der Ergebnisse, die auf eine positive Wirkung von Amitriptylin auf das Krankheitsgeschehen in den Atemwegen bei CF-Patienten hinweisen, sollte die Wirkung von Amitriptylin auf CF-Patienten an einem größeren Patientenkollektiv untersucht werden. Wegen des großen Infektionsrisikos in der Winterzeit sollten diese im Sommer stattfinden. Hierbei sollte besonderes Augenmerk auf die Sputumgewinnung gelegt werden. So ist es eventuell doch von Vorteil, induziertes Sputum zu verwenden, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Auf jeden Fall sollte die Degranulation bei Granulozyten aus Sputum von CF-Patienten nach Amitriptylinbehandlung untersucht werden.

Die Apoptose in CF-Sputum ist schwer standardisierbar, eventuell sollten andere Testsysteme auf ihre Eignung untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Granulozyten (Neutrophile Granulozyten) spielen sowohl bei der Sepsis als auch bei der Zystischen Fibrose eine herausragende Rolle, was bereits durch ihr zahlenmäßig enorm gesteigertes Vorkommen im Blut (Sepsis) und im Sputum (Zystische Fibrose) angezeigt wird. Um die Rolle der Granulozyten bei diesen beiden Krankheitsbildern genauer zu untersuchen, wurden klinische Studien durchgeführt.

Sepsis:

In der GZF-Studie, einer longitudinalen klinischen Pilotstudie an 5 Sepsispatienten (Probanden: 4 Männer, 1 Frau, Alter 58 bis 82 Jahre, Untersuchung an den Tagen 1-4, 7, 10, 17) unter Leitung von PD Dr. med. Joachim Riethmüller, wurden verschiedene Oberflächenmoleküle sowie funktionelle Parameter der Granulozyten untersucht. Die untersuchten Sepsispatienten wiesen eine stark erhöhte Anzahl an Leukozyten sowie einen erhöhten Anteil reifer und unreifer neutrophiler Granulozyten im Blut auf. Die später Verstorbenen (2/5) wiesen besonders hohe Leukozytenzahlen auf, wohingegen sich bei den Überlebenden zu Beginn der Erkrankung mehr unreife neutrophile Granulozyten im Blut befanden. Bei 4 von 5 Sepsispatienten wiesen die Granulozyten eine verringerte Selektindichte auf der Zelloberfläche im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n=5) auf. Bei einem der verstorbenen Patienten fiel eine verstärkte Integrinexpression bei gleichzeitig verringerter Selektinexpression auf. Die TLR2 und 4-Expression war bei allen Sepsispatienten verstärkt. Bei einem mit Gram-positiven *Staphylococcus aureus* infizierten Patienten wurde erwartungsgemäß aufgrund der Lipoteichonsäure eine sehr starke TLR2-Expression festgestellt, während zwei mit Gram-negativen *Escherichia coli* infizierte Patienten aufgrund des Lipopolysaccharids eine deutlich verstärkte TLR4-Expression aufwiesen. Die Granulozyten der Sepsispatienten bildeten sowohl im Grundzustand als auch nach Stimulation mehr reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) als die Kontrollgranulozyten, wobei die Granulozyten der später verstorbenen Patienten weniger ROS als die Granulozyten der Überlebenden bildeten. Bei den Sepsispatienten ließ sich im Vergleich zu den Kontrollen eine verringerte Chemotaxis und Degranulation beobachten, insbesondere bei einem der später verstorbenen Patienten. Dieser zeigte zusätzlich eine verstärkte Phagozytoseintensität der Granulozyten. Bei diesem Patienten wurde am Advia 120 ein partieller Myeloperoxidase (MPO)-Mangel festgestellt, möglicherweise litt der Patient an einer myeloischen Leukämie. Bei den Granulozyten der überlebenden Sepsispatienten konnte teilweise für die Phagozytose, die Expression des Integrins CD11b und die Chemotaxis gegen Ende der Untersuchung eine

hyporeaktive Phase festgestellt werden.

Bei allen Patienten verminderte sich im Sepsisverlauf der Wert des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins im Plasma. Die proinflammatorischen Cytokine IL1b und IL6 waren bei den verstorbenen Patienten erhöht, besonders bei dem MPO-defizienten Patienten. Die beiden später Verstorbenen wiesen auffallend hohe Werte des für die Chemotaxis verantwortlichen IL8 auf. Bei einem der Verstorbenen war die Chemotaxis stark ausgeprägt, während der MPO-defiziente Patient eine sehr schwache Chemotaxis aufwies. Das antiinflammatorische Cytokin IL10 war ebenfalls bei den verstorbenen Patienten erhöht.

Zukünftig sollte bei den Advia-Blutbildern von Sepsispatienten speziell darauf geachtet werden, ob ein MPO-Mangel vorliegt und ob diese Patienten einen dramatischeren Krankheitsverlauf zeigen.

Zystische Fibrose (CF):

In der APAII-Studie, einer randomisierten plazebokontrollierten doppelblinden Cross-over-Studie unter Leitung von PD Dr. med. Joachim Riethmüller wurde an 18 CF-Patienten die Wirkung von 3 unterschiedlichen Konzentrationen des trizyklischen Antidepressivums Amitriptylin (25 mg, 50 mg, 75 mg p.o.) untersucht (Probanden: 9 Frauen, 9 Männer, Alter 18 bis 47 Jahre, Untersuchung an Tag 0, 7, 14 und 28, je 3 Zyklen, Zeitraum Herbst 2006 bis Sommer 2007).

