

Aus der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Unertl

**Phagozytose und Rezeptorexpression von Monozyten
unter dem Einfluss künstlicher Kolloide und LPS in vitro**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

DAGMAR BARBARA ABERLE
aus Tübingen

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Unertl
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. U. Bissinger

„Blut ist ein ganz besonderer Saft.“ (J.W.v.Goethe)

Das Blut, der Saft unseres Lebens, zog seit jeher die Faszination der Menschen auf sich und ist heute Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Forschung. Eine Wechselwirkung zwischen künstlichen Substanzen und Bestandteilen des menschlichen Blutes wurde in der folgenden Arbeit untersucht.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	
1.1 Das Immunsystem – eine Einführung	6
1.2 Monozyten	6
1.2.1 Entwicklung und Differenzierung von Monozyten	6
1.2.2 Zellmorphologie	7
1.2.3 Oberflächenrezeptoren	8
1.2.3.1 CD11a	8
1.2.3.2 CD16	9
1.2.3.3 CD71	10
1.2.4 Funktion und Fähigkeiten der Monozyten im Rahmen der Immunantwort	11
1.3 LPS	12
1.4 Künstliche Kolloide	12
1.4.1 Wirkungsprinzip, Entwicklung und Einsatz	12
1.4.1.1 Dextran	13
1.4.1.2 Hydroxyethylstärke	14
1.4.1.3 Gelatine	15
1.4.2 Bisherige Erkenntnisse über den Einfluss künstlicher Kolloide auf Monozyten	16
1.5 Fragestellung	17
2. Material und Methoden	
2.1 Materialien	19
2.1.1 Geräte, Laborbedarf und Lösungen	19
2.1.2 Selbst hergestellte Medien und Puffer	20
2.1.3 Medien, Lösungen und Zusätze für die Bestimmung der Phagozytose und Rezeptorexpression	20
2.1.3.1 Kolloidlösungen	20
2.1.3.2 Lipopolysaccharid (LPS)	20

2.1.3.3 Latex Beads	21
2.1.4 Materialien zur Fluoreszenzmikroskopie	21
2.1.5 Gewinnung der Blutproben	21
2.1.5.1 Buffy Coat	21
2.1.5.2 Vollblut	21
2.2 Methoden	
2.2.1 Experiment I und III - Isolierung und Aufbereitung der Monozyten aus dem Buffy Coat	22
2.2.1.1 Dichtegradientenzentrifugation	22
2.2.1.2 Reinigungsschritte	23
2.2.1.3 Zellzahlermittlung	23
2.2.1.4 Zellkultur	23
2.2.1.5 Lösung der Monozyten	24
2.2.1.6 Aufbereitung der Proben für die Durchflusszytometrie	25
2.2.2 Experiment II - Vollblutinkubation und Aufbereitung der Leukozyten	25
2.2.3 Durchflusszytometrie	26
2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie	26
2.2.5 Statistische Auswertung	28
3. Ergebnisse	
3.1 Methodische Vorversuche	30
3.1.1 LPS-Konzentration	30
3.1.2 Inkubationszeit	31
3.2 Durchgeführte Untersuchungen	33
3.2.1 Experiment I – Phagozytose isolierter Monozyten unter dem Einfluss künstlicher Kolloide und LPS	34
3.2.1.1 Phagozytose isolierter Monozyten unter dem Einfluss von Hydroxyethylstärke und LPS	34

3.2.1.2 Phagozytose isolierter Monozyten unter dem Einfluss von Gelatine und LPS	35
3.2.1.3 Phagozytose isolierter Monozyten unter dem Einfluss von Dextran und LPS	36
3.2.2 Experiment II – Phagozytose der Monozyten im Vollblut unter dem Einfluss künstlicher Kolloide und LPS	37
3.2.2.1 Phagozytose der Monozyten im Vollblut unter dem Einfluss von Hydroxyethylstärke und LPS	37
3.2.2.2 Phagozytose der Monozyten im Vollblut unter dem Einfluss von Gelatine und LPS	38
3.2.2.3 Phagozytose der Monozyten im Vollblut unter dem Einfluss von Dextran und LPS	39
3.2.3 Experiment III – Rezeptorexpression isolierter Monozyten unter dem Einfluss künstlicher Kolloide und LPS	40
3.2.3.1 CD11a Expression isolierter Monozyten unter dem Einfluss künstlicher Kolloide und LPS	40
3.2.3.2 CD16 Expression isolierter Monozyten unter dem Einfluss künstlicher Kolloide und LPS	41
3.2.3.3 CD71 Expression isolierter Monozyten unter dem Einfluss künstlicher Kolloide und LPS	42
4. Diskussion	
4.1 Einführung	43
4.2 Diskussion der einzelnen Ergebnisse	43
4.2.1 Einfluss von künstlichen Kolloiden auf die Phagozytose isolierter Monozyten in Abhängigkeit von Art und Konzentration des Kolloids in vitro	43
4.2.2 Einfluss von LPS auf die Phagozytose isolierter Monozyten in vitro	44

4.2.3 Einfluss von künstlichen Kolloiden auf die Phagozytose isolierter Monozyten in Anwesenheit von LPS in vitro	45
4.2.4 Einfluss von künstlichen Kolloiden auf die Phagozytose der Monozyten im Vollblut in Abhängigkeit von Art und Konzentration des Kolloids in vitro	46
4.2.5 Einfluss von LPS auf die Phagozytose der Monozyten im Vollblut in vitro	47
4.2.6 Einfluss von künstlichen Kolloiden auf die Phagozytose der Monozyten im Vollblut in Anwesenheit von LPS in vitro	47
4.2.7 Einfluss von künstlichen Kolloiden und LPS auf die Expression von CD11a auf isolierten Monozyten in Abhängigkeit von Art und Konzentration des Kolloids in vitro	48
4.2.8 Einfluss von künstlichen Kolloiden und LPS auf die Expression von CD16 auf isolierten Monozyten in Abhängigkeit von Art und Konzentration des Kolloids in vitro	49
4.2.9 Einfluss von künstlichen Kolloiden und LPS auf die Expression von CD71 auf isolierten Monozyten in Abhängigkeit von Art und Konzentration des Kolloids in vitro	49
5. Zusammenfassung	51
6. Literaturverzeichnis	53
7. Anhang	68
Danksagungen	
Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

CD	Cluster of differentiation
CFU-GM	Colony-forming-unit-Granulocyte-Macrophage
FIM	Factor inducing monocytopoiesis
CFU-GEMM	Colony-forming-unit-Granulocyte-Erythrocyte-Macrophage-Megacaryocyte
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-colony-stimulating-factor
HES	Hydroxyethylstärke
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule-1
IL3	Interleukin 3
LBP	Lipopolysaccharidbindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MPS	Mononukleär-Phagozytäres System
PE	Phycoerythrin
TNF-α	Tumor necrosis factor- α

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem – eine Einführung

Historisch wurde die Aufgabe des Immunsystems als Schutz gegen Infektionen und im Speziellen als Abwehr gegenüber einem breiten Spektrum mikrobieller Erreger definiert: Bakterien, Viren, Pilze, ein- und mehrzellige Parasiten. Heute wird zu dieser Aufgabe auch die gerichtete Abwehr gegenüber nichtinfektösen, körperfremden Makromolekülen, z.B. Pharmaka gezählt.

Gesunde Individuen schützen sich gegenüber fremden Einflüssen durch unterschiedliche, doch miteinander kooperierende zelluläre und humorale Abwehrmechanismen. In ihrer Gesamtheit bilden sie die beiden sich funktionell ergänzenden Systeme der unspezifischen (natürlichen) und der spezifischen (erworbenen) Immunität.

Das spezifische Immunsystem besteht aus Lymphozyten und den von ihnen gebildeten Antikörpern und Zytokinen. Zum unspezifischen Immunsystem zählen neben Monozyten und Makrophagen und den von ihnen sezernierten Zytokinen auch die natürlichen Killerzellen der T-Lymphozyten, Granulozyten, Akutphase-Proteine und das Komplementsystem (48).

Die wichtige Bedeutung und Funktion von Monozyten im Rahmen der Immunantwort wird unter 1.2.4 näher erläutert.

1.2 Monozyten

1.2.1 Entwicklung und Differenzierung von Monozyten

Bereits um die 6. Schwangerschaftswoche beginnt bei einem menschlichen Embryo die Myelopoese in der Leber, die später beim Erwachsenen im Knochenmark stattfindet. Aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle entwickelt sich als erste Vorläuferzelle der Monozyten eine „colony-forming-unit“, CFU-GEMM. Aus ihr entstehen Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten. Unter dem Einfluss von IL3 und GM-CSF entwickelt sich die erste Vorläuferzelle zu einer weiteren, der CFU-GM, die bereits differenzierter ist und sich lediglich zu Monozyten oder neutrophilen Granulozyten entwickeln kann. Durch den Einfluss weiterer Zytokine (M-CSF) entsteht der Promonozyt, der zu einem reifen Blutmonozyten ausdifferenziert und nach weniger als 24 h das Knochenmark verlässt (59). Die gesamte Phase der Differenzierung umfasst 1-3 Tage (20, 33, 34).

Monozyten bilden im Gefäßsystem einen zirkulierenden Pool, der 5-10% der Leukozyten ausmacht. Dabei sind Monozyten noch in der Lage, DNA zu synthetisieren, wenn auch in geringerem Maße als Promonozyten im Knochenmark. Zur Zellteilung sind sie nicht mehr befähigt (20). Nach ca. drei Tagen wandern sie durch die Gefäßwände in die verschiedenen Organe und Gewebesysteme ein. Unter physiologischen Bedingungen sind es etwa $16,6 \cdot 10^6$ Monozyten in der Stunde (114). Dabei handelt es sich nicht um eine Selektion der jeweils ältesten Zellen, sondern um ein randomisiertes Verfahren, sodass die Verweildauer von Monozyten im Blut zwischen 24 Stunden und 5 Tagen betragen kann (126). Im Gewebe reifen Monozyten innerhalb eines Tages ohne weitere Zellteilung zu ausdifferenzierten, langlebigen (60-120 d) Makrophagen (66).

Gewebsständige Makrophagen finden sich in fast allen Geweben des Körpers, so in Haut (Histiozyten), Lunge (Alveolarmakrophagen), Knochen (Osteoklasten), Leber (Kupffer'sche Sternzellen), Milz (Rote-Pulpa-Makrophagen), Niere (mesangiale Zellen), Gehirn (Mikroglia) und Gelenken (Synovial-A-Zellen). Hinzu kommen freie Makrophagen, wie sie im Lymphsystem, intraperitoneal oder intrapleural vorkommen, und durch Entzündungsreize aktivierte Makrophagen, die dann z.B. als Epitheloidzellen bezeichnet werden. Dieser „Gordische Knoten“ (33) der Namensvielfalt stammt aus einer Zeit, als die Zugehörigkeit der unterschiedlichen Zellen zu einer Abstammungsreihe noch nicht genau erforscht war. Heute benutzen wir als Oberbegriff für die gesamte monozytäre Entwicklungsreihe einschließlich aller aus ihr entstandenen Makrophagen den Begriff des „Mononukleär-Phagozytären Systems“ (MPS) (20, 33).

Besteht innerhalb des MPS ein erhöhter Bedarf an Zellen, z.B. im Rahmen einer akuten oder chronischen Entzündung, so wird der Zellzyklus der Promonozyten beschleunigt, die Verweildauer der Monozyten im Blut verkürzt und die Myelopoese insgesamt bis auf das Doppelte gesteigert. Neben einer erhöhten Konzentration von CSF und IL3 konnte ein weiterer humoraler Faktor, **FIM**, bestimmt werden, der für die gesteigerte (increasing) Myelopoese verantwortlich ist (116, 117).

1.2.2 Zellmorphologie

Ein Blutmonozyt ist 10-18 μm groß und hat ein Zellvolumen von $421 \pm 24 \text{ fl}$ (76). Er besitzt einen großen, meist hufeisenförmigen Nukleus. Charakteristisch sind der gut ausgebildete Golgi-Apparat und eine grosse Anzahl von Mitochondrien und Lysosomen. Die Lysosomen enthalten Peroxidase und mehrere Säurehydrolasen zur intrazellulären Abtötung von Mikroorganismen (24, 67).

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines peripheren Blutmonozyten (Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Boston)

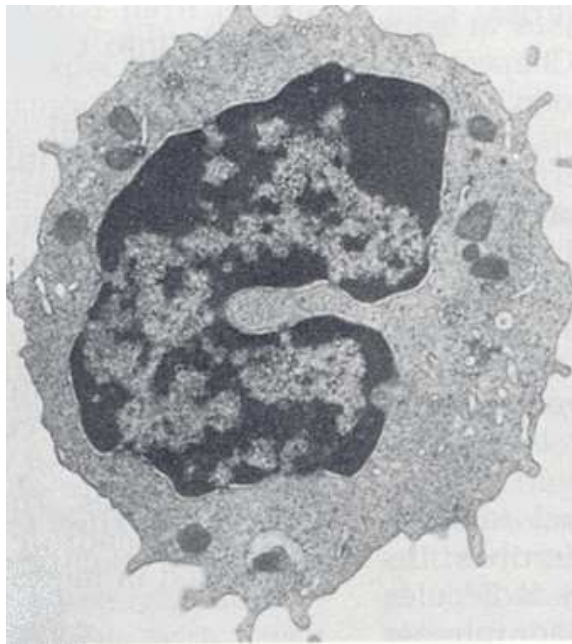


Bild 1

1.2.3 Oberflächenrezeptoren

Mit Hilfe von Oberflächenstrukturen können Monozyten mit Endothelzellen und benachbarten Zellen im Blut in engen Kontakt gelangen, mit Komplement bzw. mit Antikörpern beladene Mikroorganismen binden, aufnehmen, abbauen und verarbeitetes Antigen den Zellen des spezifischen Immunapparates präsentieren (s. 1.2.4). Die Expression der Rezeptoren kann in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad und vom Funktionszustand innerhalb eines weiten Bereichs moduliert werden (2, 54, 129, 134).

1.2.3.1 CD11a

Der Oberflächenrezeptor CD11a gehört zu der größten Gruppe von Adhäsionsmolekülen, den Integrinen. Zusammen mit CD 18 bildet er das β_2 -Integrin LFA-1, ein heterodimeres Membranglycoprotein (4). LFA (Leukocyte Function-Associated Antigens) vermitteln eine antigenunabhängige Bindung an Rezeptoren. Als Ligand für LFA-1 dient ICAM-1, ein Adhäsionsmolekül aus der Familie der Immunglobuline.

Die Aufgabe von LFA-1 im Rahmen der Immunantwort besteht vor allem in der Vermittlung von Interaktionen zwischen Leukozyten und deren Adhäsion an Endothelzellen (13, 100, 122). Auch ein Einfluss auf Lymphozyten ist bekannt. CD11a-vermittelt wird die Zytotoxizität von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen gesteigert, sowie die Proliferationsrate von T-Lymphozyten und die Ig-Produktion von B-Lymphozyten erhöht (71).

Der Ligand ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) wird vor allem auf Endothelzellen exprimiert, findet sich aber auch in gelöster Form als sICAM-1 im Blut als ein zuverlässiger Indikator für die Existenz entzündlicher Prozesse.

Dem Adhäsionsmolekül LFA-1 (CD11a/CD18) kommt also im Rahmen der unspezifischen, sowie der spezifischen Immunantwort eine Schlüsselrolle zu, die es für eine Reihe von Infektionskrankheiten, viralen und bakteriellen Ursprungs, sowie das Fortschreiten von Autoimmunerkrankungen und die Abstoßung von Transplantaten mitverantwortlich macht (52, 56, 62, 81, 99, 132).

1.2.3.2 CD16

CD16 ist einer von drei bekannten Rezeptoren für die Fc Einheit von Immunglobulin G (Fc γ R) und gehört als Adhäsionsmolekül zu der Immunglobulin-Gensuperfamilie. Er besitzt eine niedrige Affinität und kommt in gleicher Form neben Monozyten auch auf natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen vor. Eine andere Unterart findet sich auf neutrophilen Granulozyten. Die Existenz des CD16 Rezeptors auf Monozyten war bis vor kurzem noch nicht bekannt (6, 21). Heute kennt man eine Subpopulation an Monozyten, die ca. 10% der gesamten Monozyten ausmacht und den CD16 Rezeptor (Fc γ RIII) exprimiert (5, 35, 135). Bekannt ist eine Erhöhung der Rezeptorzahl sowohl auf der einzelnen Zelle als auch anteilig an der Gesamtpopulation im Rahmen des Reifungsprozesses der Monozyten zu Makrophagen in vitro sowie im Organismus (93). Die Stimulation zu einer vermehrten Expression von CD 16 geht von Cytokinen aus, wie TGF- β (transforming growth factor β) (128), M-CSF (s.1.2.1) (95) und IL-10 (Interleukin-10), einem antiinflammatorischen Cytokin. Daraus wird deutlich, dass Fc γ RIII nicht nur eine Rolle im Reifungsprozess der Monozyten, sondern auch in ihrer Funktion als Immunzellen spielt (88).

Über Fc γ RIII können Monozyten Immunkomplexe und mit IgG opsonierte Partikel aus dem Blut filtern und phagozytieren: CD16 stimuliert die Polymerisation von Aktin und induziert so die Bildung von Phagosomen (s.1.2.4) (1). Daraufhin erhöht sich die Zytotoxizität der Zelle, deren Induktion im Einzelnen noch nicht genau untersucht ist (41). Bekannt ist eine Veränderung an der Zelloberfläche, wo vermehrt Antigene und Adhäsionsmoleküle exprimiert werden, gleichzeitig kommt es zu einer reduzierten Ausschüttung von IL-10 und einer Stimulation von T-Lymphozyten (93).

Unumstritten ist eine Beteiligung von Fc γ RIII bei der Entstehung inflammatorischer Prozesse im Rahmen entzündlicher und tumoröser Erkrankungen (39). In den Mittelpunkt der Forschung rückte CD16 vor allem wegen seiner nachgewiesenen Beteiligung am Ausbruch

von Erkrankungen wie HIV (49), Tuberkulose, Asthma, rheumatischen Erkrankungen (53), Sarkoidose, Myelomen oder Lymphomen (124).

1.2.3.3 CD 71

CD 71 ist ein transmembraner Rezeptor der Oberfläche verschiedener Zellen, der als Ligand Transferrin bindet und damit für den Eisenstoffwechsel essenziell ist. Er wird außer auf Monozyten noch von einer Reihe anderer Zellen exprimiert, die entweder an der Hämoglobinsynthese beteiligt sind (Erythrozyten) oder einer raschen Teilung unterliegen (intestinale Zellen), da für diese Abläufe besonders viel Eisen benötigt wird (123). Zellen, die am Eisentransport beteiligt sind (z.B. Plazentagewebe) exprimieren CD71 ebenso wie einige Bakterien (87).

Bei physiologischem pH im Blut werden zwei Fe^{3+} Moleküle mit hoher Affinität an Transferrin gekoppelt. Nach der Bindung von Transferrin an CD71 wird der gesamte Komplex internalisiert und als Endosom in das Zellinnere transportiert: Durch Protoneneinstrom wird der pH im Endosomeninneren reduziert und die Bindung von Fe^{3+} an Transferrin gelöst. Das Eisen verbleibt im Zellinneren, wo es für Transkriptionsprozesse direkt verwendet oder gebunden an Ferritin gelagert wird. Der Apotransferrin-CD71-Komplex wandert zurück an die Zelloberfläche, wo Apotransferrin ins Blut freigesetzt wird und die Moleküle für weitere Bindungen zur Verfügung stehen (87). Der gesamte Zyklus eines CD71 Rezeptors läuft in wenigen (3–16) Minuten ab (123).

Die Zahl der Rezeptoren an der Zelloberfläche wird durch die Menge des zur Verfügung stehenden Eisens und den Bedarf der Zelle reguliert (23). Bei niedrigen Eisenserumkonzentrationen, während der Zellproliferation oder bei erhöhtem Gesamteisenbedarf (Schwangerschaft) wird CD71 vermehrt exprimiert (15). Monozyten erhöhen ihre Rezeptorzahl in ihrer Funktion als Eisenspeicher auch bei einem Überangebot an Eisen (83, 107).

Im Rahmen einer bakteriellen Infektion agieren Monozyten als Konkurrenten der Bakterienzellen, indem sie ihnen das zur Proliferation notwendige Eisen streitig machen. Durch eine erhöhte Zahl an CD71 Rezeptoren reduzieren Monozyten das Eisenangebot im Blut und verhindern somit ein schnelles Fortschreiten der Infektion (90). Da der Gesamtorganismus auf dieselbe Weise reagiert, indem er die Eisenresorption im Darm reduziert (Infektanämie), kommt es während eines späteren Stadiums der Infektion auch auf Monozyten zu einer relativ niedrigeren Rezeptorzahl (133).

CD71 dient auch Tumorzellen zur Eisenresorption. Da diese sich schnell teilenden Zellen über eine hohe Anzahl an CD71 Rezeptoren verfügen, wurde in den letzten Jahren nach Therapieansätze via CD71 geforscht (19). Sowohl Chemotherapeutika als auch modifizierte DNA können über den Transferrinrezeptor in die Zelle geschleust werden (14, 25). Hierin liegt möglicherweise ein hohes Potenzial für die Tumortherapie der Zukunft (87).

1.2.4 Funktion und Fähigkeiten der Monozyten im Rahmen der Immunantwort

Monozyten haben die Möglichkeit, sich über die Blutbahn im Körper zu verteilen und im Fall eines inflammatorischen Prozesses, gerichtet auf den Ort der Entzündung zuzuwandern: Die von der Infektion betroffenen Zellen senden Botenstoffe aus, sie sezernieren Chemokine, die Monozyten zu einer Chemotaxis an den Entzündungsherd stimulieren (113). Monozyten adhären über Integrine an Endothelzellen und können gegebenenfalls in das Gewebe einwandern (9). Gelangen Monozyten in Antigenkontakt, so werden mehrere Immunprozesse gleichzeitig eingeleitet. Durch die Chemokine sowie den Antigenkontakt induziert, sezernieren Monozyten selbst Chemokine und Cytokine, wie $\text{TNF-}\alpha$, IL-8, IL-10. Diese lösen wiederum Immunreaktionen aus und beziehen andere Zellen in den Abwehrprozess mit ein (36). Sie stimulieren aber auch die zelleigene Rezeptorexpression, wie z.B. die von CD16 und erhöhen dadurch ihre Fähigkeit zur Phagozytose.

Oponierte Partikel oder nicht opsonierte Partikel mit einer Größe von mindestens $0,5 \mu\text{m}$ werden von Monozyten an spezifische Rezeptoren gebunden und phagozytiert (119). Oponierung bedeutet die Bindung von Antikörpern oder Serumproteinen (Komplementfaktoren) an die Oberfläche von Antigenen, wodurch deren Abbau via Lyse oder Phagozytose für den Organismus erleichtert wird. Während Antikörper nur an spezifische Strukturen binden, heften sich Komplementfaktoren an unterschiedliche Oberflächen und können auch mit Antikörpern beladene Partikel über die Ig-Struktur des Antikörpers weiter opsonieren. Dadurch wird eine Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche und die Aufnahme durch Phagozytose ermöglicht. Zu Beginn des Phagozytoseprozesses umschließt die Zelle den zu phagozytierenden Partikel mit Pseudopodien. Hierfür wird das Zytoskelett der Monozyten über aktivierte Aktinfilamente verändert. Teile der Plasmamembran, die als Phagosom mit in das Zellinnere geschleust werden, müssen ständig ersetzt werden (26) .

Wurden Partikel, z.B. Bakterien, von Monozyten einmal phagozytiert, so werden sie im Zellinneren in aller Regel abgetötet, indem das Phagosom mit einem Lysosom (s.1.2.2) verschmilzt (89). Es finden dabei u.a. sauerstoffabhängige Reaktionen (oxidative burst) statt,

die zur Entstehung aggressiver Superoxide führen (98). Toxische Substanzen werden aber nicht nur im Inneren der Zelle eingesetzt, sondern auch an das umgebende Gewebe abgegeben, sodass für die Phagozytose zu große Partikel ebenfalls angegriffen werden können (112). Eine weitere Funktion der Monozyten ist, T-Lymphozyten ein Antigen direkt zu präsentieren und dadurch eine T-Zell-Proliferation auszulösen (110).

