

**Aus der Universitätsklinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin
Tübingen**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Unertl

**Der Einfluss von Thiopental und Midazolam
auf die Differenzierung von Monozyten zu
Dendritischen Zellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

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

vorgelegt von

Helga Raidt

aus

Oettingen

2009

Dekan

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter

Professor Dr. W. Krüger

2. Berichterstatter

Professor Dr. I. Hübner

Für Kristian und meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

DER EINFLUSS VON THIOPENTAL UND MIDAZOLAM AUF DIE DIFFERENZIERUNG VON MONOZYTEN ZU DENDRITISCHEN ZELLEN	
INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
1 EINLEITUNG.....	4
1.1 DENDRITISCHE ZELLEN	4
1.1.1 Ursprung und Differenzierung der Dendritischen Zelle.....	6
1.1.2 Maturation	7
1.2 EINSATZ VON THIOPENTAL UND MIDAZOLAM BEI SCHÄDEL-HIRN-TRAUMA .	10
1.2.1 Schädel-Hirn-Trauma	10
1.2.2 Pharmakologie und klinischer Einsatz von Thiopental.....	12
1.2.3 Pharmakologie und klinischer Einsatz von Midazolam	13
1.2.4 Anästhetika und Immunfunktion	14
2 FRAGESTELLUNG.....	17
3 MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 VERWENDETES UNTERSUCHUNGSMATERIAL	18
3.2 REAGENZIEN UND GERÄTE	19
3.3 REZEPTUREN	21
3.4 METHODEN	22
3.4.1 Isolation von Monozyten aus dem Buffy-Coat	22
3.4.2 Maturation der Monozyten zu Dendritischen Zellen	23
3.4.3 Maturation unter Thiopentalzugabe	24
3.4.4 Kontrollmaturation mit Midazolam	24
3.4.5 Stimulation mit TNF- α	25
3.4.6 Probenvorbereitung	25
3.4.7 FITC-Dextran Phagozytoseversuch.....	26
3.4.8 Messprinzip der Durchflusszytometrie.....	27
3.4.9 Messung und Auswertung der Proben	29
3.4.10 Statistische Auswertung	31

4	ERGEBNISSE	32
4.1	MORPHOLOGIE DER DENDRITISCHEN ZELLEN UNTER DEM EINFLUSS VON THIOPENTAL ODER MIDAZOLAM	32
4.2	EXPRESSION VON OBERFLÄCHENMARKERN	35
4.2.1	Expression von CD 1a.....	35
4.2.2	Expression von CD 40.....	37
4.2.3	Expression von CD 80.....	39
4.2.4	Expression von CD 86.....	41
4.2.5	Expression von HLA-DR.....	43
4.3	PHAGOZYTOSEFÄHIGKEIT	45
4.3.1	Thiopental.....	45
4.3.2	Midazolam	48
4.4	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	50
5	DISKUSSION.....	53
5.1	METHODEN	53
5.1.1	Auswahl der verwendeten Buffy Coats.....	53
5.1.2	Generierung von Dendritischen Zellen aus Monozyten.....	55
5.1.3	Durchflusszytometrie	57
5.2	ANÄSTHETIKA.....	59
5.2.1	Thiopental.....	59
5.2.2	Midazolam	63
5.3	AUSBLICK	65
6	ZUSAMMENFASSUNG	68
7	ANHANG.....	71
7.1	TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER DATEN.....	71
7.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	75
7.3	TABELLENVERZEICHNIS	76
8	LITERATURVERZEICHNIS	77
9	DANKSAGUNG.....	87
10	LEBENS LAUF.....	88

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zelle
CD	Cluster of Differentiation
DZ	Dendritische Zellen
g	Gramm
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor
ICP	Intracranial Pressure
IF	Interferon
IL	Interleukin
MFI	mittlere Fluoreszenz Intensität
mg	Milligramm
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
Tab	Tabelle
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
μ l	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DZ) stellen die potentesten antigenpräsentierenden Zellen des menschlichen Organismus und spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion und Regulation von Immunität. Sie stimulieren hocheffektiv naive CD8 und CD4 T-Zellen sowie B-Lymphozyten zur Immunantwort (2, 4, 49).

DZ wurden erstmals 1973 von Ralph M. Steinman beschrieben, der sie in der Milz von Mäusen entdeckte (92).

DZ besiedeln nahezu jedes lymphatische und nichtlymphatische Gewebe, sie sind unregelmäßig geformt und verfügen über lange dendritische Ausläufer. Sie gehen aus CD34+ Vorläuferzellen aus dem Knochenmark hervor, wobei es sowohl lymphatische als auch myeloide Vorläuferzellen zu geben scheint. Die Vorläuferzellen werden über das Blut ins Gewebe ausgesät, wo sie sich dann zu unreifen DZ entwickeln, die äußerst potent Antigene aufnehmen und prozessieren können, aber nur in geringem Ausmaß T-Zell-stimulatorische Fähigkeiten besitzen (2, 4, 49, 106).

Nach Antigenkontakt erfolgt eine Maturation und die DZ migrieren aus dem Gewebe in Lymphorgane, wo sie T-Zellen stimulieren und die Immunantwort einleiten. In diesem Stadium hat sich das Erscheinungsbild der DZ verändert. Sie verfügen nun über die Fähigkeit, CD4 T-Zellen zur Immunantwort zu stimulieren und ihnen die prozessierten Antigene an MHC II Moleküle gebunden zu präsentieren. In diesem Stadium ist die Fähigkeit der DZ Antigene aufzunehmen und zu prozessieren kaum noch vorhanden. Wie bereits beschrieben stellen DZ eine sehr heterogene Gruppe von Zellen dar, wobei ihnen einige Eigenschaften gemein sind:

1. Sie gehen aus CD34+ Vorläuferzellen aus dem Knochenmark hervor und werden über das Blut ins Gewebe transportiert, wo sie zu unreifen DZ ausreifen.
2. Unreife DZ haben die Fähigkeit, Antigene sowohl rezeptorabhängig als auch -unabhängig aufzunehmen und zu Antigenfragmenten zu verarbeiten, welche über MHC II Rezeptoren präsentiert werden können.
3. Als Antwort auf Gefahrensignale wie Gewebeschädigung, Toxine oder inflammatorische Zytokine reifen DZ aus und migrieren in lymphatische Organe, wo sie mit CD4 T-Zellen interagieren um die Immunantwort zu initiieren
4. Verglichen mit reifen DZ, finden sich auf unreifen DZ andere Chemokinrezeptoren, welche die Migration ins Gewebe als Antwort auf inflammatorische Chemokine regulieren.
5. Wenn DZ ausreifen, exprimieren sie eine hohe Anzahl MHC II- Antigen-Komplexe, welche für den Kontakt mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) der CD4 T-Zellen benötigt wird. Des weiteren exprimieren sie kostimulatorische Moleküle, welche die CD4 T-Zell-Proliferation stimulieren.

Weitere Fähigkeiten der DZ, abhängig von der untersuchten Subpopulation, sind die Induktion der Differenzierung von naiven B-Zellen zu immunglobulinproduzierenden Plasmazellen (49) und die Interferon- α Produktion nach viraler Stimulation. Die DZ kontrollieren somit die Funktion von B- und T-Lymphozyten (4) und spielen eine einzigartige Rolle bei der Induktion der primären Immunantwort (3).

1.1.1 Ursprung und Differenzierung der Dendritischen Zelle

IN VIVO

Nach bisherigen Erkenntnissen zirkulieren drei verschiedene Stadien von DZ im Blut: Vorläuferzellen, unreife DZ und reife DZ. Man ging bisher davon aus, dass sowohl unreife DZ als auch DZ-Vorläufer von CD 34+ Stammzellen aus dem Knochenmark abstammen. Dabei ist der Reifungsprozess, seine Induktion und die Herkunft und Art der Mediatoren, welche eine Reifung von einer CD34+ Stammzelle direkt zur unreifen DZ ermöglichen bisher nicht aufgeklärt. Die CD34+ Stammzelle produziert eine lymphatische und eine myeloide Vorläuferzelle.

Der lymphatische Weg der DZ-Entwicklung endet in der plasmazytoiden DZ, welche mit ihrer Fähigkeit Interferon zu produzieren eine Sonderstellung einnimmt.

Die myeloide Vorläuferzelle bringt Monozyten hervor, die sich unter der Stimulation mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen DZ weiterentwickeln oder bei Fehlen dieser Zytokine zu Makrophagen weiterentwickeln.

Die neuesten Erkenntnisse verbieten jedoch eine strikte Trennung der Herkunft und Entwicklung der DZ in eine myeloiden und einen lymphatischen Entwicklungsweg, da es eine komplexe Verschaltung zwischen diesen zwei Entwicklungswegen zu geben scheint (2). Somit sind die genauen Vorläufer der DZ und ihr Differenzierungsweg in vivo noch nicht vollständig aufgeklärt (3). Unabhängig jedoch von diesen neuesten Erkenntnissen gelten Monozyten, welche von CD34+ Stammzellen abstammen als eine Population von Vorläuferzellen, welche in vitro erfolgreich zu DZ maturiert werden können.

IN VITRO

Bisherige Verfahren zur Gewinnung von DZ verwendeten als Ausgangsmaterial Knochenmark, Nabelschnurblut oder Leukapherese-Produkte (11, 76, 83). Diese Verfahren erlaubten mit einem hohen Aufwand nur eine geringe Ausbeute an DZ. Sallusto et al gelang es 1994 ein Verfahren zu etablieren, mit welchem aus adultem Spenderblut und einem geringeren Aufwand eine große Anzahl von DZ-Vorläufern isoliert werden konnte (81). Bei diesem Verfahren werden Monozyten mittels Dichtegradient aus Spenderblut isoliert und über 8 bis 12 Tage unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 zu DZ maturiert. Dieses Verfahren wurde 1996 von Romani et al erweitert und ist heute eines der am häufigsten angewandte Verfahren, Monozyten in einer großen Anzahl und mit geringem Aufwand zu DZ zu züchten (77). Die aus diesem Verfahren resultierenden DZ entsprechen den von Hart definierten Kriterien (31) für DZ.

1.1.2 Maturation

Bei der Maturation von der unreifen DZ zur reifen DZ handelt es sich um einen komplexen Prozess, der phagozytierende Zellen, mit kaum immunstimulatorischen Fähigkeiten, in T-Zell-stimulierende Zellen umwandelt. Dieser Prozess ist begleitet von einer zytoskeletalen Reorganisation, geringerer Antigenaufnahme, erhöhter Zellmotilität, Migration in lymphatisches Gewebe, erhöhtem Potential zur T-Zell-Aktivierung und der Entwicklung, von den für DZ charakteristischen zytoplasmatischen Ausläufern, auch Dendriten genannt (2). Des weiteren exprimieren reife DZ eine Reihe von spezifischen Oberflächenmarkern, welche sie von unreifen DZ unterscheidet.

So exprimieren unreife DZ charakteristischerweise Mannoserezeptoren (80) und die Fcγ-Rezeptoren I und II (20). Ebenfalls auf unreifen DZ werden die für Antigenpräsentation notwendigen Marker CD1a, MHC I und MHC II (HLA-DR), die Adhäsionsmoleküle CD11, CD54 und CD58 sowie die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 exprimiert (86, 91).

Die Maturation von DZ wird von so genannten Gefahrensignalen induziert, welche die ruhenden DZ auf das Vorhandensein von Pathogenen, Inflammation oder Gewebeschädigung aufmerksam machen (2). Signale, die Maturation auslösen, werden vom Organismus selbst produziert wie z.B. CD40-Ligand, TNF α , IL-1, IL-6 und IFN α , sie werden von geschädigten Geweben sezerniert oder sind bakteriellen Ursprungs.

Nachdem die DZ von den meist infektionsbedingten chemotaktischen Reizen zum Verlassen der Blutbahn angeregt werden, erfolgt am Ort der Infektion die Ausreifung. Im peripheren Gewebe nehmen die DZ als unreife DZ Antigene mittels Endozytose oder Pinozytose auf (93), können aber auch ganze Zellen, wie beispielsweise apoptotische oder nekrotische Zellen, aufnehmen oder Antigene von gesunden Zellen übernehmen. Die aufgenommenen Antigene werden dann prozessiert und auf MHC-Moleküle geladen. Nach Maturation der DZ migriert diese in lymphatisches Gewebe und präsentiert die Antigene an B-Lymphozyten, T-Helfer- und T-Killerzellen (3). Während unreife DZ in hohem Maße zur Phagozytose befähigt sind, dabei aber weniger MHC-II-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, ändert sich dies mit der Maturation. Reife DZ sind kaum noch in der Lage zu phagozytieren, exprimieren aber nun auf ihrer dendritenreichen Zelloberfläche zahlreiche MHC-II-Moleküle, die zusätzlich über eine längere Halbwertszeit als bei den unreifen DZ verfügen. Die zuvor nur in geringer Zahl oder überhaupt nicht vorhandenen, für die T-Zell-Stimulation benötigten Moleküle werden nach der Maturation in ihrer Expression hochreguliert. So finden sich nach erfolgter Maturation, im Stadium der reifen DZ ein um eine Vielzahl erhöhte Expression der Oberflächenmarker CD 40, CD 80, CD 86 und HLA-DR (12). Auch die Adhäsionsmoleküle CD54, CD58 und CD11 werden vermehrt exprimiert (68). Zusätzlich findet sich nun CD83 und CMRF 44 als Zeichen für die erfolgte Reifung auf der Oberfläche der DZ (35, 108).

Oberflächenmarker	Monozyt	unreife DZ	reife DZ
CD1a	-	-	++
CD14	++	-	-
CD16	+	-	-
CD40	+	+/-	++
CD80	-	+	++
CD83	-	-	+
CD86	-	+	++
HLA-DR	+	++	+++

Tabelle 1: Expressionsmuster des jeweiligen Entwicklungsstadiums

1.2 Einsatz von Thiopental und Midazolam bei Schädel-Hirn-Trauma

1.2.1 Schädel-Hirn-Trauma

Schädel- Hirntraumata stellen heutzutage die häufigste Todesursache junger Männer in Industrieländern dar (57, 100). Die hohe Letalität wird dabei durch häufig auftretende sekundäre Blutungen und Hirnödemen mit damit einhergehendem gesteigerten Hirndruck bedingt (54). Pathophysiologisch stellt ein Hirnödem eine Komplikation aller akuten Erkrankungen des ZNS dar, und kann durch die mit dem Ödem einhergehende Volumenvermehrung zu lebensbedrohlichen intrakraniellen Drucksteigerungen führen. Pathogenetisch kann man das vasogene Hirnödem vom interstitiellen und vom zytotoxischen unterscheiden, wobei Mischformen häufig sind (6). Durch ein Schädel-Hirn-Trauma können alle Formen des Hirnödems verursacht werden, was in Folge zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke, erhöhter Kapillarpermeabilität, erhöhtem Natrium- und Wassereinstrom in das Hirnparenchym und Liquoraufstau führt. Eine pathologische Steigerung des Hirndrucks kann zur transtentoriellen Massenverschiebung und zum Kleinhirndruckkonus führen, welche bei entsprechender Ausprägung zu Hemiparese, Tetraplegie, Dezerebration, kortikaler Erblindung, Kreislaufstillstand, Atemlähmung und in letzter Konsequenz zum Hirntod führen können. Des Weiteren wurde eine Korrelation zwischen langfristig, nicht letal erhöhtem Hirndruck und dauerhaften neurologischen Schäden nach Therapieende festgestellt, so dass jede Steigerung des Hirndrucks eine Therapieindikation darstellt. Die Therapie des Schädel-Hirn-Traumas zielt daher in erster Linie auf die Reduktion und Kontrolle des intrakraniellen Drucks sowie den Erhalt eines ausreichenden zerebralen Perfusionsdrucks. (51). Therapeutische Vorgehen in der Intensivmedizin beinhalten die Messung des intrakraniellen Drucks, sofern keine Kontraindikationen bestehen, Sicherstellen eines ausreichenden zerebralen Perfusionsdrucks (>70 mmHg), Hochlagerung des Oberkörpers um 30°, Analgosedierung, Intubation und kontrollierte Normoventilation, Vermeiden

von Hyperkapnie, nur im Einzelfall und kurzfristig Hyperventilation, Osmotherapie und im Einzelfall die Therapie mit hypertonem NaCl unter Messung der Serumosmolalität, Vermeidung von Hyperthermie und im Einzelfall Induktion einer milden Hypothermie, Liquordrainage und operative Interventionen wie beispielsweise Ausräumung von Blutungen.

Bei Versagen dieser Maßnahmen kommt die Barbituratgabe unter EEG-Kontrolle zum Einsatz, mit dem Ziel ein Burst-Suppression-Muster zu erzeugen, und als ultima ratio die operative Dekompression durch Kraniektomie. Abhängig vom Schweregrad des erhöhten intrakraniellen Druckes werden die verschiedenen Therapiemöglichkeiten miteinander kombiniert. Unter diesen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass das Barbiturat Thiopental sowohl den Metabolismus neuronaler Zellen, als auch die zerebrale Perfusion in nicht ischämischen Arealen des Gehirns senkt und somit zu einer Reduktion des intrazerebralen Drucks und zu Neuroprotektion führen kann (26). Bei einem mit anderen Therapieansätzen nicht mehr kontrollierbaren erhöhten intrazerebralen Druck kann eine, über mehrere Tage durchgeführte Thiopentaltherapie die Letalität von schwerst Schädel-Hirn-traumatisierten Patienten senken (61) (1).

Die Therapie mit Barbituraten ist jedoch nicht unumstritten. So zeigen einige Publikationen, dass Patienten unter der Therapie mit Thiopental häufiger Pneumonien entwickelten (7, 8, 19, 58). Dies kann das Morbiditäts- und Letalitätsrisiko Schädel-Hirn-traumatisierter Patienten steigern. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Thiopental die Funktion von polymorphkernigen Leukozyten negativ hinsichtlich der chemotaktischen (45), transmigratorischen (36) und phagozytischen (59) Aktivität beeinflusst. Des weiteren wird die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten und deren Zytokinproduktion negativ beeinflusst. In der hier vorliegenden Arbeit soll nun der Effekt von Thiopental auf die Maturation von Monozyten zu DZ untersucht werden um somit möglicherweise zur Klärung des unter Thiopentaltherapie auftretenden erhöhten Infektionsrisikos beizutragen.

1.2.2 Pharmakologie und klinischer Einsatz von Thiopental

Thiopental gehört zu den Derivaten der Barbitursäure, welche zu den ältesten intravenösen Anästhetika zählt. Barbitursäure wurde erstmals 1864 von Adolf von Bayer aus Malonsäure und Harnstoff synthetisiert. Barbiturate unterscheiden sich untereinander in der Substitution und Länge ihrer Seitenketten und der Substitution an Stelle 2 des Pyrimidinrings.

Wirkort der Barbiturate sind GABA-A-Rezeptorkomplexe im zentralen Nervensystem. Die Hemmung des GABA-A-Rezeptors durch die Barbiturate führt zu einer Erhöhung des Chlorideinstroms, was eine Hyperpolarisation des Neurons bewirkt. Des Weiteren wird die intrazelluläre kalziumabhängige Signaltransduktion gehemmt. Diese Wirkungen ermöglichen die Anwendung der Barbiturate als Narkotikum und Antikonvulsivum (41). Der genaue Wirkmechanismus der Barbiturate auf das GABAerge System ist jedoch noch nicht geklärt.

Die Pharmakokinetik der Barbituratderivate wird von ihrer Lipophilie bestimmt. Die schnelle Anflutung im zentralen Nervensystem bedingt den schnellen Wirkungseintritt, die Beendigung der Wirkung wird durch Umverteilung des Wirkstoffes in Muskel- und Fettgewebe bedingt. Die sedative Wirkung hält nach einmaliger, intravenöser Gabe für ca. 5 min an. Die Plasmahalbwertszeit beträgt jedoch 11,6 Stunden. Bis dieses Phänomen 1960 durch Price bemerkt wurde, kam es zu stark verlängerter Narkosedauer und teilweise letalen hypotensiven Krisen bei Patienten nach wiederholter Gabe sedativer Dosen. Barbituraten werden deshalb überwiegend einmalig zur Narkoseeinleitung verabreicht. Thiopental und andere Barbiturate werden darüber hinaus noch zur Therapie des erhöhten intrakraniellen Drucks verwendet.

Die Anwendung von Thiopental führt zu einer Reduktion des zerebralen Glukose- und Sauerstoffmetabolismus, was in hohen Dosen zu einer deutlichen Reduktion neuronaler Funktionen führen kann, die sich im EEG als Burst-Suppression-Muster zeigt. Mit dieser Reduktion des zerebralen Metabolismus nimmt auch die zerebrale Perfusion ab. Die oben genannten Wirkungen von Thiopental ermöglichen somit den Einsatz für die Therapie des

erhöhten intrakraniellen Drucks bei neurochirurgischen Patienten, mit dem Ziel, das neurologische Outcome nach Schädel-Hirn-Trauma zu verbessern (60, 85).

1.2.3 Pharmakologie und klinischer Einsatz von Midazolam

Midazolam gehört der Substanzklasse der Benzodiazepine an, die keine Anästhetika im eigentlichen Sinn, sondern Tranquillantien darstellen. Dosisabhängig wirken Benzodiazepine: amnestisch, sedierend, anxiolytisch, antikonvulsiv und hypnotisch.