Von diesen Probanden wurden in Blut und nativem Sputum verschiedene Granulozytenparameter wie Zellzahl, Apoptose, Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen und Degranulation bestimmt.

Zuvor wurde die Wirkung von Amitriptylin auf isolierte Granulozyten gesunder Probanden in vitro untersucht. Amitriptylin verstärkte die Apoptose, hemmte aber die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen sowohl im Grundzustand als auch nach Stimulation mit PMA. Auch die Degranulation der MPO war nach Behandlung mit Amitriptylin signifikant vermindert.

Im Blut von CF-Patienten waren die Leukozytenzahlen und der Anteil neutrophiler Granulozyten erhöht. Die Granulozyten der CF-Patienten bildeten im Grundzustand weniger reaktive Sauerstoffverbindungen als die von Gesunden. Durch Stimulation mit Zymosan A erhöhte sich die ROS-Bildung. Während der Behandlung mit Amitriptylin war eine weitere Steigerung bei mit Pseudomonas- oder MRSA-infizierten CF-Patienten zu beobachten.

Die Auszählung der Cytospins ergab für Sputen von mit Pseudomonas aeruginosa-, Burkholderia cepacia- oder MRSA-besiedelten CF-Patienten fast nur neutrophile Granulozyten (> 90 %), während im Sputum von Patienten mit anderen bakteriellen Erregern

neben Neutrophilen viele Epithelzellen und Speicherzellen zu finden waren. Bei einem Patienten mit Besiedelung durch andere bakterielle Erreger musste das Sputum immer induziert werden. Dieser Vorgang scheint einen Einfluss auf die Sputumzusammensetzung zu besitzen, weil bei diesem Patienten sehr viele Speicherzellen beobachtet wurden.

Die quantitative Auswertung der Apoptosebestimmungen in Sputumproben der CF-Patienten war problematisch, weil nicht klar ist, wann die Zellen ins Sputum eingewandert sind. In dieser Studie wurden mit dem Annexin-Testsystem hohe Apoptoseraten im Sputum von CF-Patienten beobachtet, die bei Pseudomonaspatienten durch Amitriptylin noch anstiegen. Die Pseudomonasanzahl im Sputum verringerte sich während der Amitriptylinbehandlung bei manchen Patienten.

Darüber hinaus wurden Granulozyten von gesunden Spendern mit APAII-Sputumüberständen der CF-Patienten inkubiert. Die Sputen einiger Pseudomonaspatienten führten zu einer Erhöhung der Apoptose und zu einer verstärkten ROS-Bildung bei stimulierten Granulozyten, insbesondere Sputen von mit Amitriptylin behandelten Patienten. CF-Sputumüberstand ohne Amitriptylinbehandlung hemmte die Degranulation der MPO gesunder Granulozyten.

Die Lungenfunktion verbesserte sich unter der Behandlung mit Amitriptylin bei vielen Patienten. Die Korrelation der Lungenfunktionsverbesserung mit den entsprechenden Granulozytenparametern ergab unter Amitriptylineinfluss für pseudomonasinfizierte Patienten eine Abnahme der Neutrophilen in Blut und Sputum sowie eine Zunahme der Apoptose im Sputum. Die Abnahme der neutrophilen Granulozyten sowie die verstärkte Apoptose könnten zu einer geringeren Schädigung der Atemwege führen. Allerdings steht die Zunahme der Apoptose im Gegensatz zu der Annahme, dass Amitriptylin die Apoptose hemmt, wie dies für Epithelzellen durch Verminderung des Ceramidspiegels nachgewiesen wurde (Riethmüller et al., 2009). Eventuell wirken bei Granulozyten andere Mechanismen.

Trotz einiger Hinweise auf eine regulierende Wirkung von Amitriptylin auf die Granulozyten im Sputum lässt sich also noch keine generelle Aussage zur Wirkung treffen. In künftigen Studien sollte eine größere Anzahl an CF-Patienten mit Amitriptylin behandelt werden und die Studien sollten unbedingt vor Beginn der Herbst-/Winterzeit abgeschlossen werden, um den Einfluss von viralen Infekten zu minimieren. Eine weitere, gerade abgeschlossene Phase II-Studie der Arbeitsgruppe bestätigte die positive Wirkung auf die Lungenfunktion. Ein weiteres Problem war die Verwendung nativen Sputums in dieser Studie. So erhält man zwar die Granulozyten in möglichst unverändertem Zustand, aber durch die unterschiedliche Viskosität ergeben sich Probleme bei der Standardisierung. Zukünftig sollte wegen der besseren Vergleichbarkeit induziertes Sputum verwendet werden.

7 Summary

Granulocytes (neutrophil granulocytes) play an important role for sepsis as well as for cystic fibrosis, obvious through the enormous numbers in the blood (sepsis) and in the sputum (cystic fibrosis). To examine the role of neutrophils within these two diseases, clinical trials were carried out.