Monozyten verändern im Rahmen der Immunantwort ihre Zellmorphologie und die Zahl an Rezeptoren an der Zelloberfläche. Dadurch sind sie in der Lage, vermehrt Antigen zu binden, zu phagozytieren und zu präsentieren (86). Sie nehmen vermehrt Eisen auf und erhöhen ihre Zytotoxizität. Als Teil des unspezifischen Immunsystems sind sie essenzieller Bestandteil der frühen Immunantwort (115).

1.3 Lipopolysaccharid (LPS)

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Glycolipid und als Endotoxin Bestandteil der Zelloberfläche fast aller gramnegativer Bakterien. Es gilt als der potenteste Stimulus einer Entzündungsreaktion und ist nicht selten Auslöser eines, häufig letal endenden, septischen Schocks (84).

Um vom Organismus wahrgenommen zu werden, ist eine Bindung von LPS an LBP (lipopolysaccharidbindendes Protein) und einen CD14 Rezeptor notwendig. CD14 kommt als membranständiger Rezeptor auf der Oberfläche von Monozyten und einigen gewebsständigen Zellen vor. In gelöster Form findet sich CD14 ebenso wie LBP physiologisch im Blut (40).

LPS/LBP führt durch die Bindung an CD14 auf Monozyten zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie TNF α , IL-1, IL-6, G/M-CSF und IL-18 (43). Durch diese Mediatoren werden eine Vielzahl an Immunprozessen eingeleitet, wie sie oben bereits beschrieben wurden.

1.4 Künstliche Kolloide

1.4.1 Wirkungsprinzip, Entwicklung und Einsatz

Der Organismus eines erwachsenen Menschen besteht zu 60% seines Körpergewichtes aus Wasser, wobei der intravasale Anteil nur 5% ausmacht. Diese Verteilung wird physiologisch über den kristalloid-osmotischen und kolloidal-osmotischen Druck aufrechterhalten: Wasserbindende anorganische Ionen (Na⁺, K⁺, Cl⁻ etc.) und wasserbindendes Albumin halten das Körperwasser im intravasalen Raum (69). Im Rahmen verschiedener pathophysiologischer Geschehen können diese volumenregulierenden Systeme zusammenbrechen. Albuminmangel, Exsikkose, Ischämie und vor allem Schock sind häufige

Gründe. Ein intra- bzw. interzelluläres Ödem mit unzureichendem intravasalem Volumen ist die Folge. Hypovolämie führt durch Abnahme der kardialen Vorlast und des Herzzeitvolumens zu einer reduzierten Gewebepfusion und Oxygenierung und damit zu Organversagen (12, 92). Künstliche Kolloide können ähnlich wie Albumin den kolloidalen Druck im Kreislauf aufrechterhalten. Gemeinsam mit kristalloiden Lösungen verabreicht sind sie zur Beseitigung des Volumendefizits essenzieller Bestandteil der Schocktherapie (32).

Die Entwicklungsgeschichte der künstlichen Kolloide ist direkt mit unserer Weltgeschichte verknüpft. In Zeiten hohen Blutverlustes war der Bedarf an Volumenersatzpräparaten besonders hoch, sodass die ersten Experimente mit Gummi arabicum und Gelatine nicht zufällig während des Ersten Weltkrieges stattfanden. Die Einführung von Dextran und modifizierten Gelatinepräparaten in den 40er Jahren (Zweiter Weltkrieg) war ebenso von der Nachfrage bestimmt, wie die Entwicklung der Hydroxyethylstärke in den frühen 70er Jahren (Vietnamkrieg) (77).

Die heute verwendeten künstlichen Kolloide, Dextran, Hydroxyethylstärke und Gelatine, sind aus der Notfall- und Intensivtherapie nicht mehr wegzudenken. Sie werden vor allem wegen ihrer Volumenwirkung eingesetzt. Aufgrund ihrer kolloidal-osmotischen Eigenschaften ist es mit diesen Präparaten möglich, Flüssigkeit nicht nur im intravasalen Raum zurückzuhalten, sondern auch Wasser aus anderen Kompartimenten für den Blutkreislauf zu rekrutieren. Diese Fähigkeit wird vor allem im akuten Notfall, z.B. bei Volumenmangelschock, ausgenutzt. Eine gleichzeitige Substitution mit kristalloiden Lösungen ist dabei unerlässlich (37).

Günstige Auswirkungen auf die Rheologie des Blutes erweiterten das Einsatzgebiet der künstlichen Kolloide auf die Anwendung bei Perfusionsstörungen. Auf unterschiedlichen Fachgebieten bestehen für zahlreiche Erkrankungen Indikationen für den Gebrauch einzelner Kolloide, so in der Ophthalmologie (105), der Otologie (68), der Angiologie (63, 72, 118), der Neurologie (42, 61, 108) und der Geburtshilfe (50).

1.4.1.1 Dextran

Dextran ist ein Fermentationsprodukt, das ausschließlich aus Glukoseeinheiten besteht (77). "La fermentation, c'est l'acte de reproduction des germes vivants qui constituent la levure." Dank der Erkenntnisse Pasteurs (80) kennen wir heute den mikrobiellen Ursprung des Zuckerschleimes und können ihn uns zu Nutze machen. Noch im 19. Jahrhundert führte er zu einem unerklärlichen „Verschleimen“ der Zuckerfabriken und damit zu erheblichen Störungen des Betriebsablaufes (65). Aufgrund seiner optischen Rechtsdrehung erhielt das Polysaccharid schon 1869 den Namen Dextran (94).

Die technische Biosynthese der klinisch einsetzbaren Dextrane erfolgt auch heute noch auf enzymatischem Wege: durch Einwirkung des Bakteriums *Leuconostoc mesenteroides* auf eine Rohrzuckerlösung. Dabei ist der verwendete Bakterienstamm in hohem Maße entscheidend für die Eigenschaften der gebildeten Dextrane. Seit der Einführung von „Macrodex“, der ersten Infusionslösung auf Dextranbasis 1944, wurde die Herstellung um ein Vielfaches optimiert. So konnte durch die Verwendung anderer Bakterienstämme der Verzweigungsgrad der Dextranmoleküle und damit die Nebenwirkungsrate im klinischen Einsatz erheblich gesenkt werden (65, 77).

Die heute verwendeten Dextrane haben eine Kettenlänge von 200-450 Glukosemolekülen und ein Molekulargewicht von 40.000–70.000 Dalton. Dextran wird im Körper von Dextranasen abgebaut und nach Unterschreiten der Nierenschwelle (55.000 Dalton) vorwiegend renal ausgeschieden (29). Dextran 70 hat eine relativ lange Halbwertszeit, sodass nach 24h noch 50% der infundierten Dextranlösung intravasal verbleibt. Die plasmaexpandierende Wirkung beträgt etwa 130%, je nach Konzentration und Molekulargewicht (92).

Wegen der guten Volumenwirkung werden Dextrane vor allem bei hypovolämischen Zuständen eingesetzt. Ein hemmender Einfluss auf die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten erkärt den Gebrauch der Dextrane in der Thromboseprophylaxe (82, 91).

Obwohl der klinische Nutzen von Dextran unbestritten ist, sind insbesondere bei diesem Kolloid unerwünschte Wirkungen zu berücksichtigen. Bei 60% der erwachsenen Mitteleuropäer sind präformierte dextranreaktive Antikörper bekannt, die zu einer Haptenprophylaxe zwingen, bevor höhermolekulares Dextran infundiert werden kann. Ausnahme ist eine kurzzeitige Notfallinfusion „im Schuss“ (30, 111). Todesfälle durch Anaphylaxie oder Blutung wurden immer wieder publiziert (47, 74). Dextrane entweichen bei kapillärem Leck in den interstitiellen Raum und beeinträchtigen bei dehydrierten Patienten die Nierenfunktion (70).

Eine Gesamtbetrachtung der erwünschten und unerwünschten Dextraneffekte macht deutlich, dass das Polysaccharid für einen Einsatz bei septischen Patienten oder bei Langzeiteinsatz auf der Intensivstation ungeeignet ist. Als Notfallmedikament bei akuter Hypovolämie oder zur Verbesserung der Hämorrhheologie ist es hingegen sehr gut geeignet und wird nach wie vor eingesetzt (17).

1.4.1.2 Hydroxyethylstärke

Auch Hydroxyethylstärke (HES) besteht aus Glukosepolymeren pflanzlichen Ursprungs. Als Ausgangsstoff dient Amylopektin (Stärke) aus Wachsmais oder auch Kartoffeln. Das

schwere, stark verzweigte Amylopektin muss durch saure oder enzymatische Hydrolyse fragmentiert werden. Um von der körpereigenen α -Amylase nicht sofort abgebaut zu werden, ist für den klinischen Einsatz eine Substitution mit Hydroxyethylgruppen notwendig (77). Je mehr HES-Moleküle substituiert sind, umso langsamer findet der Abbau statt und umso länger ist auch die Halbwertszeit. Da sowohl die Hydrolyse als auch die Substitution in unterschiedlichem Ausmaß durchgeführt werden können, ist es möglich, HES-Präparate mit unterschiedlichen, den Anforderungen angemessenen Eigenschaften herzustellen. So ist auch zu erklären, dass HES, obwohl erst seit 1973 auf dem Markt, heute das am meisten verwendete künstliche Kolloid in Europa ist (29, 60).

HES-Präparate im klinischen Einsatz haben ein Molekulargewicht von 70.000 bis 450.000 Dalton. Der initiale plasmaexpandierende Effekt von HES 200/0,5, einem der Standardpräparate, beträgt 130% bei einer Halbwertszeit von 2 Stunden. Die Ausscheidung erfolgt nach Abbau durch die α -Amylase ausschließlich renal (29, 108).

Neben dem Einsatz als Plasmaexpander in der Notfallmedizin wird HES auch auf der Intensivstation regelmäßig appliziert, da es ein kapilläres Leck nicht überwindet, im Gegenteil sogar einen endothelregenerierenden Effekt aufweist (18, 127). Eine verbesserte Perfusion nach HES-Infusion ist nicht nur auf den Volumeneffekt zurückzuführen, sondern resultiert auch aus einer Hemmung der Erythrozytenaggregation sowie einem Einfluss auf bestimmte Gerinnungsfaktoren im Blut (28, 73, 108).

Nebenwirkungen treten bei HES weniger als bei anderen Kolloiden auf. Allergische Reaktionen sind selten, was auf die strukturelle Verwandtschaft des Moleküls mit körpereigenem Glykogen zurückgeführt wird (75). Ohne klinische Relevanz ist eine passagere Amylaseerhöhung, die beim Abbauprozess durch ein Haften des Kolloids an dem Enzym entsteht (29). Blutungskomplikationen treten lediglich bei höhermolekularem HES häufiger auf und sind immer dosisabhängig. Präparate wie HES 200/0,5 gehören aufgrund ihrer großen Vorteile und guten Verträglichkeit zu den Standardmedikamenten im klinischen Alltag (17, 38, 108).

1.4.1.3 Gelatine

Gelatine-Präparate werden aus kollagenem Gewebe hergestellt: Sehnen, Bänder, Knorpel von Schweinen und Hühnern, aber vor allem Rindern (77). In mehrschrittigen Aufarbeitungsprozessen werden die Helixstruktur des Kollagens aufgebrochen und die Proteine anschließend quervernetzt. Hierfür stehen drei unterschiedliche Reagenzien zur Verfügung, die durch Varianten im Vernetzungsmuster zu leichten Unterschieden bei

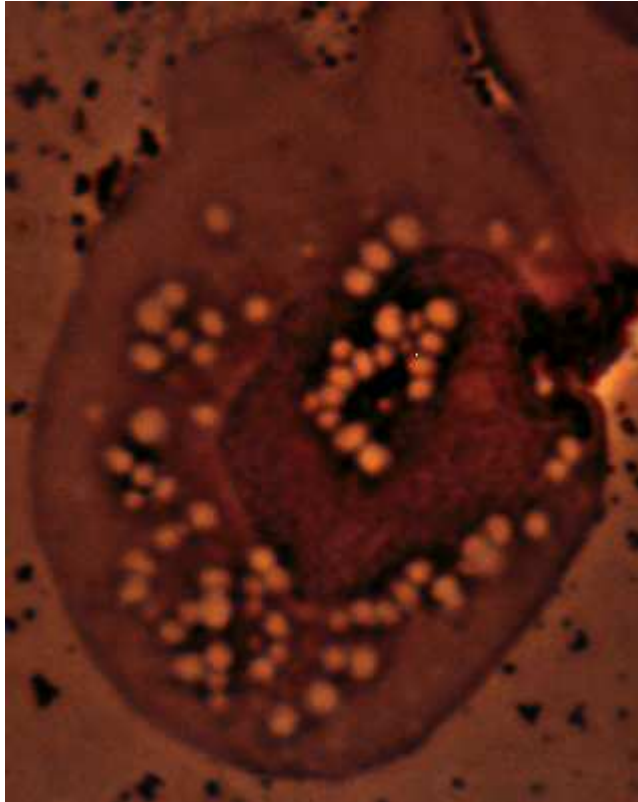
Gewicht und Wasserbindungskapazität führen (29, 77). Allgemein bestehen Gelatinelösungen aus kleineren Molekülen von durchschnittlich 30.000–35.000 Dalton. Damit liegen sie deutlich unter der Nierenschwelle und ihr niedermolekularer Anteil wird innerhalb von 30 Minuten wieder ausgeschieden. Außerdem besitzt Gelatine eine relativ geringere Wasserbindungskapazität als andere Kolloide. Der Volumenfülleffekt von Gelatine beträgt 80–100%. Insgesamt betrachtet ergibt sich hieraus eine sehr gute Steuerbarkeit beim Einsatz von Gelatinepräparaten (29, 55).

An Nebenwirkungen treten vor allem leichte allergische Reaktionen auf, selten schwere Verlaufsformen bis zur Anaphylaxie. Gelatine induziert eine Histaminfreisetzung, die auch durch den Einsatz von H-Blockern nur schwer zu unterdrücken ist (75). Gelatinepräparate diffundieren durch ein kapilläres Leck und sind bei Endothelschäden nicht indiziert (3, 29, 78). In den letzten Jahren wurde die Diskussion um eine mögliche Übertragung von BSE durch bovine Gelatinepräparate entfacht. Dies scheint aufgrund der aggressiven Herstellungsverfahren unwahrscheinlich. Auch wurde ein solcher Fall noch nie bekannt. Dennoch kann ein minimales Infektionsrisiko nicht ausgeschlossen werden, das geschätzt mit kleiner 1:1.000.000 angegeben wird (60, 96).

Aufgrund der dargestellten Eigenschaften der verfügbaren Gelatinepräparate, die in ihrem Nutzen von anderen Kolloiden meist übertroffen werden, ist Gelatine nicht das Kolloid der ersten Wahl. Eine gute Steuerbarkeit und ein möglicher Einsatz bei eingeschränkter Nierenfunktion oder dehydriertem Zustand sichern den Gelatinepräparaten aber gerade wegen der geringen Molekülgröße ihren Stellenwert in der Volumentherapie (58, 120).

1.4.2 Bisherige Erkenntnisse über den Einfluss künstlicher Kolloide auf Monozyten

Wechselwirkungen zwischen künstlichen Kolloiden und Zellen des MPS werden schon seit Jahrzehnten diskutiert (57, 109). Eine Speicherung von Gelatine in Monozyten über einen kurzen Zeitraum, sowie von Dextran und HES in vivo über Wochen und Monate ist bekannt (51). In vitro konnten wir die intrazelluläre Ansammlung aller drei Kolloide lichtmikroskopisch nachweisen (97).



Monozyt nach Inkubation mit FITC-markiertem Dextran. Die phagozytierten Partikel sind intrazellulär lichtmikroskopisch darstellbar.

Bild 2

Gelatine beeinflusst dabei nachgewiesenermaßen die Expression von Oberflächenrezeptoren (125). Dextran führt von allen Kolloiden zu den ausgeprägtesten Veränderungen in der Zellmorphologie (8). Für Hydroxyethylstärke sind zwar Einflüsse auf Zellen des MPS beschrieben (106), zu ausgeprägten Reaktionen kommt es jedoch selten (8, 125).

1.5 Fragestellung

Die künstlichen Kolloide Dextran, Hydroxyethylstärke und Gelatine besitzen einen besonderen Stellenwert in der klinischen Versorgung, vor allem in der Notfall- und Intensivmedizin. Dennoch ist ihr Einsatz bis heute umstritten. Grund dafür sind die bekannten unerwünschten Nebenwirkungen, die aus Einflüssen auf das Gerinnungs- und Immunsystem resultieren.

Im Rahmen der Immunantwort spielen Monozyten als Modulatoren und Effektorzellen eine entscheidende Rolle. Hierfür sind die unterschiedliche Expression von Oberflächenrezeptoren und ihre Fähigkeit zur Phagozytose essenziell.

Werden Monozyten durch Endotoxin zu einer Immunreaktion stimuliert, so ist ein reibungsloser Ablauf der Immunreaktion für das Überleben des Organismus entscheidend. Inwieweit künstliche Kolloide dies beeinflussen, wurde in der vorliegenden Arbeit anhand der Phagozytosekapazität von Monozyten und ihrer Expression von CD11a, CD16 und CD71 in vitro entlang der folgenden Fragen untersucht:

- 1.) Lässt sich der nachgewiesene Einfluss von künstlichen Kolloiden auf die phagozytäre Funktion von Monozyten in Abhängigkeit von Art und Konzentration des Kolloids in vitro bestätigen?
- 2.) Lässt sich ein Einfluss von LPS auf die phagozytäre Funktion von Monozyten in vitro nachweisen?
- 3.) Wie ändert sich der Einfluss von künstlichen Kolloiden auf die Phagozytose von Monozyten in Anwesenheit von LPS in vitro?
- 4.) Welche Auswirkungen auf die Phagozytoserate von Monozyten unter oben genannten Einflüssen lassen sich unter verschiedenen Versuchsbedingungen in vitro feststellen: isolierte Monozyten versus Monozyten im Vollblut?
- 5.) Lässt sich ein Einfluss von künstlichen Kolloiden auf die Expression der Oberflächenrezeptoren CD11a, CD16, CD71 auf Monozyten in Abhängigkeit von Art und Konzentration des Kolloids in vitro nachweisen?
- 6.) Lässt sich ein Einfluss von LPS auf die Expression der Oberflächenrezeptoren CD11a, CD16, CD71 auf Monozyten in vitro nachweisen?
- 7.) Wie ändert sich der Einfluss von künstlichen Kolloiden auf die Expression der Oberflächenrezeptoren CD11a, CD16, CD71 auf Monozyten in Anwesenheit von LPS in vitro?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte, Laborbedarf und Lösungen

Die verwendeten Materialien und Reagenzien sind im Anhang (Tabellen 1.1-1.3) aufgelistet.

2.1.2 Selbst hergestellte Medien und Puffer

PBS-Waschpuffer:

500 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{+}

+ 0,15 % bzw. 10 ml BSA

+ 0,13 % bzw. 3,75 ml EDTA

Die EDTA-Originallösung wurde mit 1N HCl auf einen pH von 7,4 eingestellt. Die so entstandene 0,463 molare EDTA-Lösung wurde zusammen mit BSA einer Flasche mit PBS zupipettiert. Durch Schwenken wurden die Zusätze mit der PBS-Lösung zum Puffer vermischt.

Bei Lagerung im Kühlschrank (4°C) ist der Puffer ca. 3 Monate haltbar.

Monozytenmedium:

400 ml RPMI 1640

+ 4 mmol Glutamin

+ 1 % bzw. 4 ml Non essential amino acid solution

+ 1 % bzw. 4 ml Pyruvat Stammlösung

+ 10 % bzw. 40 ml Humanserum Type AB

Humanserum und Glutamin wurden bei 37°C schnell aufgetaut und nach mehrmaligem Mischen durch Aufziehen in der Pipette der RPMI-Lösung zugegeben. Pyruvat-Lösung und Non-essential-amino-acid-solution wurden ebenfalls zupipettiert und der Ansatz durch mehrmaliges Aufziehen mit der Stripette und Schwenken der Flasche gemischt.

Das Medium wurde nach der Herstellung auf einen pH von 7,8 eingestellt. Unter CO₂ Einwirkung fällt der pH auf den gewünschten Wert von 7,4 ab.

Bei Lagerung im Kühlschrank (4°C) ist das Medium ca. 6 Wochen haltbar.

2.1.3 Medien, Lösungen und Zusätze für die Bestimmung der Phagozytose und Rezeptorexpression

Alle Angaben zu den folgenden Medien einschließlich der monoklonalen Antikörper und Lösungen für das Durchflusszytometer befinden sich in den Tabellen 1.4-1.6 im Anhang.

2.1.3.1 Kolloidlösungen

Die Kolloidlösungen wurden aus Rohstoff-Kolloidpulver hergestellt, das in Monozytenmedium gelöst wurde.

Auf der Analysenwaage wurden 1600 mg der einzelnen Kolloidpulver abgewogen und in Falcon Röhrchen gegeben. Dort wurde das Pulver in 20 ml Monozytenmedium gelöst, sodass eine Konzentration von 80 mg/ml entstand. Durch Schütteln und Rühren mit einem Magnetrührer wurde das Pulver gelöst. Die Kolloidlösungen wurden jeweils portioniert und durch Zugabe unterschiedlicher Mengen an Monozytenmedium auf Endkonzentrationen von 80, 40, 20 und 10 mg Kolloid/ml verdünnt. Für das Arbeiten unter der Werkbank wurde ein Teil dieser Kolloide steril filtriert und gelagert. Die Haltbarkeit der gelösten Kolloide entspricht der des Monozytenmediums und beträgt ca. 6 Wochen.

2.1.3.2 Lipopolysaccharid (LPS)

Über eine Kanüle wurden 5 ml steriles Wasser in die Ampulle mit LPS gespritzt. Durch mehrmaliges Aufziehen wurde der Inhalt gelöst und anschließend in ein steriles Falcon Röhrchen gegeben. Durch Zugabe weiterer 5 ml Wasser wurde die Lösung auf 100 µg LPS/ml verdünnt.

2.1.3.3 Latex Beads

Die Ausgangskonzentration von $3,93 \cdot 10^{11}$ Latex-Beads /ml wurde je nach Ansatz mit unterschiedlichen Mengen PBS⁻ verdünnt, sodass mit den jeweils gewünschten Konzentrationen gearbeitet werden konnte.

2.1.4 Materialien zur Fluoreszenzmikroskopie

sind im Anhang in Tabelle 1.7 aufgelistet

2.1.5 Gewinnung der Blutproben

2.1.5.1 Buffy Coat

Bei der Produktion von Erythrozytenkonzentraten werden durch Zentrifugation Erythrozyten, Plasma und Leukozyten voneinander getrennt. In der Leukozytenfraktion, dem Buffy Coat, sind außerdem Thrombozyten enthalten. Der Buffy Coat dient somit in erster Linie der Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten. Buffy Coats, die hierfür keine Verwendung finden, werden als Abfallprodukte entsorgt. Diese Buffy Coats freiwilliger Blutspender wurden von der Abteilung Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen für unsere Untersuchungen bereitgestellt.

Dieses Vorgehen wurde durch ein Votum der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zum Umgang mit Restblutbestandteilen aus der Präparation von Blutprodukten abgedeckt.

2.1.5.2 Vollblut

Freiwilligen, anamnestisch und klinisch gesunden Probanden wurden durch Punktion der Vena cubitalis 20 ml Blut in 5 EDTA Röhrchen abgenommen. Die Verarbeitung des Blutes erfolgte direkt im Anschluss.

2.2 Methoden

2.2.1 Experiment I und III -

Isolierung und Aufbereitung der Monozyten aus dem Buffy Coat

Buffy Coats freiwilliger Spender wurden von der Blutbank direkt nach der Produktion bereitgestellt und noch am selben Tag verarbeitet. Die gesamte Aufarbeitung der Monozyten einschließlich Zellkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen in der Reinraumwerkbank.