Wirkort der Benzodiazepine ist wie bei den Barbituraten der GABA A-Rezeptor, allerdings binden die Benzodiazepine an einer anderen Bindungsstelle als die Barbiturate. Die Wirkstärke ist dabei abhängig von der Affinität eines Benzodiazepins an den GABA A-Rezeptor. So bewirkt eine Rezeptorbesetzung von 20% eine Anxiolyse, eine Besetzung von 30-50% eine Sedierung und eine Rezeptorbesetzung von mehr als 60% führt zur Hypnose oder Bewusstseinsverlust (48).

Wie bei den Barbituraten führt die Aktivierung des GABA A-Rezeptors zur Öffnung von Chloridkanälen und somit zur Hyperpolarisation einer Zelle, was diese unerregbar macht. Midazolam zählt mit einer Eliminationshalbwertszeit von 1,5-3h zu den kurzwirksamen Benzodiazepinen. Die Metabolisierung erfolgt in der Leber zu dem pharmakologisch aktiven Hydroxymidazolam, welches dann in glukuronidierter Form über die Nieren ausgeschieden wird. Neben seinem Einsatz in der Prämedikation, als Sedierung für Kurzeingriffe wie Kardioversion oder Endoskopien spielt Midazolam in der Intensivmedizin, bei der Analgosedierung langzeitintubierter Patienten eine führende Rolle. Es gilt als Standardsubstanz für die Sedierung Schädel-Hirn-traumatisierter Patienten. Erst bei therapierefraktär erhöhtem ICP kann Thiopental hinzugenommen werden.

1.2.4 Anästhetika und Immunfunktion

Bereits Ende des 18. Jahrhunderts wurde entdeckt, dass die Wirkung der Anästhetika sich nicht nur auf das zentrale Nervensystem beschränkt, sondern der gesamte Organismus in die Wirkung miteinbezogen wird. Bereits um die folgende Jahrhundertwende folgten Berichte von postoperativen Veränderungen der Immunfunktion. Chadbourne als Beispiel berichtete über das Auftreten sowohl von Leukozytosen, als auch von Leukopenien nach Narkosen unter Diethyläther (13), auch liegen Berichte über den Einfluss von Chloroform, Trichlorethylen oder Barbituraten auf das Immunsystem aus dieser Zeit vor.

Seither ist die Wirkung der Anästhesie auf die Immunfunktion ein weites Gebiet aktueller Forschung. Die Wirkungen von Anästhetika sind dabei äußerst komplex. So konnten bisher in vitro die verschiedensten Effekte von Anästhetika auf das Immunsystem, das periphere und zentrale Nervensystem wie auch das endokrine System nachgewiesen werden (22, 37). Für nahezu alle zur Zeit gebräuchlichen Injektionsanästhetika aber auch volatilen Anästhetika ließen sich immunsuppressive Wirkungen nachweisen (22, 33, 34, 37, 43, 46, 47, 59).

Die Beeinflussung der Leukozytenfunktion wurde dabei bisher am genauesten untersucht. So ergaben sich für volatile Anästhetika eine Hemmung der inflammatorischen Zytokinproduktion und eine Verminderung der Lymphozytenproliferation (22, 37, 44).

Für Propofol fanden sich ebenfalls eine Hemmung der inflammatorischen Zytokinproduktion, eine verminderte Lymphozytenproliferation, eine Hemmung der Chemotaxis von Leukozyten sowie die Hemmung der Phagozytose und der Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale von Leukozyten (34, 82, 103).

Für Midazolam ließ sich, wenn überhaupt, nur ein geringer inhibitorischer Einfluss auf Leukozyten, wie Hemmung der Chemotaxis, Phagozytose und Zytokinproduktion von Leukozyten nachweisen (22, 42-44, 59).

Die häufigsten Berichte über einen hemmenden Einfluss auf Leukozyten liegen bisher für Thiopental vor. In der Literatur finden sich Studien, welche die Hemmung der Leukozytenmigration, der Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetabolite und die Hemmung der Phagozytose von Bakterien durch Leukozyten und Monozyten für Thiopental nachwies (22, 59, 70, 71, 82). Die bisher genannten Effekte von Anästhetika auf die Immunfunktion beruhen auf Studien *in vitro*, wobei sich für Barbiturate meist die stärksten immunsuppressiven Effekte nachweisen ließen.

Es ist allerdings anzumerken, dass sich die beschriebenen Effekte weitestgehend auf *In-vitro*-Studien beschränken und bisher keine Studien vorliegen, die einen Zusammenhang zwischen dem Einsatz von Anästhetika und der Inzidenz postoperativer Infektionen zeigen können (22, 37). Auch konnte bisher kein Vorteil oder Nachteil des Einsatzes eines bestimmten Anästhesieregimes nachgewiesen werden.

Die einzige Ausnahme davon scheint Thiopental zu sein. Für Thiopental gab es, im Gegensatz zu den anderen Anästhetika schon früh Hinweise darauf, dass die *in vitro* gefundenen Effekte durchaus von klinischer Relevanz sein könnten. Die klinischen Studien beziehen sich dabei meist auf langzeitsedierte Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma, die zur Neuroprotektion mit hohen Thiopentaldosen therapiert werden. Bereits 1986 stellten Braun et al. in einer Studie über das Pneumonierisiko für sedierte Schädel-Hirn-traumatisierte Patienten fest, dass die Sedierung mit Thiopental ein Risikofaktor für den Erwerb einer Pneumonie darstellt (7). Weitere Studien zeigten eine erhöhte Inzidenz und ein früheres Auftreten von Pneumonien und ein, im Vergleich zu anderen Anästhetika/Sedativa anderes Keimspektrum der Pneumonien unter Thiopentalsedierung (19, 58). Auch reversible Leukopenien, d. h. Knochenmarkssuppression einhergehend mit erhöhter pulmonaler Infektionsrate wurden beschrieben (95). Bronchard et al ermittelten in einer prospektiven Studie an 109 Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma den Einsatz von Thiopental als Risikofaktor für eine signifikant erhöhte Inzidenz von Pneumonien (8). Allerdings fehlen bis heute kontrollierte randomisierte klinische

Studien, welche die erhöhte Inzidenz von Infektionen kausal auf die Barbituratgabe zurückführen lassen.

2 Fragestellung

Die Hypothese ist, dass die nicht unumstrittenen, aber wiederholt postulierten immunsuppressiven Eigenschaften der Barbiturate möglicherweise auch durch einen Einfluss auf DZ erklärt werden können. Hierzu wird insbesondere die Quantität der von den DZ exprimierten Oberflächenmarkern CD1a, CD 40, CD80, CD86 und HLA-DR gemessen, welche für die Stimulation von T-Zellen eine große Bedeutung haben.

Im nächsten Schritt wird die Phagozytoseaktivität der unter dem Einfluss von Thiopental maturierten DZ quantifiziert. Als Kontrolle dienen DZ, die unter dem Einfluss von Midazolam maturiert sind und ebenfalls hinsichtlich der Oberflächenmarker und Phagozytoseaktivität quantifiziert werden. Um eine Dosis-Wirkungs-Beziehung ermitteln zu können, werden die Zellen unter unterschiedlichen Konzentrationen von Thiopental bzw. Midazolam maturiert.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

Wird die Morphologie der DZ bei Maturation unter Thiopental im Vergleich zu Midazolam beeinflusst?

Wird die Expression von Oberflächenmarkern auf DZ bei Maturation unter Thiopental im Vergleich zu Midazolam beeinflusst?

Wird die Phagozytoseaktivität der DZ bei Maturation unter Thiopental im Vergleich zu Midazolam beeinflusst?

3 Material und Methoden

Die Experimente erfolgten mit Zustimmung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen.

3.1 Verwendetes Untersuchungsmaterial

Zur Gewinnung von Monozyten wurden Buffy Coats verwendet, welche nach Entnahme von Erythrozyten, Thrombozyten und Plasma aus einer Blutspende verbleiben. Die benötigten Buffy Coats wurden vom Institut für klinische und experimentelle Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Tübingen freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Als Ausschlusskriterium galten eine CMV-Infektion des Spenders. Es wurden nur Buffy Coats, die nachweislich CMV-negativ waren, für unsere Versuche verwendet. Weiteres Ausschlusskriterium war die ASS-Einnahme des Spenders.

3.2 Reagenzien und Geräte

Chemikalien	Hersteller
2- Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis ; USA
ABM-Solution	Sigma, St. Louis ; USA
BSA 7,5%	Sigma, St. Louis ; USA
EDTA	Sigma, St. Louis ; USA
FBS	Biochrom, Berlin
Ficoll	Amersham Biosciences
FITC-Dextran	Sigma, St. Louis ; USA
GM-CSF	Berlex, New Jersey; USA
IL-4	RnD, Wiesbaden
Lugolsche Lösung	Sigma, St. Louis ; USA
Midazolam	Roche, Basel, Schweiz
N-acetyl L-Alanyl L-Glutamin	Biochrom, Berlin
PBS-	Gibco, Gaithersburg; USA
PBS+	Gibco, Gaithersburg; USA
RPMI-1640 Medium	Sigma, St. Louis ; USA
TNF- α	Biosource, Camarillo, USA
Trapanal [®] (Thiopental)	Altana, Konstanz,
Trypanblau	Sigma, St. Louis ; USA

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien

Antikörper und Farbstoffe

Antikörper	Hersteller
CD 1a	Becton Dickinson, Heidelberg
CD 40	Caltag, San Francisco, USA
CD 80	Caltag, San Francisco, USA
CD 86	Caltag, San Francisco, USA
HLA-DR	Caltag, San Francisco, USA

Tabelle 3 : Verwendete Antikörper und Farbstoffe

Geräte und Reaktionsgefäße

Gerät	Hersteller
50ml Spritze	Braun, Melsungen
6-Well Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Brutschrank	Heraeus, Stuttgart
FACS-Gerät	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikroskop	Leica, Solms
PH-Meter	WTW, Weilheim
Sterilfilter	Corning, Corning, USA
Zentrifuge	Heraeus, Stuttgart
Zentrifugenröhrchen 50ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen 15ml	Becton Dickinson, Heidelberg

Tabelle 4: Verwendete Reaktionsgefäße und Geräte

3.3 Rezepturen

DC-Medium

440 ml RPMI-Nährmedium, 50ml FBS, 5ml Antibiotic-antimycotic Solution, 5ml N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin und 3,5µl 2-Mercapto-Aethanol wurden zusammengeführt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und die Lösung anschließend sterilfiltriert.

Waschpuffer

10ml BSA 7,5% und 3,75ml EDTA wurden in 500ml PBS – gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und die Lösung anschließend sterilfiltriert.

FITC-Dextran

100mg FITC-Dextran wurden in 2ml Aqua injectabile aufgelöst und auf 20µl Aliquots verteilt. Dies entspricht 1mg FITC-Dextran pro Aliquot.

3.4 Methoden

3.4.1 Isolation von Monozyten aus dem Buffy-Coat

Zunächst wurden die noch im Buffy Coat enthaltenen Erythrozyten aus der Zellsuspension entfernt. Dazu wurde die aus dem Buffy Coat entnommene Zellsuspension mit PBS- im Verhältnis 1:4 verdünnt.

Erste Zellzahlbestimmung:

Von dieser verdünnten Suspension wurden 100 μ l in ein Eppendorf Zentrifugenröhrchen überführt, um dann im Verhältnis 1:10 mit Türks-Lösung versehen zu werden. Nach kurzem Einwirken der Türks-Lösung, welche Monozyten anfärbt, wurden die Zellen dann in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

Von der 1:4 verdünnten Suspension wurden dann jeweils 15ml auf 12,5 ml Ficoll in einem 50ml Zentrifugenröhrchen aufgeschichtet. Es folgte die Zentrifugation über 30 min mit 690 G bei 20°C ohne Bremse. Dies ist wichtig, um die nach Dichtegradienten-Zentrifugation separierten Schichten nicht durch den Bremsvorgang zu vermischen. Nach der Zentrifugation wurde die oberste Phase entnommen und verworfen. Die Bandensuspension wurde abpipetiert und jeweils 15ml davon mit 30ml PBS-Waschpuffer versehen und gut vermischt. Es folgte eine Zentrifugation über 10min mit 293 G bei 20°C mit Bremse. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet vorsichtig aufgeschüttelt. Die nun in 16 Zentrifugenröhrchen enthaltenen Pellets wurden mit 8ml Waschpuffer beginnend im 1. Röhrchen gelöst und dann ins nächste Röhrchen übertragen. Dieses Auswaschen der Röhrchen wurde 3mal wiederholt, jeweils Röhrchen 1-8 und 9-16 ineinander überführt, so dass zuletzt 2 Röhrchen verblieben, die auf 45 ml mit PBS-Waschpuffer aufgefüllt wurden. Es folgte eine Zentrifugation über 10min mit 293 G bei 20°C mit Bremse. Der Überstand wurde verworfen und die restlichen, in dem Pellet enthaltenen Erythrozyten, mit jeweils 5ml eiskaltem Aqua dest. lysiert. Nach 40 sec. wurden jedem Röhrchen 10 ml PBS-Waschpuffer zugegeben, die Inhalte der beiden

Röhrchen zusammengeführt. Erneute Zentrifugation über 10min mit 293 G bei 20°C mit Bremse. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 40 ml Zellmedium resuspendiert.

Zweite Zellzahlbestimmung:

10µl der Zellsuspension wurden nun mit 10µl Trypanblau gefärbt und unter Zugabe von 180µl PBS in der Neubauer- Zählkammer gezählt.

Die nun vorhandene Zellsuspension wurde auf 6-Well Platten verteilt, jeweils 1ml Zellsuspension pro Well und mit 2.5 ml Zellmedium aufgefüllt.

Die 6-Well Platten wurden nun für 2 Stunden in den Brutschrank gestellt um die benötigten Monozyten an die Platten adhären zu lassen und die sich im Überstand befindlichen Lymphozyten abnehmen zu können.

Nach 2 Stunden wurden die 6-Well Platten mit warmem PBS + solange gespült bis unter mikroskopischer Kontrolle keine freien Zellen (Lymphozyten) mehr sichtbar waren.

3.4.2 Maturation der Monozyten zu Dendritischen Zellen

Die Maturation erfolgte über 8 Tage, wobei jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel erfolgte.

An Tag 0 erfolgte nach dem Spülen der Platten die Zugabe von 2.5 ml Medium pro Well mit IL-4 und GM-CSF. (jeweils 1000U/ml).

An Tag 2 erfolgte erneut die Zugabe von 2,5 ml Medium pro Well allerdings mit jeweils 2000U/ml IL-4 und GM-CSF da davon auszugehen ist, dass die Zytokine verbraucht werden.

Ab Tag 4 wurde jeweils die Hälfte des Wellinhalts abpipetiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt und das Pellet mit neuem Medium und Zytokinen versetzt dem entsprechenden Well wieder zugeführt.

An Tag 8 erfolgte die Auswertung unserer Versuchsreihe

3.4.3 Maturation unter Thiopentalzugabe

Thiopental wurde in Aqua ad injectabilia gelöst und den in Nährmedium befindlichen Monozyten zugegeben. Grundlage für die Wahl der Konzentrationen waren Literaturangaben (9) in denen die Plasmakonzentration von Thiopental bei der Therapie des erhöhten ICP beschrieben wurde. Zusätzlich zu den beschriebenen Konzentrationen von 50 µg/ml wurden 2-fach und 5-fach höhere und 10-fach, 100-fach und 1000-fach niedrigere Konzentrationen gewählt.

Pro Versuch wurden 6 verschiedene Konzentrationen Thiopental und eine Kontrolle ohne Thiopental bestimmt.

In Vorversuchen wurde der pH- Wert nach Zugabe von Thiopental gemessen. Der gemessenen pH-Wert befand sich dabei im physiologischen Bereich, so dass eine Beeinflussung der Maturation der Monozyten durch basische pH-Werte ausgeschlossen werden konnte.

Die erstmalige Zugabe von Thiopental erfolgte an Tag 0 und wurde zu jedem Mediumwechsel d. h. an Tag 2, 4 und 6 wiederholt.

3.4.4 Kontrollmaturation mit Midazolam

Midazolam wurde mit Aqua ad injectabilia verdünnt und den in Nährmedium befindlichen Monozyten zugegeben. Die Konzentrationen wurden Literaturangaben (5) entnommen. Die eingesetzten Konzentrationen bewegten sich in einem Bereich von 0,05 – 250 µg/ml, Die erstmalige Zugabe von Midazolam erfolgte an Tag 0 und wurde zu jedem Mediumwechsel, d.h. an Tag 2,4, und 6 wiederholt.

3.4.5 Stimulation mit TNF- α

Die Stimulation mit TNF- α erfolgte an Tag 6, um bis zu Tag 8 eine Maturation der bis dahin unreifen DZ zu reifen DZ zu erwirken.

Es wurden jeweils 3 von 6 Wells (Vertiefungen) einer Platte an Tag 6 mit TNF α stimuliert. Pro ml im Well enthaltenes Nährmedium wurden 10 μ l TNF- α zugegeben. An Tag 8 folgte die durchflusszytometrische Auswertung bezüglich der Phagozytoseaktivität.

3.4.6 Probenvorbereitung

An Tag 8 unseres Versuchs erfolgte die Überführung der Zellen von den Well-Platten in 15ml Zentrifugen-Röhrchen und die Zentrifugation für 8 Minuten bei 21°C mit 746 G mit Bremse. Der Überstand wurde verworfen.

Die Platten wurden zweimal mit je 5ml PBS gespült, welches dann in die Zentrifugen-Röhrchen überführt wurde. Danach erfolgte eine Zentrifugation. Der Überstand wurde verworfen.

Die Pellets wurden in PBS- resuspendiert und maschinell aufgeschüttelt. Die Zellsuspension wurde nun in die bereits beschrifteten und mit jeweils 4 μ l fluoreszierendem Antikörper versehenen FACS-Röhrchen pipettiert. Pro Antikörper wurden 500 μ l Zellsuspension zupipettiert. Es folgte die Zugabe von 2ml PBS- pro FACS-Röhrchen und die maschinelle Aufschüttlung. Anschließend wurden die Röhrchen zentrifugiert für 6min, bei 21°C mit 249 G ohne Bremse. Der Überstand wurde verworfen.

Pro Röhrchen wurden 200 μ l FACS-Fix pipettiert. Die Röhrchen wurden aufgeschüttelt und anschließend 10min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte die durchflusszytometrische Auswertung.

3.4.7 FITC-Dextran Phagozytoseversuch

Der Phagozytoseversuch erfolgte an Tag 8 nach erwarteter Maturation zu unreifen bzw. reifen DZ.

Vorbereitung

Die Zellen wurden aus den Platten in Zentrifugen-Röhrchen überführt und die Platten mit PBS- gespült. Danach erfolgte eine Zentrifugation über 10 min, bei 293 G, bei 20°C mit Bremse. Der Überstand wurde entsorgt und das Pellet in 8ml PBS- resuspendiert. Die 8ml Zellsuspension wurden auf zwei FACS-Röhrchen verteilt, wovon eines für 60 min und das andere für 120 min mit FITC-Dextran inkubiert wurde. Die Thiopental-freien Zellen wurden in 12 ml DCM resuspendiert auf drei FACS-Röhrchen verteilt. Neben der Inkubation mit FITC-Dextran bei 60 und 120 min wurde das 3.Röhrchen als Kontrolle auf Eis gestellt, da unter Kühlung keine Phagozytose stattfindet.

Inkubation mit FITC-Dextran

Die FACS-Röhrchen mit der Zellsuspension wurden erneut zentrifugiert über 10 min bei 293 G, bei 20°C mit Bremse. Der Überstand wurde entsorgt und je FACS-Röhrchen 1ml DCM zugegeben. Den für 120 min Inkubation vorgesehenen Proben wurden nun 1mg FITC-Dextran pro Röhrchen zugegeben. Eine Stunde später erfolgte die Zugabe bei den für 60 min Inkubationszeit bestimmten Zellen.

Nach Ende der Phagozytosezeit erfolgte die weitere Verarbeitung der Proben auf Eis, um ein Fortschreiten der Phagozytose zu verhindern. Es folgte eine erneute Zentrifugation über 5 min, mit 293 G, bei 4°C mit Bremse. Der Überstand wurde entsorgt.

Nun wurden die Zellen dreimal mit 2ml PBS- gewaschen, wobei nach jeder Waschung eine Zentrifugation erfolgte. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand entsorgt und jedem FACS-Röhrchen 200µl auf 4°C temperierte FACS-Fix-Lösung zugegeben. Nach dieser Fixation erfolgte die durchflusszytometrische Auswertung.

3.4.8 Messprinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht mittels eines optischen Meßsystems die phänotypische Charakterisierung von Zellen. Dies erfolgt durch die Messung von Fluoreszenz und Granularität von teilweise zuvor mit fluoreszierenden Antikörpern markierten Zellen.