Sepsis:

In the GZF-study, a longitudinal clinical pilot study with 5 sepsis patients (proband: 4 male, 1 female, age 58 until 82 years, examination on day 1-4, 7, 10, 17) under supervision of associate professor MD Joachim Riethmüller, different surface molecules and functional parameters of granulocytes were analysed. The examined sepsis patients had a strongly increased amount of leucocytes and an increased percentage of mature and premature neutrophils in blood. The afterwards deceased (2/5) had especially high leucocyte numbers, whereas the survivors had more premature neutrophil granulocytes in the blood at the beginning of the disease. Granulocytes of 4 from 5 sepsis patients showed a decreased density of selectin at the cell surface compared to healthy controls (n=5). One of the deceased had an increased expression of integrin with reduced expression of selectin at the same time. TLR2 and 4-expression was increased for all sepsis patients. One patient with Gram-positive *Staphylococcus aureus* showed a very strong TLR2-expression, as expected due to lipoteichoic acid. Two patients with Gram-negative *Escherichia coli* showed a clearly heightened TLR4-expression, due to lipopolysaccharide. The granulocytes of sepsis patients produced in the ground state as well as after stimulation more reactive oxygen species (ROS) than the control granulocytes. ROS production of the later deceased was lower than that of survivors. Sepsis patients showed in comparison with control persons a diminished chemotaxis and degranulation, especially one of the afterwards deceased. Additionally, the granulocytes of this patient showed an increased intensity of phagocytosis. For this patient, a partially myeloperoxidase (MPO)-deficiency could be seen with the Advia 120, possibly the patient had a myeloid leukaemia.

Granulocytes of surviving sepsis patients showed partially at the end of the study a hyporeactive phase for phagocytosis, the expression of integrin Cd11b and chemotaxis. In the course of sepsis, the value for lipopolysaccharide-binding protein in plasma decreased for all patients. Proinflammatory cytokines IL1b and IL6 were increased for the deceased, especially for the MPO-deficient patient. Both later deceased showed high values of the chemotaxis

inducing IL8. One of them had a distinct chemotaxis, while the MPO-deficient patient showed a very low chemotaxis. The anti-inflammatory cytokine IL10 was as well increased for the deceased.

In the future, attention should be paid for MPO-deficiency in Advia-blood counts and if these patients show a more dramatically course of disease.

Cystic fibrosis (CF):

In the APAII-study, a randomized placebo controlled double blinded cross-over-trial with 18 CF-patients under supervision of associate professor MD Joachim Riethmüller, the efficacy of 3 different concentrations of the tricyclic antidepressant amitriptyline were investigated (25 mg, 50 mg, 75 mg p.o.) (probands: 9 male, 9 female, age 18 until 47 years, examination on day 0, 7, 14 and 28, 3 cycles each, period autumn 2006 to summer 2007). From this probands different granulocyte parameters were evaluated like cell amount, apoptosis, production of ROS and degranulation. Previously, the effect of amitriptyline to isolated granulocytes from healthy probands was examined. Amitriptyline increased apoptosis, but reduced ROS-production as well in ground state as after stimulation with PMA. Also, degranulation of MPO was significantly diminished after treatment with amitriptyline.

In the blood of CF-patients, the leucocyte amounts and the percentage of neutrophil granulocytes were increased. The granulocytes of CF-patients produced in ground state less ROS than granulocytes from healthy donors. Stimulation with Zymosan A heightened ROS-production. During treatment with amitriptyline, another rise was observed for CF-patients infected with *Pseudomonas aeruginosa* or MRSA.

The enumeration of cytopins from CF-patients colonised with *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* or MRSA resulted in almost merely neutrophils in sputum (> 90 %), whereas in sputa from patients colonised with other bacterial pathogens besides neutrophils many epithelial cells and storage cells were found. The sputum from one patient with colonisation with other bacterial pathogens had always to be induced. This procedure seems to have an influence on the sputum composite, because a lot of storage cells could be seen here.

The quantitative evaluation of apoptosis determination in sputum probes of CF-patients was problematically, because it is unclear, when cells migrate into sputum. In this study high rates of apoptosis were seen with the annexin test system in CF-sputum, increasing for patients with *Pseudomonas aeruginosa* under amitriptyline treatment. The amount of *Pseudomonas aeruginosa* in the sputum decreased for some patients during taking of amitriptyline.

Beyond that, granulocytes from healthy donors were incubated with APAAII-sputum supernatant from CF-patients. The sputa from some CF-patients caused an enhancement of apoptosis and an intensified ROS-production after stimulation, especially for sputa from patients treated with amitriptyline. CF-Sputum supernatant without amitriptyline treatment inhibited the degranulation of MPO from granulocytes from healthy donors.

The pulmonary function of many patients was enhanced by therapy with amitriptyline. Correlation between pulmonary function with the corresponding granulocyte parameters showed for patients with *Pseudomonas aeruginosa* under influence of amitriptyline a decrease of neutrophils in blood and sputum as well as a rise of apoptosis in sputum. The decline of neutrophil granulocytes as well as the increased apoptosis in sputum could account for less damage in the respiratory tracts. However, the increased apoptosis is contrary to the assumption of an apoptosis inhibition through amitriptyline, like proved for epithelial cells through reduction of ceramide level (Riethmüller et al., 2009). Eventually other mechanisms are valid for granulocytes. Despite of some considerations for a regulating influence of amitriptyline on granulocytes in sputum, no general statement can be made yet.

In further trials, a higher amount of CF-patients should be treated with amitriptyline and the studies should end before beginning of autumn/winter to minimize the influence of viral infections. Another just finished phaseII-trial of the working group confirmed the positive effect on the pulmonary function.

Another problem was the usage of native sputum in this study. That way, granulocytes are as unmodified as possible, but there are problems with the standardisation because of the different viscosity. In the future induced sputum should be used due to a better comparability.