Mit einer Perfusorspritze wurde der gesamte Inhalt des vorsichtig geöffneten Plastikbeutels aufgezogen. Um eine Hämolyse zu vermeiden, wurde nach dem Aufziehen die Kanüle der Perfusorspritze entfernt und die Flüssigkeit direkt in Costarröhrchen gegeben.

Sowohl das Volumen als auch die Konsistenz der Buffy Coats variierten stark. Volumina zwischen 80-100 ml Buffy Coat wurden 1:1 mit PBS⁻ in Lösung gebracht, geringere Mengen (50-70 ml) Buffy Coat wurden entsprechend stärker verdünnt.

2.2.1.1 Dichtegradientenzentrifugation

In acht Falcon Röhrchen wurden jeweils 12,5 ml Ficoll vorgelegt. 120 ml des Gemisches aus Buffy Coat und PBS⁻ wurden mit einer 25 ml Stripette vorsichtig darüber geschichtet, jeweils 15 ml pro Röhrchen. Durch die darauf folgende Zentrifugation (25 min, 1600 U/min, 20°C) wurden die einzelnen Bestandteile des Buffy Coats entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Um die unterschiedlichen Phasen durch heftiges Abbremsen des Rotors nicht wieder zu vermischen, wurde die Bremse ab einer Auslaufgeschwindigkeit von 500 U/min abgeschaltet.

Die Falcon Röhrchen enthielten nach der Zentrifugation ein Pellet aus Erythrozyten, direkt darüber eine Schicht von Granulozyten. Zwischen dem darüber liegenden Ficoll und dem abschließenden Serum befand sich eine trüb aussehende Bande, die sogenannte Interphase. Sie enthielt PBMCs (peripheral blood mononuclear cells), also Lymphozyten und Monozyten.

Mit einer 25 ml Stripette wurde die Interphase vorsichtig abgesaugt und die Flüssigkeit gleichmäßig auf weitere vier Falcon Röhrchen verteilt.

2.2.1.2 Reinigungsschritte

Die Falcon Röhren, welche die abgesaugte Interphase enthielten, wurden mit PBS-Waschpuffer auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert (10 min, 1000 U/min, 20°C). Die Monozyten sammelten sich in einem Pellet, der Überstand wurde komplett abgeschüttelt. Anschließend wurde das Pellet vorsichtig aufgeschüttelt.

Mit einer 50 ml Stripette wurden 35 ml PBS-Waschpuffer in das erste der vier Falcon Röhren gegeben, das aufgeschüttelte Pellet suspendiert und der gesamte Inhalt in das nächste Röhren gegeben. Auf diese Weise wurden die Zellen aus allen vier Röhren gelöst und gewaschen. Im letzten Röhren wurde der Inhalt nach dem Spülen belassen und zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgekippt, das Pellet sanft aufgeschüttelt und in 25 ml Monozytenmedium gelöst. Da den Zellen durch das EDTA des Waschpuffers Kalzium entzogen worden war, das ihnen im Monozytenmedium wieder zugegeben wurde, musste dieses Medium tropfenweise pipettiert werden, um eine zu schnelle Rekalzifizierung und ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden. Im Anschluß wurde nochmals zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet aufgeschüttelt. Der Zellsuspension wurden 10 ml Monozytenmedium zugegeben und die Lösung durch Aufziehen mit der Stripette resuspendiert

2.2.1.3 Zellzahlermittlung

In einem Eppendorf Hütchen wurden 245 µl Trypanblau mit 5 µl der entstandenen Monozytenlösung vermischt. Hieraus wurden unter dem Lichtmikroskop in einer Neubauer Zählkammer die Leukozytenzahl in den Eckquadraten ermittelt. Die Multiplikation mit dem Faktor $1,25 \cdot 10^5$ ergab die Zellzahl/ml in der untersuchten Leukozytenlösung ($3-8 \cdot 10^7$).

2.2.1.4 Zellkultur

Die Suspension wurde mit Monozytenmedium auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^7$ verdünnt. Für den Phagozytosenachweis wurde je 1 ml dieser Lösung in 27 Petrischalen (\varnothing 3,5 cm) gegeben. Zur Untersuchung der Rezeptorexpression wurden 2 ml in jede Petrischale (\varnothing 6 cm) pipettiert. Die Schalen wurden vorsichtig geschwenkt, sodass der Boden vollständig mit der Lösung bedeckt war. Anschließend folgte eine zweistündige

Inkubationsphase im Brutschrank, nach der die Monozyten an der Polystyroloberfläche der Petrischalen adhärten.

Nach Ablauf von zwei Stunden war eine trübe Schicht von Monozyten am Boden der Schalen zu sehen. Ein weißer Film aus nicht adhärenen Monozyten, Lymphozyten und Serumproteinen lag darüber. Um diesen Film von den adhärenen Monozyten abzulösen, wurde mit einer 1ml Pipette der Inhalt einer Petrischale aufgenommen und der Rand des Schalenbodens vorsichtig damit gespült. Der Film löste sich und konnte mit der restlichen Flüssigkeit abpipettiert und verworfen werden.

Den Petrischalen einschließlich der darin adhärenen Monozyten wurden entsprechend den Schemata der Tabellen 2.1 und 2.3 im Anhang Reagenzien zugefügt.

Der jeweilige Inhalt einer Petrischale wurde auf dem Schüttler gemischt. Anschließend wurden die Monozyten in ihrer Lösung für zwölf Stunden im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.5 Lösung der Monozyten

Die Aufbereitung der Proben zur Durchflusszytometrie erfolgte nicht mehr unter sterilen Bedingungen.

Nach der Inkubation war erneut ein weißer Film in den Petrischalen sichtbar. Er wurde zusammen mit dem Überstand nach vorsichtigem Spülen wieder abgenommen und verworfen. Das abpipettierte Volumen von 1 ml (2 ml) wurde durch eiskalten PBS-Waschpuffer ersetzt. Die Petrischalen wurden auf Eis gelegt und für 10 min in den Kühlschrank gestellt. Aufgrund mehrerer Faktoren gelang es, möglichst alle Monozyten von den Schalen zu lösen: Die Kälte, der die Zellen ausgesetzt waren, bewirkte eine Hemmung der Adhärenz. Auch das im Waschpuffer enthaltene EDTA beeinflusste durch den Kalziumentzug diese Bindung. Mit Zellschabern wurde mechanisch eine Lösung der Monozyten von ihrem Untergrund erzwungen. Dieser Vorgang wurde durch anschließendes Spülen mit einer Pipette zusätzlich unterstützt. Der Inhalt jeder Petrischale wurde nach abgeschlossenem Lösungsvorgang in ein Facs Röhrchen pipettiert. Zur Untersuchung der Rezeptoren wurden dreimal 600 µl einer Petrischale in drei unterschiedliche Röhrchen gegeben.

2.2.1.6 Aufbereitung der Proben für die Durchflusszytometrie

Die Facs Röhren wurden zentrifugiert (10 min, 1000 U/min, 4°C) und der Waschpuffer im Überstand abgekippt. Dem Pellet wurden jeweils 5 µl Antikörper zupipettiert (s. Tabelle 2.4 und 2.5). Dafür wurde die Pipettenspitze ganz an den Boden des Röhrens gebracht und durch mehrmaliges Aufziehen des Pellets in die Spitze darauf geachtet, daß die 5 µl vollständig abgegeben wurden. Der Ansatz wurde durch Schütteln gut vermischt. Es folgte eine Inkubationsphase von 20 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Anschließend wurden pro Röhren 2 ml (1,2 ml) Cell Wash zugegeben. Das Röhren wurde nochmals gut geschüttelt und zentrifugiert (1000 U/min, 5 min, 20°C). Der Überstand wurde abgekippt und 500 µl (300 µl) Cell Fix zugegeben. Nach ausreichendem Schütteln waren die Zellen auf diese Weise für mindestens 24 h fixiert.

2.2.2 Experiment II -

Vollblutinkubation und Aufbereitung der Leukozyten

Gesunden Probanden wurden in EDTA Röhren 20 ml peripher venöses Blut abgenommen. In 27 Facs Röhren wurde damit der Versuch entsprechend Tabelle 2.2 angesetzt.

Das Blut wurde gut mit den Reagenzien vermischt und für 12 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden in die Röhren 1 und 3 - 27 Antikörper pipettiert, ebenso, wie es unter 2.2.1.6 für den Phagozytose-Ansatz aus Buffy Coat beschrieben ist. Im Anschluss an die 20 minütige Inkubation wurde jedem Röhren 2 ml Facs Lysing zugegeben. Der Inhalt wurde gut vermischt und für 10 min im Kühlschrank inkubiert. In dieser Zeit wurde bereits ein Großteil der Erythrozyten lysiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (5 min, 1000 U/min, 20°C). Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet aufgeschüttelt. Erneut wurde Facs Lysing zugegeben und der Prozess der Lyse wiederholt. Nach dem zweiten Abkippen des Überstandes wurden jeweils 500 µl Cell Fix zugegeben. Die Röhren wurden geschüttelt und die Zellen damit für mindestens 24 h fixiert. Der Inhalt der Röhren war zu diesem Zeitpunkt klar, da die Erythrozyten lysiert und ihre Reste verworfen worden waren.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Suspendierte Zellen werden in einer Trägerflüssigkeit einzeln an einem fokussierten Lichtstrahl (Laser) vorbeigeleitet. Detektoren nehmen Lichtbeugung und Lichtbrechung (Reflektion) durch die einzelnen Partikel wahr. Entlang der Achse des einfallenden Lichts (Forward Scatter, FSC) wird die Lichtbeugung gemessen, die eine Aussage über die relative Größe der Zellen zulässt. Senkrecht dazu (Side Scatter, SSC) wird die Lichtbrechung registriert. Sie ist der Zellgranularität proportional. Jede gemessene Zelle wird nach diesen beiden Parametern graphisch in einem Koordinatenkreuz (Dot Plot) dargestellt. So können Zellpopulationen einer Probe optisch identifiziert und mit Hilfe der Software (Cell Quest) quantifiziert werden.

Zellen können zusätzlich spezifisch über eine Antikörperbindung mit unterschiedlichen Fluorochrommolekülen markiert werden. Das Absorptionsmaximum der Fluorochrome muss der Wellenlänge des Anregungslichtes entsprechen. Dem Durchflusszytometer stehen drei verschiedene Detektoren zur Verfügung, welche die unterschiedlichen Emissionswellen der Fluoreszenzen (FL1–3) in drei definierten Bereichen wahrnehmen können. Mit Hilfe der Fluoreszenzanalyse sind zusätzliche Differenzierungen von Zellpopulationen nach ihren Antikörpereigenschaften möglich.

Alle beschriebenen Parameter (FSC, SSC, FL1-3) werden gleichzeitig gemessen und können graphisch in verschiedenen Darstellungen gegeneinander ausgewertet werden.

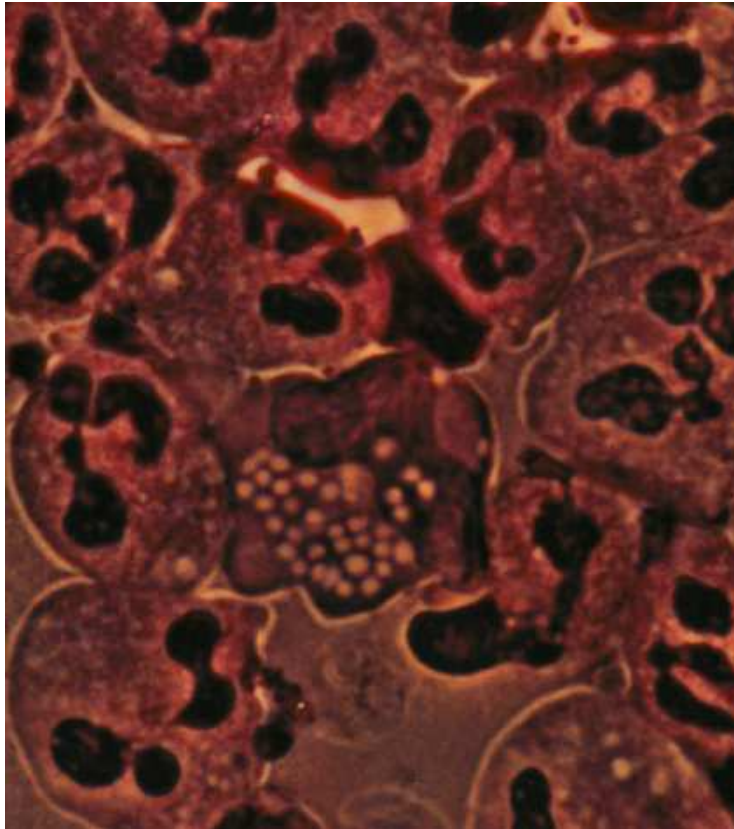
Um die Monozytenpopulation eindeutig identifizieren zu können, wurden allen Ansätzen PE (Phycoerythrin) markierte CD14-Antikörper zugegeben. Die Antikörper der zu untersuchenden Oberflächenrezeptoren oder die phagozytierten Latex beads waren mit FITC (Floureszein Isothiozyanat) markiert, das Licht einer anderen Wellenlänge emittiert. So konnte der Anteil der Monozyten dargestellt und berechnet werden, der die entsprechenden Oberflächenrezeptoren trägt bzw. an der Phagozytose teilgenommen hat.

2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Proben als Cytospins aufgearbeitet.

Anstatt die Zellen, wie oben beschrieben, zur Facsanalyse mit FACS-Fix zu fixieren, wurde das Pellet einer Vollblutprobe mit 200 µl PBS⁻ verdünnt. Bei Monozyten aus dem Buffy coat war die Verdünnung mit PBS⁻ um das Zehnfache höher. 100 µl dieser Suspension wurden in einem Reagenzglas eine Minute mit 200 µl Acridinorange gefärbt. Anschließend wurde 1 ml PBS⁻ zugegeben und bei 1000 U 5 min zentrifugiert. Der Überstand aus dem Reagenzglas wurde abgekippt und dem Pellet 50 µl „Gentianaviolett“ und 30 µl bovines Serumalbumin (BSA) zugegeben. Der Inhalt des Reagenzglases wurde gut gemischt und jeweils 50 µl davon in ein Cytocub pipettiert. Über einen Filter wurden die Zellen aus dieser Lösung 5 min bei 500 U auf einen Objektträger zentrifugiert.

Mit dieser Methode ist es möglich, einzelne Zellen nebeneinander flach auf dem Objektträger anzuordnen, die so mikroskopisch gut zu beurteilen sind. Mit Hilfe in das Mikroskop eingelegter Filter können fluoreszierende Partikel, z.B. markierte Latex beads oder Kolloide, ebenfalls dargestellt werden.



Monozyt zwischen Granulozyten nach Inkubation mit FITC-markierten Latex-Beads, die phagozytierten Partikel sind intrazellulär lichtmikroskopisch sichtbar.

Bild 3

2.2.5 Statistische Auswertung

Der Median /Mittelwert der Fluoreszenz I der durchflusszytometrischen Untersuchung wurde mittels Covarianzanalyse ausgewertet, in der der Proband als Zufallsgröße berücksichtigt wurde. Weitere nominale Einflussgrößen waren das Kolloid (Ausprägungen: Dextran, HES, Gelatine) sowie die Anwesenheit oder Abwesenheit von LPS.

Als hinreichende Einflussgröße wurde die Kolloidkonzentration berücksichtigt.

Außerdem wurde angenommen, dass der Einfluss der Kolloidkonzentration bei jedem Probanden unterschiedlich stark ausgeprägt war.

Eine statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Methodische Vorversuche

3.1.1 LPS-Konzentration

Da in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von LPS untersucht werden sollte, musste initial die optimale Konzentration an LPS bestimmt werden, die den Ansätzen zur Phagozytose und Rezeptorexpression zugegeben werden sollte. In anderen Arbeiten wurden im Rahmen von Stimulationsversuchen mit LPS häufig Konzentrationen zwischen 10 ng und 1 µg pro ml verwendet (22, 45).

Untersucht wurde zum einen, ob die Zugabe von LPS in diesem Konzentrationsbereich zu starken Schwankungen bei der Phagozytose von Monozyten führt, wenn diese gleichzeitig unterschiedlichen Konzentrationen eines Kolloids, in diesem Fall Dextran ausgesetzt sind. Der Versuch wurde zweifach mit aus buffy coat isolierten Zellen durchgeführt und ein Mittelwert bestimmt. Es ergaben sich keine drastischen Änderungen der phagozytären Kapazität innerhalb der angegebenen Konzentrationsbereiche von Dextran und LPS, sodass für die Experimente I und II die mittlere Konzentration von 100 ng LPS pro ml festgelegt wurde.

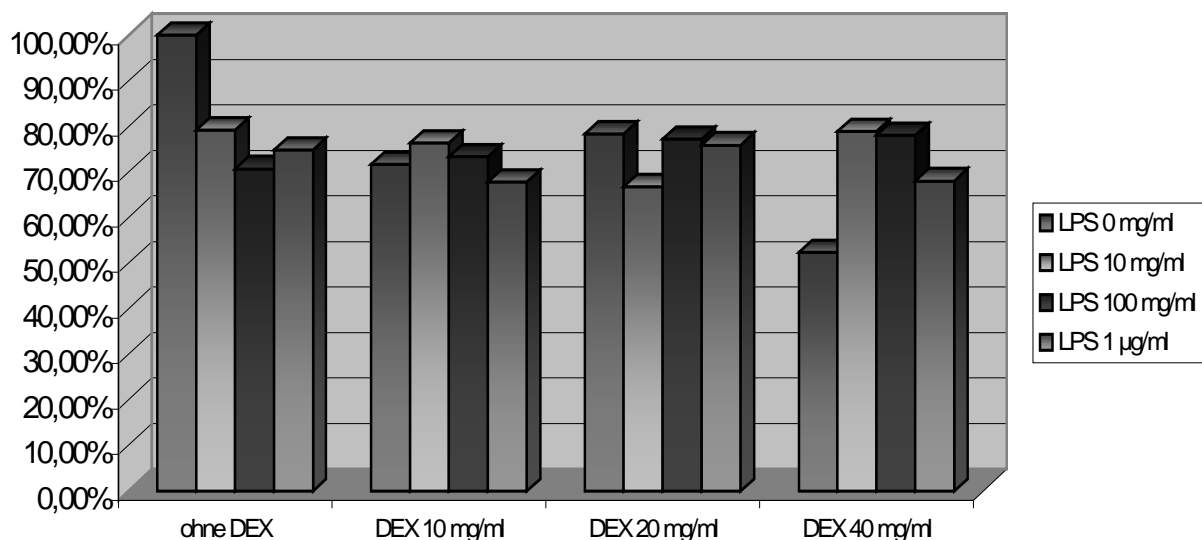


Abbildung 3.1: Phagozytose von Latex-beads durch isolierte Monozyten, angegeben ist der Median der phagozytierenden Monozyten in der Facs-Analyse

Des Weiteren wurde die LPS Konzentration zur Stimulation der Rezeptorexpression festgesetzt. Hierzu wurde ein breiterer Konzentrationsbereich zwischen 0,01 ng und 1 µg pro ml bei Proben dreier verschiedener Probanden durchgetestet. Der Einfluss des Kolloids blieb dabei unberücksichtigt. Die zu untersuchenden Oberflächenrezeptoren CD11a, CD16 und CD71 zeigten eine verstärkte Expression bei Stimulation mit LPS im oberen Konzentrationsbereich. Für CD11a lag das Maximum bei einer LPS-Konzentration von 10 ng/ml, für CD16 bei 1 µg/ml und für CD71 bei 100 ng/ml. Da die Ergebnisse für diese drei Konzentrationen bei keinem der untersuchten Rezeptoren stark differierten und um einen einheitlichen Versuchsaufbau zu ermöglichen, wurde für das Experiment III eine einheitliche LPS Konzentration von 100 ng/ml festgelegt.

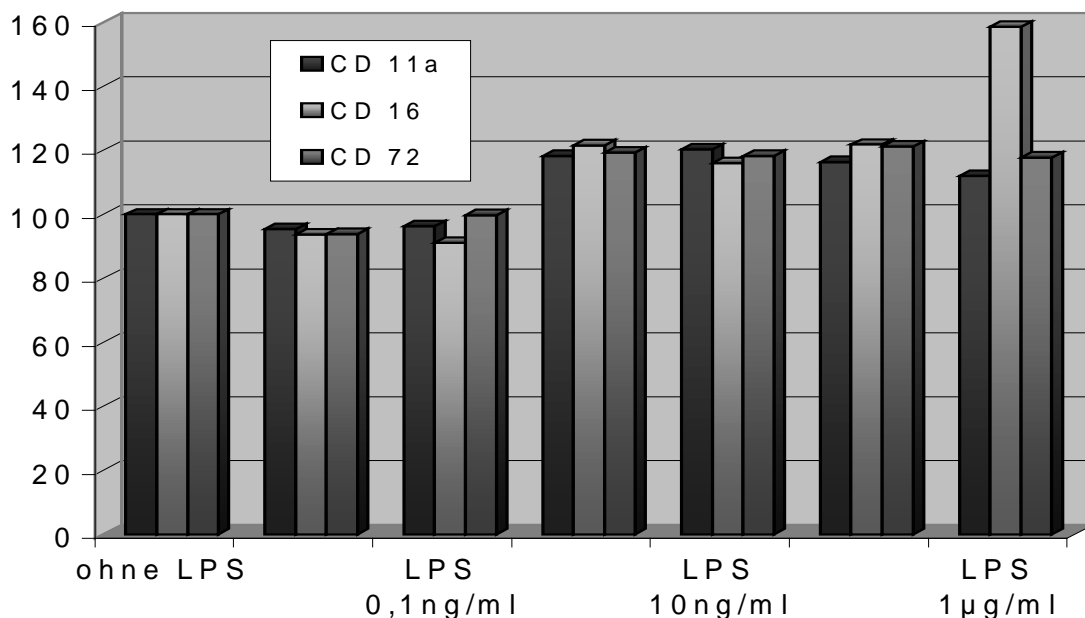


Abbildung 3.2: Rezeptorexpression von isolierten Monozyten, angegeben ist der Median der Fluoreszenzintensität in der Facs-Analyse

3.1.2 Inkubationszeit

In anderen Studien zur Untersuchung des Einflusses künstlicher Kolloide auf Monozyten wurde die jeweilige Inkubationszeit für isolierte Zellen in Zeitversuchen ermittelt und betragen in Abhängigkeit vom Versuchsansatz 10- 16 Stunden (44, 97). Da in dieser Versuchsreihe Vollblutproben eingesetzt wurden und auch die Zugabe von LPS einen Einfluss auf die Phagozytose von künstlichen Kolloiden durch Monozyten erwarten ließ, musste die optimale Inkubationszeit in einem Zeitversuch neu ermittelt werden.

3. Ergebnisse

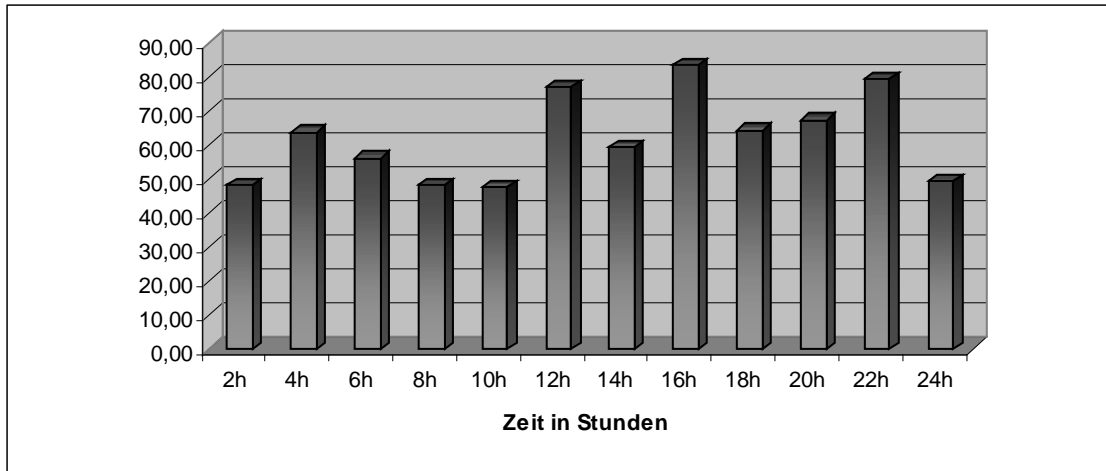


Abbildung 3.3: Phagozytose von Latex-Beads durch isolierte Monozyten über 24 Stunden, angegeben ist der Median der phagozytierenden Monozyten in der Facs-Analyse

Bei der Inkubation von Vollblut unter Zugabe von Latex-Beads über 24 h zeigte sich in der Facs-Analyse ein leichter Anstieg der Phagozytose von Monozyten ab einer Inkubationszeit von 12 Stunden mit einem Maximum bei 16 Stunden.