Die zuvor markierten Zellen werden aus einem Probenröhrchen in einem laminaren Strom in das Zytometer gesaugt und von einem Laserstrahl getroffen. Dabei wird immer genau eine Zelle dem Laserstrahl ausgesetzt. Beim Auftreffen des Laserstrahls auf die Zellen wird das Licht je nach Granularität, d.h. Menge und Größe intrazellulär bestehender Zellorganellen, Membranfaltung, äußerer Form, und Größe der Zelle unterschiedlich gestreut. Als Maß für die Größe der Zelle wird der Forwardscatter (FSC) verwendet, der durch die Brechung des Lichts an der Zelloberfläche entsteht. Der Sidewardscatter (SSC) entsteht durch das intrazellulär an den Organellen gebrochene Licht und ist ein Maß für die Granularität einer Zelle. Des weiteren werden die Farbstoffe der gebundenen Antikörper durch Auftreffen des Laserstrahls angeregt und geben Licht mit unterschiedlichen Emissionsspektren ab. Die Stärke der Lichtemission der Fluoreszenzfarbstoffe ist proportional zu der Menge der an der Zelle gebundenen Antikörper, somit ist eine quantitative Erfassung der Oberflächenmarker einer Zelle möglich.

Da die fluoreszenzmarkierten Antikörper nicht nur an spezifischen Antigenen auf der Zelloberfläche binden, sondern auch an unspezifischen Bindungsstellen, kann dies zu Messfehlern führen. Daher wurden in jedem Versuch Isotypkontrollen durchgeführt welche den Anteil der unspezifischen Bindungen erfassen. Darauf folgend konnte das Durchflusszytometer in seiner Fluoreszenzverstärkung so eingestellt werden, dass die unspezifischen Bindungen nicht mehr als fluoreszierend angezeigt werden.

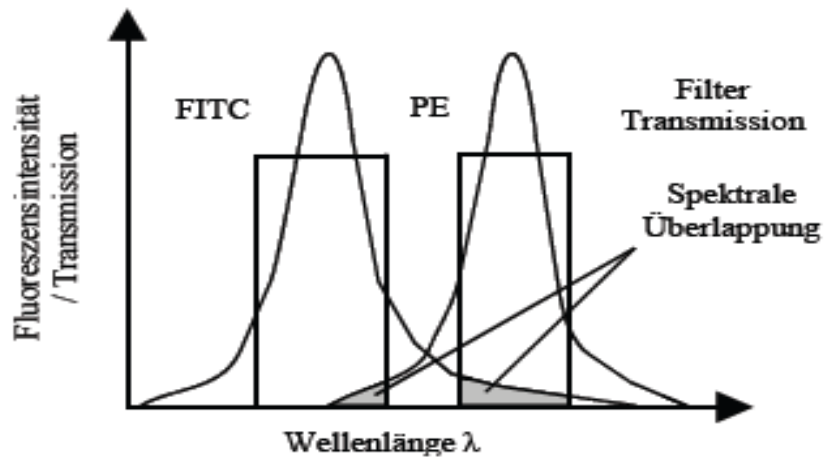


Abbildung 1: Fluoreszenzspektren der Farbstoffe FITC und PE

Bei der Messung mehrerer Farben kann es zu Fehlmessungen kommen. Diese Fehlmessungen sind in der Überlagerung der Emissionsspektren der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe begründet. Abb. 1 zeigt als Beispiel die Überschneidung der Fluoreszenzen für FITC und PE.

Um Fehlmessungen, die durch diese Überschneidung verursacht sind vorzubeugen, bzw. zu verringern, wird mit Hilfe von Farbfiltern von jedem Farbstoff nur ein bestimmter Wellenlängenbereich des emittierten Lichts gemessen. Da zwischen den einzelnen Fluoreszenzkanälen dennoch ein geringer Anteil von Überschneidungen in den Emissionsspektren vorhanden ist, muss dieser mit Hilfe von Kontrollproben für jede Fluoreszenz manuell in der Kompensationseinstellung korrigiert werden. Für die verwendeten Farbstoffe wurde die Fluoreszenzkompensation so gewählt, dass ein Überstrahlen in benachbarte Fluoreszenzkanäle nicht auftrat.

Für die Auswertung des FITC-Dextran-Phagozytoseversuchs war eine Isotypenkontrolle nicht notwendig, da das überschüssige FITC-Dextran aus der Zellsuspension ausgewaschen werden konnte und keine unspezifische Bindung zu befürchten ist, da es sich nicht um einen Antikörper handelt, sondern allein durch Phagozytose aufgenommen und nur intrazellulär gebunden wird.

3.4.9 Messung und Auswertung der Proben

Messung

Die auszuwertenden Proben enthielten, - je nach Stimulation mit TNF- α - mature (reife) oder immature (unreife) DZ.

Der durchflusszytometrische Messvorgang wurde nach 10000 Zellen pro Probe beendet. Waren nach einer Messzeit von 2 min noch keine 10000 Zellen gezählt, wurde die Messung abgebrochen und die Probe erneut aufgeschüttelt und nochmals gemessen.

Die Daten der Messungen wurden in sogenannten Listmodes gespeichert. Der Informationsgehalt der Messungen bleibt dadurch vollständig erhalten und die Daten können zu einem beliebigen Zeitpunkt reanalysiert werden.

Datenanalyse

Die Analyse und Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe der CellquestPro-Software. Dabei wurden die Daten in Punktdiagrammen, sogenannte Dot-Plots oder als Histogramme dargestellt s. Abb 2. Bei Dot-Plots handelt es sich um eine Zwei-Parameter-Darstellung, bei der, beispielsweise Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht, d.h. Zellgröße und Granularität gegeneinander aufgetragen werden können. In diesem Dot-Plot kann nun die Region markiert werden, welche als Auswertungsfenster (Gate) die Zellen enthält, die für die Analyse von Interesse sind. Die so markierte Region, kann dann wiederum in einem Histogramm dargestellt werden, s. Abb.3, in welchem z.B. die Expression eines Oberflächenmarkers gegen die Zellzahl aufgetragen wird.

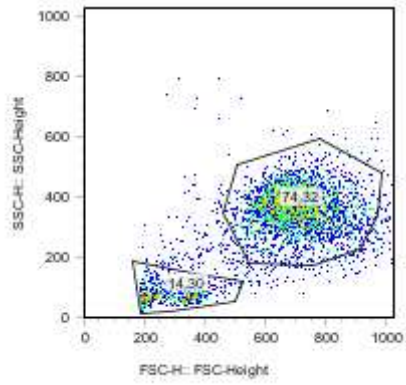


Abb 2: Dot-Plot-Histogram, Forward-Scatter gegen Side-Scatter; die umfahrenden Bereiche entsprechen dem Auswertungs-Fenster (Gate)

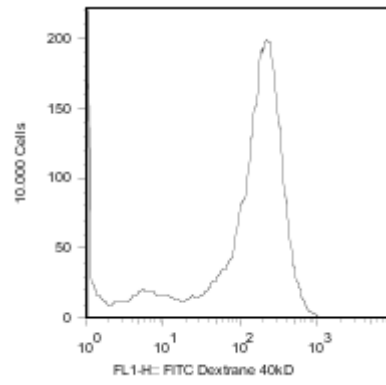


Abb 3: Histogramm, Fluoreszenz gegen Zellzahl

3.4.10 Statistische Auswertung

In jeder Probe wurden 10000 Zellen analysiert. In der ersten Versuchsreihe wurde das graphische Mittel (Geo-Mean) der Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen, und somit die quantitative Expression der Oberflächenmarker CD 1a, CD 40, CD 80, CD 86 und HLA-DR bestimmt.

In der zweiten Versuchsreihe wurde der Geo-Mean der Fluoreszenzintensität der Zellen nach FITC-Dextran Phagozytose und somit die Phagozytoseaktivität bestimmt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Es wurde von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen. Statistische Unterschiede wurden mittels One-Way Analysis of Variance (ANOVA) und anschließendem Tukey-Kramer-Test überprüft. Das Signifikanzniveau wurde für alle Ergebnisse bei $p < 0,05$ festgelegt und bezieht sich auf den Kontrollwert

Für die graphische Darstellung der Daten, wurden der Mittelwert und die Standardabweichung, die aus dem GeoMean der Fluoreszenzintensität berechnet wurden, verwendet.

Die einzelnen Messergebnisse sind als Tabellen im Anhang aufgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Morphologie der Dendritischen Zellen unter dem Einfluss von Thiopental oder Midazolam

Um zu untersuchen, ob und in welcher Art die Morphologie der Zellen unter dem Einfluss der verschiedenen Medikamente differiert, wurden die Zellen an Tag 0 und Tag 8 bei 100facher Vergrößerung mikroskopiert und fotografiert. Da sich an Tag 0 der Versuchsreihe die Zellen noch gleichen, wird hier in Abb. 4 exemplarisch die Morphologie der Zellen anhand der Kontrolle an Tag 0 gezeigt.

Kontrollzellen

Die Zellen der Kontrolle, zeigten an Tag 8 die für DZ typische Morphologie: Keine Adhärenz im Kulturgefäß, freies Schwimmen im Medium, Bildung kleiner Zellaggregate und Ausbildung kleiner Zellausläufer.

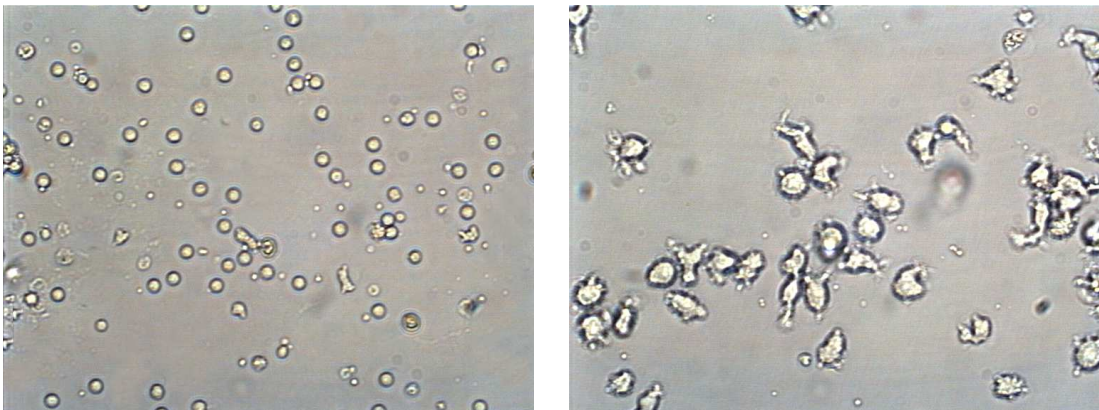


Abbildung 4: Morphologie der ohne Medikamenteneinfluss maturierten Zellen.

Links adhärierende Monozyten an Tag 0. Rechts: frei schwimmende, aggregatbildende Dendritische Zellen mit sichtbaren Zellausläufern an Tag 8 der Maturation

Thiopental

Zellen, die unter niedrigen Konzentrationen von Thiopental maturiert wurden, (0,05-0,5 und 5 $\mu\text{g/ml}$) zeigten keinen signifikanten morphologischen Unterschied zu Kontrollzellen.

Im Gegensatz dazu führten hohe Konzentrationen von Thiopental (100 und 250 $\mu\text{g/ml}$) zu kleineren Zellen, Mangel der Zellzusammenlagerung, und dem Verlust von Zellausläufern, im Vergleich zu DZ die ohne Thiopental maturiert wurden.

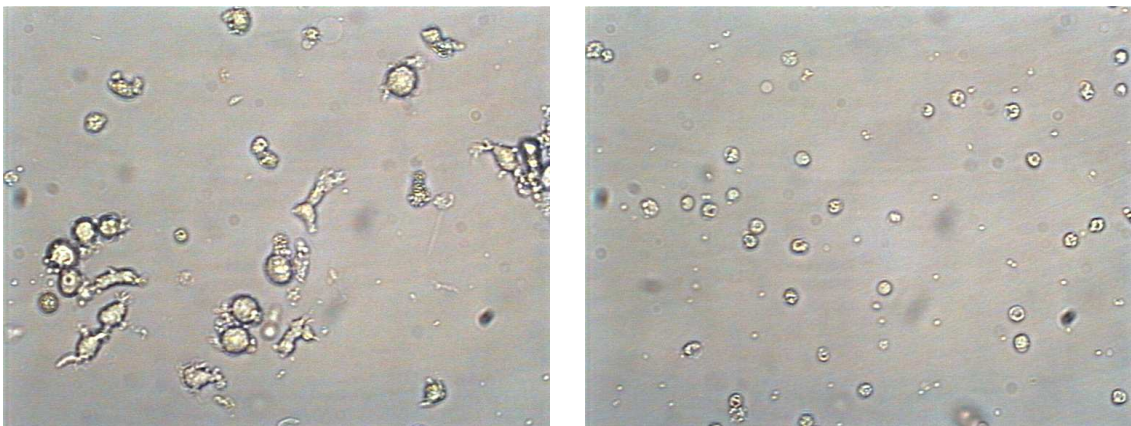


Abbildung 5: Morphologie Dendritischer Zellen unter Maturation mit Thiopental.

Links Tag 8 nach Maturation unter 50 $\mu\text{g/ml}$ die Zellen schwimmen frei im Medium, bilden Zellcluster und besitzen Zellausläufer. Rechts nach Maturation unter 250 $\mu\text{g/ml}$ Thiopental. Die Zellen sind klein, bilden keine Aggregate oder Zellausläufer aus.

Midazolam

Unter Midazolam maturierte Zellen, zeigten auch unter hohen Dosen keine signifikanten morphologischen Veränderungen. Unabhängig von der Midazolamdosierung fanden sich frei schwimmende, nonadhärente und clusterbildende Zellen, mit den für DZ typischen Zellausläufern.

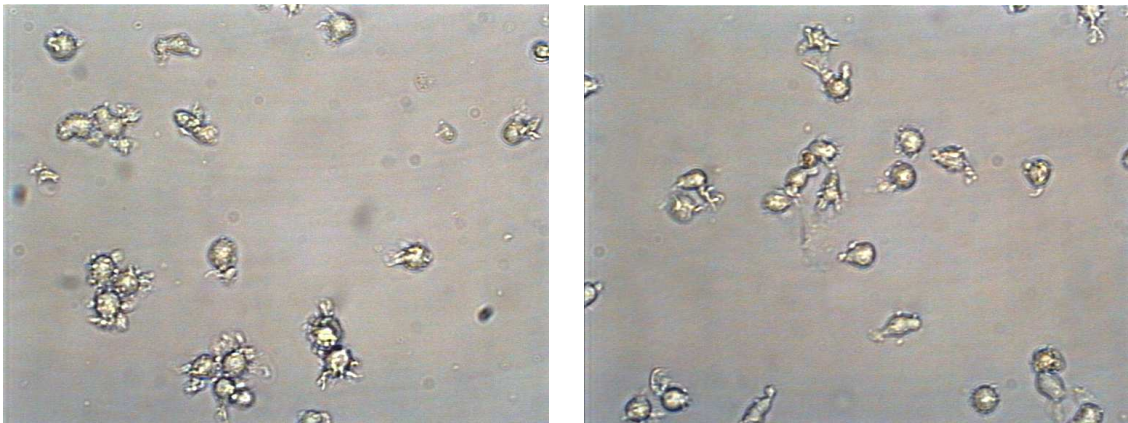


Abbildung 6: Morphologie der unter Midazolam maturierten DZ an Tag 8. Die Zellen bilden kleine Zellaggregate, schwimmen frei im Medium und haben Zellausläufer gebildet.

Links: nach Maturation unter 2500ng/ml Midazolam, Rechts: nach Maturation unter 5000ng/ml Midazolam.

4.2 Expression von Oberflächenmarkern

Nachdem die Monozyten für 8 Tage unter dem Einfluss von Thiopental bzw. Midazolam maturierten, erfolgte an Tag 8 die durchflusszytometrische Auswertung für die Oberflächenmarker CD1a, CD40, CD80, CD86 und HLA-DR, mit folgenden Ergebnissen:

4.2.1 Expression von CD1a

Thiopental

Für die Expression von CD1a zeigten sich unter niedrigen Dosen von Thiopental keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

Unter hohen Dosen von Thiopental 100 und 250 µg/ml zeigte sich jedoch eine statistisch nicht signifikante Tendenz zur Reduktion der Expression von CD1a.

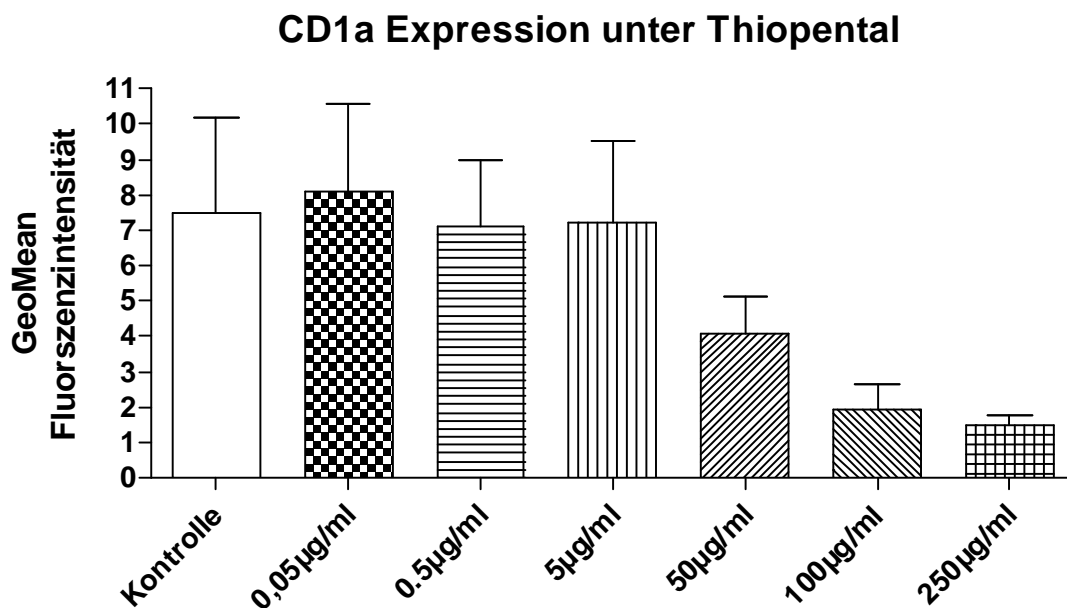


Abbildung 7: CD1a Expression der unter Thiopental maturierten DZ. (n = 5 für Kontrolle – 50µg/ml, n = 3 für 100µg/ml, n = 2 für 250µg/ml) Es wurden pro Messung 10000 Zellen ausgewertet

Midazolam

Unter dem Einfluss von Midazolam kam es unter keiner, der im Versuch verwendeten Konzentrationen, zu einer Veränderung der CD1a Expression im Vergleich zur Kontrolle. Auch Tendenzen zu einer veränderten Expression von CD1a waren nicht erkennbar

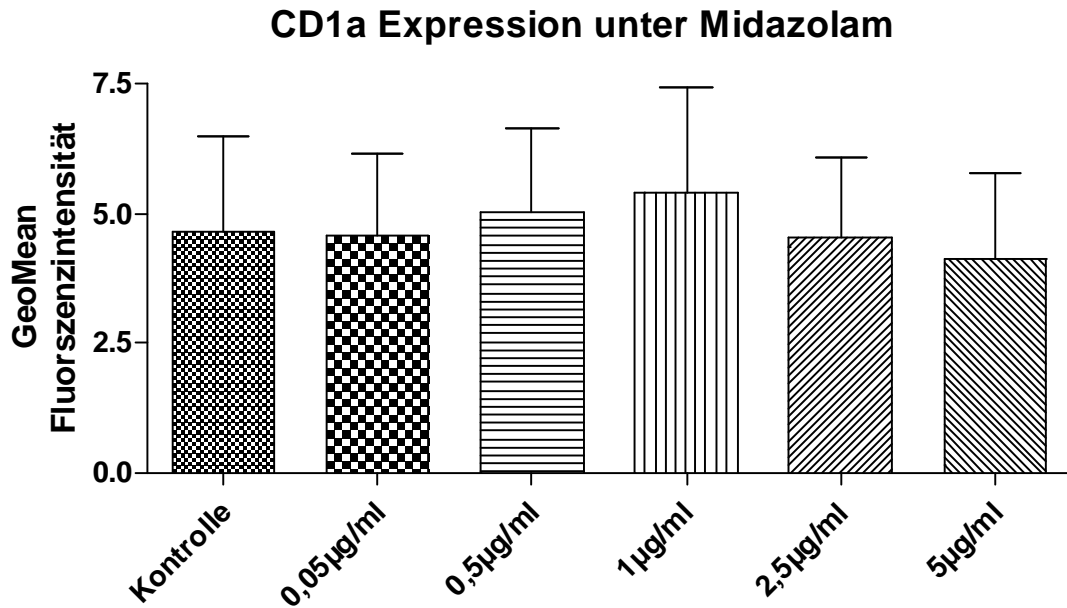


Abbildung 8: CD1a Expression der unter Midazolam maturierten DZ. (n= 3) Es wurden pro Messung 10000 Zellen ausgewertet

4.2.2 Expression von CD40

Thiopental

Für niedrigen Dosierungen von Thiopental zeigte sich keine signifikante Veränderung der CD40-Expression, auch wenn Tendenzen einer Reduktion erkennbar scheinen. Für die Zellen, die unter einer Dosierung von 50 µg/ml Thiopental und höher maturiert wurden, zeigte sich eine signifikante Reduzierung der CD40 – Expression mit $p < 0,05$ für 50µg/ml, $p < 0,05$ für 100µg/ml und $p < 0,001$ für 250µg/ml.

