

Aus der Klinik für Anaesthesiologie der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. K. Peter

Mikrobizide und zytotoxische Funktionen polymorphkerniger Leukozyten bei
Patienten mit Sepsis

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Florian Schliephake

München

(2006)

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Thiel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Rüssmann
Prof. Dr. G. Enders

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. I. Kaufmann

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Sepsis - eine große Herausforderung in der Intensivmedizin	5
1.2. Definition und Pathophysiologie der Sepsis	6
1.3. Physiologie polymorphkerniger Leukozyten	9
1.4. Ambivalenz polymorphkerniger neutrophiler Leukozyten	10
2. Fragestellung	13
3. Material und Methodik	14
3.1. Allgemeine Grundlagen	14
3.2. Das Prinzip der Durchflusszytometrie	22
3.3. Präparation leukozytenreichen Plasmas und allgemeine Versuchsbedingungen	25
3.4. Präparation von nicht-opsoniertem und opsoniertem Zymosan	26
3.5. Quantitative Erfassung von Adhärenz und Phagozytose polymorphkerniger Leukozyten	27
3.6. Bestimmung der Phagozytose-assoziierten H ₂ O ₂ -Produktion polymorphkerniger Leukozyten	29
3.7. Bestimmung der durch lösliche Stimuli induzierten potenziell zytotoxischen H ₂ O ₂ -Produktion	31
3.8. Quantitative Erfassung von Immunglobulinen und der Aktivierungswege des Komplementsystems	33
3.9. Bestimmung der β 2-Integrinexpression	34
3.10. Studiendesign und Patientenkollektiv	34
3.11. Statistik	35
4. Ergebnisse	36
4.1. Patientengruppen	36
4.2. Klinische Parameter	36
4.3. Adhärenz und Phagozytose von Zymosan	38
4.4. Adhärenz und Phagozytose von opsoniertem Zymosan	39
4.5. Phagozytose-assoziierte H ₂ O ₂ -Produktion	40
4.6. Immunglobuline und Aktivität des klassischen und alternativen Komplementsystems	41
4.7. Numerische Expression von β 2-Integrinen auf PMNL	42
4.8. H ₂ O ₂ -Produktion nach Aktivierung von PMNL mit löslichen Stimuli	43

5. Diskussion	45
5.1. Charakterisierung der Patientenkollektive	46
5.2. Mikrobizide Partialfunktionen zirkulierender PMNL bei Sepsis	48
5.3. Potenziell gewebeschädigende, zytotoxische Partialfunktionen von PMNL	56
5.4. Die Granulozytendysfunktion bei Sepsis	57
5.5. Methodenkritik	59
6. Zusammenfassung	62
6.1. Perspektiven	66
7. Abkürzungen	67
8. Literaturverzeichnis	68
9. Danksagung	75
10. Lebenslauf	76

1. Einleitung

1.1. Sepsis - eine große Herausforderung in der Intensivmedizin

Das Krankheitsbild der Sepsis bzw. des septischen Schocks ist noch immer eine der häufigsten Todesursachen von Patienten auf Intensivstationen. Trotz verbesserter Antibiotikatherapie und großer Fortschritte in der adjuvanten intensivmedizinischen Behandlung leidet ein großer Anteil der betroffenen Patienten unter schweren Organdysfunktionen, die vor allem das ZNS, das Herz-Kreislauf-System, die Lunge sowie die Nieren betreffen, und häufig in einem Multiorganversagen münden. Die Letalität der Sepsis steigt mit zunehmender Schwere der Erkrankung und liegt bei Patienten mit septischem Schock seit Jahren nahezu unverändert hoch bei 50-60% (3,28,90).