8 Literaturverzeichnis

- ACCP/SCCM Consensus Conference Committee (1992): Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 20: 864-874
- Adib-Conquy M, Pedron T, Petit-Bertron AF, Tabary O, Corvol H, Jaquot J, Clément A, Cavaillon JM (2008): Neutrophils in cystic fibrosis display a distinct gene expression pattern. *Mol Med* 14: 36-44
- Agarwal DS (1967): Subcutaneous staphylococcal infection in mice. II. The inflammatory response to different strains of staphylococci and micrococci. *Br J Exp Pathol* 48: 468-482
- Akabas MH (2000). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J Biol Chem* 275: 3729-3732
- Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ (2008): The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock* Oct. 30; Suppl. 1: 3-9
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR (2001): Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29: 1303-1310
- Aratani Y, Koyama H, Nyui S, Suzuki K, Kura F, Maeda N (1999): Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun* 67: 1828-1836
- Assari T (2006): Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. *Med Immunol* 5: 4
- Ballmann M, Smaczny C (Hsg): CF-Manual. Solvay Arzneimittel GmbH, 1. Auflage 1998
- Baumann R, Casaulta C, Simon D, Conus S, Yousefi S, Simon HU (2003): Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *FASEB J* 17:2221-2230
- Becker KA, Gellhaus A, Winterhager E, Gulbins E (2008): Ceramide-enriched membrane domains in infectious biology and development. *Subcell Biochem* 49: 523-538
- Becker KA, Grassmé H, Zhang Y, Gulbins E (2010): Ceramide in *Pseudomonas aeruginosa* infections and cystic fibrosis. *Cell Physiol Biochem* 26: 57-66
- Belaouaj A, McCarthy R, Baumann M, Gao Z, Ley TJ, Abraham SN, Shapiro SD (1998): Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med* 4: 615-618
- Bellocchio S, Moretti S, Perruccio K, Fallarino F, Bozza S, Montagnoli C, Mosci P, Lipford GB, Pitzurra L, Romani L (2004): TLRs govern neutrophil activity in Aspergillosis. *J Immun* 173: 7406-7415
- Berlutti F, Morea C, Battistoni A, Sarli S, Cipriani P, Superti F, Ammendolia MG, Valenti P (2005): Iron availability influences aggregation, biofilm, adhesion and invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. *Int J Immunopathol Pharmacol* 18: 661-670

- Bjorgvinsdóttir H, Zhen L, Dinauer MC (1996): Cloning of murine gp91phox cDNA and functional expression in a human x-linked chronic granulomatous disease cell line. *Blood* 87: 2005-2010
- Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G (1999): The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 22: 347-351
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992): Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 101: 1644-55
- Bonfield TL, Konstan MW, Burfeind P, Panuska JR, Hilliard JB, Berger M (1995): Normal bronchial epithelial cells produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13: 257-261
- Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, Berger M (1995). Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 2111-2118
- Boujaoude LC, Bradshaw-Wilder C, Mao C, Cohn J, Ogretmen B, Hannun YA, Obeid L (2001): Cystic fibrosis transmembrane regulator regulates uptake of sphingoid base phosphates and lysophosphatidic acid; modulation of cellular activity of sphingosine-1-phosphate. *J Biol Chem* 276: 35258-35264
- Breton-Gorius J, Houssay D, Vilde JL, Dreyfus B (1975). Partial myeloperoxidase deficiency in a case of preleukaemia. II. Defects of degranulation and abnormal bactericidal activity of blood neutrophils. *Br J Haematol* 30: 279-288
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004): Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535
- Carlos TM, Harlan JM (1994): Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068-2101
- Castillo SS, Levy M, Thaikootathil JV, Goldkorn T (2007): Reactive nitrogen and oxygen species activate different sphingomyelinases to induce apoptosis in airway epithelial cells. *Exp Cell Res* 313: 2680-2686
- Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock JI, Herrmann M, Preissner KT (2002): Staphylococcus aureus extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* 8: 687-693
- Chishti AD, Shenton BK, Kirby JA, Baudouin SV (2004): Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Int Care Med* 30: 605-611
- Clauditz A, Resch A, Wieland K-P, Peschel A, Götz F (2006): Staphyloxanthin plays a role in the fitness of Staphylococcus aureus and its ability to cope with oxidative stress. *Infect Immun* 74: 4950-4953
- Claus RA, Bunck AC, Bockmeyer CL, Brunckhorst FM, Losche W, Kinscherl R, Deigner HP (2005): Role of increased sphingomyelinase activity in apoptosis and organ failure of patients with severe sepsis. *FASEB J* 19: 1719-1721
- Cremesti A, Paris F, Grassmé H, Holler N, Tschopp J, Fuks Z, Gulbins E, Kolesnick R (2001): Ceramide enables Fas to cap and kill. *J Biol Chem* 276: 23954-23961