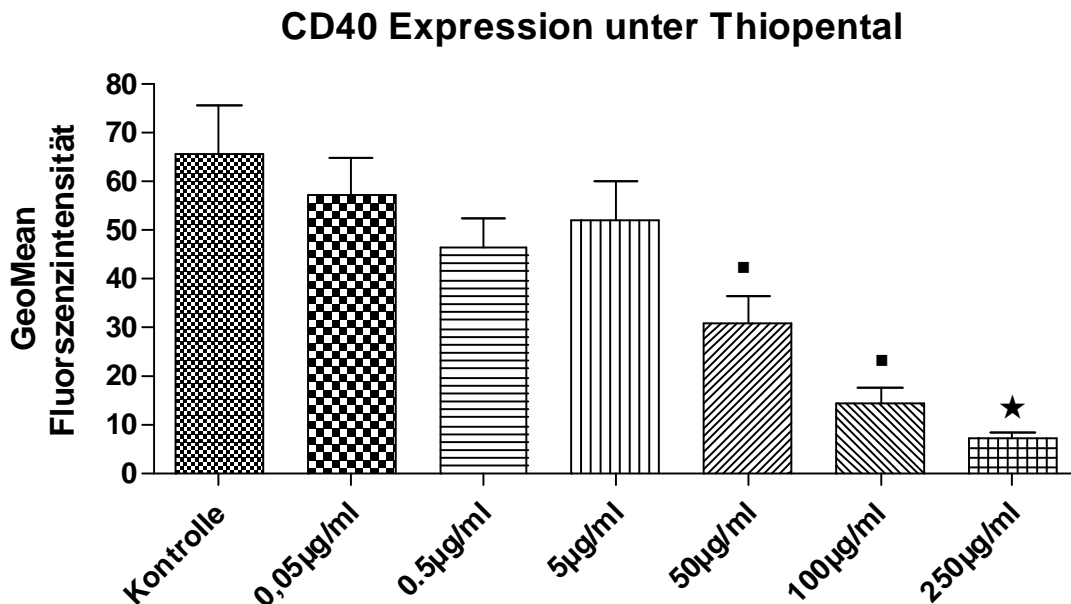


Abbildung 9: CD40 Expression der unter Thiopental maturierten DZ. Für die gekennzeichneten Konzentrationen ergab sich eine signifikant reduzierte CD40-Expression, mit $p < 0,05$ (Quadrat) für die Konzentrationen 50 und 100 µg/ml und $p < 0,001$ (Stern) für 250 µg/ml. (n = 5 für Kontrolle – 50µg/ml, n = 3 für 100µg/ml, n = 2 für 250µg/ml) Es wurden pro Messung 10000 Zellen ausgewertet.

Midazolam

Für die unter Midazolam maturierten Dendritischen Zellen konnte für keine der verwendeten Konzentrationen eine signifikante Veränderung die CD40-Expression betreffend festgestellt werden.

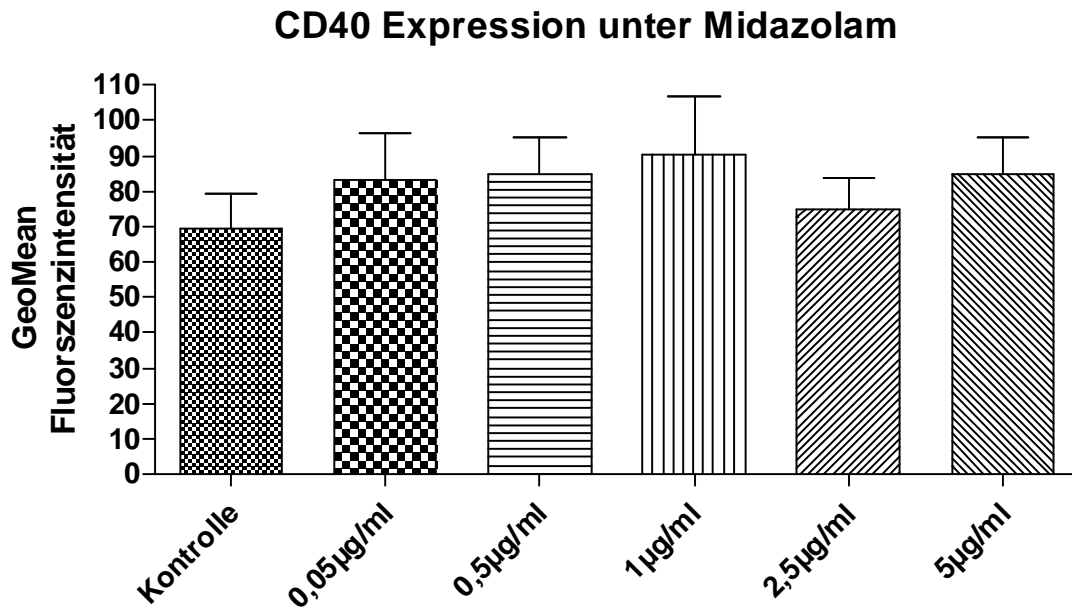


Abbildung 10: CD40 Expression der unter Midazolam maturierten DZ. Es ist keine Beeinflussung der CD40-Expression ersichtlich. (n = 3) Es wurden pro Messung 10000 Zellen ausgewertet.

4.2.3 Expression von CD80

Thiopental

Die Maturation unter Thiopental zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression des Oberflächenmarkers CD80. Unter allen verwendeten Konzentrationen bewegte sich die CD80 Expression in ähnlichen Bereichen. Der für die Konzentration von 250µg/ml in der Grafik sichtbare Anstieg der CD80 Expression war statistisch nicht signifikant.

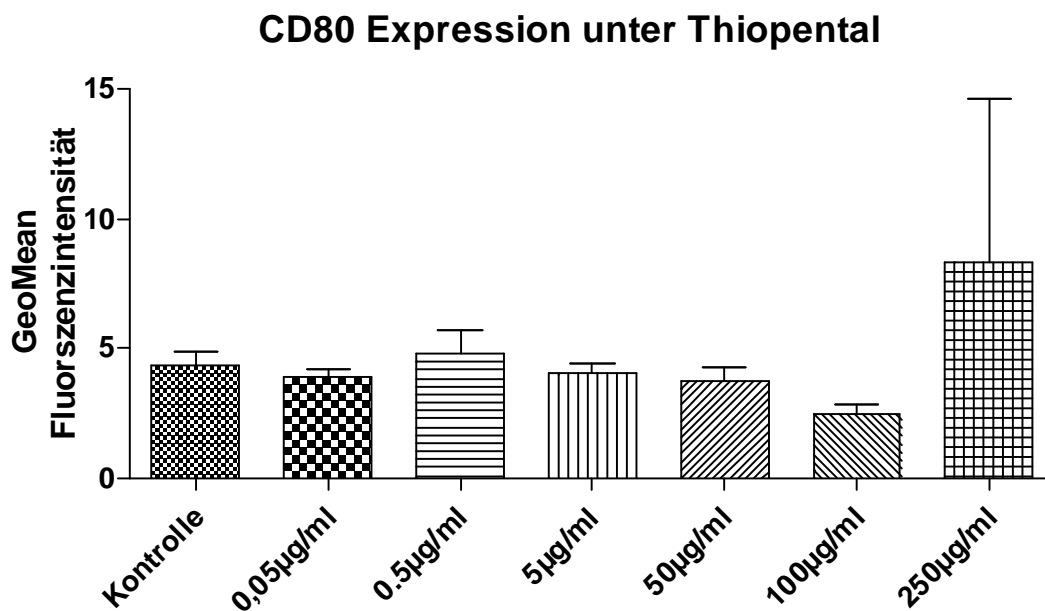


Abbildung 11: CD80 Expression der unter Thiopental maturierten DZ. Es ist keine Beeinflussung der CD80-Expression ersichtlich. (n = 4 für Kontrolle – 50µg/ml, n = 2 für 100µg/ml, n = 2 für 250µg/ml) Es wurden pro Messung 10000 Zellen ausgewertet.

Midazolam

Für unter Midazolam maturierte DZ ließ sich keine signifikante Veränderung der CD80 Expression nachweisen

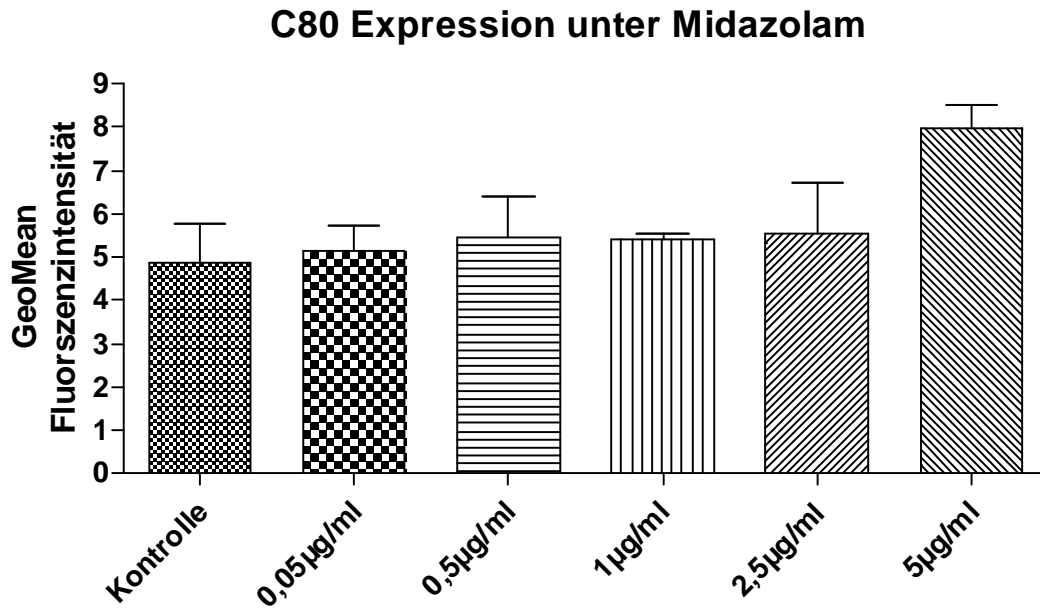


Abbildung 12: CD80 Expression der unter Midazolam maturierten DZ. Es ist keine Beeinflussung der CD80-Expression ersichtlich. (n = 3) Es wurden pro Messung 10000 Zellen ausgewertet.

4.2.4 Expression von CD 86

Thiopental

Für die unter Thiopental maturierten DZ fanden sich für niedrige Konzentrationen keine Unterschiede in der Expression von CD86. Für die hohen Thiopentalkonzentrationen 100 µg/ml und 250µg/ml fanden sich signifikante Anstiege in der CD 86 Expression mit $p < 0,05$ für 100µg/ml und $p < 0,001$ für 250µg/ml.

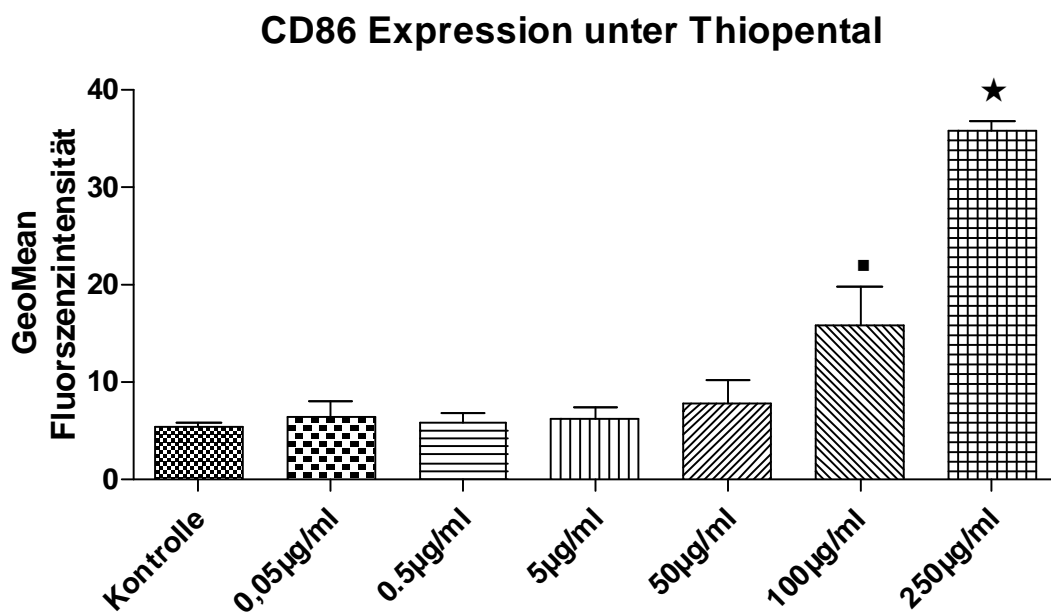


Abbildung 13: CD86 Expression der unter Thiopental maturierten DZ. Für die gekennzeichneten Konzentrationen ergab sich eine signifikant erhöhte CD86-Expression, mit $p < 0,05$ (Quadrat) bei 100 µg/ml und $p < 0,001$ (Stern) bei 250 µg/ml. (n = 4 für Kontrolle – 50µg/ml, n = 2 für 100µg/ml, n = 2 für 250µg/ml) Es wurden pro Messung 10000 Zellen ausgewertet.

Midazolam

Für unter Midazolam maturierte DZ ließ sich keine signifikante Veränderung bezüglich der CD86 Expression nachweisen.

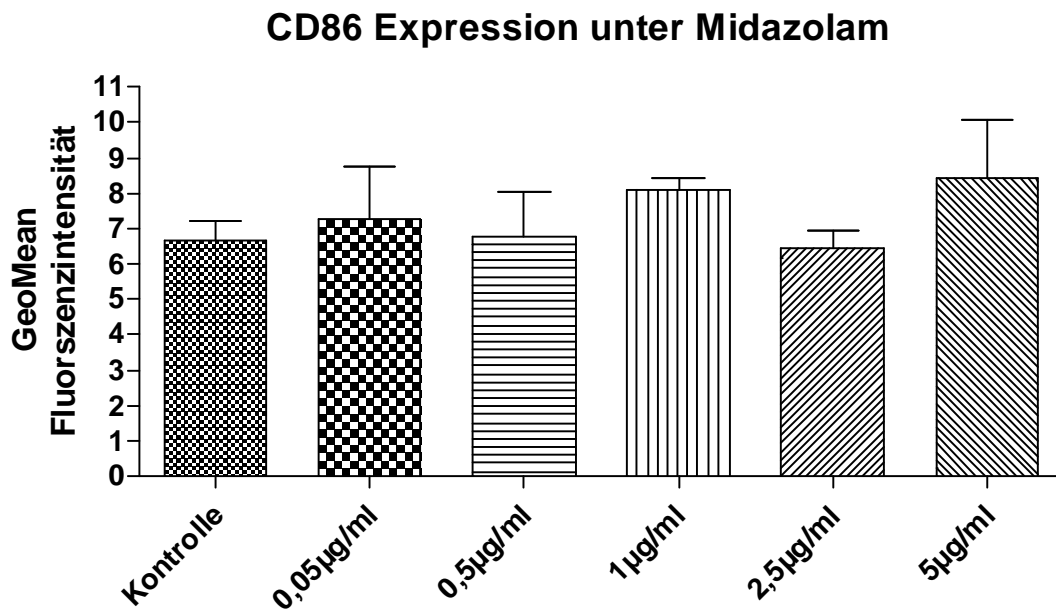


Abbildung 14: CD86 Expression der unter Midazolam maturierten DZ. Es ist keine Beeinflussung der CD86-Expression ersichtlich. (n = 2) Es wurden pro Messung 10000 Zellen ausgewertet.

4.2.5 Expression von HLA-DR

Thiopental

Die unter dem Einfluss von Thiopental maturierten DZ zeigten unter niedrigen Thiopentaldosierungen keine Veränderung ihrer HLA-DR-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Unter den hohen Dosen 100µg/ml und 250µg/ml zeigte sich eine, statistisch nicht signifikante, Tendenz zur reduzierten HLA-DR-Expression im Vergleich zur Kontrolle.

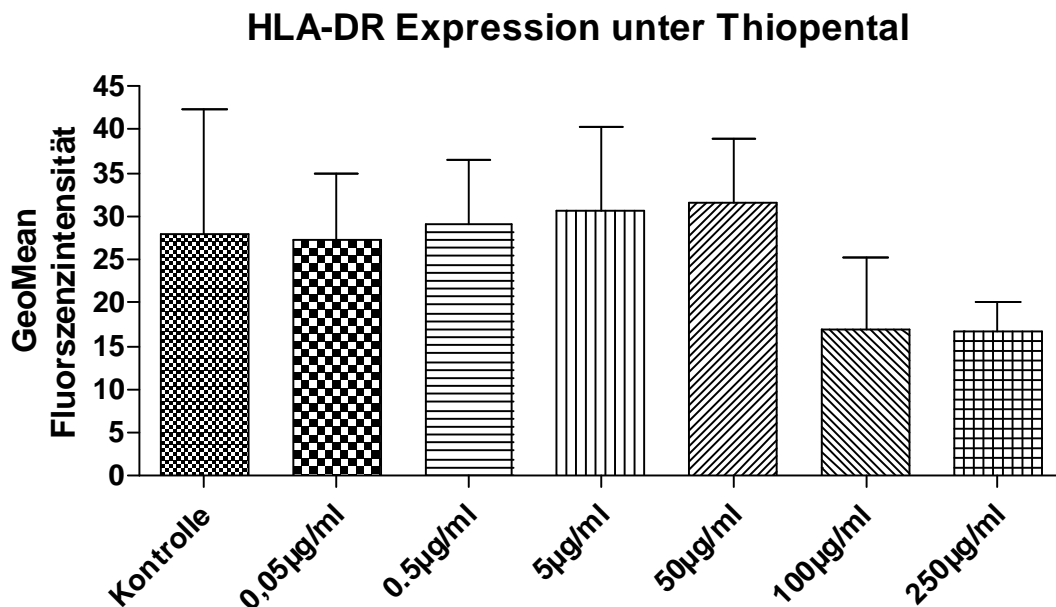


Abbildung 15: HLA-DR Expression der unter Thiopental maturierten DZ. Es ist keine Beeinflussung der HLA-DR Expression ersichtlich. (n = 4 für Kontrolle – 50µg/ml, n = 2 für 100µg/ml, n = 2 für 250µg/ml) Es wurden pro Messung 10000 Zellen ausgewertet.

Midazolam

Für unter Midazolam maturierte DZ ließ sich keine signifikante Veränderung bezüglich der HLA-DR-Expression nachweisen. Für die hohe Dosierung von 5µg/ml Midazolam scheint ein tendenzieller Anstieg der HLA-DR-Expression sichtbar zu werden, dieser ist statistisch jedoch nicht signifikant.

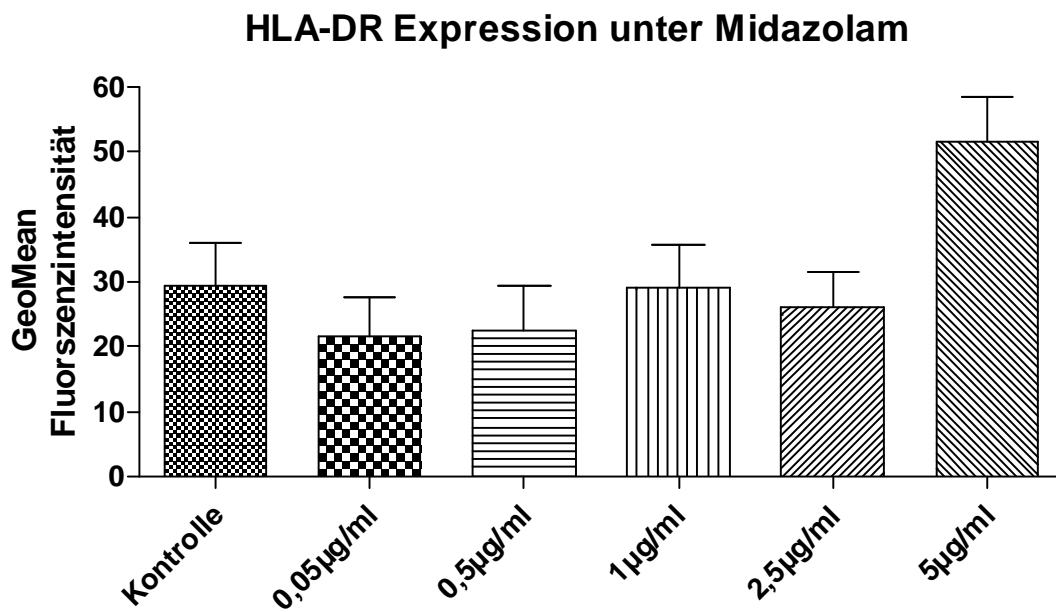


Abbildung 16: HLA-DR Expression der unter Midazolam maturierten DZ. Es ist keine Beeinflussung der HLA-DR-Expression ersichtlich. (n = 3) Es wurden pro Messung 10000 Zellen ausgewertet.