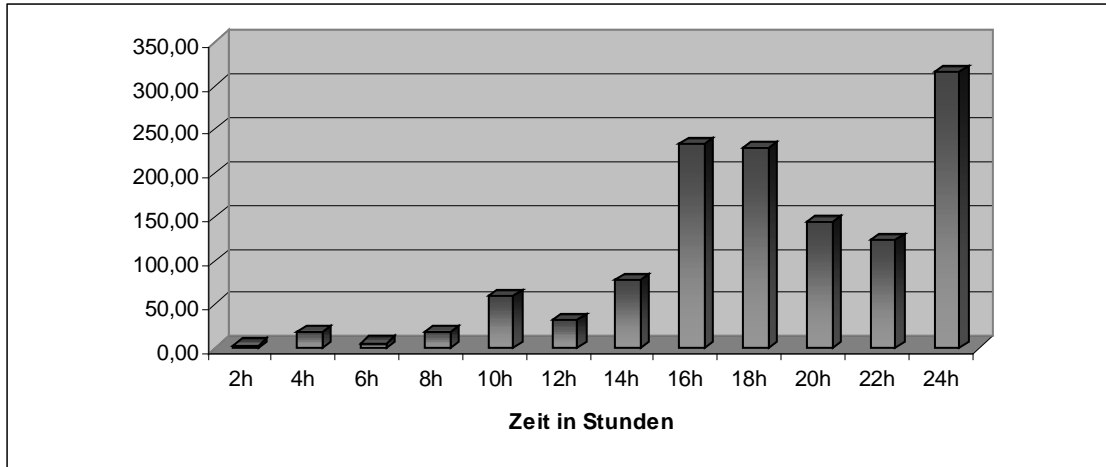


Abbildung 3.4: Phagozytose von Latex-Beads durch isolierte Monozyten über 24 Stunden unter Zugabe von Dextran 20 mg/ml, angegeben ist der Median der phagozytierenden Monozyten in der Facs-Analyse

Bei Zugabe von Dextran in einer Konzentration von 20 mg/ml war eine Zunahme der Phagozytoserate ab einer Inkubationszeit von 10 Stunden zu verzeichnen mit einem deutlichen Anstieg nach 18 Stunden.

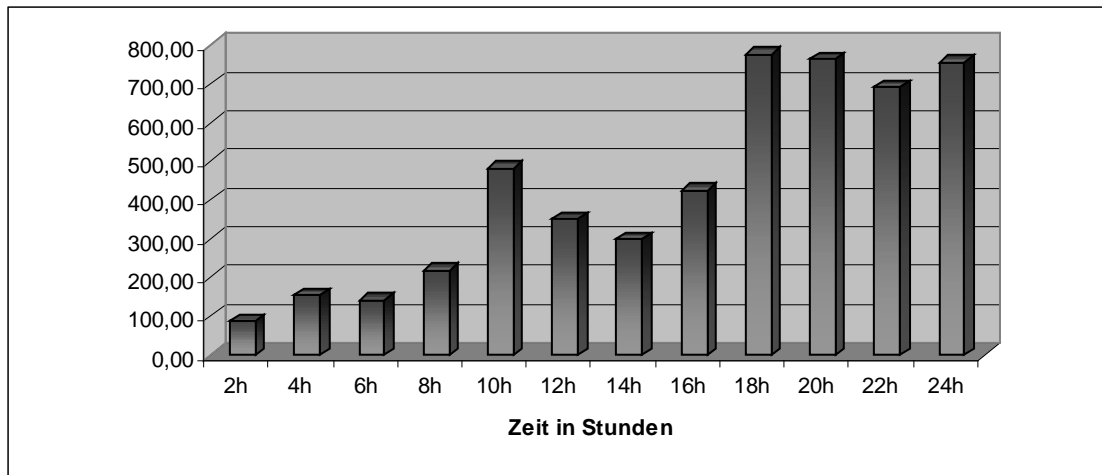


Abbildung 3.5: Phagozytose von Latex-Beads durch isolierte Monozyten über 24 Stunden unter Zugabe von LPS angegeben ist der Median der phagozytierenden Monozyten in der Facs-Analyse

Die Zugabe von LPS in einer Konzentration von 100 ng/ml zeigte eine Zunahme der Phagozytose ab einer Inkubation von mindestens zehn Stunden Dauer.

Eine Reduktion der Phagozytoserate bei längeren Inkubationszeiten bis zu 24 h konnte bei diesen Versuchen nicht festgestellt werden. Um unnötig lange Inkubationszeiten zu vermeiden, die einen zunehmenden Zelluntergang im Vollblut zulassen und damit die gemessenen Ergebnisse in Frage stellen könnten, wurde mit Hinblick auf die im Zeitversuch erhobenen Daten eine einheitliche Inkubationszeit für die Experimente I, II und III von zwölf Stunden festgesetzt.

3.2 Durchgeführte Untersuchungen

Die in der FACS-Analyse ermittelten Daten wurde statistisch ausgewertet (2.2.5) und sind im Folgenden graphisch dargestellt. Die Messergebnisse der Proben im Einzelnen sind als Tabellen im Anhang aufgeführt.

3.2.1 EXPERIMENT I -

PHAGOZYTOSE ISOLIERTER MONOZYTEN UNTER DEM EINFLUSS KÜNSTLICHER KOLLOIDE UND LPS

Die einzelnen Messergebnisse, die im Säulendiagramm dargestellt sind, umfassen jeweils die Daten von zehn Proben. Ausgewertet wurde der Median der Fluoreszenzintensität in der Facs-Analyse. Die 0-Werte sind zusätzlich dreifach bestimmt worden, der Mittelwert daraus ist angegeben.

3.2.1.1 Phagozytose isolierter Monozyten unter dem Einfluss von Hydroxyethylstärke und LPS

Mit zunehmender Konzentration von HES zeigt sich eine Reduktion der Phagozytose von Latex-Beads durch Monozyten. Auch die Zugabe von LPS führt zu einer deutlichen Einschränkung der phagozytären Kapazität. Bei gleichzeitiger Inkubation der Monozyten mit LPS und HES zeigt sich eine weitere Reduktion der Phagozytose gegenläufig zu der ansteigenden Kolloidkonzentration. Signifikant ist sowohl der Einfluss von LPS als auch der von HES in einer Konzentration von 40 mg/ml.

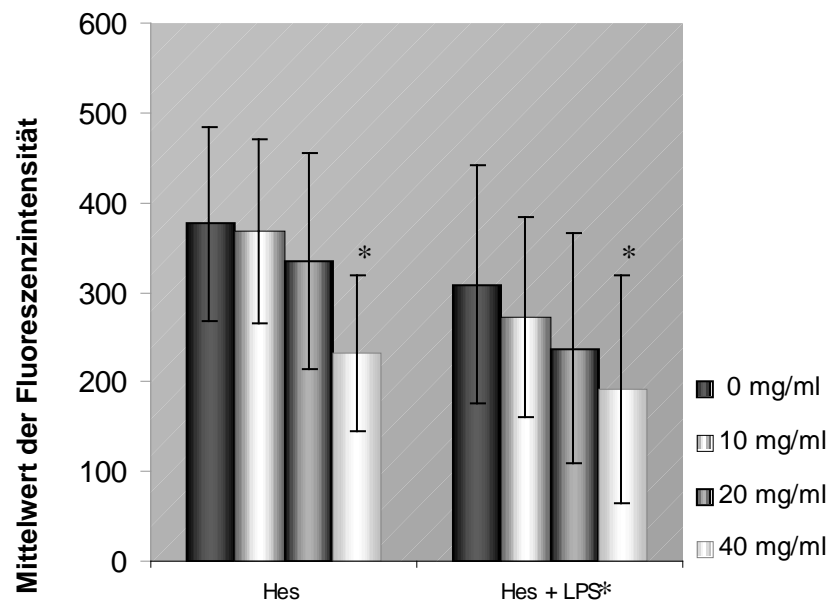


Abbildung 3.6: Mittelwerte und zweifacher Standardfehler der Phagozytoserate der Monozyten bei Inkubation mit Hydroxyethylstärke 200/0.5 in zunehmender Konzentration und unter Zugabe von LPS; Mittelwerte aus n=10; p<0,05*

3.2.1.2 Phagozytose isolierter Monozyten unter dem Einfluss von Gelatine und LPS

Die Inkubation isolierter Monozyten mit Gelatine führt zu einer Reduktion der Phagozytose mit signifikanten Ergebnissen für alle verwendeten Konzentrationen des Kolloids. Eine Zugabe von LPS führt ebenfalls zu einer signifikanten Einschränkung der Phagozytoserate. Die gleichzeitige Inkubation mit Gelatine und LPS reduziert die phagozytären Möglichkeiten der Monozyten um ein Weiteres, wobei die Abnahme unter Gelatinekonzentrationen von 20 und 40 mg/ml statistisch signifikant ist.

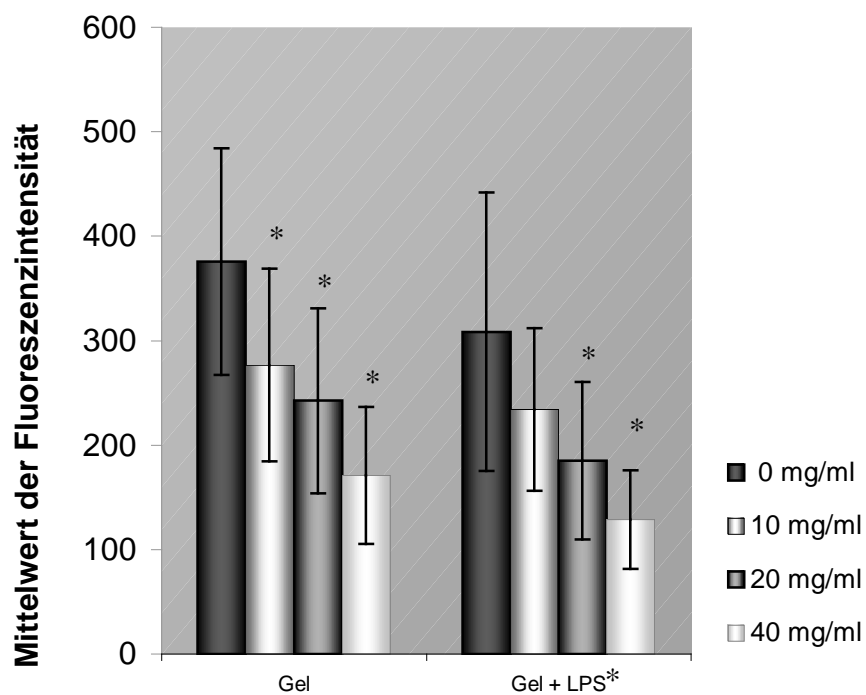


Abbildung 3.7: Mittelwerte und zweifacher Standardfehler der Phagozytoserate der Monozyten bei Inkubation mit Gelatine in zunehmender Konzentration und unter Zugabe von LPS; Mittelwerte aus n=10; $p < 0,05^*$

3.2.1.3 Phagozytose isolierter Monozyten unter dem Einfluss von Dextran und LPS

Auch die Zugabe von Dextran zu isolierten Monozyten reduziert deren phagozytäre Leistung. Ohne LPS Einfluss ist die Abnahme der Phagozytose von Latex-beads durch Dextran für alle verwendeten Konzentrationen signifikant. Bei zusätzlicher Gabe von LPS ist sowohl eine Hemmung durch das Polysaccharid alleine als auch durch Kolloideinfluss zu beobachten. Dabei wird die Phagozytose etwas weniger eingeschränkt, wenn bei Inkubation mit Dextran 20 mg/ml und 40 mg/ml zusätzlich LPS zugegeben wurde.

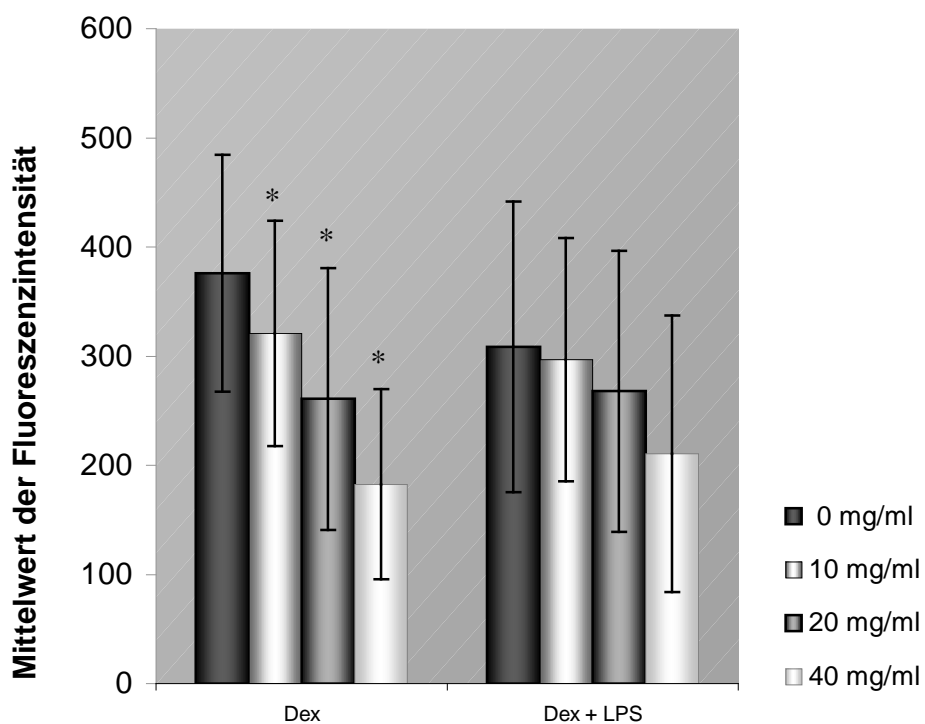


Abbildung 3.8: Mittelwerte und zweifacher Standardfehler der Phagozytoserate der Monozyten bei Inkubation mit Dextran in zunehmender Konzentration und unter Zugabe von LPS; Mittelwerte aus n=10; $p < 0,05^*$

3.2.2 EXPERIMENT II –

PHAGOZYTOSE DER MONOZYTEN IM VOLLBLUT UNTER DEM EINFLUSS KÜNSTLICHER KOLLOIDE UND LPS

3.2.2.1 Phagozytose der Monozyten im Vollblut unter dem Einfluss von Hydroxyethylstärke und LPS

Die Inkubation von Vollblut mit HES in steigenden Konzentrationen zeigt keinen signifikanten Einfluss des Kolloids auf die Phagozytose von Monozyten. Die Zugabe von LPS führt jedoch zu einer signifikanten Steigerung der phagozytären Aktivität auf über das Dreifache. Eine zusätzliche Kolloidgabe induziert ab einer Konzentration von 20 mg HES pro ml eine weitere Zunahme der Phagozytose, jedoch ohne statistische Signifikanz.

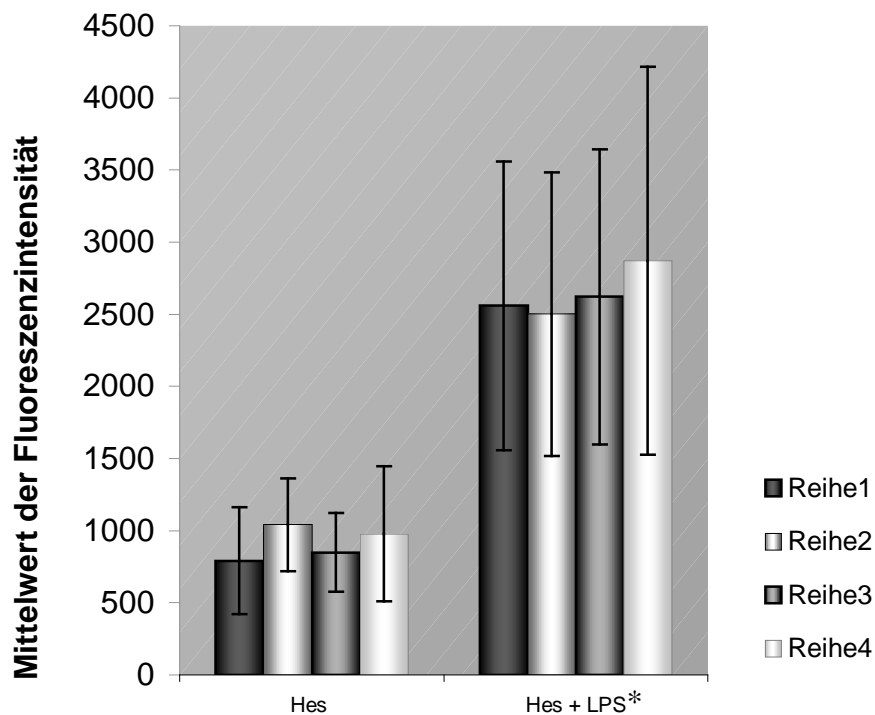


Abbildung 3.9: Mittelwerte und zweifacher Standardfehler der Phagozytoserate der Monozyten bei Inkubation im Vollblut mit Hydroxyethylstärke 200/0.5 in zunehmender Konzentration und unter Zugabe von LPS; Mittelwerte aus n=10; $p < 0,05^*$

3.2.2.2 Phagozytose der Monozyten im Vollblut unter dem Einfluss von Gelatine und LPS

Gelatine in steigenden Konzentrationen führt bei Inkubation im Vollblut zu einer gesteigerten Phagozytose der Monozyten. Dabei ist jedoch weder eine lineare Steigerung in Abhängigkeit von der Konzentration festzustellen noch eine statistische Signifikanz. Signifikant ist hingegen der Einfluss von LPS auf die Phagozytose, der zu einer Verdreifachung der monozytären Aktivität führt.

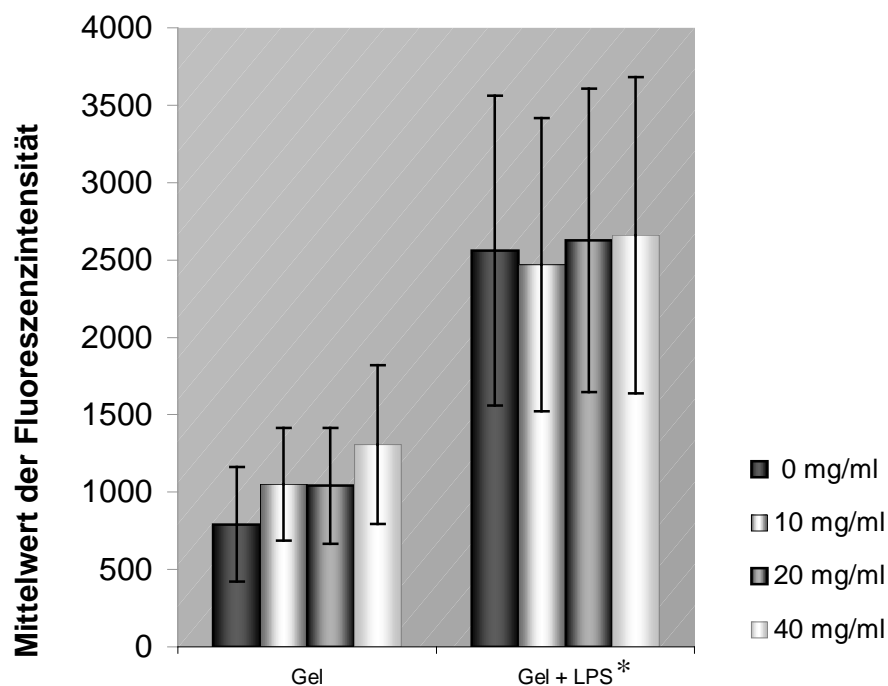


Abbildung 3.10: Mittelwerte und zweifacher Standardfehler der Phagozytoserate der Monozyten bei Inkubation im Vollblut mit Gelatine in zunehmender Konzentration und unter Zugabe von LPS; Mittelwerte aus n=10; p< 0,05*

3.2.2.3 Phagozytose der Monozyten im Vollblut unter dem Einfluss von Dextran und LPS

Monozyten im Vollblut lassen sich durch Dextrankonzentrationen von 10 mg/ml und 20 mg/ml deutlich beeinflussen. Sie zeigen eine Phagozytosesteigerung, die bei Inkubation mit 20 mg Dextran pro ml signifikant ist. Derselbe Einfluss des Kolloids lässt sich auch unter Zugabe von LPS beobachten. In beiden Ansätzen zeigt sich jedoch eine Reduktion der Phagozytose bei Inkubation mit einer hohen Dextrankonzentration von 40 mg/ml, die unter LPS Einfluss noch deutlicher nachzuweisen war.

Unabhängig von der Kolloidkonzentration führt LPS auch hier zu einer signifikanten Steigerung der phagozytären Aktivität von Monozyten im Vollblut.

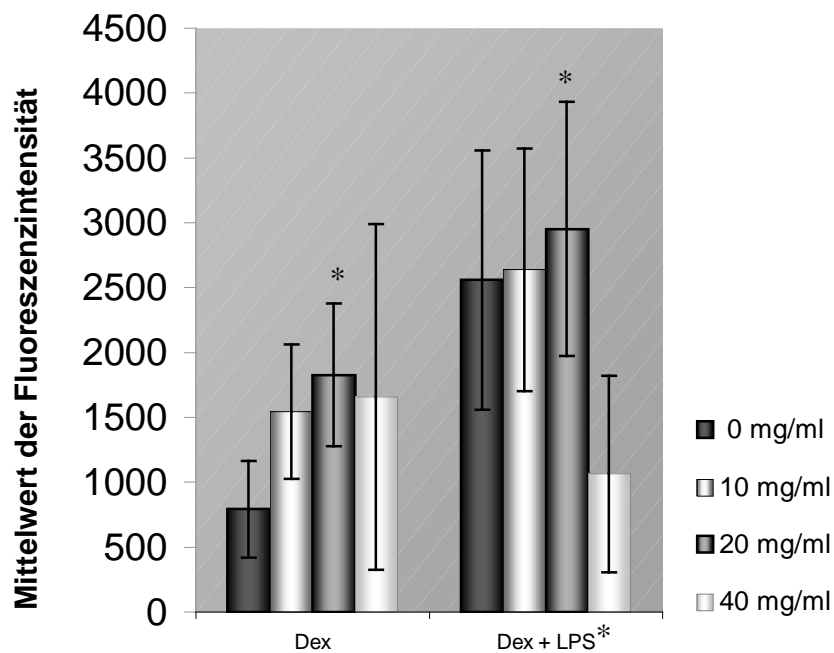


Abbildung 3.11: Mittelwerte und zweifacher Standardfehler der Phagozytoserate der Monozyten bei Inkubation im Vollblut mit Dextran in zunehmender Konzentration und unter Zugabe von LPS; Mittelwerte aus n=10; p<0,05*

3.2.3 EXPERIMENT III –

REZEPTOREXPRESSION ISOLIERTER MONOZYTEN UNTER DEM EINFLUSS KÜNSTLICHER KOLLOIDE UND LPS

Bei aus buffy coat isolierten Monozyten wurde die Expression der Oberflächenrezeptoren CD11a, CD16 und CD71 mit Hilfe der Facs-Analyse bestimmt. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde der Median der Fluoreszenzintensität herangezogen.