- Crouch Brewes S, Wunderink RG, Jones CB, Leeper KV Jr (1996): Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 109:1019-1029
- De Haas CJ, Veldkamp KE, Peschel A, Weerkamp F, Van Wamel WJ, Heezius EC, Poppelier MJ, Van Kessel KP, van Strijp JA (2004). Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial anti-inflammatory agent. *J Exp Med* 199: 687-695
- Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003): A decade of caspases. *Oncogene* 22: 8543-8567
- Delogu G, Famularo G, Amati F, Signore L, Antonucci A, Trinchieri V, Di Marzio L, Cifone MG (1999): Ceramide concentration in septic patients: a possible marker of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 27: 2413-2417
- Dumitru CA, Zhang Y, Li X, Gulbins E (2007): Ceramide: A novel player in reactive oxygen species-induced signalling? *Antioxidants & Redox Signaling* 9: 1535-1540
- Esen M, Schreiner B, Jendrossek V, Lang F, Fassbender K, Grassmé H, Gulbins E (2001): Mechanisms of *Staphylococcus aureus* induced apoptosis of human endothelial cells. *Apoptosis* 6:431-439
- Essin K, Gollasch M, Rolle S, Weissgerber P, Sausbier M, Bohn E, Autenrieth IB, Ruth P, Luft FC, Nauseef WM, Kettritz R (2009): BK channels in innate immune functions of neutrophils and macrophages. *Blood* 113:1326-1331
- Fialkow L, Fochesatto Filho L, Bozetti MC, Milani AR, Rodrigues Filho EM, Ladniuk MR, Pierozan P, De Moura RM, Prolla JC, Vachon E, Downey GP (2006): Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* 10: R155
- Fournier B, Philpott DJ (2005): Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* 18: 521-540
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A (2007): Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176: 231-241
- Fülöp T Jr, Fouquet C, Allaire P, Perrin N, Lacombe G, Stankova J, Rola-Pleszczynski M, Gagne D, Wagner JR, Khalil A, Dupuis G (1997): Changes in apoptosis of human polymorphonuclear granulocytes with aging. *Mech Ageing Dev* 96: 15 – 34
- Gabriel SE, Brigman KN, Koller BH, Boucher RC, Stutts MJ (1994). Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science* 266: 107-109
- Gaut JP, Yeh GK, Tran HD, Byun JP, Henderson J, Richter GM, Brennan M-L, Luscis AJ (2001): Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *PNAS* 98: 11961-11966
- Gerber CE, Kuci S, Zipfel M, Niethammer D, Bruchelt G (1996): Phagocytic activity and oxidative burst of granulocytes in persons with MPO deficiency. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 34: 901-908
- Giamarellos-Bourboulis, EJ, Plachouras D, Tzivra A, Kousoulas V, Bolanos N, Raftogiannis M, Galani I, Dontas I, Dionyssiou Asteriou A, Giamarellou H (2004): Stimulation of innate immunity by susceptible and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an in vitro and in vivo study. *Clin Exp Immunol* 135: 240-246
- Gibson LE, Cooke RE (1959). A test for concentrations of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancrea utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 23: 545-5

- Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM (1997): Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88: 553-560
- Grassmé H, Gulbins E, Brenner B, Ferlinz K, Sandhoff K, Harzer K, Lang F, Meyer TF (1997): Acidic sphingomyelinase mediates entry of *N. gonorrhoeae* into nonphagocytic cells. *Cell* 91: 605-615
- Grassmé H, Kirschneck S, Riethmüller J, Riehle A, von Kürthy G, Lang F, Weller M, Gulbins E (2000): Host defense to *Pseudomonas aeruginosa* requires CD95/CD95 ligand interaction on epithelial cells. *Science* 290: 527-530
- Grassmé H, Jekle A, Riehle A, Schwarz H, Berger J, Sandhoff K, Kolesnick R, Gulbins E (2001): CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 276: 23954-23961
- Grassmé H, Jendrossek V, Riehle A, von Kürthy G, Berger J, Schwarz H, Weller M, Kolesnick R, Gulbins E (2003): Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med* 9: 322-330
- Grassmé H, Becker KA, Zhang Y, Gulbins E (2008): Ceramide in bacterial infections and cystic fibrosis. *Biol. Chem.* 389: 1371-1379
- Grossl NA, Candel AG, Shrit A, Schumacher HR (1993): Myeloperoxidase deficiency and severe sepsis. *Southern medical Journal* 86: 832-836
- Guilbault C, De Sanctis JB, Wojewodka G, Saeed Z, Lahance C, Skinner TA, Vilela RM, Kubow S, Lands LC, Hajduch M, Matouk E, Radzioch D (2008): Fenretinide corrects newly found ceramide deficiency in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38:47-56
- Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S (2005): Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol* 66: 1146-1154
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC (1998): Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92: 3007-3017
- Hauck CR, Grassmé H, Bock J, Jendrossek V, Ferlinz K, Meyer TF, Gulbins E (2000): Acid sphingomyelinase is involved in CEACAM receptor-mediated phagocytosis of *N. gonorrhoeae*. *FEBS-Letters* 478: 260-266
- Herman S, Zurgil N, Deutsch M (2005): Low dose methotrexate induces apoptosis with reactive oxygen species involvement in T lymphocytic cell lines to a greater extent than in monocytic lines. *Inflamm Res* 54: 273-280
- Hirche TO, Gaut JP, Heinecke JW, Belaouaj A (2005): Myeloperoxidase plays critical roles in killing *Klebsiella pneumoniae* and inactivating neutrophil elastase; effects on host defense. *J Immunol* 174: 1557-1565
- Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degtarev A, Xavier RJ, Yuan J (2008): Identification of a molecular signalling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 135: 1311-1323
- Hurwitz R, Ferlinz K, Sandhoff K (1994): The tricyclic antidepressant desipramine causes proteolytic degradation of lysosomal sphingomyelinase in human fibroblasts. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375: 447-450