Neue Therapiekonzepte, die in einer Vielzahl von klinischen Studien untersucht wurden, hatten die Beeinflussung inflammatorischer Reaktionen bei Sepsis zum Ziel. Der gemeinsame Ansatz dieser Studien war es, einzelne endogen gebildete inflammatorische Mediatoren wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukine oder PAF (platelet-activating factor) in ihrer Wirkung auszuschalten. Bisher führte keiner dieser Therapieansätze zu einem klinisch messbaren Erfolg. Die Ursache für den Misserfolg dieser Versuche scheint die große Anzahl unterschiedlicher inflammatorischer Mediatoren zu sein, die im Immunsystem redundante Wirkung entfalten (5,40,52). Als eine weitere Ursache für die enttäuschenden Ergebnisse ist die große Inhomogenität der untersuchten Patientengruppen bezüglich Dauer und Ursache einer Sepsis, sowie bezüglich der Vorerkrankungen, Alter und Rasse zu diskutieren (1,8,47,90). Angesichts der Vielzahl fehlgeschlagener Versuche die Überlebenschancen von Patienten mit Sepsis oder septischem Schock zu erhöhen, erscheint es sinnvoll, vor der Einführung neuer Therapien die zu Grunde liegenden

pathophysiologischen Vorgänge genauer aufzuklären, um auf diesem Weg das Verständnis für dieses hochkomplexe Krankheitsbild zu verbessern.

1.2. Definition und Pathophysiologie der Sepsis

Sepsis kann als eine generalisierte Entzündungsreaktion des gesamten Organismus auf eine Infektion verstanden werden. Ihr Ausgangspunkt ist in den meisten Fällen eine schwere bakterielle Infektion und die damit verbundene Aussaat der Erreger und/oder ihrer Toxine in die Blutbahn. Die Bezeichnung Sepsis oder septischer Schock ist allerdings erst dann zutreffend, wenn es neben einer Bakteriämie oder Endotoxinämie zu Symptomen einer schweren Entzündungsreaktion mit Beeinträchtigungen lebenswichtiger Organfunktionen kommt. Von der ACCP/SCCM Consensus Conference wurde die Sepsis deshalb als eine systemische inflammatorische Antwort ("systemic inflammatory response syndrome, SIRS") des Organismus auf eine Infektion definiert (12).

SIRS („systemic inflammatory response syndrome“): mindestens zwei der folgenden Bedingungen müssen erfüllt sein:

- Temperatur > 38° oder <36°C
- Pulsfrequenz > 90 /min
- Atemfrequenz > 20 Atemzüge/min oder PaCO₂ < 32 mmHg
- Leukozyten > 12.000 /mm³ oder < 4000/mm³, oder >10% unreife Zellformen

Sepsis: Der Patient erfüllt die Bedingungen eines SIRS bei gleichzeitigem Nachweis oder klinisch begründetem Verdacht auf eine Infektion.

Schwere Sepsis: Der Patient erfüllt die Bedingungen einer Sepsis und es besteht zusätzlich eine Organdysfunktion, arterielle Hypotension oder Minderperfusion.

Septischer Schock: Der Patient erfüllt die Bedingungen einer Sepsis und ist trotz adäquater Volumensubstitution hypoton (RR systolisch <90 mmHg). Zusätzlich können Perfusionsstörungen auftreten, die sich als Laktatazidose, Oligurie oder in einer Beeinträchtigung des neurologischen Status manifestieren. Erhält der Patient vasokonstriktive Substanzen, kann die Phase der Hypotension nicht exakt ermittelt werden. Der Patient wird somit als im septischen Schock betrachtet.

Abb.1: Definitionen von SIRS, Sepsis und septischem Schock laut der ACCP/SCCM Consensus Conference 1992 (12)

Bei der Bekämpfung von Infektionen nehmen die Zellen der unspezifischen Abwehr eine Schlüsselposition ein. Ihre Hauptvertreter, polymorphkernige neutrophile Leukozyten (PMNL) sind in der Lage sowohl Mikroorganismen zu eliminieren, als auch im Rahmen der Wundheilung abgestorbenes Gewebe zu beseitigen. Um diesen Aufgaben gerecht zu werden, sind sie zur Phagozytose von Krankheitserregern und Debridement sowie der intrazellulären Abtötung der aufgenommenen Mikroorganismen durch ein Arsenal hochwirksamer Substanzen befähigt (32,46,58).