3.2.3.1 CD11a Expression isolierter Monozyten unter dem Einfluss künstlicher Kolloide und LPS

Bei der Inkubation isolierter Monozyten wird durch Zugabe von künstlichen Kolloiden mit steigender Konzentration eine Reduktion der CD11a Expression induziert. Diese Auswirkung lässt sich bei Inkubation mit Dextran und HES als Tendenz beobachten, bei Gelatine zeigt sich ein stetiger Verlauf. Eine solche Reaktion auf eine höhere Dosierung der Kolloide ist unter LPS Einfluss nicht mehr nachweisbar. Mit einer statistischen Signifikanz jedoch konnte der Einfluss des LPS selbst nachgewiesen werden, das zu einer um ein Drittel reduzierten CD11a Expression führt.

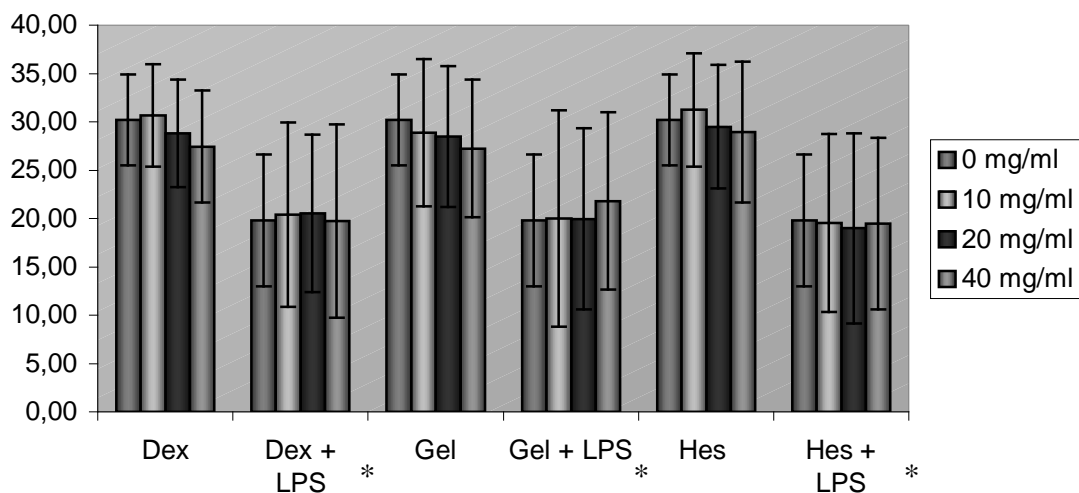


Abbildung 3.12: Mittelwerte und zweifacher Standardfehler der CD11a Expression isolierter Monozyten bei Inkubation mit künstlichen Kolloiden in zunehmender Konzentration und unter Zugabe von LPS; Mittelwerte aus n=6 (n=5 bei LPS), $p < 0,05^*$

3.2.3.2 CD16 Expression isolierter Monozyten unter dem Einfluss künstlicher Kolloide und LPS

Dextran, Gelatine und HES führen zu einer gesteigerten Expression von CD16 auf isolierten Monozyten, wenn diese durch die Zugabe von LPS stimuliert werden. Ohne die Einwirkung des Saccharids haben die Kolloide auch in gesteigerter Konzentration keinen Einfluss auf die Rezeptorexpression. Dahingegen führt schon die alleinige Zugabe von LPS zu einer vermehrten Expression von CD16, die sich mit statistischer Signifikanz nachweisen lässt.

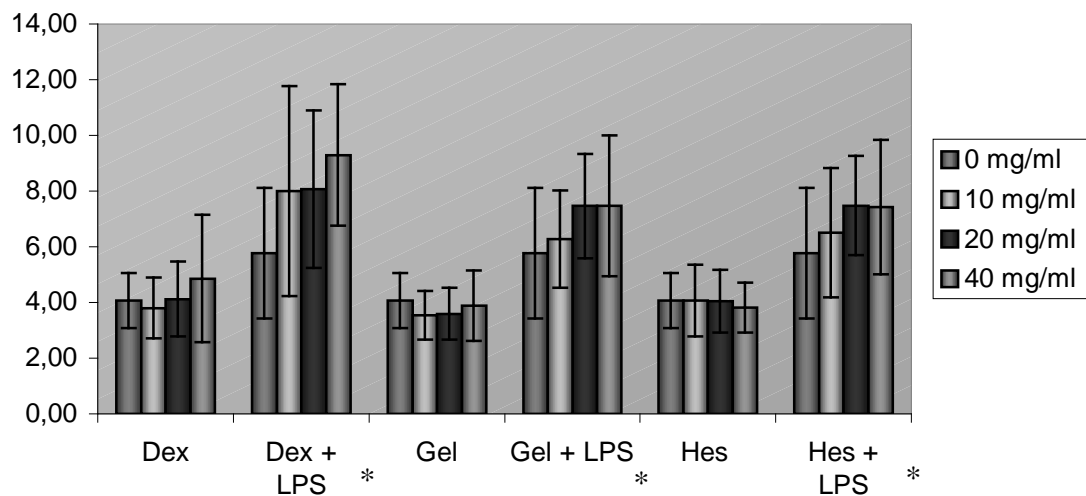


Abbildung 3.13: Mittelwerte und zweifacher Standardfehler der CD16 Expression isolierter Monozyten bei Inkubation mit künstlichen Kolloiden in zunehmender Konzentration und unter Zugabe von LPS; Mittelwerte aus n=6; p<0,05*

3.2.3.3 CD71 Expression isolierter Monozyten unter dem Einfluss künstlicher Kolloide und LPS

Die Expression von CD71 isolierter Monozyten lässt sich ebenfalls durch Inkubation mit LPS signifikant steigern. Steigende Konzentrationen künstlicher Kolloide induzieren unter stimulierten Bedingungen eine weitere Zunahme der Rezeptorexpression. Nur Dextran führt auch ohne LPS Einfluss in Abhängigkeit von seiner Konzentration zu einer erhöhten Rezeptordichte.

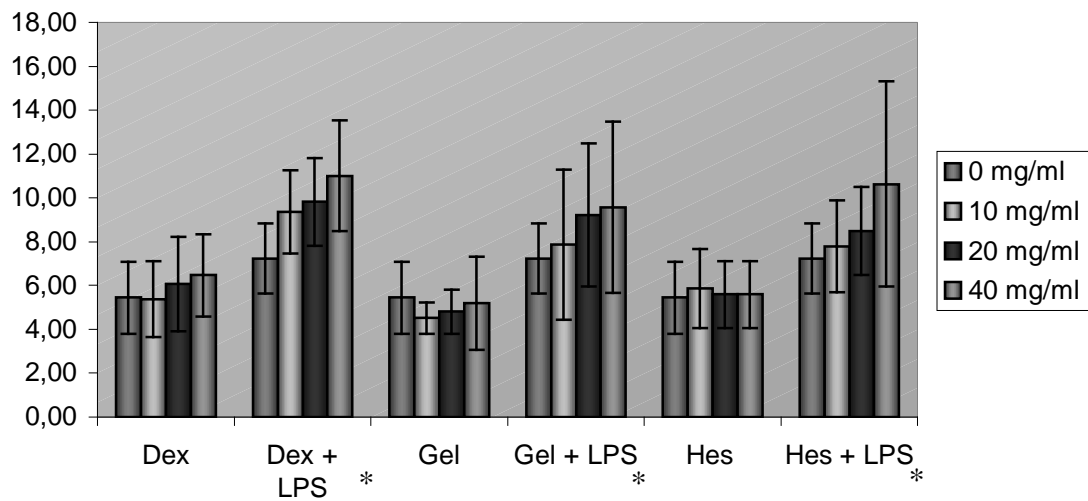


Abbildung 3.14: Mittelwerte und zweifacher Standardfehler der CD71 Expression isolierter Monozyten bei Inkubation mit künstlichen Kolloiden in zunehmender Konzentration und unter Zugabe von LPS; Mittelwerte aus n=6; p<0,05*

4. Diskussion

4.1 Einführung

Die künstlichen Kolloide Dextran, Hydroxyethylstärke und Gelatine haben in der Notfall- und Intensivmedizin sowie im operativen Bereich einen festen Stellenwert in der Patientenversorgung. Dass Kolloide von Zellen des Immunsystems aufgenommen und gespeichert werden, ist bekannt. Inwieweit Dextran, HES und Gelatine dabei die Funktion des Mononukleär-Phagozytären-Systems beeinflussen, ist derzeit Gegenstand vieler Studien. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der künstlichen Kolloide auf die Expression von Oberflächenrezeptoren unter Berücksichtigung des stimulierenden Einflusses von LPS an isolierten Monozyten *in vitro* untersucht. Für die Untersuchungen der Phagozytose von Monozyten unter Kolloideinfluss wurde ebenfalls eine LPS-Exposition durchgeführt. Außerdem wurden die Auswirkungen der Kolloide auf die phagozytäre Kapazität von Monozyten in zwei unterschiedlichen Ansätzen untersucht. Gegenstand der Arbeit waren vergleichende Beobachtungen von isolierten Monozyten versus Monozyten im Vollblut unter Kolloidexposition in unterschiedlichen Konzentrationen.

4.2 Diskussion der einzelnen Ergebnisse

4.2.1 Einfluss von künstlichen Kolloiden auf die Phagozytose isolierter Monozyten in Abhängigkeit von Art und Konzentration des Kolloids *in vitro*

In Anwesenheit aller untersuchten Kolloide sehen wir eine Reduktion der Phagozytose von Latex-Beads bei isolierten Monozyten, die von der Kolloidkonzentration abhängig ist. Je höher die Dosierung des Kolloids ist, mit dem die Monozyten inkubiert werden, desto niedriger ist die phagozytäre Aufnahme von Latex-Beads.

Diese Beobachtung entspricht Untersuchungen von Schulze (97), in denen der gleiche Effekt auftrat. In diesen Studien wurde auch nachgewiesen, dass es zu einer konzentrationsabhängigen Aufnahme von Kolloiden durch Monozyten kommt. Als Erklärungsmodell für diese Beobachtung dient die Annahme, dass Kolloidpartikel anstatt Latex-Beads von den Zellen phagozytiert werden. Diese Theorie konnte durch mikroskopische Untersuchungen bestätigt werden (97).

In vivo können Monozyten während ihrer Verweildauer im Blut Partikel in unbegrenzter Menge phagozytieren und abbauen. Enthalten die Phagosomen jedoch Latex-Beads, so kann der Abbau von ca. 30 Minuten auf über 70 Stunden verzögert werden (27, 131). Eine

verlängerte Phase für den Abbau künstlicher Kolloide muss ebenfalls angenommen werden. Dextran, HES und Gelatine enthalten jeweils Vernetzungen ihrer Moleküle, die einen Abbau durch Lysosomen erschweren (s.1.4). Es muss folglich davon ausgegangen werden, dass die phagozytierten Kolloide während der zwölf Stunden der Inkubation nicht abgebaut werden. Da die Konzentration an Latex-Beads in allen Versuchsansätzen konstant ist und lediglich die Konzentration der Kolloide variiert, werden bei einem steigenden Angebot an Kolloiden verhältnismäßig weniger Latex-Beads aufgenommen. Dies konnte in Experiment I bestätigt werden.

Im Unterschied zu den Ergebnissen von Schulze wurde in dieser Studie eine Abnahme der phagozytären Kapazität isolierter Monozyten auch bei klinisch relevanten Kolloidkonzentrationen beobachtet.

Der klinisch relevante Bereich wird durch die nach Kolloidinfusion im Patienten durchschnittlich nachgewiesenen Serumspiegel festgelegt. Unterschiedlichen Quellen zufolge liegt dieser Bereich zwischen 5 mg/ml und 15 mg/ml (103) respektive 3 mg/ml und 10 mg/ml (31).

Eine signifikante Reduktion der Phagozytose trat in der vorliegenden Studie durch Inkubation mit Gelatine und Dextran bereits bei Konzentrationen von 10 mg/ml auf (HES 40 mg/ml). Eine mögliche Erklärung für eine geringere Aufnahme von HES-Molekülen mag in ihrer Größe liegen. Mit 200 kDa übertreffen sie Dextran- und Gelatinemoleküle um das Drei- bis Sechsfache. Eine Studie mit Latex-Beads ergab eine schrittweise Reduktion der Phagozytose durch Leukozyten bei zunehmender Größe der Beads (10). Es muss also davon ausgegangen werden, dass auch bei Kolloiden die Molekülgröße einen Einfluss auf die Phagozytoserate hat.

4.2.2 Einfluss von LPS auf die Phagozytose isolierter Monozyten in vitro

Lipopolysaccharid ist als Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien einer der stärksten natürlichen Stimuli inflammatorischer Reaktionen (s.1.3). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass isolierte Monozyten durch Inkubation mit LPS über zwölf Stunden eine signifikante Reduktion ihrer phagozytären Kapazität erfahren.

Da die Monozyten von einem Medium umgeben sind, das keine Antikörper oder Bestandteile des Komplementsystems enthält, muss die Phagozytose von Latex-Beads über einen unspezifischen Rezeptor der Monozytenoberfläche vermittelt werden. Einer dieser Rezeptoren ist der Mannose-Rezeptor, der nichtopsonierte Partikel bindet und deren Phagozytose induziert. An den Mannose-Rezeptor binden Kohlenhydratgruppen, wie sie auf der

Zelloberfläche von Mikroorganismen vorkommen (7). Latex-Beads enthalten ebenfalls kohlenhydratähnliche Strukturen, sodass eine Aufnahme über diesen Weg wahrscheinlich ist. Andere Rezeptoren, die nicht opsonierte Partikel binden, sind der CD14 Rezeptor und die so genannten Scavenger-Rezeptoren (79). In vivo sind sie vor allem für die Aufnahme apoptotischer Zellen verantwortlich. Sie binden an Lipopolysaccharide respektive -proteine und könnten für die Phagozytose der Latex-Beads mitverantwortlich sein.

Der CD14 Rezeptor besitzt auch die Bindungsstelle für LPS. Um von diesem Rezeptor erkannt zu werden, ist eine Bindung von LPS an LBP, lipopolysaccharidbindendes Protein, notwendig, das in dem serumfreien Medium der isolierten Monozyten enthalten ist.

Die Reduktion der Phagozytose isolierter Monozyten durch LPS ist signifikant, was beweist, dass das Lipopolysaccharid einen Einfluss auf die Zelle hat. Seine immunmodulatorische Auswirkung entwickelt LPS durch eine Interaktion des CD14 Rezeptors mit dem Toll like Rezeptor 2, die erst zu einer Ausschüttung von Zytokinen wie IL-1, IL-10, GM-CSF, TNF- α führt (130).

IL-10 induziert u.a. eine vermehrte Expression des Mannose-Rezeptors (64). Schon in mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass sich die Aktivität des Mannose-Rezeptors umgekehrt proportional zu einer allgemeinen Immunantwort verhält: Es liegen Daten vor, die belegen, dass eine Inkubation mit 10 mg/ml LPS zu einer verminderten Aktivität des Mannose- und scavenger Rezeptors auf Makrophagen führt (101). Ebenso verhält es sich bei einer Exposition mit Erregern wie *Candida albicans* (102) oder *Leishmania donovani* (11).

In diesem Zusammenhang besteht Grund zur Annahme, dass auch die Aufnahme der Latex-Beads durch isolierte Monozyten über den Mannose respektive scavenger Rezeptor vermittelt wird. Dies kann erklären, warum eine Inkubation der isolierten Monozyten mit LPS zu einer Reduktion ihrer phagozytären Kapazität führt.

4.2.3 Einfluss von künstlichen Kolloiden auf die Phagozytose isolierter Monozyten in Anwesenheit von LPS in vitro

Da sowohl die Anwesenheit von LPS als auch von Kolloiden zu einer verminderten Phagozytose führt, ist es ein erwartetes Ergebnis, dass bei der Zugabe beider Substanzen die Phagozytoserate isolierter Monozyten noch weiter zurückgeht. Auch hier ist eine Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten.

Auch künstliche Kolloide enthalten Kohlenhydratgruppen, die von Mannose-Rezeptoren erkannt und gebunden werden können. Es ist demnach wahrscheinlich, dass Kolloide und Latex-Beads nicht nur im Zellinnern um die Kapazität der Monozyten konkurrieren, sondern

bereits bei der Bindung am Rezeptor in einen Wettstreit eintreten. Dies führt bei einer höheren Konzentration an Kolloiden zu einer relativ verminderten Aufnahme an Latex-Beads.

4.2.4 Einfluss von künstlichen Kolloiden auf die Phagozytose der Monozyten im Vollblut in Abhängigkeit von Art und Konzentration des Kolloids in vitro

Eine Inkubation von Vollblut in vitro über zwölf Stunden mit künstlichen Kolloiden führt zu einer Steigerung der phagozytären Aktivität von Monozyten. In Experiment II konnte gezeigt werden, dass diese Aktivitätserhöhung bei steigenden Konzentrationen der Kolloide noch zunimmt. Für HES und Gelatine ist eine tendenzielle Zunahme in der Phagozytose von Latex-Beads zu beobachten. Dextran stimuliert die Zellen in einer Konzentration von 10 mg/ml und 20 mg/ml signifikant zu einer vermehrten Aufnahme der Partikel (s. 3.2.2). Damit zeigt sich ein entgegengesetztes Verhalten zu der Inkubation isolierter Monozyten (s. oben).

Es ist davon auszugehen, dass die Phagozytose im Vollblut über andere Rezeptoren vermittelt wird als bei isolierten Zellen. Im menschlichen Serum sind Komplementfaktoren und Antikörper vorhanden, die zu einer Opsonierung der Partikel führen (s.1.2.4). Daher stehen bei einer Bindung der zugegebenen Substanzen an Monozyten andere Rezeptoren im Vordergrund.

Mit IgG opsonierte Partikel werden von Monozyten an Fc γ Rezeptoren, z.B. Fc γ RIII (CD16), gebunden (s.1.2.3.2). CR1 (CD35), CR3 (CD11b) und CR4 (CD11c) stehen zur Aufnahme mit Komplement opsonierter Partikel zur Verfügung. Eine – möglicherweise Zytokin vermittelte - Interaktion dieser Rezeptoren ist bekannt. So stimuliert die Phagozytose von mit Komplementfaktoren opsonierten Molekülen Monozyten zu einer vermehrten Phagozytose von IgG-gebundenen Fremdkörpern (16). Umgekehrt führt eine Bindung an CD16 zu einer Aktivitätserhöhung von CR3, der die Phagozytose komplementgebundener Partikel vermittelt (85).

Auch bei diesen für die Phagozytose opsonierter Substanzen verantwortlichen Rezeptoren ist von einer Konkurrenz zwischen Latex-Beads und Kolloiden um die Rezeptorbindung auszugehen. Da jedoch die Bindung an einen Rezeptor hier im Sinne eines positiven Feedbacks die phagozytäre Kapazität der Zelle insgesamt erhöht, kann die Anwesenheit von Kolloiden im Sinne eines vermehrten Angebots auch die Aufnahme von Latex-Beads steigern. Über den gleichen Mechanismus wäre auch die Zunahme der Phagozytose unter steigenden Kolloidkonzentrationen zu erklären. Die Möglichkeit der Monozyten, ihre phagozytäre Kapazität auszudehnen, scheint in Anwesenheit von $2 \cdot 10^9$ Latex-Beads/ ml jedoch bereits weitgehend ausgeschöpft. Eine signifikante oder lineare Steigerung ist durch

eine höhere Dosierung der Kolloide nicht mehr zu erreichen. Hier bildet Dextran eine Ausnahme. Das Polysaccharid steigert als Einziges der untersuchten künstlichen Kolloide im klinisch relevanten Konzentrationsbereich die Phagozytose von Monozyten im Vollblut signifikant. In einer Konzentration von 40 mg/ml führt Dextran jedoch zu einer geringeren Aufnahme von Latex-Beads als in der niedrigeren Dosierung von 20 mg/ml. Möglicherweise ist die Oberflächenbeschaffenheit der Dextranmoleküle für eine Opsonierung der von Latex-Beads oder anderen Kolloiden weit überlegen. Das könnte zu der besseren Stimulierung der monozytären Phagozytose durch Dextran, sowie einem Selektionsvorteil gegenüber den Latex-beads in einer Konzentration von 40 mg/ml führen. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die rückläufige Aufnahme der Latexpartikel bei hohen Dextrankonzentrationen. Belege hierfür liegen jedoch nicht vor.

4.2.5 Einfluss von LPS auf die Phagozytose der Monozyten im Vollblut in vitro

Unter dem Einfluss von Lipopolysaccharid findet im Vollblut eine Zunahme der Phagozytose durch Monozyten statt. Die Anzahl der aufgenommenen Latex-Beads steigt auf mehr als das Dreifache.

Dieser Effekt kann über die LPS –induzierte Zytokinausschüttung erklärt werden (s.1.3). Die Rezeptoren, die auf Monozyten für eine Bindung mit opsonierten Substraten zur Verfügung stehen (s.o.), reagieren auf die Zytokinerhöhung mit einer gesteigerten Rezeptoraktivität oder einer vermehrten Expression auf der Zelloberfläche. Da über diese Rezeptoren auch die Phagozytose vermittelt wird, erweitert sich die phagozytäre Kapazität von Monozyten durch die erhöhte Rezeptorenzahl oder –aktivität erheblich. Am besten untersucht ist der Einfluss auf Rezeptoren durch TNF- α , das sowohl die komplement- als auch die anikörpervermittelte Phagozytose positiv beeinflusst (46).

4.2.6 Einfluss von künstlichen Kolloiden auf die Phagozytose der Monozyten im Vollblut in Anwesenheit von LPS in vitro

Alle untersuchten Kolloide führen auch in Anwesenheit von LPS zusätzlich zu einer leichten Zunahme der Phagozytose von Monozyten im Vollblut. Dieser Einfluss ist allerdings nur als Tendenz zu beobachten und tritt für HES und Gelatine erst ab einer Konzentration von 20 mg/ml auf. Das hohe Niveau des phagozytären Umsatzes, wie es durch die LPS-induzierte Zytokinausschüttung bereits erreicht wurde, wird in Anwesenheit der Kolloide nochmals ein wenig angehoben. Diese Daten lassen vermuten, dass auch unter dem immunstimulierenden Einfluss von LPS eine Rezeptorinteraktion stattfindet. So ist es den Kolloiden durch ihr

vermehrtes Angebot zur Phagozytose in höheren Konzentrationen möglich, die Aufnahme durch die Zelle noch weiter zu stimulieren. Eine Ausnahme bildet auch hier wieder Dextran, das in einer Konzentration von 40 mg/ml zu einer Reduktion der Phagozytose von Latex-Beads führt: Es werden sogar mehr als die Hälfte weniger Partikel aufgenommen als ohne Kolloidzugabe. Hierfür könnte ebenfalls die besondere Oberflächenbeschaffenheit des Polysaccharids eine Erklärung bieten (s.1.4.1.1).

Insgesamt ist aus den erhobenen Daten festzuhalten, dass der Einfluss der untersuchten künstlichen Kolloide auf die Phagozytose von Monozyten im Vollblut in eine völlig andere Richtung weist als es aus den Untersuchungen an isolierten Monozyten zu erwarten wäre. Dextran, Hydroxyethylstärke und Gelatine führen zu einer gesteigerten phagozytären Kapazität der Zellen und üben diesen Einfluss auch in Anwesenheit des Endotoxins LPS weiter aus. Als Erklärung hierfür kommt eine Interaktion mit Antikörpern und Komplement aus dem Serum in Frage.