- Inoue H, Massion PP, Ueki IF, Grattan KM, Hara M, Dohrmann AF, Chan B, Lausier JA, Golden JA, Nadel JA (1994): Pseudomonas stimulates interleukin-8 mRNA expression selectively in airway epithelium, in gland ducts, and in recruited neutrophils. *Am J Resp Cell Mol Biol* 11: 651-663
- Jendrossek V, Fillon S, Belka C, Müller I, Puttkammer B, Lang F (2003): Apoptotic response of Chang cells to infection with Pseudomonas aeruginosa strains PAK and PAO-I: molecular ordering of the apoptosis signalling cascade and role of type IV pili. *Infect Immun* 71: 2665-2673
- Jendrossek V, Grassmé H, Müller I, Lang F, Gulbins E (2001): P aeruginosa induced apoptosis involves mitochondria and stress activated protein kinases. *Infect Immun* 69: 2675-2683
- Kalinski T, Jentsch-Ullrich K, Fill S, König B, Costa A-D, Roessner A (2007). Lethal candida sepsis associated with myeloperoxidase deficiency and pre-eclampsia. *APMIS* 115: 875-880
- Kempe DS, Akel A, Lang PA, Hermle T, Biswas R, Muresanu J, Friedrich B, Dreischer P, Wolz C, Schumacher U, Peschel A, Götz F, Döring G, Wieder T, Gulbins E, Lang F (2007): Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol Med* 85: 273-281
- Kharazmi A, Rechnitzer C, Shiotz PO, Jensen T, Baek L, Hoiby N (1987): Priming of neutrophils for enhanced oxidative burst by sputum from cystic fibrosis patients with Pseudomonas aeruginosa infection. *Eur J Clin Invest* 17: 256-261
- Klotz, KN, Jesaitis, AJ (1994): Neutrophil chemoattractant receptors and the membrane skeleton. *Bioessays* 16:193-198
- Koller DY, Urbanek R, Götz M (1995): Increases degranulation of eosinophil and neutrophil granulocytes in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 152:629-633
- Kowalski MP, Pier GB (2004): Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for Pseudomonas aeruginosa-induced cellular activation. *J Immunol* 172: 418-425
- Kraus D, Herbert S, Kristian SA, Khosravi A, Nizet V, Götz F, Peschel A (2008): The GraRS regulatory system controls Staphylococcus aureus susceptibility to antimicrobial host defenses. *BMC Microbiol* 8:85
- Lehrer RI, Hanifin J, Cline MJ (1969): Defective bacterial activity in myeloperoxidase-deficient human neutrophils. *Nature* 223: 78-79
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G (2003): 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. *Intensive Care Med* 29:530-538
- Lewis SM, Treacher DF, Bergmeier C, Brain SD, Chambers DJ, Pearson JD, Brown KA (2009): Plasma from patients with sepsis up-regulates the expression of CD49d and CD64 on blood neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40: 724-732
- Liles WC, Thomsen AR, O'Mahony DS, Klebanoff SJ (2001): Stimulation of human neutrophils and monocytes by staphylococcal phenol-soluble modulín. *J Leuko Biol* 70: 96-102
- Liptay S, Fulda S, Schanbacher M, Bourtelee S, Ferri KF, Kroemer G, Adler G, Debatin KM, Schmid RM (2002): Molecular mechanisms of sulfasalazine-induced T-cell-apoptosis. *Br J Pharmacol* 137: 608-620
- Liu H, Lazarus SC, Caughey GH, Fahy JV (1999): Neutrophil elastase and elastase-rich cystic fibrosis sputum degranulate human eosinophils in vitro. *Am J Physiol* 276: L28-34

Löffler G, Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, Springer, 6. Auflage, 2005

Maekawa K, Futami S, Nishida M, Terada T, Inagawa H, Suzuki S, Ono K (1998): Effects of trauma and sepsis on soluble L-selectin and cell surface expression of L-selectin and CD11b. *J Trauma* 44: 460-468

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M (2003): The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348: 1546-1554

Martins PS, Kolles EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salmonao R (2003): Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock* 20: 208-212

Martins PS; Brunialti MKC, Martos LSW, Machado FR, Assuncao MS; Blecher S, Salomao R (2008): Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. *Crit Care* 12: R25

Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM, Root RK (1986): Laboratory manual of neutrophil function. Raven Press. New York

Moss M (2005): Epidemiology of sepsis: race, sex, and chronic alcohol abuse. *Clin Infect Dis.* 41: S490-497

Müller-Peddinghaus R (1984): In vitro determination of phagocyte activity by luminol- and lucigenin-amplified chemiluminescence. *Int J Immunopharmac* 6: 455-466

Nakae H, Endo S, Inada K, Takakuwa T, Kassai T (1996): Changes in adhesion molecule levels in sepsis. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 91: 329-338

Nauseef WM (1988): Myeloperoxidase deficiency. *Hematol Oncol Clin N Am* 2: 135-158

Oceandy D, McMorran B, Smith SN, Schreiber R, Kunzelmann K, Alton EFWF, Hume DA, Wainwright BJ (2002): Gene complementation of airway epithelium in the cystic fibrosis mouse is necessary and sufficient to correct the pathogen clearance and inflammatory abnormalities. *Human Mol Genetics* 11: 1059-1067

Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG (2006): Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol* 177: 1967-74

Ottonello L, Frumento G, Arduino N, Dapino P, Tortolina G, Dallegri F (2001): Immune complex stimulation of neutrophil apoptosis: investigating the involvement of oxidative and nonoxidative pathways. *Free Radic Biol Med* 30: 161-169

Petit-Bertron AF, Tabary O, Corvol H, Jaquot J, Clément A, Cavaillon JM, Adib-Conquy M (2008): Circulating and airway neutrophils in cystic fibrosis display different TLR expression and responsiveness to interleukin-10. *Cytokine* 41: 54-60

Pier GB, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn SS, Banting G, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH (1998). *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 393:79-82

Rada BK, Geiszt M, Káldi K, Timár C, Ligeti E (2004): Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing. *Blood* 104: 2947-2952