PMNL werden entweder direkt durch Bestandteile und Produkte eingedrungener Mikroorganismen oder indirekt unter Vermittlung humoraler und zellulärer Mediatoren des Immunsystems aktiviert. Im Rahmen einer Sepsis erfahren sie auf diese Weise eine Stimulation, welche das physiologische Maß weit überschreiten kann (4,79).

Unter diesen Bedingungen können PMNL neben ihren physiologischen sowie anti-mikrobiellen Aufgaben auch eine pro-inflammatorische Wirkkomponente entfalten, welche sich in einer exzessiven Freisetzung potenziell zytotoxischer Substanzen äußert (6,22).

Diese durch Granulozyten induzierten Vorgänge spielen sich hauptsächlich in der Endstrombahn des Organismus ab und verursachen so eine generalisierte Mikrozirkulationsstörung (33,49). Diese wird als eine der Hauptursachen für die Entwicklung von Organdysfunktionen bis hin zum septischen Multiorganversagen betrachtet (s. Abb.2) (8).

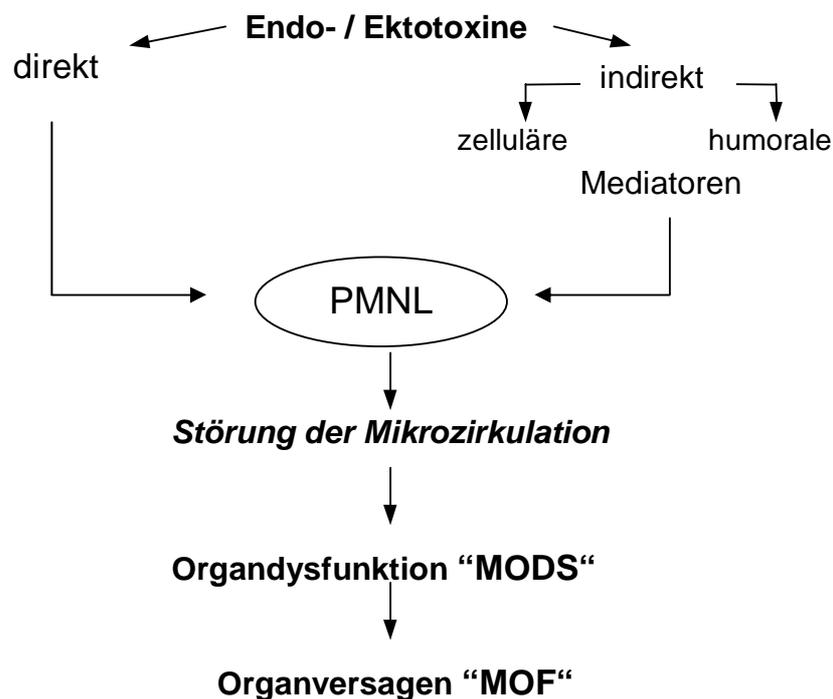


Abb.2: Modell der Pathogenese des septischen Multiorganversagens

MODS: „Multiple Organ Dysfunktion Syndrome“,

MOF: „Multiple Organ Failure“

1.3. Physiologie polymorphkerniger Leukozyten

Das Funktionsprinzip von Granulozyten, welches der Pathogenese des septischen Multiorganversagens zu Grunde liegt, kann vereinfacht als eine Stimulus-Antwort-Reaktion beschrieben werden (s. Abb.3) (79). In Folge einer Stimulation beinhaltet die Zellantwort polymorphkerniger Leukozyten zunächst die Diapedese, das Verlassen des Intravasalraumes, und anschließend das Auffinden von Fremdorganismen im Gewebe mittels Chemotaxis. Am Ort einer Infektion erfolgt die Kontaktaufnahme durch Adhärenz und nachfolgend die Aufnahme ins Zellinnere mittels Phagozytose.