4.3 Phagozytoseaktivität

Die für die Antigenpräsentation und Immunstimulation wichtige Fähigkeit der Phagozytose wurde untersucht, indem reife und unreife DZ über 60 und 120 Minuten mit FITC-markiertem Dextran inkubiert wurden. Für die Auswertung wurde das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität gewählt, welche für die Menge des intrazellulär aufgenommenen FITC-Dextran steht und somit die Phagozytoseaktivität der untersuchten DZ zeigt. Die graphische Darstellung stellt den geometrischen Mittelwert und die Standardabweichung dar.

4.3.1 Thiopental

Ohne Stimulation

Für die unstimulierten unter Thiopental maturierten Zellen zeigte sich im zeitlichen Verlauf von 60 zu 120 Minuten ein Anstieg der Phagozytose.

In Abhängigkeit der Thiopentalkonzentration zeigte sich eine Abnahme der Phagozytose. Für die Konzentrationen bis 50µg/ml zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle nur eine geringe Tendenz zur Abnahme der Phagozytosefähigkeit. Bei einer Konzentration von 100µg/ml zeigte sich jedoch eine signifikant reduzierte Phagozytosefähigkeit. Sowohl nach 60 min als auch nach 120 min gab es eine signifikante Korrelation zwischen Phagozytoseleistung und Medikamentendosierung. Gegenüber der Kontrolle zeigte sich für die maximale Dosierung von 100µg/ml Thiopental eine reduzierte Phagozytoseleistung nach 60 min mit einem $p < 0,001$ und nach 120 min eine Reduktion mit einem $p < 0,05$ (s. Abb 17).

Phagozytose unstimuliert nach 60'/120'

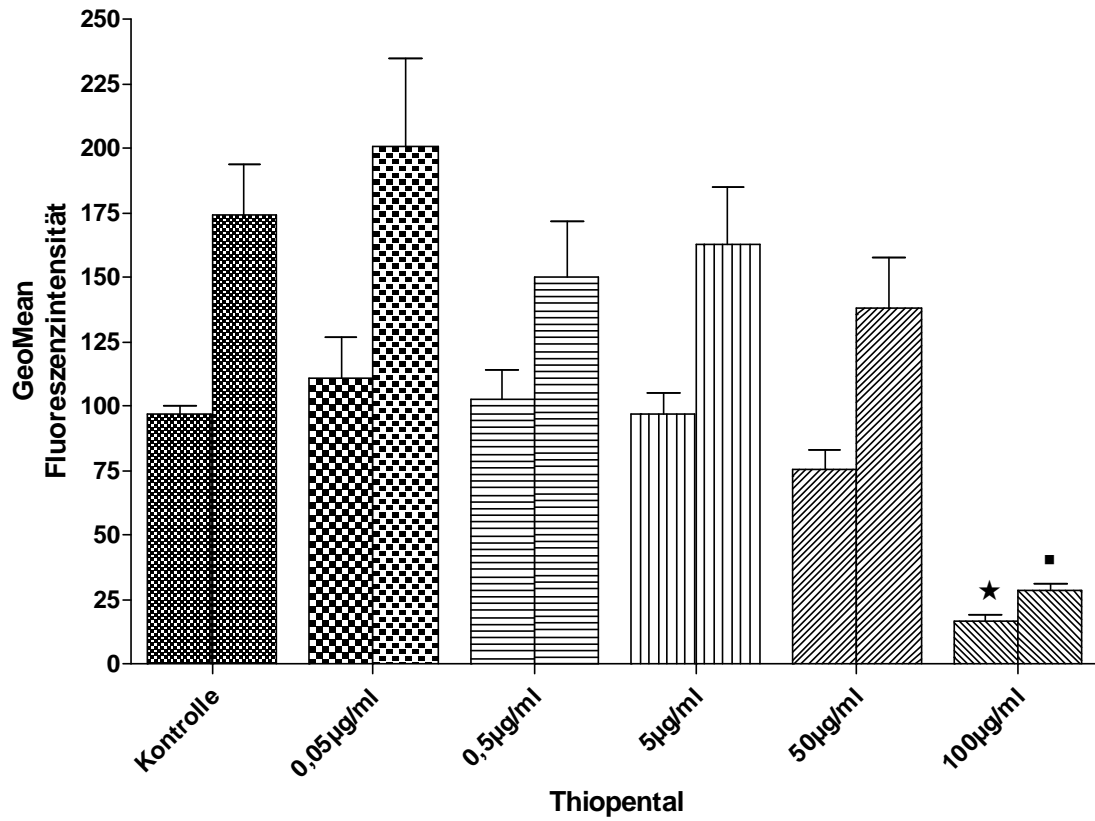


Abbildung 17: Phagozytose nach 60 Minuten (linker Balken) und 120 Minuten (rechter Balken), der unter Thiopental maturierten unstimulierten DZ. Es fand sich eine signifikante Reduzierung der Phagozytose nach 60 und 120 Minuten bei 100 µg/ml, mit $p < 0,001$ (Stern) und $p < 0,05$ (Quadrat). ($n = 2$ für die Kontrolle, $n = 3$ für die übrigen Konzentrationen) Es wurden pro Messung 10000 Zellen ausgewertet.

Nach Stimulation

Für die mit TNF- α stimulierten Zellen zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der Phagozytose im Verlauf der Zeit.

Eine Korrelation zwischen Phagozytoseverhalten und Thiopentalkonzentration war weder signifikant noch in Tendenzen erkennbar. In keiner Konzentration konnte eine signifikant reduzierte Phagozytoseleistung dargestellt werden.

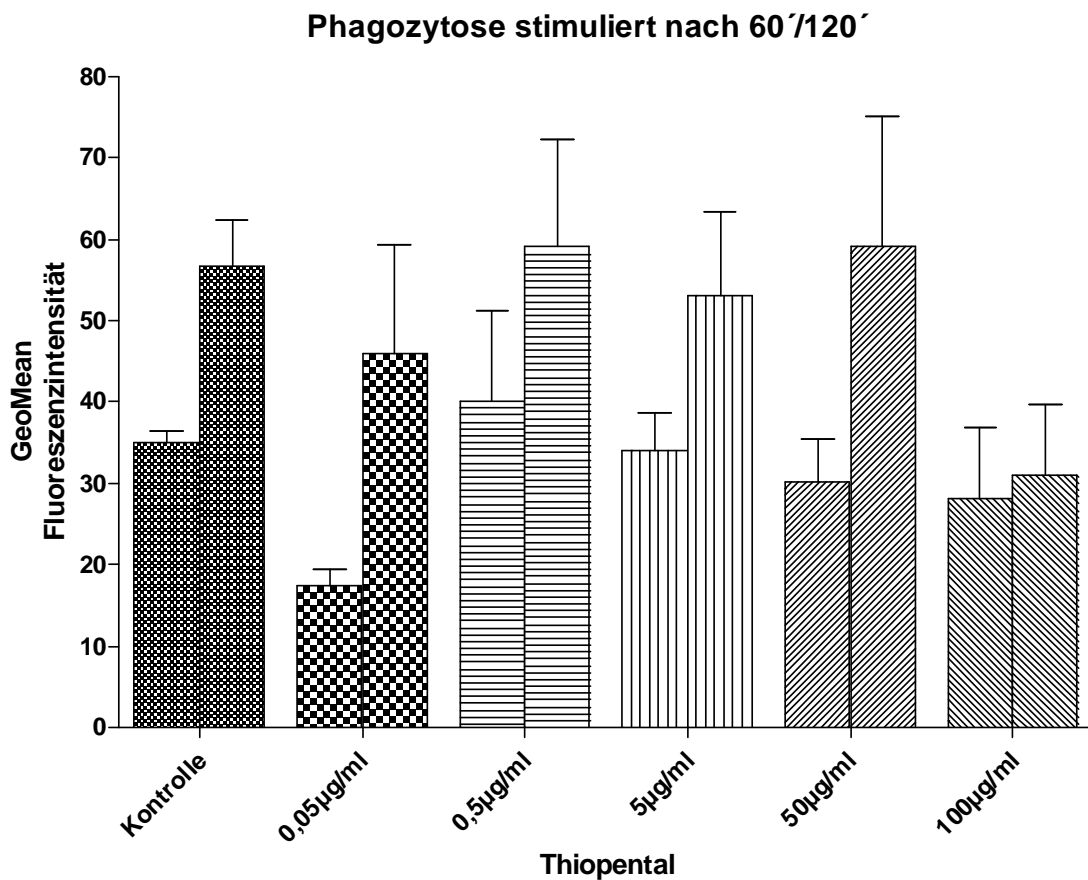


Abbildung 18: Phagozytose nach 60 (linker Balken) und 120 (rechter Balken) Minuten, der unter Thiopental maturierten stimulierten DZ. Es ließ sich keine thiopentalabhängige Beeinflussung der Phagozytose erkennen. (n = 2 für die Kontrolle, n = 3 für die übrigen Konzentrationen) Es wurden pro Messung 10000 Zellen ausgewertet.

4.3.2 Midazolam

Ohne Stimulation

Für Midazolam zeigte sich in Abhängigkeit der Zeit ein Anstieg des phagozytierten FITC-Dextrans.

In Abhängigkeit der Konzentration von Midazolam ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Phagozytoseverhalten erkennen.

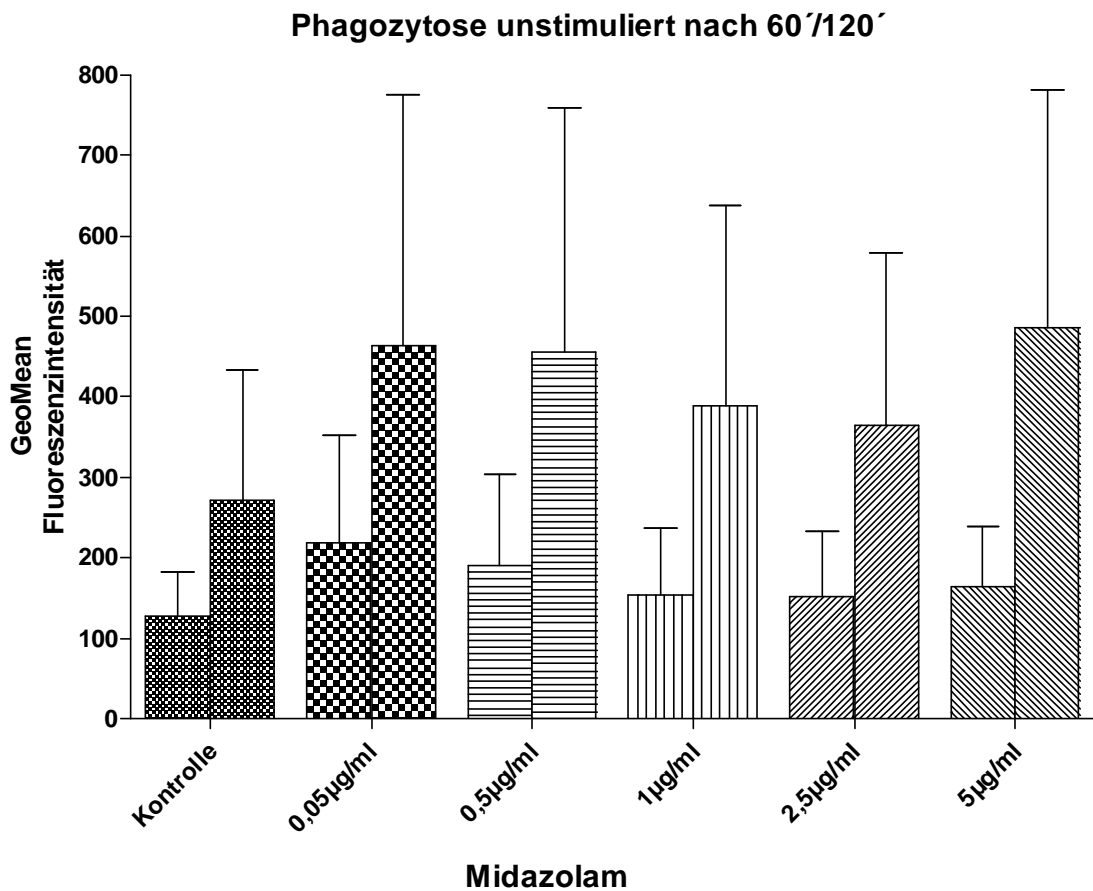


Abbildung 19: Phagozytose nach 60 (linker Balken) und 120 (rechter Balken) Minuten, der unter Midazolam maturierten unstimulierten DZ. Es war keine signifikante Beeinflussung der Phagozytose nachweisbar. (n = 2) Es wurden pro Messung 10000 Zellen ausgewertet.

Nach Stimulation

Für die mit TNF- α stimulierten und unter Midazolam maturierten Zellen zeigte sich in zeitlicher Abhängigkeit eine tendenzielle, statistisch nicht signifikante Zunahme der Phagozytose. In Korrelation zur Dosierung des Midazolams ließ sich keine signifikante Beeinflussung der Phagozytose erkennen.

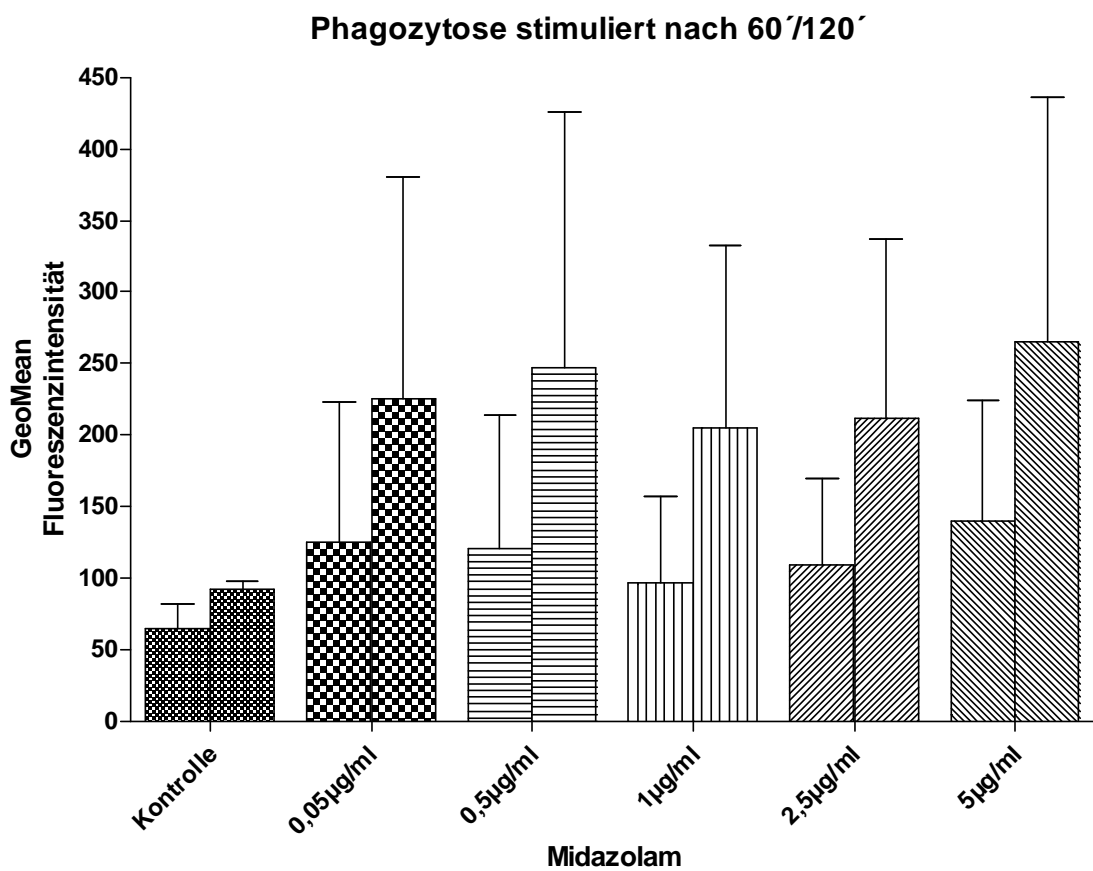


Abbildung 20: Phagozytose nach 60 (linker Balken) und 120 (rechter Balken) Minuten, der unter Midazolam maturierten unstimulierten DZ. Es war keine signifikante Beeinflussung der Phagozytose nachweisbar. (n=2) Es wurden pro Messung 10000 Zellen ausgewertet.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Maturation von Monozyten zu DZ unter dem Einfluss von Thiopental oder Midazolam beeinträchtigt wird. Dabei wurde die Expression der für DZ charakteristischen Oberflächenmarker CD1a, CD40, CD80, CD86 und HLA-DR durchflusszytometrisch bestimmt. Des Weiteren wurden die Zellen vor und nach Maturation bei 100facher Vergrößerung mikroskopiert, um somit morphologische Unterschiede, falls vorhanden zu dokumentieren.

Für niedrige Konzentrationen von Thiopental und für jede der eingesetzten Konzentrationen von Midazolam ließen sich keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle feststellen. Die Zellen lagen freischwimmend und aggregatbildend im Medium vor und hatten kurze Zellausläufer gebildet.

Für hohe Konzentrationen fand sich eine veränderte Zellmorphologie dahingehend, dass vermehrt Zellen abstarben, und die an Tag 8 verbliebenen Zellen morphologisch den an Tag 0 eingesetzten Monozyten ähnelten. Die Zellen blieben klein, bildeten keine Aggregate und Zellausläufer aus.

Bezüglich der Beeinflussung der Expression der Oberflächenmarker fanden sich für Thiopental und Midazolam die folgenden Ergebnisse:

Für die Oberflächenmarker CD1a, CD80, CD83 und HLA-DR fanden sich weder für Thiopental noch für Midazolam signifikante Veränderungen. Bei unter hohen Dosen Thiopental maturierten DZ erschien für CD1a in der graphischen Darstellung eine deutliche Tendenz für eine reduzierte Expression, diese war statistisch jedoch nicht signifikant.

Mit deutlicher Signifikanz fanden sich reduzierte Werte der CD40 Expression bei unter Thiopental maturierten DZ, für die Dosierungen 50, 100 und 250 µg/ml.

Ebenfalls signifikant waren die Werte für unter 100 und 250µg/ml Thiopental matrierte Zellen, die CD86-Expression betreffend. Hier waren die Werte im Vergleich zur Kontrolle jedoch erhöht.

Unter dem Einfluss von Midazolam fanden sich weder für CD40 noch für CD86 Veränderung in der Expressionsfähigkeit der Dendritischen Zellen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht ob die Maturation von DZ unter dem Einfluss von Thiopental oder Midazolam die Fähigkeit der maturen und immaturen DZ zur Phagozytose beeinflusst. Um die über insgesamt 8 Tage matrierten DZ zur Ausreifung zu bringen, wurden diese an Tag 6 mit TNF- α stimuliert, um somit an Tag 8 reife DZ zu erhalten.

Die unter Thiopental matrierten unstimulierten Zellen glichen in ihrem Phagozytoseverhalten bei den niedrigen Dosierungen bis 50µg/ml dem der Kontrolle. Für die in diesem Versuchsteil eingesetzte Höchstdosis von 100µg/ml zeigte sich jedoch eine deutlich reduzierte Phagozytoseleistung sowohl nach 60 min wie auch nach 120 min.

Für die mit TNF- α stimulierten, reifen DZ fanden sich in den eingesetzten Thiopentaldosierungen keine Beeinträchtigung der Phagozytoseleistung.

Die unter Midazolam matrierten Zellen zeigten in keiner der verwendeten Dosierungen und zu keinem Messzeitpunkt eine Beeinträchtigung der Phagozytose.

Auch bei stimulierten DZ zeigte sich keine Veränderung der Phagozytose, weder in Abhängigkeit der Midazolamdosierung noch zu einem der 2 Messzeitpunkte.

Vergleicht man nun die Ergebnisse der zwei Medikamente so zeigt sich, dass Thiopental im Gegensatz zu Midazolam die Maturation von Monozyten zu DZ partiell beeinflusst. Während sich bei Thiopental für die Oberflächenmarker CD40 und CD86 eine eindeutige Veränderung feststellen lässt, bleiben für Midazolam die Werte aller Oberflächenmarker im Vergleich zur Kontrolle unbeeinträchtigt.

Ebenfalls durch Thiopental signifikant beeinträchtigt ist die Phagozytoseaktivität der unstimulierten DZ für hohe Dosen Thiopental sowohl nach 60 min als auch nach 120 min. Für unter Midazolam maturierte unstimulierte DZ hingegen findet sich keine Veränderung der Phagozytosefähigkeit.

Für die mit TNF- α stimulierten DZ findet sich kein Unterschied zwischen den unter Thiopental und den unter Midazolam maturierten DZ. Zu keinem der Messzeitpunkte differieren die Werte für Phagozytose in Abhängigkeit von Medikament oder Dosis im Vergleich zur Kontrolle.

5 Diskussion

5.1 Methoden

5.1.1 Auswahl der verwendeten Buffy Coats

Die von uns verwendeten Zellen entstammen Buffy Coats freiwilliger Spender, welche uns vom Institut für klinische und experimentelle Transfusionsmedizin der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt wurden.

Bei der Auswahl der Buffy Coats galt die ASS-Einnahme des Spenders als ein Ausschlusskriterien.