- Ratjen, Felix (Hrsg.): Aktuelle Aspekte zu Diagnostik und Therapie der Mukoviszidose, Uni-Med Science, 1. Auflage 2004
- Rautenberg M, Joo H-S, Otto M, Peschel A (2010): Neutrophil responses to staphylococcal pathogens and commensals via the formyl peptide receptor 2 relates to phenol-soluble modulins release and virulence. *FASEB J*, published online December 23, 2010.
- Raza K, Scheel-Toellner D, Lee C-Y, Pilling D, Curnow SJ, Falciani F, Trevino V, Kumar K, Assi LK, Lord JM, Gordon C, Buckley CD, Salmon M (2006): Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 8: R120
- Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW (2002): Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by k+ influx. *Nature* 416: 291-297
- Remick DG (2007): Biological Perspectives: Pathophysiology of Sepsis. *Am J Pathol* 170: 1435-1444
- Riethmüller J, Anthonysami J, Serra E, Schwab M, Döring G, Gulbins E (2009): Therapeutic efficacy and safety of amitriptyline in patients with cystic fibrosis. *Cell Physiol Biochem* 24: 65 - 72
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J-L, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui L-C (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073
- Roos D, Winterbourn CC (2002): Lethal weapons. *Science* 296: 669-671
- Ross GD, Vetvicka V (1993): CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clin Exp Immunol* 92: 181-184
- Rüggeberg A, Deja M, Kaisers U, Steinmüller T, Keske U, Falke TK (2002): Multiorganversagen bei septischer Granulomatose. *Anaesthesist* 51: 731-734
- Russwurm S, Vickers J, Meier-Hellmann A, Spangenberg P, Bredle D, Reinhart K, Losche W (2002): Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock* 17: 263-268
- Saba S, Soong G, Greenberg S, Prince A. (2002): Bacterial stimulation of epithelial G-CSF and GM-CSF expression promotes PMN survival in CF airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27: 561-7
- Sant` Agnese PA die, Darling RC, Perera A, Shea E (1953). Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatrics* 12: 549-563
- Sato T, Machida T, Takahashi S, Iyama S, Sato Y, Kuribayashi K, Takada K, Oku T, Kawano Y, Okamoto T, Takimoto R, Matsunaga T, Takayama T, Takahashi M, Kato J, Niitsu Y (2004): Fas-mediated apoptosome formation is dependent on reactive oxygen species derived from mitochondrial permeability transition in Jurkat cells. *J Immunol* 173: 285-296.
- Scheel-Toellner D, Wang K, Assi LK, Webb PR, Craddock RM, Salmon M, Lord JM (2004 a): Clustering of death receptors in lipid rafts initiates neutrophil spontaneous apoptosis. *Biochem Soc Trans* 32: 679-681
- Scheel-Toellner, D, Wang K, Craddock R, Webb PR, McGettrick HM, Assi LK, Parkes N, Clough LE, Gulbins E, Salmon M, Lord JM (2004 b): Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signalling. *Blood* 104: 2557-2564

- Schultz MJ, Rijnevald AW, Florquin S, Edwards CK, Dinarello CA, van der Poll T (2002): Role of interleukin-1 in the pulmonary immune response during *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L285-290
- Segal AW (2005): How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23: 197-223
- Seumois G, Fillet M, Faccineto C, Desmet C, Francois C, Dewals B, Oury C, Vanderplassen A, Lekeux P, Bureau F (2007): De novo C16- and C24-ceramide generation contributes to spontaneous neutrophil apoptosis. *J Leukoc Biol* 1: 1477-1486
- Sheppard, DN, Welsh MJ (1999): Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 79: S23-S45
- Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ (1996). Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85: 229-236
- Solomkin JS, Bass HS, Björnson HS, Tindal CJ, Babcock GF (1994): Alterations of neutrophil responses to tumor necrosis factor alpha and interleukin 8 following human endotoxemia. *Infect Immun* 62: 943-947
- Son JH, Yoo HH, Kim DH (2007): Activation of de novo synthetic pathway of ceramides is responsible for the initiation of hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL-60 cells. *J Toxicol Environ Health A* 70: 1310-1318
- Stern M, Sens B, Widemann B, Bisse O, Wenzlaff P (eds) (2002). *Qualitätssicherung Mukoviszidose-Überblick über den Gesundheitszustand der Patienten in Deutschland 2002*. Zentrum für Qualitätsmanagement im Gesundheitswesen. Ärztekammer Hannover
- Tabary O, Escotte S, Couetil JP, Hubert D, Dusser D, Puchelle E, Jaquot J (2001): Relationship between IkappaBalpha deficiency, NFkappaB activity and interleukin-8-production in CF human airway epithelial cells. *Pflugers Arch* 443: S40-44
- Taneja R, Parodo J, Jia SH, Kapus A, Rotstein OD, Marshall JC (2004): Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity. *Crit Care Med* 32: 1460-1469
- Teichgräber V, Ulrich M, Endlich N, Riethmüller J, Wilker B, De Oliveira-Munding CC, van Heeckeren AM, Barr ML, von Kürthy G, Schmid KW, Weller M, Tümmler B, Lang F, Grassmé H, Döring G, Gulbins E (2008): Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat Med* 14: 382-391
- Tirouvanziam R, de Bentzmann S, Hubeau C, Hinnrasky J, Jaquot J, Peault B, Puchelle E (2000): Inflammation and infection in naïve human cystic fibrosis airway grafts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 121-127
- Tirouvanziam R, Gernez Y, Conrad CK, Moss RB, Schrijver I, Dunn CE, Davies ZA, Herzenberg LA (2008): Profound functional and signalling changes in viable inflammatory neutrophils homing to cystic fibrosis airways. *PNAS* 105: 4335-4339
- Tortorella C, Piazzola G, Spaccavento F, Pece S, Jirillo E, Antonaci S (1998): Spontaneous and FAS-induced apoptotic cell death in aged neutrophils. *J Clin Immunol* 18: 321-329
- Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J (2002): Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal* 4: 405-414

- Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A (2006): Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 8: 668-676
- Usher LR, Lawson RA, Geary I, Taylor CJ, Bingle CD, Taylor GW, Whyte MK (2002): Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *J Immunol* 168: 1861-1868.
- Venkatakrishnan A, Stecenko AA, King G, Blackwell TR, Brigham KL, Christman JW, Blackwell TS (2000): Exaggerated activation of nuclear factor-kappa and altered IkappaB-beta processing in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 396-403
- Vidal F, Mensa J, Almela M, Martinez JA, Marco F, Casals C, Gatell JM, Soriano E, Jimenez de Anta MT (1996): Epidemiology and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia, with special emphasis on the influence of antibiotic treatment. Analysis of 189 episodes. *Arch Intern Med* 156: 2121-2126
- Vilela RM, Lands LC, Meehan B, Kubo S (2006): Inhibition of IL-8-release from CFTR-deficient lung epithelial cells following pre-treatment with fenretinide. *Int Immunopharmacol.* 6: 1651-1664
- Walev I, Trappe D, Gulbins E, Bhakdi S (2000): Streptolysin O-permeabilized granulocytes shed L-selectin concomitantly with ceramide generation via neutral sphingomyelinase. *J Leukoc Biol* 68: 865-872
- Watt AP, Courtney J, Moore J, Ennis M, Elborn JS (2005): Neutrophil cell death, activation and bacterial infection in cystic fibrosis. *Thorax* 60: 659-664
- Weiss M, Elsharkawi M, Welt K, Schneider EM (2003): Transient leukocytosis, granulocyte colony-stimulating factor plasma concentrations, and apoptosis determined by binding of Annexin V by peripheral leukocytes in patients with severe sepsis. *Ann NY Acad Sci* 1010: 742-747
- Weiss SJ (1989): Tissue Destruction by Neutrophils. *N Engl J Med* 320:365-376
- Wesche DE, Lomas-neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A (2005): Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol* 78: 325-337
- Zhang B, Hirahashi J, Cullere X, Mayadas TN (2003): Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis. *JBC*, 278: 28443-28454

9 Danksagung

Diese Doktorarbeit entstand an der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen in der Abteilung Hämatologie und Onkologie unter der Leitung des ärztlichen Direktors Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger, dem ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danke.

Ich danke dem Leiter des pädiatrischen Studiensekretariats, Herrn PD Dr. med. Joachim Riethmüller, für die Möglichkeit zur Promotion und für die Organisation der Studien, ebenso seinen Labormitarbeitern, allen voran Frau Sook Thies. Ebenso danke ich allen Studienassistentinnen und sonstigen Mitarbeitern des Studiensekretariats für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gernot Bruchelt für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die Bereitschaft zur Übernahme der Erstgutachterrolle. Mit seinem enormen Wissen ließ er mich an seiner Forschungserfahrung teilhaben. Mit seiner Begeisterungsfähigkeit riss er mich immer wieder mit und führte mich auch durch schwierige Phasen.

Frau Prof. Dr. med. Dorothee Wernet vom Institut für Transfusionsmedizin gilt mein herzlicher Dank für die Bereitstellung von Blutproben, ebenso ihrem Team von der Abteilung für Zellseparation.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Reimer Riessen von der Intensivstation IS3 der medizinischen Klinik für die Bereitstellung der Sepsisblutproben.

Besonders danken möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen aus dem Labor, insbesondere Frau Dr. Zyrafete Kuçi, Frau Gisela Merkel und Frau Dr. Iris Schwantzer für ihre stets positive Einstellung und ihre ermutigende Unterstützung, dem hämatologischen Routinelabor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin für die Bereitstellung des Advia 120 zur Blutbildbestimmung und die stets freundliche und hilfsbereite Art sowie den Arbeitsgruppen der Kinderklinik für die freundliche Atmosphäre und das angenehme Arbeitsklima:

10 Veröffentlichungen

Publikationen:

Adams C, Icheva V, Engler N, Anthonysamy J, Schneider D, Herrmann G, Lauer J, Deppisch C, Wirth A, Döring G, Gulbins E, Riethmüller J.

Anti-inflammatory pulmonal therapy of CF-patients with Amitriptyline and Placebo - proof of action and biomarkers in two placebo-controlled phase II studies. Manuskript in Vorbereitung

Zieker D, Engler N, Markovic S, Dietzsch J, Zieker J, Hauth M, Riessen R, Northoff H, Gulbins E, Riethmüller J. Gene expression profiling as a marker of disease severity in sepsis. Manuskript in Vorbereitung

Engler N, Riethmüller J, Handgretinger R, Bruchelt G, Gerber C.

Strong reduction of sodium vitamin C transporter 1 (SVCT1)-expression in myeloid cell lines after differentiation with PMA. Manuskript in Vorbereitung

Besuchte Kongresse:

10. Workshop: Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung, Xanten, Dezember 2003

Vortrag: Differenzierung von normalen, Myeloperoxidase- oder NADPH - Oxidase-defizienten Zelllinien

4th small animal imaging workshop, Tübingen, Januar 2009

47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin, Leipzig, April 2009