4.2.7 Einfluss von künstlichen Kolloiden und LPS auf die Expression von CD11a auf isolierten Monozyten in Abhängigkeit von Art und Konzentration des Kolloids in vitro

Alle untersuchten künstlichen Kolloide haben einen nicht signifikanten Einfluss auf die Expression von CD11a auf Monozyten. Tendenziell ist eine verminderte Expression bei steigenden Kolloidkonzentrationen zu beobachten, bei Gelatine einem linearen Verlauf entsprechend, jedoch ebenfalls ohne statistische Signifikanz. Diese Daten entsprechen Versuchen von Hahn, der ebenfalls keinen signifikanten Einfluss von Gelatine auf die Expression von CD11a bei isolierten Monozyten feststellen konnte (44). Eine deutlich erhöhte Rezeptorzahl lässt sich jedoch durch Inkubation mit LPS etablieren. Da die Adhäsion im Rahmen der Immunantwort eine entscheidende Rolle spielt (s. 1.2.3.1), entspricht der Nachweis einer vermehrten Expression des CD11a-Rezeptors den klinischen Erwartungen. Unter Stimulation mit LPS ist auch die tendenzielle Reduktion der Rezeptorexpression nicht mehr nachzuweisen. Damit gibt es keinen Anhalt für einen relevanten Einfluss der untersuchten künstlichen Kolloide in Konzentrationen bis zu 40 mg/ml auf die Expression des Adhäsionsrezeptors CD11a in vitro. Daten aus veröffentlichten Untersuchungen lassen vermuten, dass das Potenzial für eine gesteigerte Adhäsion im Rahmen der Immunantwort nicht in erster Linie durch eine vermehrte CD11a-Expression bedingt ist sondern initial durch eine vermehrte Präsenz seines Liganden ICAM-1 (104). Erst im weiteren Verlauf der

Immunreaktion wird auch die Zahl an CD11a-Rezeptoren erhöht, wie wir es nach der LPS-Stimulation beobachten konnten.

4.2.8 Einfluss von künstlichen Kolloiden und LPS auf die Expression von CD16 auf isolierten Monozyten in Abhängigkeit von Art und Konzentration des Kolloids in vitro

Der Fc γ III Rezeptor CD16 wird durch Gelatine und HES in seiner Expression tendenziell eingeschränkt, doch ohne statistische Signifikanz oder linear nachweisbaren Einfluss der Konzentrationszunahme. In den Untersuchungen von Hahn war der Einfluss von Gelatine auf die Rezeptorexpression jedoch signifikant (44). Dextran führt in einer Konzentration von 40 mg/ml zu einer leicht erhöhten Expression von CD16. Einen signifikanten Einfluss auf die Expression des Rezeptors kann für keines der untersuchten Kolloide festgestellt werden. Ebenso verhält es sich unter LPS-Exposition. Unter stimulierten Bedingungen zeichnet sich zwar eine erhöhte Expression von CD16 unter steigenden Kolloidkonzentrationen ab, ein signifikanter Einfluss ist jedoch nicht nachweisbar.

Eindeutig ist hier die Auswirkung von LPS selbst nachgewiesen, die zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der CD16-Expression führt. Dieses Ergebnis bestätigt Untersuchungen an neutrophilen Granulozyten, die auf LPS-Exposition in vitro ebenfalls mit einer erhöhten Rate an CD16 Rezeptoren reagierten (121).

Dass mit einer Steigerung der CD16-Expression keine erhöhte Phagozytoserate einhergeht, wird aus der oben geführten Diskussion bereits klar. Isolierten Monozyten steht der Fc γ III Rezeptor zur Induktion der Phagozytose nicht zur Verfügung. Trotz einer erhöhten Präsenz kann er in Abwesenheit von Antikörpern keinen Beitrag zur Immunabwehr leisten. Das unterstützt die These, dass auf isolierten Monozyten die Phagozytose vor allem über den Mannose-Rezeptor und andere Oberflächenmarker vermittelt wird, die in der Lage sind, nicht opsonierte Bestandteile zu binden.

4.2.9 Einfluss von künstlichen Kolloiden und LPS auf die Expression von CD71 auf isolierten Monozyten in Abhängigkeit von Art und Konzentration des Kolloids in vitro

CD71 ist als Transferrinrezeptor für die Eisenaufnahme in die Zelle verantwortlich. Eine Steigerung der Rezeptorexpression kann durch Kolloide in steigenden Konzentrationen beobachtet werden. Jedoch ist hierfür die Anwesenheit von LPS notwendig. Die Steigerung der Rezeptorzahl an der Zelloberfläche verläuft dann linear, entsprechend einer zunehmenden

Kolloidkonzentration, und ist sowohl unter Dextran- und Gelatine- als auch unter HES-Einfluss zu beobachten. Eine statistische Signifikanz lässt sich jedoch für keines der untersuchten Kolloide nachweisen. LPS selbst hat auch hier einen deutlich immunstimulierenden Einfluss, da es zu einer signifikanten Rezeptorinduktion führt. Entsprechend ihrer pathophysiologischen Bestimmung erhöhen Monozyten die Eisenaufnahme während eines Entzündungsgeschehens. Sie dienen dem Organismus als Eisenspeicher und entziehen pathogenen Keimen ihre Grundlage zum Eisenstoffwechsel (107). So wurde bereits nachgewiesen, dass eine Exposition mit gramnegativen Bakterien zu einer Induktion des Transferrinrezeptors auf Endothelzellen führt (90). Dass LPS als Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien bei Monozyten zu einem vergleichbaren Resultat führt, ist ein aus klinischer Sicht erwartetes Ergebnis und konnte hier nachgewiesen werden.

Eine wichtige Beobachtung ist, dass keines der untersuchten Kolloide einen statistisch relevanten Einfluss auf die Expression der Rezeptoren hat. Auch die Auswirkung von LPS auf die Rezeptorexpression wird durch die Kolloide Dextran, HES und Gelatine in einem Konzentrationsbereich von 10 mg/ml bis 40 mg/ml nicht beeinflusst.

5. Zusammenfassung

Dextran, Hydroxyethylstärke und Gelatine gehören zu den Standardtherapeutika in der Versorgung von Notfallpatienten. Sie werden als Plasmaexpander vor allem zur Kreislaufstabilisierung im Schock eingesetzt. Aus der Notfallversorgung sowie im Operationssaal und auf der Intensivstation sind sie als essenzieller Bestandteil der adäquaten medizinischen Versorgung nicht wegzudenken. In der Literatur wird ihr Einsatz jedoch kontrovers diskutiert. Ein Grund hierfür ist der Einfluss der künstlichen Kolloide auf das menschliche Immunsystem.

Als wichtiger Bestandteil der Immunreaktion tragen Monozyten zum Abbau von Fremdmaterial bei. Sie phagozytieren Partikel und verändern im Rahmen der Immunantwort ihre Zahl an Oberflächenrezeptoren. Inwieweit diese Reaktionen durch künstliche Kolloide *in vitro* beeinflusst werden, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Da die Experimente zur Phagozytose sowohl an isolierten Monozyten als auch im Vollblut durchgeführt wurden, können aus den Daten Vergleiche gezogen werden, die den Einfluss von Substanzen aus dem Serum mitberücksichtigen. Zusätzlich wurde allen Ansätzen LPS hinzugefügt. Das Lipopolysaccharid induziert als Bakterienendotoxin im lebenden Organismus starke Immunreaktionen bis hin zum septischen Schock. Somit konnte zusätzlich untersucht werden, inwieweit künstliche Kolloide die Reaktion der Monozyten auf den Stimulus LPS beeinflussen.

Isolierte Monozyten wurden mit Dextran, HES und Gelatine jeweils in Konzentrationen von 10, 20 und 40 mg/ml inkubiert. Unter Berücksichtigung eines Einflusses von LPS (100 ng/ml) wurde die Phagozytosekapazität der Monozyten für fluoreszenzmarkierte Latex-Beads in der FACS-Analyse untersucht: Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Einschränkung der phagozytären Leistung unter steigenden Kolloidkonzentrationen, bei Inkubation mit Dextran und Gelatine bereits in klinisch relevanten Konzentrationen von 10 mg/ml. Der Einfluss von LPS ist ebenfalls signifikant und führt zu einem zusätzlichen Rückgang der Phagozytose. Die gleichen Inkubationsversuche wurden an Monozyten im Vollblut wiederholt. Dabei kam es zu einer Zunahme der phagozytären Kapazität unter steigenden Kolloidkonzentrationen. Dextran erhöht die phagozytäre Leistung von Monozyten in Konzentrationen von 10 mg/ml und 20 mg/ml sogar signifikant. Der stimulierende Einfluss der Kolloide ist auch unter LPS-Einfluss zu beobachten, wobei Dextran in einer Konzentration von 40 mg/ml zu einer eingeschränkten Phagozytose der Latex-Beads führt. LPS selbst führt zu einer signifikanten Phagozytosesteigerung. Ein wichtiges Ergebnis ist die unterschiedliche Wirkung der Kolloide auf die Phagozytose der Monozyten in Abhängigkeit vom umgebenden Medium. Dies lässt

vermuten, dass die im Serum vorhandenen Zytokine sowie Komplementfaktoren und Antikörper eine entscheidende Auswirkung auf Art und Ausprägung der Phagozytose haben. Vor allem der unterschiedliche Weg der rezeptorvermittelten Aufnahme und Phagozytoseinduktion von opsonierten und nicht opsonierten Partikeln könnte hierfür eine Erklärung sein.

In einem weiteren Ansatz wurden isolierte Monozyten mit Dextran, HES und Gelatine jeweils in der gleichen Konzentration von 10, 20 und 40 mg/ml inkubiert. Im Anschluss wurden sie mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern für CD11a, CD16 und CD71 markiert und die Expression dieser Rezeptoren in der FACS-Analyse untersucht. Der Einfluss von LPS (100 ng/ml) wurde ebenfalls berücksichtigt. Für keines der untersuchten Kolloide unabhängig von der Konzentration konnte hierbei ein signifikanter Einfluss festgestellt werden. Die Inkubation mit LPS führte jedoch zu einer Reduktion der Expression von CD11a sowie zu einer gesteigerten Expression von CD16 und CD71. Die Auswirkungen des Lipopolysaccharids wurden durch die Kolloide ebenfalls nicht beeinflusst.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Dextran und Gelatine in klinisch relevanten Konzentrationen *in vitro* einen Einfluss auf Monozyten und ihre Fähigkeit zur Phagozytose haben, nicht jedoch auf die Expression der untersuchten Rezeptoren.

Es erscheint schwierig, aus diesen Daten auf eine klinische Relevanz zu schließen. Vor allem die vergleichenden Versuche zur Phagozytose im Vollblut lassen vermuten, dass *in vivo* der Einfluss der künstlichen Kolloide von den vielfachen immunmodulierenden Abläufen im Organismus überschattet wird. Allenfalls Dextran provoziert in den vorliegenden Untersuchungen eine derart ausgeprägte Veränderung des phagozytären Verhaltens der Monozyten in jeweils unterschiedliche Richtungen, dass hier eine klinische Bedeutung möglich erscheinen kann. Um jedoch valide Aussagen in diesem Zusammenhang machen zu können und um den Einfluss der Serumbestandteile auf die Phagozytose genauer zu beurteilen, sind weitere Studien erforderlich.

Literaturverzeichnis

1. Aderem, A., Underhill, D.M (1999)
Mechanisms of phagocytosis in macrophages
Annu Rev Immunol, 17, 593-623
2. Aleixo, L.F., Goodenow, M.M., and Sleasman, J.W. (1995)
Molecular analysis of highly enriched populations of T-cell-depleted monocytes
Clin.Diagn.Lab Immunol., 2, 733-739
3. Allison, K.P., Gosling, P., Jones, S. (1999)
Randomized trial of hydroxyethyl starch versus gelatine for trauma resuscitation
J Trauma, 47, 1114-1121
4. Alvarez, B., Domenech, N., Alonso, F., Sanchez, C., Gomez, M., Ezquerro, A., Dominguez, J. (2000)
Molecular and functional characterization of porcine LFA-1 using monoclonal antibodies to CD11a and CD18
Xenotransplantation, 7, 258-266
5. Anderson, C.L. (1982)
Isolation of the receptor for IGG from a human monocyte cell line (U937) and from human peripheral blood monocytes
J Exp Med, 156, 1794-1806
6. Andreesen, R., Brugger, W., Scheibenbogen, C., Kreutz, M., Leser, H.G., Rehm, A., Lohr, G.W. (1989)
Surface phenotype analysis of human monocyte to macrophage maturation
J Leuk Biol, 47, 490-497
7. Apostolopoulos, V., McKenzie, I.F. (2001)
Role of the mannose receptor in the immune response
Curr.Mol.Med, 1, 469-474
8. Artursson, P., Arro, E., Edman, P., Ericsson, J.L., Sjöholm, I. (1987)
Biodegradable microspheres. V: Stimulation of macrophages with microparticles made of various polysaccharides
J Pharm.Sci, 76, 127-133
9. Audran, R., Lesimple, T., Delamaire, M., Picot, C., Van Damme, J., Toujas, L. (1996)
Adhesion molecule expression and response to chemotactic agents of human monocyte-derived macrophages
Clin Exp Immunol, 103, 155-160

10. Ayhan, H. (1995)
Phagocytosis of monosize polystyrene-based microspheres having different size and surface properties
J Biomater Sci Polym Ed, 7, 329-342
11. Basu, N., Sett, R., Das, P.K. (15-7-1991)
Down-regulation of mannose receptors on macrophages after infection with *Leishmania donovani*
Biochem.J, 277 (Pt 2), 451-456
12. Bauer, C. (1999)
Blutverlust: Physiologische Anpassungsmechanismen und therapeutischer Ersatz
Anästhesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther., 34, 764-769
13. Beekhuizen, H., Blokland, I., van Furth, R. (1993)
Cross-Linking of CD14 Molekules on Monocytes Results in a CD11/CD18- and ICAM-1-Dependent Adherence to Cytokine-Stimulated Human Endothelial Cells
J Immunol, 150, 950-959
14. Beyer, U., Roth, T., Schumacher, P., Maier, G., Unold, A., Frahm, A.W., Fiebig, H.H., Unger, C., Kratz, F. (1998)
Synthesis and in vitro efficacy of transferrin conjugates of the anticancer drug Chlorambucil
J Med Chem, 41, 2701-2708
15. Bianchi, D.W., Yih, M.C., Zickwolf, G.K., Flint, A.F. (1994)
Transferrin Receptor (CD71) expression on circulating mononuclear cells during pregnancy
Am J Obstet Gynecol, 170, 202-206
16. Bobak, D.A., Gaither, T.A., Frank, M.M., Tenner, A.J. (1987)
Modulation of FcR function by complement: subcomponent C1q enhances the phagocytosis of IgG-opsonized targets by human monocytes and culture-derived macrophages
J Immunol, 138, 1150-1156
17. Boldt, J., Lenz, M., Kumle, B., Papsdorf, M. (1998)
Volume replacement strategies on intensive care units: results from a postal survey
Intensive Care Med, 24, 147-151
18. Brazeal, B.A., Honeycutt, D., Traber, L.D., Toole, J.G., Herndon, D.N., Traber, D.L. (1995)
Pentafraction for superior resuscitation of the ovine thermal burn
Crit Care Med, 23, 332-339

19. Cazzola, M., Bergamaschi, G., Dezza, L., Arosio, P. (1990)
Manipulations of cellular iron metabolism for modulating normal and malignant cell proliferation: achievements and prospects
Blood, 75, 1903-1919
20. Clark, W.R. (1980)
Structure of the immune system
in: Clark, W.R.: *The experimental foundations of modern immunology*, 10-27
John Wiley & Sons, New York
21. Clarkson, S.B., Ory, P.A. (1988)
CD16 - developmentally regulated IgG receptors on cultured human monocytes
J Exp Med, 167, 408-417
22. Cohen, L., Haziot, A., Shen, D.R., Lin, X.Y., Sia, C., Harper, R., Silver, J., Goyert, S.M. (1995)
CD14-independent responses to LPS require a serum factor that is absent from neonates
J Immunol, 155, 5337-5342
23. Cook, J.D., Skikne, B.S., Baynes, R.D. (1993)
Serum transferrin receptor
Annu Rev Med, 44, 63-74
24. Cooper, E.L. (1982)
Macrophages and Monocytes
in: Cooper, E.L: *General Immunology*, 79-91
Pergamon Press, New York
25. Cotton, M., Langle-Rouault, F., Kirlappos, H., Wagner, E., Mechtler, K., Zenke, M., Beug, H., Birnstiel, M.L. (1990)
Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: Stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels
Proc Natl Acad Sci, 87, 4033-4037
26. Creutz, C.E.(1992)
The annexins and exocytosis
Science, 258, 924-931
27. De Chastellier, C. (1997)
Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle
Eur J Cell Biol, 174, 49-62

28. De Jonge, E., Levi, M. (2001)
Effects of different plasma substitutes on blood coagulation: a comparative review
Crit Care Med, 29, 1261-1267
29. Dieterich, H.J. (2001)
Kolloide in der Intensivmedizin
Anaesthesist, 50, 54-68
30. Dieterich, H.J. (2001)
Kristalloide versus Kolloide - a never ending story?
Anaesthesist, 50, 432-435
31. Dieterich, H.J. (2003)
Penetration of intravenous hydroxyethyl starch into the cerebrospinal fluid in patients with impaired blood-brain barrier function
Aneast Analg, 96, 1150-1154
32. Dieterich, H.J., Unertl, K. (1998)
Volumenersatz mit künstlichen Kolloiden
Anästhesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther., 33, 250
33. Edelson, P.J. (1980)
Monocytes and macrophages: Aspects of their cell biology
in: Weissmann, G.: The cell biology of inflammation, 469-495
Elsevier/ North-Holland Biomedical Press,
34. Edelson, P.J., Zwiebel, R., Cohn, Z.A. (1975)
The pinocytotic rate of activated macrophages
J Exp Med., 142, 1150-1164
35. Fingerle, G, Pforte, A., Passlick, B., Blumenstein, M., Strobel, M., Ziegler-Heitbrock, H.W. (1993)
The novel subset of CD 14+ /CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients
Blood, 82, 3170-3176
36. Fulton, S.A., Johnsen, J.M., Wolf, S.F., Sieburth, D.S., Boom, W.H. (1996)
Interleukin-12 Production by Human Monocytes Infected with Mycobacterium tuberculosis: Role of Phagozytosis
Infect.Immun., 64, 2523-2531
37. Funk, W., Maldinger, V. (1995)
Microcirculatory perfusion during volume therapy: a comparative study using crystalloid or colloid in awake animal
Anaesthesiology, 82, 975-982

38. Gallandat Huet, R.C., Siemons, A.W., Baus, D., Rooyen-Butijn, W.T., Haagenaars, J.A., van Oeveren, W., Bepperling, F. (2000)
A novel hydroxyethyl starch (Voluven) for effective perioperative plasma volume substitution in cardiac surgery
Canadian J Anaesth, 47 , 1207-1215
39. Galon, J., Gauchat, J.F., Mazieres, N., Spagnoli, R., Storkus, W., Lotze, M., Bonnefoy, J.Y., Fridman, W.H., Sautes, C. (1996)
Soluble Fcgamma receptor type III (FcgammaRIII, CD 16) triggers cell activation through interaction with complement receptors
J Immunol, 157, 1184-1192
40. Gegner, J.A., Ulevitch, R.J., Tobias, P.S. (1995)
Lipopolysaccharid (LPS) signal transduction and clearance
J Biol Chem, 270, 5320-5325
41. Gessl, A. Willheim, M., Spittler, A., Agis, H., Krugluger, W., Boltz-Nitulescu, G. (1994)
Influence of tumor necrosis factor-alpha on the expression of Fc IgG and IgA receptors, and on other markers by cultured human blood monocytes and U937 cells
Scand.J.Immunol., 39, 151-156
42. Guggiari, M., Georgescu, H. (1994)
The injured brain. Basis for hydroelectrolytic and hemodynamic resuscitation
Ann Fr Anesth Reanim, 13, 98-104
43. Guha, M., Mackman, N. (2000)
LPS induction of gene expression in human monocytes
Cellular Signaling, 13 , 85-94
44. Hahn, O. (2000)
Der Einfluß von Gelatinepräparaten auf die Immunfunktion humaner Monozyten in vitro
Medizinische Dissertation, Universität Tübingen
45. Hailman, E., Vasselon, T., Kelley, M., Busse, L.A., Hu, M.C., Lichenstein, H.S., Detmers, P.A., Wright, S.D. (1996)
Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of lipopolysaccharide and soluble CD14
J Immunol, 156, 4384-4390
46. Hepburn, A.L., Mason, J.C., Davies, K.A. (2004)
Expression of Fc{gamma} and complement receptors on peripheral blood monocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis
Rheumatology.(Oxford), 43, 547-554

47. Hernandez, D., de Rojas, F., Martinez, Escribano, C., Arriaga, F., Cuellar, J., Molins, J., Barber, L. (2002)
Fatal dextran-induced allergic anaphylaxis
Allergy, 57, 862
48. Holländer, G. Seger, R.A. (1994)
Aufbau und Funktion des Immunsystems
in: Wahn, U., Seger, R., Wahn, V.: Pädiatrische Allergologie und Immunologie
Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, New York
49. Homsy, J., Meyer, M., Tateno, M., Clarkson, S., Levy, J.A. (1982)
The Fc and not CD4 receptor mediates antibody enhancement of HIV infection in human cells
Science, 244, 1357-1360
50. Hubner, F., Sander, C (1995)
Doppler ultrasound findings in hemodialysis with hydroxyethylstarch in intrauterine fetal retardation
Geburtshilfe Frauenheilkd., 55, 87-92
51. Jurecka, W. (1998)
Befunde zur Speicherung künstlicher Kolloide beim Menschen
Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther., 33, 264-268
52. Kapsogeorgou, E.K., Dimitriou, I.D., Abu-Helu, R.F., Moutsopoulos, H.M., Manoussakis, M.N. (2001)
Activation of epithelial and myoepithelial cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome: high expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM.1) in biopsy specimens and cultured cells
Clin Exp Immunol, 124, 126-133
53. Kawanaka, N., Yamamura, M., Aita, T., Morita, Y., Okamoto, A., Kawashima, M., Iwahashi, M., Ueno, A., Ohmoto, Y., Makino, H. (2002)
CD14+, CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis
Arthritis & Rheumatism, 46, 2578-2586
54. Keller, R. (1994)
Adhäsionsmoleküle
in: Keller, R.: Immunologie und Immunpathologie, 48-52
4, Thieme, Stuttgart, New York
55. Kilian, J., Spilker, D., Borst, R. (1975)
The effect of 6% hydroxyethyl starch, 45% dextran 60 and 5.5% oxy-polygelatine on blood volume and circulation in human volunteers
Anaesthesist, 24, 193-197

56. Kinder, O. (2000)
Ischämie und Reperfusionsschaden in der klinischen Lebertransplantation -
Verlauf der löslichen Adhäsionsmoleküle sICAM-1 und sVCAM-1 aus
humanem Serum im Zusammenhang mit dem Ischämie-Reperfusionsschaden
Medizinische Dissertation, Universität Tübingen
57. Krombach, F. (1995)
Zytokininduktion durch kolloidale Plasmaersatzmittel?
Infusionsther Transfusionsmed, 22, 330-331
58. Kumle, B., Boldt, J., Piper, S., Schmidt, C., Suttner, S., Salopek, S. (1999)
The influence of different intravascular volume replacement regimes on renal
function in the elderly
Aneast Analg, 89, 1124-1130
59. Langermans, J.A., Hazenbos, W.L., van Furth, R.(14-9-1994)
Antimicrobial functions of mononuclear phagocytes
J.Immunol.Methods, 174, 185-194
60. Laubenthal, H., Sirtl, C. (1998)
HES, Dextran und Gelatine - Indikationen und Verträglichkeit
Anästhesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther., 33, 251-255
61. Lennard, N.S., Vijayasekar, C., Tiivas, C., Chan, C.W., Higman, D.J., Imray,
C.H. (2003)
Control of emboli in patients with recurrent or crescendo transient ischaemic
attacks using preoperative transcranial doppler-directed dextran therapy
Br J Surg, 90, 166-170
62. Locher, C.H., Vanham, G. (1994)
Expression patterns of FCgamma receptors, HLA-DR and selected adhesion
molecules on monocytes from normal and HIV-infected individuals
Clin Exp Immunol, 98, 115-122
63. Logason, K., Bergqvist, D., (2001)
Low molecular weight heparin (enoxaparin) versus dextran in the prevention of
early occlusion following arterial bypass surgery distal to the groin
Eur J Vasc Endovasc Surg, 21, 261-265
64. Longoni, D., Piemonti, L., Bernasconi, S., Mantovani, A., and Allavena, P.
(1998)
Interleukin-10 increases mannose receptor expression and endocytic activity in
monocyte-derived dendritic cells
Int.J Clin.Lab Res, 28, 162-169