Untersuchungen von Hackstein und Matasic zeigten, dass, die Einnahme von ASS dosisabhängig die Differenzierung von DZ negativ beeinflusst, und dies geschieht bereits in Dosierungen, die für Patienten mit Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis, üblich sind (28, 53). So zeigten sich unter dem Einfluss von ASS reduzierte Expressionen der Oberflächenmarker CD40, CD80, CD86, CD83 und HLA-DR. Des weiteren waren unter ASS maturierte DZ in ihrer Fähigkeit zur Stimulation der T-Zellproliferation stark eingeschränkt. Morphologisch wiesen reife DZ die Merkmale unreifer DZ auf.

Ein weiteres Ausschlusskriterium für die verwendeten Buffy Coats war die CMV-Infektion des Spenders. Unterschiedliche Studien (25, 56, 74) konnten zeigen, dass die Monozyten CMV-infizierter Spender nicht im natürlichen Maße zu DZ reifen können. Bedingt durch die Produktion des immunsuppressiv wirksamen IL-10 Analogons des CMV-Viruses, CMVIL-10 (90) wird die Expression der Oberflächenmarker CD40, CD80, CD86 deutlich und die Expression von HLA-DR leicht reduziert. Die untersuchten DZ waren nicht in der Lage, IL-12 zu produzieren und die von ihnen stimulierten T-Zellen waren in ihrem Proliferationsverhalten deutlich eingeschränkt. Des weiteren waren die untersuchten DZ in ihrem Phagozytoseverhalten beeinträchtigt und unter der Maturation stellte sich bei einer erhöhten Zellzahl Apoptose ein (74).

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Thiopental bzw Midazolam auf die Maturation von Monozyten zu DZ zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die DZ hinsichtlich ihrer Fähigkeit der Expression der Oberflächenmarker CD1a, CD40, CD80, CD86 und HLA-DR untersucht. Da nun die Expression dieser für uns relevanten Oberflächenmarker, durch eine ASS-Einnahme des Spenders oder die CMV-Infektion des Spenders beeinträchtigt werden und somit die Ergebnisse in ihrer Aussagekraft einschränken, wurden das Vorliegen einer oder beider genannter Merkmale als Ausschlusskriterium festgelegt.

Für die CMV-Infektion erfolgte zum Zeitpunkt der Laborversuche eine routinemäßige Testung des Spenderbluts auf IgG gegen CMV. Per Definitionem war somit eine CMV-Freiheit gegeben, auch wenn durch diese Testung seltene Fälle einer frischen CMV-Infektion nicht ausgeschlossen werden konnte.

Die Angabe der ASS-Freiheit beruht auf der wahrheitsgemäßen Angabe des Spenders und schließt somit eine ASS-Einnahme nicht völlig aus.

Zusammenfassend können also Faktoren im Bereich des Ausgangsmaterials nicht vollständig ausgeschlossen werden. Insgesamt kann aber davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Veränderungen in der Expression von Oberflächenmarkern tatsächlich auf den Einfluss der im Experiment verwendeten Medikamente – und nicht auf diese bekannten äußeren Störfaktoren – zurück zu führen ist.

5.1.2 Generierung von Dendritischen Zellen aus Monozyten

Nach der erstmaligen Entdeckung DZ in Form der Langerhanszellen der Epidermis durch Paul Langerhans, rückten diese Zellen ab 1973, nach der Entdeckung morphologisch ähnlicher Zellen in der Milz von Mäusen durch Steinman (92) in den Focus der Wissenschaft. Kurze Zeit später wurde entdeckt, dass DZ potente Stimulatoren der primären Immunantwort darstellen (39, 94, 105) und sowohl in nahezu allen lymphatischen als auch nichtlymphatischen Organen des Menschen zu finden sind (32). Diese Entdeckung und die folgenden zogen enorme Anstrengungen nach sich, DZ zu isolieren.

Zunächst versuchte man DZ aus dem peripheren Blut und Lymphorganen zu isolieren. Mangels Wissen um für DZ charakteristische Oberflächenmerkmale konnte dies nur aufgrund morphologischer Kriterien geschehen. Die damals angewandten Verfahren nutzten, die im Vergleich zu anderen Zellen, unterschiedliche Dichte der DZ zur Separation der verschiedenen Zellpopulationen und somit Isolation der DZ mittels Dichtegradientenzentrifugation (104).

Ein anderes Verfahren war die Entfernung verunreinigender Zellen, deren Oberflächenmarker bekannt waren, um isolierte DZ zu erhalten. Da DZ nur einen sehr geringen Anteil der im Blut zirkulierenden Zellen ausmachen, waren diese Methoden sehr aufwändig und die Anzahl der isolierten Zellen nur sehr gering. Mittlerweile gibt es die Möglichkeit, die Ausbeute von in vivo gereiften DZ mittels Stimulation durch Fit3Ligand zu erhöhen (73, 87). Dennoch wird für klinische und experimentelle Zwecke die in vitro Generierung von DZ aus Vorläuferzellen bevorzugt.

Für die Generierung von DZ in vitro wurden zunächst CD34 positive Stammzellen oder Stammzellen aus Nabelschnurblut verwendet, die dann unter GM-CSF und TNF- α maturiert wurden (11). Etwa zur selben Zeit suchte man intensiv nach im Blut zirkulierenden Vorläuferzellen der DZ. Die 1991 von Peters et al aufgestellte Hypothese, Monozyten seien im Blutkreislauf

zirkulierende Vorläuferzellen (67) wurde 1996 von Zhou et al bestätigt und neue Verfahren der DZ-Gewinnung konnten etabliert werden (109). Noch vor dieser Entdeckung durch Zhou, gelang es Sallusto erstmals aus zirkulierenden mononukleären Zellen DZ zu kultivieren (81). Erstmals konnten somit eine große Anzahl DZ auf einfache Weise generiert werden.

Diese von Sallusto etabliert Methode, 1996 von Romani erweitert (78), ist auch heute noch eine der am häufigsten angewandten Methoden zur Kultivierung hoher Zahlen DZ. Es werden dabei durch Dichtegradient isolierte Monozyten aus Spenderblut über 5 bis 7 Tage unter der Zugabe von GM-CSF und IL-4 zu DZ maturiert. Mittlerweile wurde dieses Verfahren erweitert, indem die Isolation der Monozyten durch Leukapherese (101) oder mittels magnetischer Beads erfolgt.

Seit 2003 wurden mit den Verfahren von Dauer (16, 63), ein Verfahren etabliert, welches es ermöglicht, in nur 48h eine große Menge DZ zu generieren. Dieses Verfahren ist vor allem für die Immuntherapie tumorkrankter Patienten von großer Bedeutung.

Für diese Arbeit wurde das Verfahren von Sallusto bzw. das darauf beruhende und erweiterte Verfahren von Romani gewählt. Dadurch konnte Spenderblut verwendet werden, ohne die Erfordernis die Spender mit Fit3-Ligand vor zu behandeln um eine Zellexpansion zu erreichen. Die Möglichkeit DZ aus CD34 positivem Stammzellen zu generieren wäre erheblich kostspieliger und mit erheblich mehr Aufwand verbunden gewesen. Die Generierung der DZ innerhalb von 48 h fand in unserer Arbeit keine Anwendung, da wir die Bedingungen unter Langzeitsedierung mit Thiopental oder Midazolam simulieren wollten, und somit der Maturation über 7 Tage unter Medikamenteneinfluss den Vorzug zu geben war.

5.1.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein etabliertes Verfahren, mit dem eine große Zellzahl innerhalb kürzester Zeit hinsichtlich ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften untersucht werden kann. Bei dem von uns gewählten Verfahren wurden aus Buffy Coats isolierte Monozyten nach 7-tägiger Maturation zu DZ bezüglich ihrer Oberflächenmarker und Phagozytosefähigkeit untersucht.

Der Vorteil unserer Vorgehensweise im Vergleich zu Verfahren, die Vollblut verwenden liegt darin, dass eine weitestgehend reine Zellkultur vorliegt und Wechselwirkungen mit anderen Zellen, deren Zytokine oder eine Auswertung der falschen Zellpopulation vermieden werden können. Zwar bietet die Verwendung von Vollblut den Vorteil, dass Zellen in ihrer physiologischen Umgebung weniger stör anfällig sind, jedoch schied dieses Verfahren für unsere Studie aus, da eine Maturation über 7 Tage bei der Verwendung von Vollblut nicht möglich wäre.

Um eine reine Auswertung der gereiften Monozyten zu gewährleisten, wurde um die zu untersuchende Zellpopulation ein Messfenster (Gate) gesetzt und lediglich die in diesem Gate gemessenen Zellen nahmen an der Auswertung teil. Zelltrümmer, tote Zellen oder andere Zellpopulationen, die nicht vollständig eliminiert werden konnten, verfälschten somit die Auswertung nicht.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die DZ mit monoklonalen Antikörpern markiert, um dadurch die Expressionsmuster der einzelnen Oberflächenmarker nach Medikamentenexposition zu ermitteln. Die dafür verwendeten Antikörper waren dabei mit den Farben PE oder FITC gefärbt. Die Bindung der verwendeten Antikörper erfolgt dabei für gewöhnlich an spezifischen aber auch an unspezifischen Bindungsstellen. Daher wurden in jedem Versuch Isotypkontrollen durchgeführt, welche den Anteil der unspezifischen Bindungen erfassen. Darauf folgend konnte das Durchflusszytometer in seiner Fluoreszenzverstärkung so eingestellt werden, dass die unspezifischen Bindungen nicht mehr als fluoreszierend angezeigt werden.

Für die Auswertung des FITC-Dextran-Phagozytoseversuch war eine Isotypenkontrolle nicht notwendig, da das überschüssige FITC-Dextran aus der Zellsuspension ausgewaschen werden konnte und keine unspezifische Bindung zu befürchten ist, da es sich nicht um einen Antikörper handelt, sondern allein durch Phagozytose und nur intrazellulär gebunden wird.

Die beschriebenen Überlegungen zeigen, dass durch die von uns verwandte Kulturmethode in Verbindung mit der selektiven durchflusszytometrischen Auswertung, sichergestellt werden konnte, dass nur die gewünschte Zellpopulation der DZ auf ihre Eigenschaften hin untersucht werden konnte.

5.2 Anästhetika

5.2.1 Thiopental

Thiopental wird heute zur Einleitung von Narkosen, in der Vergangenheit auch zur Aufrechterhaltung von Narkosen und weiterhin als ultima ratio zur Sedierung von Schädel-Hirn-traumatisierten Patienten in der Intensivmedizin verwendet. Die dabei erreichten Plasmakonzentrationen reichen von unter 10 µg/ml nach der Einleitung einer Narkose (40, 96), bis zu 10 - 20 µg/ml intraoperativ bei einer Thiopentalnarkose (14, 55). Während der hochdosierten Anwendung von Thiopental zur Therapie des erhöhten Hirndrucks, werden zur Reduzierung der neuronalen Aktivität Plasmakonzentrationen zwischen 30 und 50 µg/ml angestrebt (102) allerdings wurden auch höhere Konzentrationen bis zu 80 µg/ml gemessen (79, 97).

Eine Eigenschaft des Thiopentals ist dabei, dass bei Messungen von Konzentrationen in Patientenblut das Thiopental nur zu 15-25% als freie wirksame Substanz vorkommt und zu 75-85% an Plasmaproteine gebunden vorliegt (14, 97). Für Studien in vitro konnte dieser hohe Prozentsatz der Plasmaproteinbindung für Thiopental bestätigt werden (96, 98). Für Studien in denen eine Zellseparation angewandt wird, müssen die Konzentrationen des wirksamen Thiopentals anders bemessen werden, da bei einer Versuchsanordnung ohne die Verwendung von Plasma somit die eingesetzte Thiopentalkonzentration in freier, wirksamer Form vorliegt.

In der vorliegenden Arbeit ließ sich für hohe Thiopentalkonzentrationen von 250 µg/ml eine veränderte Morphologie beschreiben s. Abb.5. Die Zellen ähnelten dabei in ihrer Morphologie den zu Beginn, an Tag 0 eingesetzten Monozyten. Sie waren rund, bildeten keine Aggregate und auch keine Zellausläufer aus. Die unter niedrigeren Konzentrationen maturierten DZ zeigten, wie die Kontrollzellen, die für DZ charakteristische Morphologie von freischwimmenden, aggregatbildenden Zellen, die Zellausläufer gebildet hatten.

Wir untersuchten den Einfluss von Thiopental auf die von DZ exprimierte Oberflächenmarker. Vergleichbare Arbeiten, welche die Beeinflussung von Oberflächenmarkern nach der DZ-Maturation untersuchten, beschäftigten sich u.a. mit dem Einfluss von Vitamin D3, ASS, Glukokortikoiden oder Statinen (10, 28, 69, 107). Die von uns gefundenen Effekte müssen deshalb mit diesen Arbeiten verglichen werden, da unseres Wissens der Einfluss von Anästhetika oder Sedativa auf die Reifung von DZ nicht in der Literatur beschrieben ist.

In der vorliegenden Arbeit ergab die durchflusszytometrische Untersuchung der Oberflächenmarker CD1a, CD80, und HLA-DR keinerlei Beeinträchtigung der Expression. Jedoch fand sich eine signifikant reduzierte Expression von CD40 für die Dosierungen 50, 100 und 250 µg/ml. Die Konzentrationen von 50 – 100 µg/ml liegen zwar prinzipiell in den Bereichen, wie sie für Langzeit-Sedierung bei Schädel-Hirn-Traumatisierten beschrieben sind. Angesichts der oben beschriebenen Proteinbindung, die in unserem Versuchansatz nicht simuliert werden konnte, sind die Konzentrationen, in denen Effekte beobachtet wurden als supraphysiologisch zu betrachten. Dies ist jedoch nur ein Aspekt, warum direkte Schlussfolgerungen unserer Experimente auf die klinische Situation nicht abzuleiten sind. Dennoch ist bemerkenswert, dass die Veränderungen der Morphologie, der Oberflächenantigen-Expression von CD 40 und CD 86 und der Phagozytose nur bei Thiopental, nicht aber bei Midazolam-Exposition auftraten.

Die CD40-Expression wurde in den oben genannten Arbeiten unter Verwendung von ASS, Statinen, Glukokortikoiden und Vit D3 signifikant reduziert (10, 28, 69, 107). Für die Marker CD1a, CD80, CD86 und HLA-DR fanden sich im Gegensatz zu unseren Ergebnissen allerdings eine Hemmung der Expression, sofern die Marker untersucht wurden.

Darüber hinaus war unter dem Einfluss von Glukokortikoiden die Expression von CD1a, unter dem Einfluss von Vit D3 die Expression von CD1a, CD80 und HLA-DR und unter dem Einfluss von ASS und Statinen die Expression von CD80 und HLA-DR verändert (10, 28, 69, 107), was unter Thiopental von uns nicht bestätigt werden konnte.

Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass die Interaktionen der Medikamente – also in unserem Fall durch Thiopental – spezifische zelluläre Effekte beeinflussen und nicht auf einer generellen Störung der Expression von Oberflächenantigenen im Sinne einer Reifungshemmung der DZ beruhen.

Für CD86 fanden sich für die Dosierungen von 100 und 250 µg/ml erstaunlicherweise ein signifikanter Anstieg der Expression. Bisherige Ergebnisse von Piemonti, Hackstein oder Yilmaz beschrieben eine Hemmung der CD86 Expression. Einzig in der Arbeit von Canning, die sich mit dem Einfluss von Vitamin D3 auf die Maturation von Monozyten zu DZ befasste, fanden sich Ergebnisse die einen Anstieg von CD86, bei in ihrer Maturation gehemmten DZ beschreiben (10). Dieses Ergebnis ist insofern bemerkenswert, da CD86 auf immaturren DZ in geringeren Mengen vorkommt, und üblicherweise auf maturaen DZ in seiner Expression hochreguliert ist. Somit ist CD86, als kostimulatorisches Molekül ein Marker der Aktivierung, der bei einer Hemmung der Maturation nicht als erhöht erwartet wird. Möglicherweise spielt dabei die Kultivierung der DZ unter unphysiologischen Bedingungen eine Rolle, welche aktivierend auf die DZ wirken könnte.

Der zweite Teil unserer Arbeit befasst sich mit der Beeinflussung der Phagozytose von DZ durch Thiopental. Bisherige Arbeiten untersuchten die Hemmung der Phagozytose von Monozyten und Granulozyten durch Thiopental (17, 34, 70, 71).

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der Phagozytose konnte eine Zunahme der MFI in zeitlicher Abhängigkeit festgestellt werden. Dosisabhängig fand sich bei einer Thiopentaldosis von 100 µg/ml eine deutliche Hemmung der Phagozytose von FITC-Dextran durch unreife DZ. Sowohl nach 60 wie auch nach 120 Minuten waren die ermittelten Werte im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Für niedrigere Konzentrationen fand sich keine Reduktion der Phagozytoseleistung. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen von Davidson und Ploppa, die ihre Versuche mit Vollblut durchführten (17, 71). Davidson beschreibt eine Beeinträchtigung der Phagozytose bei Granulozyten bei einer Plasmakonzentration von 2000 µg/ml und auch Ploppa beschreibt

einen Effekt auf die Phagozytose erst bei einer Konzentration über der 100fachen (3000 - 5000 µg/ml) der in vivo Erreichten. Berücksichtigt man die oben beschriebene Eigenschaft der Plasmaproteinbindung von Thiopental, so würde unsere eingesetzte Höchstkonzentration von 100 µg/ml im plasmafreien Medium eine Konzentration von 400-660 µg/ml im Vollblut voraussetzen, und damit unter den von Ploppa und Davidson eingesetzten Konzentrationen liegen. Die von Heller beschriebene Hemmung der Phagozytose bei Granulozyten und Monozyten unter 20 µg/ml Thiopental (34), konnte für DZ in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung für die Hemmung der Phagozytose unter diesen niedrigen Thiopentalkonzentrationen, könnte die Zahl der eingesetzten zu phagozytierenden Bakterien sein. Die im Vergleich zu Davidson niedrige Konzentration der zu phagozytierenden Bakterien könnte möglicherweise nicht ausgereicht haben, die Granulozyten vollständig zu aktivieren. Neben der Tatsache, dass in unserem Fall DZ untersucht wurden, gibt es aber weitere methodische Aspekte, die eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschweren. So wurde in den Arbeiten von Davidson mit abgetöteten und in den Arbeiten von Ploppa et al mit lebenden Bakterien gearbeitet; wohingegen in unserer Arbeit Fluoreszenz-markiertes Dextran zum Einsatz kam.

Um eine Beeinflussung der Phagozytoseaktivität bei ausgereiften DZ zu untersuchen, wurden unsere DZ mit Hilfe von TNF- α zur Ausreifung gebracht. Bei TNF- α handelt es sich um ein physiologisches, proinflammatorisches Zytokin, welches unter Infektion ausgeschüttet wird, und DZ zur Maturation stimuliert.

Für mit TNF- α stimulierte, und somit ausgereifte DZ zeigte sich ein Anstieg der Phagozytose in Abhängigkeit der Zeit.

Hier war im Gegensatz zu den oben beschriebenen Effekten keine Beeinflussung der Phagozytose durch Thiopental nachweisbar. Da mature DZ nur über eine geringe Phagozytoseaktivität, im Vergleich zu immaturren DZ verfügen, könnte dieses Ergebnis auf die trotz Thiopentaleinfluss erfolgte Ausreifung der DZ hinweisen. Da die nur geringe Phagozytoseaktivität der

maturen DZ nicht beeinträchtigt scheint, wären die Untersuchung der Fähigkeit zur Antigenpräsentation und T-Zell Stimulation mögliche Ansatzpunkte, um weitere Rückschlüsse über eine Beeinträchtigung der Maturation zu erhalten.

5.2.2 Midazolam

Midazolam findet seine Einsatzgebiete in der Prämedikation, als Sedierung für Kurzeingriffe wie Kardioversion oder Endoskopien und in der Analgosedierung von Patienten in der Intensivmedizin. Für die Analgosedierung im intensivmedizinischen Bereich stellt Midazolam, in Kombination mit einem Opioid, eines der am häufigsten eingesetzten Anästhetika (89). Besonders in Fällen, in denen eine Sedierung über mehr als 48h benötigt wird, kommt Midazolam in Deutschland am häufigsten zum Einsatz (52).

Die für eine länger andauernde Analgosedierung in der Intensivmedizin benötigten Plasmakonzentrationen bewegen sich in den Bereichen von 500-600ng/ml (5). Ähnlich wie Thiopental wird Midazolam dabei zu einem hohen Anteil, 94-96%, an Plasmaprotein gebunden (24), so dass für Studien, in denen plasmafreie Zellkulturen ihre Anwendung finden, dies berücksichtigt werden muss.

Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse, zeigen für Midazolam folgendes:

Trotz der Maturation unter supratherapeutischen Dosierungen von Midazolam waren für die Morphologie, für die Expression der Oberflächenmarker CD1a CD40, CD80, CD86 und HLA-DR und für die Phagozytoseaktivität keine Effekte nachweisbar.

Bisherige Studien, die sich der Untersuchung der immunsuppressiven Wirkung von Midazolam widmeten, kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. So fanden Galley und Kollegen eine Reduzierung der IL-8 Produktion von Neutrophilen durch Midazolam (23). Heine et al fanden eine Hemmung des oxidativen burst bei neutrophilen Granulozyten die von Heller et al bestätigt werden konnte (33, 34). Eine weitere Studie wiederum zeigte die durch Midazolam gehemmte Chemotaxis und Phagozytose bei neutrophilen Granulozyten (59).

Den Ergebnissen von Heine und Heller steht die Arbeit von Davidson gegenüber, welche Phagozytose- und respiratory burst-Aktivität von Neutrophilen Granulozyten im Vollblutmodell untersuchte, und keine Hemmung durch Midazolam nachweisen konnte (17). Ebenfalls keine Effekt fand O`Donell für die Polarisation neutrophiler Granulozyten (62).

Allerdings fehlen bisher klinische Studien die diese in vitro erhobenen Befunde bestätigen könnten, und in der Zusammenschau experimenteller und klinischer Studienergebnisse wird Midazolam als Substanz gewertet, die aller Wahrscheinlichkeit nach keine immunsuppressiven Effekte aufweist (72).

Unsere Ergebnisse decken sich am ehesten mit denen von Davidson und O`Donnell da auch sie in ihren Arbeiten kein Einfluss von Midazolam auf das Immunsystem nachweisen konnten. Auch wenn aufgrund der methodischen Einschränkungen ein direkter Transfer unserer Daten in die klinische Situation nicht möglich ist, deuten unsere Daten in die Richtung, dass von Midazolam keine immunsuppressiven Effekte auf DZ ausgehen

5.3 Ausblick

In der Intensivmedizin verdichten sich die Hinweise, dass Barbituraten eine immunsuppressive Wirkung zugesprochen werden kann, wenn sie über mehrere Tage in hohen Dosierungen zur Therapie erhöhten intrakraniellen Drucks angewendet werden. Neben zahlreichen Daten aus Studien in vitro wurde u.a. in klinischen Studien eine erhöhte Pneumonie-Inzidenz unter dem hochdosierten Einfluss von Barbituraten beobachtet (8, 19, 58, 84).

Dennoch kann deshalb nicht auf eine alleinige immunsuppressive Wirkung der Barbiturate bzw. Thiopental geschlossen werden. Schädel-Hirn-Traumata an sich, die damit einhergehenden endokrinologischen Beeinträchtigungen und die Aspirationsgefahr bei Bewusstseinsverlust können per se zu einer Beeinträchtigung der Immunfunktion und erhöhten Pneumonie-Inzidenz führen (27, 30, 75). Die mit einem solchen Trauma einhergehenden intensivmedizinischen und medikamentösen Interventionen greifen zusätzlich in das immunologische Gleichgewicht ein. So zeigen Studien, dass durch wiederholte, auch innerklinischer Transporte intensivpflichtiger Patienten, Atelektasenbildung, sogar die alleinige Tatsache der maschinellen Beatmung oder auch Bluttransfusionen das Immunsystem negativ beeinflusst wird und die Inzidenz von Pneumonien erhöht wird (27). Zusammenfassend ist eine Beurteilung der immunsuppressiven Wirkung eines Anästhetikums schwierig, da die Gewichtung der einwirkenden Variablen wie Trauma, Medikamente (Glucokortikoide, Katecholamine), endokrinologische Beeinträchtigung und weitere Faktoren, und die Wirkungen nicht getrennt voneinander beurteilt werden können, sich vielleicht sogar gegenseitig bedingen und verstärken.

Dennoch scheint gerade in der Intensivmedizin eine zusätzliche Immunsuppression durch den Einsatz von Thiopental denkbar zu sein. Bisherige Studien in vitro zeigten hemmende Effekte zwar erst oberhalb klinisch relevanter Dosierungen. Durch die Verdrängung des Thiopentals aus den Plasmaproteinbindungen durch z. B. Antibiotika, ist es allerdings nicht aus zu schließen, dass solche Konzentrationen in den Bereich des Möglichen treten.

Weitere klinische Studien, welche die verschiedenen Sedierungsverfahren bezüglich ihrer immunsuppressiven Eigenschaften untersuchen, erscheinen deshalb unerlässlich.

Trotz der Aktualität des Themas Anästhetika und Immunfunktion, gibt es bisher nur geringe Erkenntnisse über die molekularen Wirkmechanismen die dieser Beeinflussung zu Grunde liegen.

Die Forschungen der letzten Jahre zeigten unter anderem eine Beeinflussung sowohl der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle durch nahezu alle derzeit angewandten volatilen und iv-Anästhetika (29, 64, 99), wie auch der ligandengesteuerten Ionenkanäle (18, 43). Darüber hinaus werden auch Enzyme anderer Signaltransduktionswege wie Tyrosinkinasen und Proteinkinase C, durch z. B Barbiturate in ihrer Funktion beeinflusst (15, 88).

Zwar gibt es vereinzelt Arbeiten, die Wirkungen von Anästhetika auf molekularer Ebene beschreiben, über die Wirkungen an Zellen des Immunsystems liegen jedoch nur wenige Daten vor.

Für Thiopental konnte ein Mechanismus der Hemmung von Leukozytenfunktion entschlüsselt werden. Diese Hemmung konnte auf eine veränderte Aktivierung der Proteinkinase C zurückgeführt werden (21). Loop und Kollegen konnten 2002 eine für Thiopental spezifische Hemmung des Transkriptionsfaktors NFκB nachweisen (50). NFκB ist ein zentraler Regulator der Immunantwort und kontrolliert die Transkription einer Vielzahl von Genen, die z.B. inflammatorisch wirksame Zytokine, Adhäsionsmoleküle, akute Phase Proteine oder auch Immunorezeptoren kodieren (65, 66). Humer et al gelang es darauf 2004 in ihrer Arbeit die Hemmung des p21/MAP kinase/Ap1 Stoffwechselweges durch Thiopental zu beschreiben (38). Dabei nimmt der p21/MAP kinase/Ap1 Stoffwechselweg, indem er für die Transkription und Generierung für die T-Zell-Aktivierung wichtiger Moleküle zuständig ist, eine ähnlich wichtige Stellung wie NFκB ein. Die Beeinträchtigung der Generierung all dieser für die Immunantwort wichtigen Proteinkomplexe zeigen einen molekularen Teilaspekt, der Thiopental zu einem potentiell immunsuppressiven Anästhetikum macht.

Die genannten, bisher aufgeklärten und beschriebenen Wirkmechanismen zeigen für Thiopental und auch für andere Anästhetika eine Wirkung die sich nicht nur auf neuronale Systeme beschränkt, sondern sich auf den ganzen Organismus und die unterschiedlichen Organsysteme auswirken kann. Zwar werden durch die beschriebenen Erkenntnisse immer mehr Aspekte der Wirkung von Thiopental erkennbar, die klinische Relevanz lässt sich dadurch jedoch nicht ableiten. Ob und in welchem Maße der therapeutische Anwendung von Thiopental Grenzen gesetzt werden sollten, bleibt unklar. Dennoch sollte eine immunsuppressive Wirkung in der Anwendung von hochdosiertem Thiopental nicht außer Acht gelassen werden.

6 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Studie wurde die Maturierung von Monozyten zu DZ unter dem Einfluss der Anästhetika Thiopental und Midazolam untersucht. Anlass zu dieser Untersuchung geben wiederholte Berichte, dass Thiopental immunsuppressive Effekte aufweist, wenn es über mehrere Tage in hoher Dosierung zur Therapie des erhöhten intrakraniellen Drucks appliziert wird. Die fragliche Beeinträchtigung der Ausreifung von Monozyten zu DZ wurde anhand der Fähigkeit der DZ zur Phagozytose und ihres Expressionsmusters von Oberflächenmarkern durchflusszytometrisch untersucht. Des Weiteren wurde die Morphologie DZ nach Kultivierung unter dem Einfluss von Thiopental oder Midazolam mikroskopisch dokumentiert.

Hierzu wurden Monozyten aus Buffy Coats gesunder Blutspender isoliert und anschließend über 8 Tage unter dem Einfluss von Thiopental oder Midazolam in unterschiedlichen Dosierungen zu DZ kultiviert. An Tag 8 erfolgte die durchflusszytometrische Auswertung

Für unter Thiopental kultivierte DZ zeigte sich bei hohen Konzentrationen von 250 µg/ml eine im Vergleich zu Kontrollzellen veränderte Morphologie. So wiesen die Versuchszellen eine geringere Größe auf, zudem fehlten die für DZ typische Fähigkeit zu Aggregatbildung ebenso wie die Ausbildung von Zellausläufern.

Für unter Midazolam kultivierte DZ ließ sich keinerlei Veränderung der Morphologie erkennen. In jeder der eingesetzten Konzentrationen fanden sich wie bei den Kontrollzellen frei schwimmende, aggregatbildende Zellen mit Ausläufern, entsprechend der für dieses Entwicklungsstadium charakteristischen Morphologie.

Das Expressionsmuster der Oberflächenmarker erwies sich für unter Thiopental kultivierte DZ als ebenfalls verändert. Zwar waren die Marker CD1a, CD80 und HLA-DR in ihrer Expression unbeeinträchtigt, für CD40 fand sich jedoch eine deutlich reduzierte Expression im Vergleich zur Kontrolle. Bereits ab einer Dosierung von 50 µg/ml zeigte sich eine signifikante Reduktion der CD40-

Expression. CD86 wurde ab einer Konzentration von 100 µg/ml im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermehrt exprimiert.

Im Gegensatz dazu fanden sich keinerlei Veränderungen des Expressionsmusters der untersuchten Oberflächenmarker, wenn DZ unter Midazolam kultiviert wurden. .

Die Phagozytoseaktivität der DZ war ab einer Konzentration von 100 µg/ml Thiopental reduziert. Die Hemmung war signifikant für die Phagozytoseaktivität der immaturen, d.h. der nicht mit TNF- α stimulierten DZ zu den beiden Messzeitpunkten 60min und 120min. Für die stimulierten maturen DZ ließ sich zu keiner der zwei Messzeitpunkte und bei keiner der eingesetzten Konzentrationen eine Hemmung nachweisen.

Die Zellen, die unter dem Einfluss von Midazolam kultiviert wurden zeigten zu keinem Messzeitpunkt und bei keiner der eingesetzten Konzentrationen eine Veränderung bezüglich ihrer Phagozytoseaktivität. Dabei bestand kein Unterschied zwischen den maturen und den immaturen Zellen.

Zusammenfassend lässt sich für Thiopental eine Beeinträchtigung in der Maturation von Monozyten zu DZ nachweisen. Die beschriebenen Effekte treten allerdings, wenn man die Plasmaproteinbindung des Thiopentals berücksichtigt, erst unter Konzentrationen ab 50µg/ml auf. Berücksichtigt man jedoch die Interaktionen der unter intensivmedizinischen Bedingungen verabreichten Medikamente wie beispielsweise Antibiotika oder Antikonvulsiva, so kann das Erreichen erhöhter Plasmakonzentrationen nicht ausgeschlossen werden.

Für Midazolam lässt sich im Gegensatz dazu keine Beeinflussung der von uns untersuchten Parameter nachweisen, was darauf hin deutet, dass keine Beeinträchtigung der Maturation von Monozyten zu DZ besteht. Nach unserer Kenntnis wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals der Einfluss von Thiopental auf DZ untersucht.

Bisher veröffentlichte Arbeiten deuten daraufhin, dass Thiopental eine immunsuppressive Wirkung auf andere Zellen des Immunsystems wie Granulozyten oder Monozyten aufweist. Dabei beziehen sich diese Arbeiten meist auf die hochdosierte Thiopentalgabe bei erhöhtem ICP. Zwar lassen alle

bisherigen Veröffentlichungen keine endgültige Aussage über die Konzentration zu, ab der diese Wirkung eintritt und über die Relevanz im klinischen Alltag, dennoch sollte eine immunsuppressive Wirkung des Thiopentals im Falle des Einsatzes nicht außer Acht gelassen werden.

Auch wenn direkte Schlussfolgerungen aus Experimenten *in vitro* auf die klinische Situation nicht möglich sind, deuten unsere Ergebnisse auf einen immunsuppressiven Effekt von Thiopental auf DZ hin, der allerdings erst in supratherapeutischen Konzentrationen auftritt. Bemerkenswert ist jedoch, dass unter der Vergleichssubstanz Midazolam auch in den höchsten Konzentrationen keinerlei Effekte erkennbar waren. Da das von uns beschriebene Muster in der Hemmung der Expression der Oberflächenantigene CD40 und CD86 nicht deckungsgleich ist mit den Effekten, die unter anderen Medikamenten beschrieben ist, kann dies nicht als generelle Reifungshemmung von DZ interpretiert werden. Vielmehr deuten unsere Ergebnisse auf spezifische Effekte von Thiopental hin, die zu einer selektiven Hemmung der Expression des Oberflächenantigens CD40 sowie zu einer Hemmung der Phagozytoseaktivität der DZ führen.

7 Anhang

7.1 Tabellarische Zusammenfassung der Daten

Expression der Oberflächenmarker unter Thiopental

Thiopental CD1a	Kontrolle	0.05µg/ml	0.5µg/ml	5µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	250µg/ml
Mittelwert	7.47	8.08	7.12	7.232	4.106	1.96	1.51
Standardabweichung	6.029	5.603	4.126	5.112	2.27	0.9758	0.4757
Anzahl der Versuche	5	5	5	5	5	3	2

Thiopental CD40	Kontrolle	0.05µg/ml	0.5µg/ml	5µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	250µg/ml
Mittelwert	65.87	57.21	46.65	52.4	31.13	14.72	7.453
Standardabweichung	22.35	16.99	13.23	17.23	11.79	4.094	1.976
Anzahl der Versuche	5	5	5	5	5	3	2

Thiopental CD80	Kontrolle	0.05µg/ml	0.5µg/ml	5µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	250µg/ml
Mittelwert	4.353	3.93	4.81	4.038	3.77	2.465	8.33
Standardabweichung	1.125	0.4947	1.76	0.791	1.088	0.5728	8.91
Anzahl der Versuche	4	4	4	4	4	2	2

Thiopental CD86	Kontrolle	0.05µg/ml	0.5µg/ml	5µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	250µg/ml
Mittelwert	5.365	6.5	5.868	6.298	7.885	15.75	35.93
Standardabweichung	1.06	2.902	1.954	2.117	4.713	5.692	1.386
Anzahl der Versuche	4	4	4	4	4	2	2

Thiopental HLA-DR	Kontrolle	0.05µg/ml	0.5µg/ml	5µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	250µg/ml
Mittelwert	27.85	27.32	29.14	30.73	31.56	17.03	16.64
Standardabweichung	14.44	15.15	14.76	19.21	14.97	11.65	4.971
Anzahl der Versuche	4	4	4	4	4	2	2

Expression der Oberflächenmarker unter Midazolam

Midazolam CD1a	Kontrolle	0.05µg/ml	0.5µg/ml	1µg/ml	2.5µg/ml	5µg/ml
Mittelwert	4.647	4.577	5.033	5.413	4.527	4.137
Standardabweichung	3.173	2.738	2.819	3.521	2.697	2.846
Anzahl der Versuche	3	3	3	3	3	3

Midazolam CD40	Kontrolle	0.05µg/ml	0.5µg/ml	1µg/ml	2.5µg/ml	5µg/ml
Mittelwert	69.45	83.3	85.02	90.29	74.82	85.03
Standardabweichung	16.84	22.94	17.52	28.43	15.53	17.73
Anzahl der Versuche	3	3	3	3	3	3

Midazolam CD80	Kontrolle	0.05µg/ml	0.5µg/ml	1µg/ml	2.5µg/ml	5µg/ml
Mittelwert	4.873	5.15	5.473	5.407	5.523	7.95
Standardabweichung	1.518	1.03	1.611	0.2548	2.068	0.9897
Anzahl der Versuche	3	3	3	3	3	3

Midazolam CD86	Kontrolle	0.05µg/ml	0.5µg/ml	1µg/ml	2.5µg/ml	5µg/ml
Mittelwert	6.645	7.285	6.79	8.085	6.42	8.41
Standardabweichung	0.799	2.086	1.739	0.502	0.7495	2.376
Anzahl der Versuche	2	2	2	2	2	2

Midazolam HLA-DR	Kontrolle	0.05µg/ml	0.5µg/ml	1µg/ml	2.5µg/ml	5µg/ml
Mittelwert	29.49	21.72	22.66	29.01	26.24	51.72
Standardabweichung	11.28	10.09	11.81	11.72	9.085	11.91
Anzahl der Versuche	3	3	3	3	3	3

Phagozytose unter Thiopental

Thiopental unstimuliert 60min						
	0 µg/ml	0.05 µg/ml	0.5 µg/ml	5 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Mittelwert	96.94	110.9	102.5	96.91	75.56	16.52
Standardabweichung	4.596	27.49	19.83	13.97	12.59	5.056
Anzahl der Versuche	2	3	3	3	3	3

Thiopental unstimuliert 120 min						
	0 µg/ml	0.05 µg/ml	0.5 µg/ml	5 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Mittelwert	174.3	200.9	150.3	162.5	138.1	28.94
Standardabweichung	27.23	58.96	37.26	38.78	34.18	3.895
Anzahl der Versuche	2	3	3	3	3	3

Thiopental stimuliert 60 min						
	0 µg/ml	0.05 µg/ml	0.5 µg/ml	5 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Mittelwert	34.93	17.48	40.06	33.97	30.22	28.12
Standardabweichung	2.121	3.531	19.23	8.012	9.115	15.21
Anzahl der Versuche	2	3	3	3	3	3

Thiopental stimuliert 120 min						
	0 µg/ml	0.05 µg/ml	0.5 µg/ml	5 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Mittelwert	56.7	46.01	59.01	53	59.18	30.95
Standardabweichung	7.891	23.04	23.04	18.02	27.66	15.15
Anzahl der Versuche	2	3	3	3	3	3

Phagozytose unter Midazolam

Midazolam unstimuliert 60 min						
	0 µg/ml	0,05µg/ml	0,5µg/ml	1µg/ml	2,5µg/ml	5µg/ml
Mittelwert	127.9	218.5	190.4	154.3	152	163.4
Standardabweichung	78.41	188.6	159.9	116.7	113.7	106.5
Anzahl der Versuche	2	2	2	2	2	2

Midazolam unstimuliert 120 min						
	0 µg/ml	0,05µg/ml	0,5µg/ml	1µg/ml	2,5µg/ml	5µg/ml
Mittelwert	271.1	463.6	456.1	388.5	364.3	485.8
Standardabweichung	228.2	440	427.7	351.2	304.1	418.2
Anzahl der Versuche	2	2	2	2	2	2

Midazolam stimuliert 60 min						
	0 µg/ml	0,05µg/ml	0,5µg/ml	1µg/ml	2,5µg/ml	5µg/ml
Mittelwert	64.71	125.3	121.3	96.34	109.4	140
Standardabweichung	24.65	138.8	130.7	86.15	85.01	118.6
Anzahl der Versuche	2	2	2	2	2	2

Midazolam stimuliert 120 min						
	0 µg/ml	0,05µg/ml	0,5µg/ml	1µg/ml	2,5µg/ml	5µg/ml
Mittelwert	92.21	225.1	247	205.4	212	265.2
Standardabweichung	7.509	220.2	253.1	179.5	177.1	240.9
Anzahl der Versuche	2	2	2	2	2	2

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite	Inhalt
Abbildung 1	28	Fluoreszenzspektren der Farben FITC und PE
Abbildung 2	30	Punktdiagramm
Abbildung 3	30	Histogramm
Abbildung 4	32	Morphologie der Kontrollzellen
Abbildung 5	33	Morphologie der unter Thiopental maturierten Zellen
Abbildung 6	34	Morphologie der unter Midazolam maturierten Zellen
Abbildung 7	35	CD1a Expression unter Thiopental maturierter DZ
Abbildung 8	36	CD1a Expression unter Midazolam maturierter DZ
Abbildung 9	37	CD40 Expression unter Thiopental maturierter DZ
Abbildung 10	38	CD40 Expression unter Midazolam maturierter DZ
Abbildung 11	39	CD80 Expression unter Thiopental maturierter DZ
Abbildung 12	40	CD80 Expression unter Midazolam maturierter DZ
Abbildung 13	41	CD86 Expression unter Thiopental maturierter DZ
Abbildung 14	42	CD86 Expression unter Midazolam maturierter DZ
Abbildung 15	43	HLA-DR Expression unter Thiopental maturierter DZ
Abbildung 16	44	HLA-DR Expression unter Midazolam maturierter DZ
Abbildung 17	46	Phagozytose nach 60 und 120 Minuten, der unter Thiopental maturierten unstimulierten DZ
Abbildung 18	47	Phagozytose nach 60 und 120 Minuten, der unter Thiopental maturierten stimulierten DZ
Abbildung 19	48	Phagozytose nach 60 und 120 Minuten, der unter Midazolam maturierten unstimulierten

Abbildung 20	49	Phagozytose nach 60 und 120 Minuten, der unter Midazolam maturierten stimulierten
--------------	----	---

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle	Seite	Inhalt
Tabelle 1	10	Expressionsmuster des jeweiligen Entwicklungsstadiums
Tabelle 2	18	Verwendete Reagenzien
Tabelle 3	19	Verwendete Antikörper und Farbstoffe
Tabelle 4	19	Verwendete Reaktionsgefäße und Geräte

8 Literaturverzeichnis

1. The Brain Trauma Foundation. The American Association of Neurological Surgeons. The Joint Section on Neurotrauma and Critical Care. Computed tomography scan features. *J Neurotrauma* 17: 597-627, 2000.
2. Adams S, O'Neill DW, Bhardwaj N. Recent advances in dendritic cell biology. *J Clin Immunol* 25: 177-188, 2005.
3. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767-811, 2000.
4. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252, 1998.
5. Behne M, Asskali F, Steuer A, Forster H. [Continuous Midazolam infusion for sedation of respirator patients]. *Anaesthesist* 36: 228-232, 1987.
6. Böcker D, Heitz. *Pathologie*. Urban & Fischer 2001.
7. Braun SR, Levin AB, Clark KL. Role of corticosteroids in the development of pneumonia in mechanically ventilated head-trauma victims. *Crit Care Med* 14: 198-201, 1986.
8. Bronchard R, Albaladejo P, Brezac G, Geffroy A, Seince PF, Morris W, Branger C, Marty J. Early onset pneumonia: risk factors and consequences in head trauma patients. *Anesthesiology* 100: 234-239, 2004.
9. Buhner M, Maitre PO, Hung OR, Ebling WF, Shafer SL, Stanski DR. Thiopental pharmacodynamics. I. Defining the pseudo-steady-state serum concentration-EEG effect relationship. *Anesthesiology* 77: 226-236, 1992.
10. Canning MO, Grotenhuis K, de Wit H, Ruwhof C, Drexhage HA. 1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. *Eur J Endocrinol* 145: 351-357, 2001.
11. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360: 258-261, 1992.
12. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184: 747-752, 1996.