65. Lutz, H. (1986)
Plasmaersatzmittel
Georg Thieme Stuttgart, New York
66. Lydyard, P. Grossi, C. (1995)
Mononukleäre Phagozyten,
in: Roitt, I., Brostoff J. Male D: Kurzes Lehrbuch der Immunologie; 23-26
3., Thieme, Stuttgart
67. Lydyard, P. Grossi C (1995)
Myeloische Zellen
in: Roitt, I. Brostoff J., Male D.: Kurzes Lehrbuch der Immunologie; 143-144
3., Thieme, Stuttgart
68. Maassen, M.M., Pfister, M., Plontke, S., Koitschev, A., Vogler, A., Lowenheim,
H. (2002)
Recovery of hearing: results of delayed medical treatment in patients with
idiopathic sudden hearing loss
HNO, 50, 1062-1067
69. Märki, H.H., Kuhlmann, U., Siegenthaler, W., Siegenthaler, G. (1979)
Stoffwechsel
in: Siegenthaler, W.: Klinische Pathophysiologie, 34-285
4, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
70. McGrath, A.M., Conhaim, R.L., Myers, G.A., Harms, B.A. (1996)
Pulmonary vascular filtration of starch-based macromolecules: effects on fluid
balance
J Surg Res, 65, 128-134
71. Mentzer, S.J, Gromkowski, S.H., Krensky, A.M., Burakoff, S.J., Martz, E.
(1985)
LFA-1 membrane molecule in the regulation of homotypic adhesion of human B
lymphocytes
J Immunol, 135, 9-11
72. Merikallio, E. (1976)
Haemodilution in cardiopulmonary bypass using gelatine derivate for priming
Ann Chir Gynaecol, 65, 138-144
73. Mortelmans, Y.J., Vermaut, G., (1995)
Effects of 6% hydroxyethylstarch and 3% modified fluid gelatine on
intravascular volume and coagulation during intraoperative hemodilution
Anaesth Analg, 81, 1235-1242

74. Muir, J.J., Church, E.J., Weinmeister, K.P. (2003)
Epidural hematoma associated with dextran infusion
South Med J, 96, 811-814
75. Nearman, H.S., Herman, M.L. (1991)
Toxic effects of colloids in the intensive care unit
Critical Care Clinics, 7, 713-723
76. Nibbering, P.H., Zomerdijk, T.P., Corsel-Van Tilburg, A.J., van Furth, R. (1990)
Mean cell volume of human blood leucocytes and resident and activated murine macrophages
J.Immunol.Methods, 129, 143-145
77. Nitsch, E. (1998)
Volumenersatz mit künstlichen Kolloiden
Anästhesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther., 33, 255-260
78. Ostgaard, G., Onarheim, H. (1996)
Retention and distribution of polygeline (Haemaccel) in the rat
Acta Anaesthesiol Scandinavica, 40, 96-101
79. Palecanda, A. Kobzik, L. (2001)
Receptors for unopsonized particles: the role of alveolar macrophage scavenger receptors
Curr.Mol.Med, 1, 589-595
80. Pasteur, J. (1861)
Sur la fermentation visqueuse et la fermentation butyrique
Bull.Soc.chim.Fr., 8, 30-31
81. Patarroyo, M. (1994)
Adhesion molecules mediating recruitment of monocytes to inflamed tissue
Immunobiology, 191, 474-477
82. Petroianu, G.A., Maleck, W.H., Koetter, K.P., Liu, J., Schmitt, A. (2003)
Effect of in vitro hemodilution with hydroxyethyl starch and dextran on the activity of plasma clotting factors
Crit Care Med, 31, 250-254
83. Ponka, P. Lok, C.N. (1999)
The transferrin receptor: role in health and disease
Int J Biochem Cell Biol, 31, 1111-1137
84. Poxton, I.R. (1995)
Antibodies to lipopolysaccharid
J Immunol Methods, 186, 1-15

85. Preynat-Seauve, O., Villiers, C.L., Jourdan, G., Richard, M.J., Plumas, J., Favier, A., Marche, P.N., Favrot, M.C. (2004)
An interaction between CD16 and CR3 enhances iC3b binding to CR3 but is lost during differentiation of monocytes into dendritic cells
Eur J Immunol, 34, 147-155
86. Pryjma, J. Baran, J., Ernst, M., Woloszyn ,M., Flad, H.D. (1994)
Altered antigen-presenting capacity of human monocytes after phagocytosis of bacteria
Infect.Immun., 62, 1961-1967
87. Qian, Z.M., Li, H., Sun, H., Ho, K. (2002)
Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway
Pharmacological reviews, 54, 561-587
88. Randolph, G.J., Sanchez-Schmitz, G., Liebman, R.M., Schakel, K. (2002)
The CD16+ (Fc gamma RIII+) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting
J Exp Med, 196, 517-527
89. Riber, U., Lind, P. (1998)
Interaction between *Salmonella typhimurium* and phagocytic cells in pigs
Phagocytosis, oxidative burst and killing in polymorphonuclear leukocytes and monocytes
Veterinary Immunology and Immunopathology, 67, 259-270
90. Robert, A. (2000)
Alteration of epithelial cell transferrin-iron homeostasis by *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*
Cellular Microbiology, 2, 207-218
91. Robless, P.A., Tegos, T.J., Okonko, D., Mansfield, A.O., Nicolaides, A.N., Mikhailidis, D.P., Stansby, G.(2002)
Platelet activation during carotid endarterectomy and the antiplatelet effect of Dextran 40
Platelets, 13, 231-239
92. Sakka, S.G., Reinhart ,K. (1998)
Volumetherapie im septischen Schock
Anästhesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther., 33, 260-264
93. Sanches-Torres, C., Garcia-Romo, G.S., (2001)
CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD 4+ T cells
Int Immunology, 13, 1571-1581

94. Scheibler, C. (1869)
Untersuchungen über die Natur der galleartigen Ausscheidungen
(sog. "Froschleisch"), welche bei der Saftgewinnung aus Rüben beobachtet wird.
J.Verh.dtsch.Zuckerind., 24, 309
95. Schmid, I., Baldwin, G.C., Jacobs, E.L., Isacescu, V., Neagos, N., Giorgi, J.V.,
Glaspy, J.A. (1995)
Alterations in phenotype and cell-surface antigen expression levels of human
monocytes: differential response to in vivo administration of rhM-CSF or
rhGM-CSF
Cytometry, 22, 103-110
96. Schrieber, R., Seybold, U. (1993)
Gelatine production, the six steps to maximum safety
Dev Biol Stand, 80, 195-198
97. Schulze, J. (2000)
Untersuchungen zum Einfluß künstlicher Volumenersatzmittel auf die
phagozytäre Kapazität humaner Monozyten in vitro
Medizinische Dissertation, Universität Tübingen
98. Seres, T., Knickelbein, R.G., Warshaw, J.B., Johnston, R.B., Jr. (2000)
The phagocytosis-associated respiratory burst in human monocytes is associated
with increased uptake of glutathion
J Immunol, 165, 3333-3340
99. Shang, X., Issekutz, A. (1998)
Contribution of CD11a(CD18, CD11b/CD18, ICAM-1 (CD54) and -2 (CD102)
to human monocyte migration through endothelium and connective tissue
fibroblast barriers
Eur.J.Immunol., 28, 1970-1979
100. Shang, X., Issekutz, A. (1999)
Enhancement of monocyte transendothelial migration by granulocyte-
macrophage colony-stimulating factor: requirement for chemoattractant and
CD11a/CD18 mechanisms
Eur.J.Immunol., 29, 3571-3582
101. Shepherd, V.L., Abdolrasulnia, R., Garrett, M., Cowan, H.B. (1990)
Down-regulation of mannose receptor activity in macrophages after treatment
with lipopolysaccharide and phorbol esters
J Immunol, 145, 1530-1536
102. Shepherd, V.L., Lane, K.B., Abdolrasulnia, R. (1997)
Ingestion of *Candida albicans* down-regulates mannose receptor expression on
rat macrophages
Arch.Biochem.Biophys., 344, 350-356

103. Sirtl, C., Salewsky, G., Baier, J., Lange, S., Laubenthal, H., Neumann, H.A. (1995)
Der Einfluß kolloidaler Plasmaersatzmittel auf die Freisetzung von Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha) in menschlichem Vollblut in vitro
Infusionsther Transfusionsmed, 22, 332-338
104. Stuyt, R.J., Netea, M.G. (2003)
Selective regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression by interleukin-18 and interleukin-12 on human monocytes
Immunology, 110, 329-334
105. Sugita, J., Yokoi, N., Kinoshita, S. (2000)
Observation of corneal epithelial disturbance through soft contact lens using fluorescein dextran
Cornea, 19, 508-511
106. Szepefalusi, Z., Parth, E., Jurecka, W., Luger, T.A., Kraft, D. (1993)
Human monocytes and keratinocytes in culture ingest hydroxyethylstarch
Arch.Dermatol.Res, 285, 144-150
107. Testa, U., Pelosi, E., Peschle, C. (2004)
The transferrin receptor
Crit Rev Oncog, 4, 241-276
108. Treib, J., Baron, J.F., Grauer, M.T., Strauss, R.G. (1999)
An international view of hydroxyethyl starches
Intensive Care Med, 25, 258-268
109. Trop, M., Schiffrin, J., Callahan, R., Carter, E.A. (1992)
Effect of heta-starch colloidal solutions on reticuloendothelial phagocytic system (RES) function in burned and infected rats
Burns, 18, 463-465
110. Unanue, E.R. Beller, D.I., Lu, C.Y., Allen, P.M. (1984)
Antigen presentation: comments on its regulation and mechanism
J Immunol, 132, 1-5
111. van den Broek, W.G., Trouwborst, A., Bakker, W.H. (1989)
The effect of iso-oncotic plasma substitutes: gelatine, dextran 40 (50g/l) and the effect of Ringer's lactate on the plasma volume in healthy subjects
Acta Anaesthesiol Belg, 40, 275-280
112. van der Goes, A., Hoekstra, K., van den Berg, T.K., Dijkstra, C.D. (2000)
Dexamethasone promotes phagocytosis and bacterial killing by human monocyte/macrophages in vitro
J Leukoc Biol, 67, 801-807

113. van Furth, R. (1998)
Human monocytes and cytokines
Res.Immunol., 149, 719-720
114. van Furth, R., Raeburn, J.A., van Zwet, T. (1979)
Characteristics of human mononuclear phagocytes
Blood, 54, 485-500
115. van Kessel, K.P., Verhoef, J. (1990)
A view to a kill: cytotoxic mechanisms of human polymorphnuclear leukocytes compared with monocytes and natural killer cells.
Pathobiology, 58, 264
116. van Waarde, D., Hulsing-Hesselink, E., Sandkuyl, L.A., van Furth, R. (1977)
Humoral regulation of monocytopoiesis during the early phase of an inflammatory reaction caused by particulate substances
Blood, 50, 141-154
117. van Waarde, D., Hulsing-Hesselink, E., van Furth, R. (1977)
Properties of a factor increasing monocytopoiesis (FIM) occurring in serum during the early phase of an inflammatory reaction
Blood, 50, 727-742
118. Victorino, G.P., Newton, C.R., Curran, B. (2003)
Dextran modulates microvascular permeability: effect in isotonic and hypertonic solutions
Shock, 19, 183-186
119. Vignola, A.M., Gjomarkaj, M., Arnoux, B., Bousquet, J. (1998)
Monocytes
J Allergy Clin Immunol, 101, 149-152
120. Vogt, N., Brinkmann, A., Georgieff, M. (1998)
Effekte von HES, Dextran und Gelatine auf die Nierenfunktion
Anästhesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther., 33, 268-270
121. Wagner, C., Deppisch, R., Deneffle, B., Hug, F., Andrassy, K., Hansch, G.M. (2003)
Expression patterns of the lipopolysaccharide receptor CD14, and the FCgamma receptors CD16 and CD64 on polymorphonuclear neutrophils: data from patients with severe bacterial infections and lipopolysaccharide-exposed cells
Shock, 19, 5-12
122. Wang, J., Beekhuizen, H., van Furth, R. (1994)
Surface molecules involved in the adherence of recombinant interferon-gamma-stimulated human monocytes to vascular endothelial cells
Clin Exp Immunol, 95, 263-269

123. Ward, J.H. (1987)
The Structure, Function and Regulation of Transferrin Receptors
Invest Radiol, 22, 74-83
124. Weber, C., Belge, K.U., von Hundelshausen, P., Draude, G., Steppich, B., Mack, M., Frankenberger, M., Weber, K.S., Ziegler-Heitbrock, H.W. (2000)
Differential chemokine receptor expression and function in Human monocyte subpopulations
J Leukoc Biol, 67, 699-704
125. Welters, I.D., Spangenberg, U., Menzebach, A., Engel, J., Menges, T., Langefeld, T.W., Hempelmann, G. (2000)
[The effect of different volume expanders on neutrophil granulocyte function in vitro]
Anaesthesist, 49, 196-201
126. Whitelaw, D.M. (1966)
The intravascular lifespan of monocytes
Blood, 28, 455-464
127. Wisselink, W., Patetsios, P., Panetta, T.F., Ramirez, J.A., Rodino, W., Kirwin, J.D., Zikria, B.A. (1998)
Medium molecular weight pentastarch reduces reperfusion injury by decreasing capillary leak in an animal model of spinal cord ischemia
J Vasc Surg, 27, 109-116
128. Wong, H.L., Welch, G.R., Brandes, M.E., Wahl, S.M. (1991)
IL-4 antagonizes induction of Fc gamma RIII (CD16) expression by transforming growth factor beta on human monocytes
J Immunol, 147, 1843-1848
129. Wuorela, M., Jalkanen, S., Toivanen, P., Granfors, K. (1996)
Expression of MHC class II molecules on human monocytes is regulated independently from each other after phagocytosis of bacteria
Scand.J.Immunol., 43, 39-46
130. Yang, R.B., Mark, M.R., Gray, A., Huang, A., Xie, M.H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W.I., Gurney, A.L., Godowski, P.J. (1998)
Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling
Nature, 395, 284-288
131. Yu-Kyoung, O. (1996)
Different fates of phagocytosed particles after delivery into macrophage lysosomes
J Cell Biol, 132, 585-593

132. Zhang X and Feng M(2000)
Adherence of human monocytes and NK cells to human TNF-alpha-stimulated porcine endothelial cells
Immunology and Cell biology, 78, 633-640
133. Zhong, W., Lafuse, W.P., Zwillig, B.S. (2001)
Infection with *Mycobacterium avium* differentially regulates the expression of iron transport protein mRNA in murine peritoneal macrophages
Infect.Immun., 69, 6618-6624
134. Ziegler-Heitbrock, H.W. (1996)
Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation
Immunol.Today, 17, 424-428
135. Ziegler-Heitbrock, H.W., Strobel M, Kieper, D., Fingerle, G., Schlunck, T., Petersmann, I., Ellwart, J., Blumenstein, M., Haas, J.G. (1992)
Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations
Blood, 79, 503-511

7. Anhang

Materialien

Gerät	Hersteller
Mikrobiologische Reinraumwerkbank; Lamin Air© HB 2472 S	Heraeus, Stuttgart
Zentrifuge; Megafuge 1,0 R	Heraeus, Stuttgart
Brutschrank; Cytoperm 8080	Heraeus, Stuttgart
Gefrierkühlschrank	Liebherr, Lienz, A
Wasserbad; Schüttelwasserbad 1083	GFL©, Burgwedel
Lichtmikroskop; Leica DMIL	Leica, Wetzlar
Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim/Main
Fluoreszenzmikroskop; Leitz DMIRB	Leica, Wetzlar
Magnetrührer; MINI-MR	Janke&Kunkel, Staufen
pH-Meter; pH 539	WTW, Weilheim
Vortex; Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Vortex; REAX top	Heidolph, Kelheim
Vortex; 4010 Multi-Tube Vortexer	Corning, Medfield USA
Analysenwaage; AE 240	Mettler Instrumente GmbH, Giessen
Durchflußzytometer; FACSort	Becton&Dickinson, Heidelberg
Software zur Facsanalyse; Cell Quest	Becton&Dickinson, Heidelberg
Drucker; HP DeskJet 1600 CM	Hewlett Packard, Böblingen

Tabelle 1.1: Geräte

Artikel	Hersteller
Perfusorspritze; 50 ml	Becton&Dickinson, Heidelberg
Falkon Stripette; 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Becton&Dickinson, Heidelberg
Pipettierhilfe; Pipetboy acu	Integra Biosciences, Wallisellen, CH
Falcon Röhrchen; 15 ml, 50 ml	Becton&Dickinson, Heidelberg
Varipette; 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Polystyren Gefäß; Costar 8393	Costar, Cambridge, USA
Eppendorf Cup; 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen; CELLSTAR© 3,5 cm, 6 cm	Greiner, Frickenhausen
Petrischalen; 6 cm	Costar, Cambridge, USA
12-well-Platten	Costar, Cambridge, USA
Einmalspritze; 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterifilter; Minisart©	Sartorius, Göttingen
Cryo Röhrchen; Nunc cryo tube™ vials	Nalge Nunc International, DK
Zellschaber; Costar 3010	Costar, Cambridge, USA
Polypropylen Facs-Röhrchen; 5 ml	Becton&Dickinson, Heidelberg
Multipipetten; Multipette© 4780, Multipette© plus	Eppendorf, Hamburg
Combitips; 12,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Polyethylen Verschuß; 12 mm	Becton&Dickinson, Heidelberg
Venenpunktionsbesteck; Butterfly©-21	Abbott, Dublin, IR
Multi-Adapter	Sarstedt, Nümbrecht
Blutentnahmesystem; S-Monovette EDTA K	Sarstedt, Nümbrecht

Tabelle 1.2: Verbrauchsartikel

Reagenz	Hersteller
Ficoll; Paque plus	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Dulbecco PBS (phosphate buffered saline); ohne Ca ²⁺ und Mg ⁺	Sigma, Deisenhofen
BSA (bovine serum albumin); 7,5 %	Sigma, Deisenhofen
EDTA; 0,5 M	Sigma, Deisenhofen
Hydrochloric acid (HCl); 1,0 N	Sigma, Deisenhofen
Sodium hydroxide (NaOH); 1,0 N	Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640; ohne Glutamin	Sigma, Deisenhofen
MEM non essential amino acid solution; 100*	Sigma, Deisenhofen
Sodium Pyruvat	Sigma, Deisenhofen
Glutamin, stabilisiert; 2 M	Biochrom seromed, Berlin
Humanserum; Type AB, hitzeinaktiviert bei 56°	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen

Tabelle 1.3: Reagenzien zur Zellkultur

Reagenz	Hersteller
Dextran 70; 004002 G	Fresenius AG, Bad Homburg
HES 200/0,5; 7432021	Fresenius AG, Bad Homburg
Polygelin; E01 01760 18081/E	Behringerwerke AG, Marburg
Lipopolysaccharid; Sigma, L 6529; 1 mg	Sigma, Deisenhofen
Water, sterile	Sigma, Deisenhofen
Fluoresbrite™ calibration grade 0,5 µ YG, 18859 Konzentration 3,93*10 ¹¹ , fluoreszenzmarkiert mit FITC	Polysciences, Warrington, USA

Tabelle 1.4: Reagenzien zu den Versuchsansätzen

Monoklonale Antikörper	Hersteller
CD 11a; fluoreszenzmarkiert mit FITC	Caltag laboratories, SF, USA
CD 16; fluoreszenzmarkiert mit FITC	Caltag laboratories, SF, USA
CD 71; fluoreszenzmarkiert mit FITC	Caltag laboratories, SF, USA
CD 14 fluoreszenzmarkiert mit Phycoerytin (PE)	Caltag laboratories, SF, USA
CD 14 fluoreszenzmarkiert mit Phycoerytin (PE)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Mouse IgG ₁ ; 349041, fluoreszenzmarkiert mit FITC	Becton&Dickinson, Heidelberg
Mouse IgG _{2a} ; 340053, fluoreszenzmarkiert mit PE	Becton&Dickinson, Heidelberg

Tabelle 1.5: Antikörper

Lösung zur Durchflusszytometrie	Hersteller
Cell Wash; 349524	Becton&Dickinson, Heidelberg
Cell Fix; 340181	Becton&Dickinson, Heidelberg
Lysing Solution; 349202	Becton&Dickinson, Heidelberg
Facs Flow; 342003	Becton&Dickinson, Heidelberg
Facs Safe; 340345	Becton&Dickinson, Heidelberg
Facs Rinse; 340346	Becton&Dickinson, Heidelberg

Tabelle 1.6: Lösungen zur Durchflusszytometrie

Materialien zur Fluoreszenzmikroskopie	Hersteller
Acridinorange	Sigma, Deisenhofen
Gentianaviolett	Sigma, Deisenhofen
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Cytocup, Mikrogefäße mit Bodenöffnung	Heraeus Instrument-GmbH, Osterode
Zuschnitte/ Cuts	Schleicher&Schuell, Dassel
Fluorescein Isothiocyanate- Dextran	Sigma, St. Louis, USA

Tabelle 1.7: Materialien zur Fluoreszenzmikroskopie

Experiment I – Phagozytoseuntersuchung aus dem Buffy Coat: Zellkultur

well	Lösung	Latex-Beads	LPS
1	1 ml Monozytenmedium	0 µl	0 µl
2	0,99 ml Monozytenmedium	10 µl ($1 \cdot 10^8$)	0 µl
3	1 ml Monozytenmedium	0µl	0 µl
4 - 6	0,99 ml Monozytenmedium	10 µl ($1 \cdot 10^8$)	0 µl
7 - 9	0,99 ml Dextran	10 µl ($1 \cdot 10^8$)	0 µl
10 - 12	0,99 ml HES	10 µl ($1 \cdot 10^8$)	0 µl
13 - 15	0,99 ml Gelatine	10 µl ($1 \cdot 10^8$)	0 µl
16 - 18	0,98 ml Monozytenmedium	10 µl ($1 \cdot 10^8$)	10 µl (100 ng/ml)
19 - 21	0,98 ml Dextran	10 µl ($1 \cdot 10^8$)	10 µl (100 ng/ml)
22 - 24	0,98 ml HES	10 µl ($1 \cdot 10^8$)	10 µl (100 ng/ml)
25 - 27	0,98 ml Gelatine	10 µl ($1 \cdot 10^8$)	10 µl (100 ng/ml)

Tabelle 2.1

Experiment II – Phagozytoseuntersuchung aus dem Vollblut: Zellkultur

well	Vollblut	Lösung	Latex-Beads	LPS
1	500 µl	500 µl Monozytenmedium	0 µl	0 µl
2	495 µl	495 µl Monozytenmedium	10 µl ($1 \cdot 10^9$)	0 µl
3	500 µl	500 µl Monozytenmedium	0 µl	0 µl
4 - 6	495 µl	495 µl Monozytenmedium	10 µl ($1 \cdot 10^9$)	0 µl
7 - 9	495 µl	495 µl Dextran	10 µl ($1 \cdot 10^9$)	0 µl
10 - 12	495 µl	495 µl HES	10 µl ($1 \cdot 10^9$)	0 µl
13 - 15	495 µl	495 µl Gelatine	10 µl ($1 \cdot 10^9$)	0 µl
16 - 18	490 µl	490 µl Monozytenmedium	10 µl ($1 \cdot 10^9$)	10 µl (100 ng/ml)
19 - 21	490 µl	490 µl Dextran	10 µl ($1 \cdot 10^9$)	10 µl (100 ng/ml)
22 - 24	490 µl	490 µl HES	10 µl ($1 \cdot 10^9$)	10 µl (100 ng/ml)
25 - 27	490 µl	490 µl Gelatine	10 µl ($1 \cdot 10^9$)	10 µl (100 ng/ml)