13. Chadbourne T. Ether Leukocytosis. Philadelphia Medical Journal 3: 380-395, 1899.
14. Crankshaw DP, Edwards NE, Blackman GL, Boyd MD, Chan HN, Morgan DJ. Evaluation of infusion regimens for thiopentone as a primary anaesthetic agent. Eur J Clin Pharmacol 28: 543-552, 1985.
15. Dahmani S, Tesniere A, Rouelle D, Toutant M, Desmots JM, Mantz J. Effects of anesthetic agents on focal adhesion kinase (pp125FAK) tyrosine phosphorylation in rat hippocampal slices. Anesthesiology 101: 344-353, 2004.
16. Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. J Immunol 170: 4069-4076, 2003.
17. Davidson JA, Boom SJ, Pearsall FJ, Zhang P, Ramsay G. Comparison of the effects of four i.v. anaesthetic agents on polymorphonuclear leucocyte function. Br J Anaesth 74: 315-318, 1995.
18. Dilger JP. The effects of general anaesthetics on ligand-gated ion channels. Br J Anaesth 89: 41-51, 2002.
19. Eberhardt KE, Thimm BM, Spring A, Maskos WR. Dose-dependent rate of nosocomial pulmonary infection in mechanically ventilated patients with brain oedema receiving barbiturates: a prospective case study. Infection 20: 12-18, 1992.
20. Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, Guyre PM. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. J Immunol 157: 541-548, 1996.
21. Frohlich D, Wittmann S, Rothe G, Schmitz G, Taeger K. Thiopental impairs neutrophil oxidative response by inhibition of intracellular signalling. Eur J Anaesthesiol 19: 474-482, 2002.
22. Galley HF, DiMatteo MA, Webster NR. Immunomodulation by anaesthetic, sedative and analgesic agents: does it matter? Intensive Care Med 26: 267-274, 2000.
23. Galley HF, Dubbels AM, Webster NR. The effect of midazolam and propofol on interleukin-8 from human polymorphonuclear leukocytes. Anesth Analg 86: 1289-1293, 1998.
24. Garzone PD, Kroboth PD. Pharmacokinetics of the newer benzodiazepines. Clin Pharmacokinet 16: 337-364, 1989.

25. Grigoleit U, Riegler S, Einsele H, Laib Sampaio K, Jahn G, Hebart H, Brossart P, Frank F, Sinzger C. Human cytomegalovirus induces a direct inhibitory effect on antigen presentation by monocyte-derived immature dendritic cells. *Br J Haematol* 119: 189-198, 2002.
26. Guo J, White JA, Batjer HH. The protective effects of thiopental on brain stem ischemia. *Neurosurgery* 37: 490-495, 1995.
27. Häberle HA, Krueger WA. Pneumonia in Trauma Patients. In: *Nosocomial Pneumonia*, Hrsg. Rello JWiley & Sons, Ltd, 2007, .215-234.
28. Hackstein H, Morelli AE, Larregina AT, Ganster RW, Papworth GD, Logar AJ, Watkins SC, Falo LD, Thomson AW. Aspirin inhibits in vitro maturation and in vivo immunostimulatory function of murine myeloid dendritic cells. *J Immunol* 166: 7053-7062, 2001.
29. Hall AC, Lieb WR, Franks NP. Insensitivity of P-type calcium channels to inhalational and intravenous general anesthetics. *Anesthesiology* 81: 117-123, 1994.
30. Harbuz M. Neuroendocrine-immune interactions. *Trends Endocrinol Metab* 14: 51-52, 2003.
31. Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90: 3245-3287, 1997.
32. Hart DN, Fabre JW. Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med* 154: 347-361, 1981.
33. Heine J, Leuwer M, Scheinichen D, Arseniev L, Jaeger K, Piepenbrock S. Flow cytometry evaluation of the in vitro influence of four i.v. anaesthetics on respiratory burst of neutrophils. *Br J Anaesth* 77: 387-392, 1996.
34. Heller A, Heller S, Blecken S, Urbaschek R, Koch T. Effects of intravenous anesthetics on bacterial elimination in human blood in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* 42: 518-526, 1998.
35. Hock BD, Starling GC, Daniel PB, Hart DN. Characterization of CMRF-44, a novel monoclonal antibody to an activation antigen expressed by the allostimulatory cells within peripheral blood, including dendritic cells. *Immunology* 83: 573-581, 1994.
36. Hofbauer R, Kaye AD, Kapiotis S, Frass M. The immune system and the effects of non-volatile anesthetics on neutrophil transmigration through endothelial cell monolayers. *Curr Pharm Des* 5: 1015-1027, 1999.

37. Homburger JA, Meiler SE. Anesthesia drugs, immunity, and long-term outcome. *Curr Opin Anaesthesiol* 19: 423-428, 2006.
38. Humar M, Andriopoulos N, Pischke SE, Loop T, Schmidt R, Hoetzel A, Roesslein M, Pahl HL, Geiger KK, Pannen BH. Inhibition of activator protein 1 by barbiturates is mediated by differential effects on mitogen-activated protein kinases and the small G proteins ras and rac-1. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 1232-1240, 2004.
39. Inaba K, Witmer MD, Steinman RM. Clustering of dendritic cells, helper T lymphocytes, and histocompatible B cells during primary antibody responses in vitro. *J Exp Med* 160: 858-876, 1984.
40. Janik R, Becker J, Zollner W, Manz J. [Thiopental concentrations in the whole blood of pregnant and non-pregnant patients in the first minutes following injection. Forensic aspects]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 26: 132-136, 1991.
41. Karow TL-RR. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Köln: Thomas Karow, 2006, p. 1161.
42. Kelbel I, Weiss M. Anaesthetics and immune function. *Curr Opin Anaesthesiol* 14: 685-691, 2001.
43. Kress HG. Effects of general anaesthetics on second messenger systems. *Eur J Anaesthesiol* 12: 83-97, 1995.
44. Kress HG, Eberlein T. [Effect of anesthesia and operation on essential immune functions]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 27: 393-402, 1992.
45. Kress HG, Eberlein T, Horber B, Weis KH. Suppression of neutrophil migration and chemiluminescence is due to the sulphur atom in the thiobarbiturate molecule. *Acta Anaesthesiol Scand* 33: 122-128, 1989.
46. Krumholz W, Endrass J, Hempelmann G. Inhibition of phagocytosis and killing of bacteria by anaesthetic agents in vitro. *Br J Anaesth* 75: 66-70, 1995.
47. Krumholz W, Endrass J, Knecht J, Hempelmann G. The effects of midazolam, droperidol, fentanyl, and alfentanil on phagocytosis and killing of bacteria by polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* 39: 624-627, 1995.
48. Larsen R. *Larsen Anästhesie*. München: Urban & Fischer, 2006, p. 1470.
49. Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 82: 97-130, 2002.

50. Loop T, Liu Z, Humar M, Hoetzel A, Benzing A, Pahl HL, Geiger KK, BH JP. Thiopental inhibits the activation of nuclear factor kappaB. *Anesthesiology* 96: 1202-1213, 2002.
51. Maas AI, Dearden M, Teasdale GM, Braakman R, Cohadon F, Iannotti F, Karimi A, Lapierre F, Murray G, Ohman J, Persson L, Servadei F, Stocchetti N, Unterberg A. EBIC-guidelines for management of severe head injury in adults. European Brain Injury Consortium. *Acta Neurochir (Wien)* 139: 286-294, 1997.
52. Martin J, Parsch A, Franck M, Wernecke KD, Fischer M, Spies C. Practice of sedation and analgesia in German intensive care units: results of a national survey. *Crit Care* 9: R117-123, 2005.
53. Matasic R, Dietz AB, Vuk-Pavlovic S. Cyclooxygenase-independent inhibition of dendritic cell maturation by aspirin. *Immunology* 101: 53-60, 2000.
54. Miller JD, Dearden NM, Piper IR, Chan KH. Control of intracranial pressure in patients with severe head injury. *J Neurotrauma* 9 Suppl 1: S317-326, 1992.
55. Morgan DJ, Crankshaw DP, Prideaux PR, Chan HN, Boyd MD. Thiopentone levels during cardiopulmonary bypass. Changes in plasma protein binding during continuous infusion. *Anaesthesia* 41: 4-10, 1986.
56. Moutaftsi M, Mehl AM, Borysiewicz LK, Tabi Z. Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 99: 2913-2921, 2002.
57. Murray GD, Teasdale GM, Braakman R, Cohadon F, Dearden M, Iannotti F, Karimi A, Lapierre F, Maas A, Ohman J, Persson L, Servadei F, Stocchetti N, Trojanowski T, Unterberg A. The European Brain Injury Consortium survey of head injuries. *Acta Neurochir (Wien)* 141: 223-236, 1999.
58. Nadal P, Nicolas JM, Font C, Vilella A, Nogue S. Pneumonia in ventilated head trauma patients: the role of thiopental therapy. *Eur J Emerg Med* 2: 14-16, 1995.
59. Nishina K, Akamatsu H, Mikawa K, Shiga M, Maekawa N, Obara H, Niwa Y. The inhibitory effects of thiopental, midazolam, and ketamine on human neutrophil functions. *Anesth Analg* 86: 159-165, 1998.
60. Nordby HK, Nesbakken R. The effect of high dose barbiturate decompression after severe head injury. A controlled clinical trial. *Acta Neurochir (Wien)* 72: 157-166, 1984.

61. Nordstrom CH, Messeter K, Sundborg G, Schalen W, Werner M, Ryding E. Cerebral blood flow, vasoreactivity, and oxygen consumption during barbiturate therapy in severe traumatic brain lesions. *J Neurosurg* 68: 424-431, 1988.
62. O'Donnell NG, McSharry CP, Wilkinson PC, Asbury AJ. Comparison of the inhibitory effect of propofol, thiopentone and midazolam on neutrophil polarization in vitro in the presence or absence of human serum albumin. *Br J Anaesth* 69: 70-74, 1992.
63. Obermaier B, Dauer M, Herten J, Schad K, Endres S, Eigler A. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol Proced Online* 5: 197-203, 2003.
64. Olcese R, Usai C, Maestrone E, Nobile M. The general anesthetic propofol inhibits transmembrane calcium current in chick sensory neurons. *Anesth Analg* 78: 955-960, 1994.
65. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6853-6866, 1999.
66. Pannen BH, Robotham JL. The acute-phase response. *New Horiz* 3: 183-197, 1995.
67. Peters JH, Ruppert J, Gieseler RK, Najjar HM, Xu H. Differentiation of human monocytes into CD14 negative accessory cells: do dendritic cells derive from the monocytic lineage? *Pathobiology* 59: 122-126, 1991.
68. Pickl WF, Majdic O, Kohl P, Stockl J, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Knapp W. Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. *J Immunol* 157: 3850-3859, 1996.
69. Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone BE, Succi C, Di Carlo V. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* 162: 6473-6481, 1999.
70. Ploppa A, Kiefer RT, Nohe B, Haeberle HA, Dieterich HJ, Unertl KE, Durieux ME, Krueger WA. Monocyte Phagocytosis of Viable *Staphylococcus aureus* is Impaired by Barbiturates, but not by Propofol. *Infection* 36: 220-225, 2008.
71. Ploppa A, Kiefer RT, Nohe B, Haeberle HA, Dieterich HJ, Unertl KE, Krueger WA. Dose-dependent influence of barbiturates but not of propofol on human leukocyte phagocytosis of viable *Staphylococcus aureus*. *Crit Care Med* 34: 478-483, 2006.

72. Ploppa A Krueger WA. Einfluss der Anästhesie auf Immunsystem und Infektionen. In: Anästhesiologie, Hrsg. Eberhard Kochs, Claudia Spies. Stuttgart: Thieme, 2008, p. 516-525.
73. Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, Kraus E, Guinet E, Chalouni C, Caron D, Maliszewski C, Davoust J, Fay J, Palucka K. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* 165: 566-572, 2000.
74. Raftery MJ, Wieland D, Gronewald S, Kraus AA, Giese T, Schonrich G. Shaping phenotype, function, and survival of dendritic cells by cytomegalovirus-encoded IL-10. *J Immunol* 173: 3383-3391, 2004.
75. Reichlin S. Neuroendocrine-immune interactions. *N Engl J Med* 329: 1246-1253, 1993.
76. Reid CD, Stackpoole A, Meager A, Tikerpae J. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow. *J Immunol* 149: 2681-2688, 1992.
77. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180: 83-93, 1994.
78. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 196: 137-151, 1996.
79. Russo H, Simon N, Duboin MP, Urien S. Population pharmacokinetics of high-dose thiopental in patients with cerebral injuries. *Clin Pharmacol Ther* 62: 15-20, 1997.
80. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182: 389-400, 1995.
81. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179: 1109-1118, 1994.
82. Salo M, Perttola J. Effects of thiopental on granulocyte oxidative microbicidal capacity. *Acta Anaesthesiol Scand* 33: 339-342, 1989.

83. Santiago-Schwarz F, Belilos E, Diamond B, Carsons SE. TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 52: 274-281, 1992.
84. Sato M, Tanaka S, Suzuki K, Kohama A, Fujii C. Complications associated with barbiturate therapy. *Resuscitation* 17: 233-241, 1989.
85. Schalen W, Messeter K, Nordstrom CH. Complications and side effects during thiopentone therapy in patients with severe head injuries. *Acta Anaesthesiol Scand* 36: 369-377, 1992.
86. Scheeren RA, Koopman G, Van der Baan S, Meijer CJ, Pals ST. Adhesion receptors involved in clustering of blood dendritic cells and T lymphocytes. *Eur J Immunol* 21: 1101-1105, 1991.
87. Shurin MR, Pandharipande PP, Zorina TD, Haluszczak C, Subbotin VM, Hunter O, Brumfield A, Storkus WJ, Maraskovsky E, Lotze MT. FLT3 ligand induces the generation of functionally active dendritic cells in mice. *Cell Immunol* 179: 174-184, 1997.
88. Slater SJ, Cox KJ, Lombardi JV, Ho C, Kelly MB, Rubin E, Stubbs CD. Inhibition of protein kinase C by alcohols and anaesthetics. *Nature* 364: 82-84, 1993.
89. Soliman HM, Melot C, Vincent JL. Sedative and analgesic practice in the intensive care unit: the results of a European survey. *Br J Anaesth* 87: 186-192, 2001.
90. Spencer JV, Lockridge KM, Barry PA, Lin G, Tsang M, Penfold ME, Schall TJ. Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J Virol* 76: 1285-1292, 2002.
91. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9: 271-296, 1991.
92. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137: 1142-1162, 1973.
93. Steinman RM, Swanson J. The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 182: 283-288, 1995.
94. Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 5132-5136, 1978.

95. Stover JF, Stocker R. Barbiturate coma may promote reversible bone marrow suppression in patients with severe isolated traumatic brain injury. *Eur J Clin Pharmacol* 54: 529-534, 1998.
96. Taeger K, Lueg J, Finsterer U, Roedig G, Weninger E, Peter K. [Thiopental levels in the plasma during induction of anesthesia]. *Anasth Intensivther Notfallmed* 21: 169-174, 1986.
97. Taeger K, Murr R, Schmiedeck P, Jensen U, and Peter K. [Thiopental kinetics in high-dose use]. *Anasth Intensivther Notfallmed* 21: 237-244, 1986.
98. Taeger K, Schultze K, Weninger E, Rodig G, Peter K. [Thiopental distribution in the blood of surgical patients]. *Anasth Intensivther Notfallmed* 21: 175-180, 1986.
99. Terrar DA, Victory JG. Isoflurane depresses membrane currents associated with contraction in myocytes isolated from guinea-pig ventricle. *Anesthesiology* 69: 742-749, 1988.
100. Thurman DJ, Alverson C, Dunn KA, Guerrero J, Sniezek JE. Traumatic brain injury in the United States: A public health perspective. *J Head Trauma Rehabil* 14: 602-615, 1999.
101. Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kampgen E, Bender A, Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods* 223: 1-15, 1999.
102. Turcant A, Delhumeau A, Premel-Cabic A, Granry JC, Cottineau C, Six P, Allain P. Thiopental pharmacokinetics under conditions of long-term infusion. *Anesthesiology* 63: 50-54, 1985.
103. Weiss M, Birkhahn A, Krone M, Schneider EM. Do etomidate and propofol influence oxygen radical production of neutrophils? *Immunopharmacol Immunotoxicol* 18: 291-307, 1996.
104. Williams LA, Egner W, Hart DN. Isolation and function of human dendritic cells. *Int Rev Cytol* 153: 41-103, 1994.
105. Witmer MD, Steinman RM. The anatomy of peripheral lymphoid organs with emphasis on accessory cells: light-microscopic immunocytochemical studies of mouse spleen, lymph node, and Peyer's patch. *Am J Anat* 170: 465-481, 1984.
106. Yao V, Platell C, Hall JC. Dendritic cells. *ANZ J Surg* 72: 501-506, 2002.

107. Yilmaz A, Reiss C, Weng A, Cicha I, Stumpf C, Steinkasserer A, Daniel WG, Garlachs CD. Differential effects of statins on relevant functions of human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 79: 529-538, 2006.
108. Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, Tedder TF. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol* 149: 735-742, 1992.
109. Zhou LJ, Tedder TF. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2588-2592, 1996.

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Unertl für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Zentrum für medizinische Forschung in Derendingen.

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Krüger für seine Bereitschaft die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen, die konstruktive Kritik und die unglaublich schnelle Bearbeitung all meiner Fragen und der Korrekturen. Seine wertvollen Anregungen und Ratschläge habe ich sehr geschätzt.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich Herrn Prof. Dr. Hübner sehr herzlich.

Herrn Dr. Christian Karcher danke ich für eine fantastische Betreuung dieser Arbeit im Labor, stetige Bereitschaft Fragen zu klären sowie menschlichen und fachlichen Beistand.

Ich danke Alice Marger, Michaela Hoch-Gutbrod und Irene Vollmer und allen Mitarbeitern des Labors für die freundliche Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima während der Zeit im Labor.

Meinen Brüdern und Judith danke ich von Herzen für den unerschütterlichen Glauben an mich und meine Fähigkeiten und die entspannenden Stunden voller chaotischer Normalität, Kindergeschrei und Familienleben, die manchmal so nötig waren.

Meinem Vater möchte ich für das Lesen und Korrigieren dieser Arbeit, konstruktive Kritik und sein Vertrauen in meine Fähigkeiten unendlich danken. Für die Unterstützung während meines Studiums und all meiner Entscheidungen. Ohne Dich wäre das Alles nicht möglich gewesen.

Meinem Mann Kristian danke ich für die ständige bedingungslose Unterstützung, den Zuspruch in Momenten der Verzweiflung und den so nötigen Beistand bei Software-Problemen. Fachlich wie emotional eine Inspiration und Stütze. Danke, Du bist mein Glück.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Helga Raidt

geboren am 12.06.1980 in Oettingen

Schulbildung:

1986 - 1988

Grundschule Kornwestheim

1988 - 1990

Grundschule Rottenburg am Neckar

1990 - 1999

Eugen-Bolz-Gymnasium Rottenburg am Neckar

06 / 1999

Abitur

1999 - 2000

Freiwilliges Soziales Jahr

2000 - 2001

Ausbildung zur Krankenpflegehelferin

Hochschulstudium der Humanmedizin:

2001 - 2002

Universität des Saarlandes Homburg

2002 - 2008

Eberhardt-Karls-Universität Tübingen

03 / 2004

Ärztliche Vorprüfung

2007 - 2008

PJ an der Universitätsklinik Tübingen

08.05.2008

2. Staatsexamen

26.05.2008

Approbation

seit 09 / 2008

Assistenzärztin an der Klinik für
Anästhesiologie und Intensivmedizin,
Universitätsklinik Tübingen