Tabelle 2.2

Experiment III – Rezeptorenuntersuchung aus dem Buffy Coat: Zellkultur

well	Lösung	LPS
1 - 6	2 ml Monozytenmedium	0 µl
7 - 9	2 ml Dextran	0 µl
10 - 12	2 ml HES	0 µl
13 - 15	2 ml Gelatine	0 µl
16 - 18	1,98 ml Monozytenmedium	20 µl (100 ng/ml)
19 - 21	1,98 ml Dextran	20 µl (100 ng/ml)
22 - 24	1,98 ml HES	20 µl (100 ng/ml)
25 - 27	1,98 ml Gelatine	20 µl (100 ng/ml)

Tabelle 2.3**Experiment I und II – Phagozytoseuntersuchungen: Aufbereitung**

Nr.	Inhalt	Antikörper	Verwendungszweck (s. auch 2.2.4)
1	Monozyten	IgG ₁ FITC, IgG _{2a} PE	Ermittlung unspezifischer Bindungen und Autofluoreszenzen, Einstellung der FSC/SSC, des Schwellenwertes und der Verstärkungen der Fluoreszenzen 1 und 2
2	Monozyten, Latex-Beads	---	Einstellung der Kompensation der Fluoreszenz 2 gegenüber 1
3	Monozyten	CD14 PE	Einstellung der Kompensation der Fluoreszenz 1 gegenüber 2
4 - 6	Monozyten, Latex-Beads	CD14 PE	Ermittlung der Phagozytoserate ohne Kolloideinfluß
7 - 9	Monozyten, Latex-Beads	CD14 PE	Ermittlung der Phagozytoserate unter Einfluß von Dextran (Dextran 70)
10 - 12	Monozyten,	CD14 PE	Ermittlung der Phagozytoserate unter Einfluß

	Latex-Beads		von Hydroxyethylstärke (HES 200/0.5)
13 - 15	Monozyten, Latex-Beads	CD14 PE	Ermittlung der Phagozytoserate unter Einfluß von Gelatine (Polygelin)
16 - 18	Monozyten, Latex-Beads	CD14 PE	Ermittlung der Phagozytoserate unter Einfluß von LPS ohne Kolloid
19 - 21	Monozyten, Latex-Beads	CD14 PE	Ermittlung der Phagozytoserate unter Einfluß von Dextran und LPS
22 - 24	Monozyten, Latex-Beads	CD14 PE	Ermittlung der Phagozytoserate unter Einfluß von Hydroxyethylstärke und LPS
25 - 27	Monozyten, Latex-Beads	CD14 PE	Ermittlung der Phagozytoserate unter Einfluß von Gelatine und LPS

Tabelle 2.4

Experiment III – Rezeptorenuntersuchung aus dem Buffy Coat: Aufbereitung

Nr.	Inhalt	Antikörper	Verwendungszweck (s. auch 2.2.4)
1	Monozyten	IgG ₁ FITC, IgG _{2a} PE	Ermittlung unspezifischer Bindungen und Autofluoreszenzen, Einstellung der FSC/SSC, des Schwellenwertes und der Verstärkungen der Fluoreszenzen 1 und 2
2	Monozyten	CD14 PE	Einstellung der Kompensation der Fluoreszenz 1 gegenüber 2
3	Monozyten	CD11a FITC	Einstellung der Kompensation der Fluoreszenz 2 gegenüber 1
4 - 6	Monozyten	CD11a FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression ohne Kolloideinfluß
7 - 9	Monozyten	CD11a FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Dextran (Dextran 70)
10 - 12	Monozyten	CD11a FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Hydroxyethylstärke (HES 200/0.5)

13 - 15	Monozyten	CD11a FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Gelatine (Polygelin)
16 - 18	Monozyten	CD11a FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von LPS ohne Kolloid
19 - 21	Monozyten	CD11a FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Dextran und LPS
22 - 24	Monozyten	CD11a FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Hydroxyethylstärke und LPS
25 - 27	Monozyten	CD11a FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Gelatine und LPS
28	Monozyten	CD16 FITC	Einstellung der Kompensation der Fluoreszenz 2 gegenüber 1
29 - 31	Monozyten	CD16 FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression ohne Kolloideinfluß
32 - 34	Monozyten	CD16 FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Dextran (Dextran 70)
35 - 37	Monozyten	CD16 FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Hydroxyethylstärke (HES 200/0.5)
38 - 40	Monozyten	CD16 FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Gelatine (Polygelin)
41 - 43	Monozyten	CD16 FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von LPS ohne Kolloid
44 - 46	Monozyten	CD16 FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Dextran und LPS
47 - 49	Monozyten	CD16 FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Hydroxyethylstärke und LPS
50 - 52	Monozyten	CD16 FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Gelatine und LPS

53	Monozyten	CD71 FITC	Einstellung der Kompensation der Fluoreszenz 2 gegenüber 1
54 - 56	Monozyten	CD71 FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression ohne Kolloideinfluß
57 - 59	Monozyten	CD71 FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Dextran (Dextran 70)
60 - 62	Monozyten	CD71 FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Hydroxyethylstärke (HES 200/0.5)
63 - 65	Monozyten	CD71 FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Gelatine (Polygelin)
66 - 68	Monozyten	CD71 FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von LPS ohne Kolloid
69 - 71	Monozyten	CD71 FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Dextran und LPS
72 - 74	Monozyten	CD71 FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Hydroxyethylstärke und LPS
75 - 77	Monozyten	CD71 FITC, CD14 PE	Ermittlung der Rezeptorexpression unter Einfluß von Gelatine und LPS

Tabelle 2.5

Ergebnisse – Experiment I

	HES 0	HES 10	HES 20	HES 40	HES 0 + LPS	HES 10 + LPS	HES 20 +LPS	HES 40 + LPS
I	443,85	453,16	248,05	133,35	534,36	417,92	182,69	140,75
II	360,68	248,05	361,90	198,10	271,73	98,22	191,10	70,41
III	128,43	65,52	66,12	28,13	152,28	158,20	48,70	3,80
IV	726,91	820,47	858,21	743,18	720,40	667,14	729,93	791,48
V	250,22	316,23	283,87	144,60	60,43	68,54	52,33	40,32
VI	255,16	228,76	209,08	139,49	109,76	177,83	121,88	104,60
VII	394,95	437,14	321,97	209,08	378,56	342,89	299,61	253,69
VIII	448,07	414,18	345,99	239,28	297,77	319,08	226,71	182,69
IX	234,11	208,14	205,35	162,53	129,39	90,58	114,44	89,77
X	516,14	486,97	445,08	324,88	429,40	375,16	403,15	232,91
	375,85	367,86	334,56	232,26	308,41	271,56	237,05	191,04

Tabelle 3.1: Median der Fluoreszenzintensität in der Facs-Analyse der Phagozytose von Latexbeads durch isolierten Monozyten unter Zugabe von HES in steigenden Konzentrationen und LPS

	GEL 0	GEL 10	GEL 20	GEL 40	GEL 0 + LPS	GEL 10 + LPS	GEL 20 +LPS	GEL 40 + LPS
I	443,85	201,69	109,90	43,32	534,36	199,89	100,00	69,16
II	360,68	140,75	122,98	109,41	271,73	121,88	83,54	94,75
III	128,43	42,17	56,74	31,91	152,28	49,14	37,86	21,67
IV	726,91	451,12	449,10	349,12	720,40	358,66	342,89	342,89
V	250,22	166,98	159,63	98,22	60,43	118,64	67,93	62,64
VI	255,16	273,84	184,34	134,56	109,76	228,76	145,90	90,58
VII	394,95	330,77	330,77	194,56	378,56	339,82	294,27	224,68
VIII	448,07	453,16	403,15	243,62	297,77	381,97	316,23	144,60
IX	234,11	243,62	216,74	245,82	129,39	161,08	142,02	132,16
X	516,14	461,38	392,42	257,13	429,40	381,97	319,08	198,10
	375,85	276,55	242,58	170,77	308,41	234,18	184,97	128,64

Tabelle 3.2: Median der Fluoreszenzintensität in der Facs-Analyse der Phagozytose von Latexbeads durch isolierten Monozyten unter Zugabe von Gelatine in steigenden Konzentrationen und LPS

	DEX 0	DEX 10	DEX 20	DEX 40	DEX 0 + LPS	DEX 10 + LPS	DEX 20 +LPS	DEX 40 + LPS
I	443,85	336,78	173,09	1,70	534,36	399,54	375,16	2,07
II	360,68	252,55	128,64	67,32	271,73	399,54	209,08	138,24
III	128,43	70,41	74,32	36,19	152,28	121,88	94,75	35,07
IV	726,91	679,25	723,39	482,61	720,40	649,38	743,18	593,52
V	250,22	319,08	216,74	201,69	60,43	121,88	86,60	86,60
VI	255,16	218,70	165,48	162,53	109,76	176,24	130,97	119,17
VII	394,95	361,90	207,21	220,67	378,56	395,96	321,97	261,80
VIII	448,07	342,89	259,46	174,66	297,77	232,91	214,80	201,69
IX	234,11	187,69	214,80	194,56	129,39	98,22	102,74	135,77
X	516,14	437,14	445,08	283,87	429,40	371,80	399,54	532,80
	375,85	320,64	260,82	182,58	308,41	296,74	267,88	210,67

Tabelle 3.3: Median der Fluoreszenzintensität in der Facs-Analyse der Phagozytose von Latexbeads durch isolierten Monozyten unter Zugabe von Dextran in steigenden Konzentrationen und LPS

Ergebnisse – Experiment II

	HES 0	HES 10	HES 20	HES 40	HES 0 + LPS	HES 10 + LPS	HES 20 +LPS	HES 40 + LPS
I	269,06	186,01	174,66	145,9	560,73	518,61	399,54	352,27
II	931,15	1252,15	333,76	518,61	482,62	478,29	449,1	572,55
III	64,79	973,38	913,98	32,2	1742,48	1700,08	1433,01	114,96
IV	455,15	1229,83	820,47	1407,46	4899,27	5093,68	4613,84	4869,68
V	785,36	1240,94	918,1	1945,64	3687,4	3959,64	4332,3	5376,12
VI	618,49	673,17	743,18	1218,81	2501,96	2617,99	3428,91	4613,84
VII	1039,14	1252,15	1333,52	265,36	2063,34	2090,8	2226,67	1298,02
VIII	959,01	973,38	1000	1252,15	2084,79	1998,85	2147,99	2996,14
IX	586,51	557,31	620,82	850,53	2487,92	2147,99	2436,23	3337,62
X	2212,24	2072,08	1632,64	2147,99	5078,75	4410,94	4740,03	5186,13
	649,4	957,93	777,66	958,23	2419,79	2456,56	2579,99	2890,73

Tabelle 3.4: Median der Fluoreszenzintensität in der Facs-Analyse der Phagozytose von Latexbeads durch Monozyten im Vollblut unter Zugabe von HES in steigenden Konzentrationen und LPS

	GEL 0	GEL 10	GEL 20	GEL 40	GEL 0 + LPS	GEL 10 + LPS	GEL 20 +LPS	GEL 40 + LPS
I	269,06	201,69	198,1	205,35	560,73	368,47	357,16	399,54
II	931,15	239,28	182,69	259,46	482,62	433,23	577,72	567,42
III	64,79	1027,35	858,21	1046	1742,48	2308,24	2525,48	2571,32
IV	455,15	1445,96	1640	2414,42	4899,27	4613,84	4913,67	5139,7
V	785,36	1445,96	1647,39	2548,3	3687,4	4031,52	4104,7	3959,64
VI	618,49	897,69	964,66	1357,73	2501,96	2594,55	2942,73	2996,14
VII	1039,14	1420,18	1309,75	1539,93	2063,34	1928,22	1826,92	1945,64
VIII	959,01	1064,99	1000	1018,15	2084,79	1910,95	2128,75	2016,91
IX	586,51	697,83	710,5	770,4	2487,92	2090,8	2329,1	2128,75
X	2212,24	2053,53	1893,84	1893,84	5078,75	4410,94	4572,53	4869,68
	792,09	1049,45	1040,51	1305,36	2558,93	2469,08	2627,88	2659,47

Tabelle 3.5: Median der Fluoreszenzintensität in der Facs-Analyse der Phagozytose von Latexbeads durch Monozyten im Vollblut unter Zugabe von Gelatine in steigenden Konzentrationen und LPS

	DEX 0	DEX 10	DEX 20	DEX 40	DEX 0 + LPS	DEX 10 + LPS	DEX 20 +LPS	DEX 40 + LPS
I	269,06	352,27	491,37	1229,83	560,73	385,42	509,37	1321,58
II	931,15	316,23	598,89	2458,24	482,62	562,34	784,39	1810,56
III	64,79	1036,63	1730,94	7,53	1742,48	1928,22	2128,75	57,51
IV	455,15	2392,8	2329,1	7057	4899,27	4613,84	4531,58	5,78
V	785,36	2287,57	2641,65	35,55	3687,4	4255,07	5002,86	180,24
VI	618,49	1762,36	2525,48	2256,92	2501,96	2813,32	3619,04	3554,52
VII	1039,14	1860,08	913,98	51,86	2063,34	2788,13	2109,69	85,82
VIII	959,01	1989,89	2329,1	1893,84	2084,79	2267,09	3050,53	1252,15
IX	586,51	973,38	1876,88	842,91	2487,92	2392,8	3337,62	2226,67
X	2212,24	2480,45	2838,74	746,53	5078,75	4371,44	4450,79	152,61
	792,09	1545,17	1827,61	1658,02	2558,93	2637,77	2952,46	1064,74

Tabelle 3.6: Median der Fluoreszenzintensität in der Facs-Analyse der Phagozytose von Latexbeads durch Monozyten im Vollblut unter Zugabe von Dextran in steigenden Konzentrationen und LPS

Ergebnisse – Experiment III

	HES 0	HES 10	HES 20	HES 40	HES 0 + LPS	HES 10 + LPS	HES 20 +LPS	HES 40 + LPS
I	35,56	43,71	42,17	44,91	35,45	37,52	38,54	36,85
II	23,87	25,25	23,5	22,27	15,19	17,78	14,86	17,78
III	32,11	30,23	28,13	28,13	15,31	16,55	14,59	14,86
IV	37,41	35,23	35,55	32,78	23,37	--	--	--
V	24	24,8	21,67	20,54	14,09	11,97	11,97	12,41
VI	28,39	28,13	25,95	25,03	15,5	13,95	14,99	15,4
	30,22	31,23	29,5	28,94	19,82	19,55	18,99	19,46

Tabelle 3.7: Median der Fluoreszenzintensität in der Facs-Analyse der CD11a Expression von isolierten Monozyten unter Zugabe von HES in steigenden Konzentrationen und LPS

	GEL 0	GEL 10	GEL 20	GEL 40	GEL 0 + LPS	GEL 10 + LPS	GEL 20 +LPS	GEL 40 + LPS
I	35,56	45,32	44,11	42,17	35,45	42,17	37,86	38,2
II	23,87	20,54	20,91	20,72	15,19	16,7	20,35	25,25
III	32,11	26,42	26,9	25,48	15,31	14,59	14,72	17,47
IV	37,41	33,98	33,68	32,49	23,37	--	--	--
V	24	22,07	22,47	18,94	14,09	11,55	11,76	13,34
VI	28,39	24,8	22,88	23,71	15,5	14,99	15,12	14,86
	30,22	28,86	28,49	27,25	19,82	20	19,96	21,82

Tabelle 3.8: Median der Fluoreszenzintensität in der Facs-Analyse der CD11a Expression von isolierten Monozyten unter Zugabe von Gelatine in steigenden Konzentrationen und LPS

	DEX 0	DEX 10	DEX 20	DEX 40	DEX 0 + LPS	DEX 10 + LPS	DEX 20 +LPS	DEX 40 + LPS
I	35,56	39,6	40,32	38,89	35,45	39,24	36,52	39,24
II	23,87	24,58	24,36	24,36	15,19	17,15	18,6	18,27
III	32,11	31,06	26,42	27,14	15,31	15,96	16,25	14,86
IV	37,41	37,18	33,68	32,49	23,37	--	--	--
V	24	24,36	22,67	21,48	14,09	12,98	13,7	11,34
VI	28,39	27,14	25,25	20,26	15,5	16,7	17,62	14,99
	30,22	30,65	28,78	27,44	19,82	20,41	20,54	19,74

Tabelle 3.8: Median der Fluoreszenzintensität in der Facs-Analyse der CD11a Expression von isolierten Monozyten unter Zugabe von Dextran in steigenden Konzentrationen und LPS

	HES 0	HES 10	HES 20	HES 40	HES 0 + LPS	HES 10 + LPS	HES 20 +LPS	HES 40 + LPS
I	5,07	6,32	5,52	5,16	10,29	10,94	10,65	12,19
II	4,62	5,62	5,19	4,7	8,22	8,58	8,43	9,73
III	5,09	3,75	4,57	4,22	3,85	6,98	6,32	7,17
IV	2,57	2,79	2,62	3,02	5,29	3,79	7,5	5,19
V	4,54	3,59	4,29	3,59	3,68	4,61	7,84	5,14
VI	2,52	2,31	2,09	2,21	3,26	4,14	4,14	5,09
	4,07	4,06	4,05	3,82	5,77	6,51	7,48	7,42

Tabelle 3.9: Median der Fluoreszenzintensität in der Facs-Analyse der CD16 Expression von isolierten Monozyten unter Zugabe von HES in steigenden Konzentrationen und LPS

	GEL 0	GEL 10	GEL 20	GEL 40	GEL 0 + LPS	GEL 10 + LPS	GEL 20 +LPS	GEL 40 + LPS
I	5,07	5,38	4,83	4,87	10,29	10,75	10,09	11,34
II	4,62	3,89	3,82	6,32	8,22	7,5	11,04	12,63
III	5,09	3,55	4,7	4,18	3,85	2,86	7,23	8,2
IV	2,57	3,11	2,29	3,05	5,29	7,14	10,27	7,23
V	4,54	3,19	3,75	2,74	3,68	7,17	3,72	2,84
VI	2,52	2,15	2,17	2,15	3,26	2,25	2,41	2,62
	4,07	3,55	3,59	3,89	5,77	6,28	7,46	7,48

Tabelle 3.10: Median der Fluoreszenzintensität in der Facs-Analyse der CD16 Expression von isolierten Monozyten unter Zugabe von Gelatine in steigenden Konzentrationen und LPS

	DEX 0	DEX 10	DEX 20	DEX 40	DEX 0 + LPS	DEX 10 + LPS	DEX 20 +LPS	DEX 40 + LPS
I	5,07	5,14	5,05	5,38	10,29	16,25	13,82	14,59
II	4,62	4,91	5,88	9,35	8,22	7,17	8,2	8,13
III	5,09	4,78	5,75	6,61	3,85	5,52	7,23	6,85
IV	2,57	2,44	3	2,69	5,29	5,52	6,26	8,35
V	4,54	3,46	3,02	2,89	3,68	3,4	3,49	6,49
VI	2,52	2,09	2,02	2,25	3,26	10,09	9,47	11,34
	4,07	3,8	4,12	4,86	5,77	7,99	8,08	9,29

Tabelle 3.11: Median der Fluoreszenzintensität in der Facs-Analyse der CD16 Expression von isolierten Monozyten unter Zugabe von Dextran in steigenden Konzentrationen und LPS

	HES 0	HES 10	HES 20	HES 40	HES 0 + LPS	HES 10 + LPS	HES 20 +LPS	HES 40 + LPS
I	4,44	5,45	5,78	4,61	10,21	10,37	10,46	12,52
II	7,17	6,79	6,67	7,3	7,78	10,27	11,34	31,06
III	8,58	9,31	8,13	7,99	7,12	8,51	9,65	9,91
IV	3,74	3,62	3,68	4,45	6,55	4,49	7,1	8,06
V	5,2	6,55	6,15	6,15	7,57	8,28	7,7	7,64
VI	3,53	3,4	3,13	3,05	4,17	4,83	4,66	4,57
	5,44	5,85	5,59	5,59	7,23	7,79	8,49	12,29

Tabelle 3.12: Median der Fluoreszenzintensität in der Facs-Analyse der CD71 Expression von isolierten Monozyten unter Zugabe von HES in steigenden Konzentrationen und LPS

	GEL 0	GEL 10	GEL 20	GEL 40	GEL 0 + LPS	GEL 10 + LPS	GEL 20 +LPS	GEL 40 + LPS
I	4,44	3,96	4,66	4,91	10,21	10,94	12,86	9,35
II	7,17	5,78	6,67	10	7,78	4,43	13,22	16,25
III	8,58	4,91	5,88	5,94	7,12	4,96	10,55	10,46
IV	3,74	4,26	4,07	4,26	6,55	13,95	10,09	12,86
V	5,2	4,91	4,22	2,86	7,57	9,39	4,66	5
VI	3,53	3,25	3,34	3,22	4,17	3,52	3,96	3,49
	5,44	4,51	4,81	5,2	7,23	7,87	9,22	9,57

Tabelle 3.13: Median der Fluoreszenzintensität in der Facs-Analyse der CD71 Expression von isolierten Monozyten unter Zugabe von Gelatine in steigenden Konzentrationen und LPS

	DEX 0	DEX 10	DEX 20	DEX 40	DEX 0 + LPS	DEX 10 + LPS	DEX 20 +LPS	DEX 40 + LPS
I	4,44	4,83	5,94	7,84	10,21	13,82	13,95	16,55
II	7,17	5,83	8,94	7,57	7,78	9,31	10,65	12,19
III	8,58	9,14	9,39	9,31	7,12	8,2	10,65	10,75
IV	3,74	3,79	3,85	4,03	6,55	8,2	7,7	9,82
V	5,2	5,62	5,38	6,67	7,57	7,23	7,64	7,99
VI	3,53	3,08	2,89	3,37	4,17	9,39	8,35	8,74
	5,44	5,38	6,07	6,47	7,23	9,36	9,82	11,01

Tabelle 3.14: Median der Fluoreszenzintensität in der Facs-Analyse der CD71 Expression von isolierten Monozyten unter Zugabe von Dextran in steigenden Konzentrationen und LPS

Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. K. Unertl für die freundliche Überlassung des Themas,
Dr. H.J. Dieterich für die fachliche und persönliche Unterstützung der Arbeit.

Herrn Dr. N. Deschner gilt mein Dank für die direkte Betreuung in allen Phasen der
Entstehung dieser Arbeit, vor allem für seine Bereitschaft, stets auf meine eigenen
Vorstellungen und Überlegungen einzugehen.

Dem Personal des Forschungslabors der Klinik für Anaesthesiologie danke ich für seine
Unterstützung und freundliche Aufnahme, Frau Dr. A. Ploppa insbesondere für die
Einarbeitung und die kompetente Hilfe bei der Durchführung der Messungen, Herrn
Dipl.-Geogr. Ch. Zanke für seine Geduld und Hilfe bei EDV- Notrufen.

Allen Ärzten der Klinik für Anaesthesiologie, vor allem Frau Dr. H. Häberle, danke ich für
zahlreiche Diskussionen, die meine Arbeit inhaltlich bereichert haben.

Dank meiner Mutter für die Korrekturlesung der Dissertationsschrift zu jeder Tages- und
Nachtzeit.

Ich danke all denen, die in der Zeit der Entstehung dieser Arbeit, beruflich oder privat, an
meiner Seite standen und mich dabei unterstützt haben.

Lebenslauf

Dagmar Barbara Aberle, geboren am 14.11.1975 in Tübingen, Tochter von Theodor Aberle, Krankenpfleger und Schlosser, und Helga Aberle, geborene Schlicksupp, Diplom-Biologin.

1982 – 86	Grundschule in Tübingen, Waldhäuser-Ost
1986 – 95	Gymnasium der Geschwister-Scholl-Schule in Tübingen, Abitur am 01.07.1995
1995 – 2002	Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen Praktisches Jahr im Klinikum am Steinenberg in Reutlingen (Chirurgie/ Innere) und im Kantonspital in Aarau /CH (Gynäkologie)
17.05.2002	3. Staatsexamen
2002 – 2004	Ärztin im Praktikum, Frauenklinik des Hegau-Klinikums in Singen
seit 01.02.2004	Assistenzärztin, Frauenklinik des Hegau-Klinikums in Singen