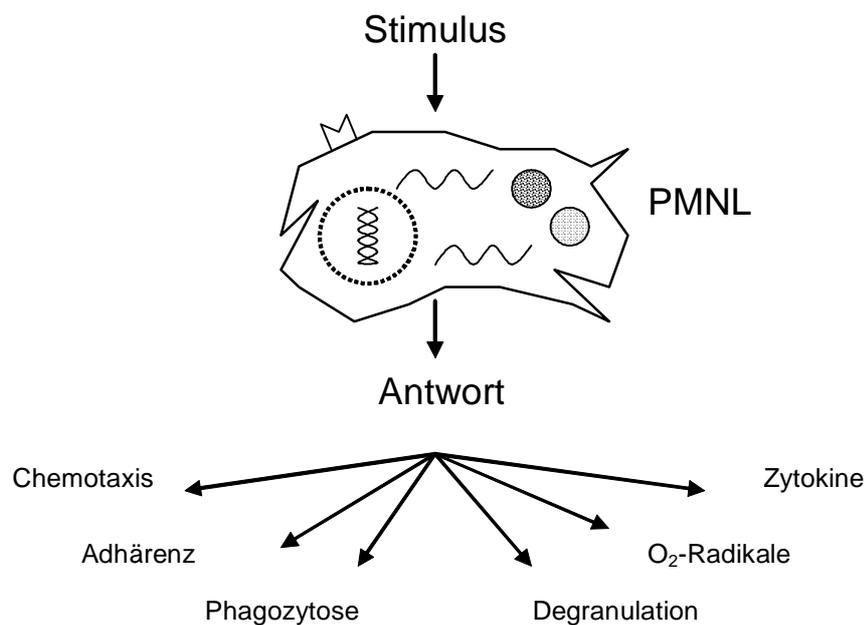


Abb.3: Stimulus-Antwort-Reaktion als Funktionsprinzip polymorphkerniger Leukozyten. Die durch Stimulation ausgelöste Zellantwort des PMNL umfasst eine Vielzahl unterschiedlicher Schritte zur Eliminierung von pathogenen Fremdorganismen.

Das antimikrobielle System polymorphkerniger Granulozyten kann in einen sauerstoffunabhängigen sowie in einen sauerstoffabhängigen Teil gegliedert werden. Das sauerstoffunabhängige antimikrobielle System umfasst die Wirkung von Proteasen, die in den unspezifischen und spezifischen Granula des PMNL enthalten sind. Die Bildung von hochreaktiven Sauerstoffradikalen aus molekularem Sauerstoff in einer durch die NADPH-Oxidase katalysierten Reaktion bezeichnet man auch als „respiratory burst“. Dieses hochwirksame Arsenal an keimabtötenden Substanzen befähigt den Granulozyten zu einer effektiven Bekämpfung von Krankheitserregern (32,58).

1.4. Ambivalenz polymorphkerniger neutrophiler Leukozyten

Neben der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Wirkung haben die von PMNL primär zur Abtötung von Mikroorganismen produzierten Stoffe ein erhebliches Potenzial körpereigenes Gewebe zu schädigen (6,9). Somit ist es von herausragender Bedeutung, dass diese bakteriziden Substanzen ihre Wirkung zur richtigen Zeit am richtigen Ort entfalten. Dies wird durch die Orientierung des aktiven Zentrums der NADPH-Oxidase, dem Schlüsselenzym für die Bildung von reaktiven Superoxidanionen, zum Extrazellulärraum hin erreicht. Bei der Phagozytose adhären PMNL zunächst an den Fremdpartikel, umfließen ihn und stülpen dabei ihre Zellmembran nach innen um das zu phagozytierende Material herum ein. Folglich bildet die Außenseite der Zellmembran nun die Innenseite des entstandenen Phagosoms. So ist unter physiologischen Bedingungen eine gerichtete Abgabe der potenziell zytotoxischen Stoffe in das Phagosom zu den darin aufgenommenen Mikroorganismen garantiert (s. Abb. 4)(22,32,58).

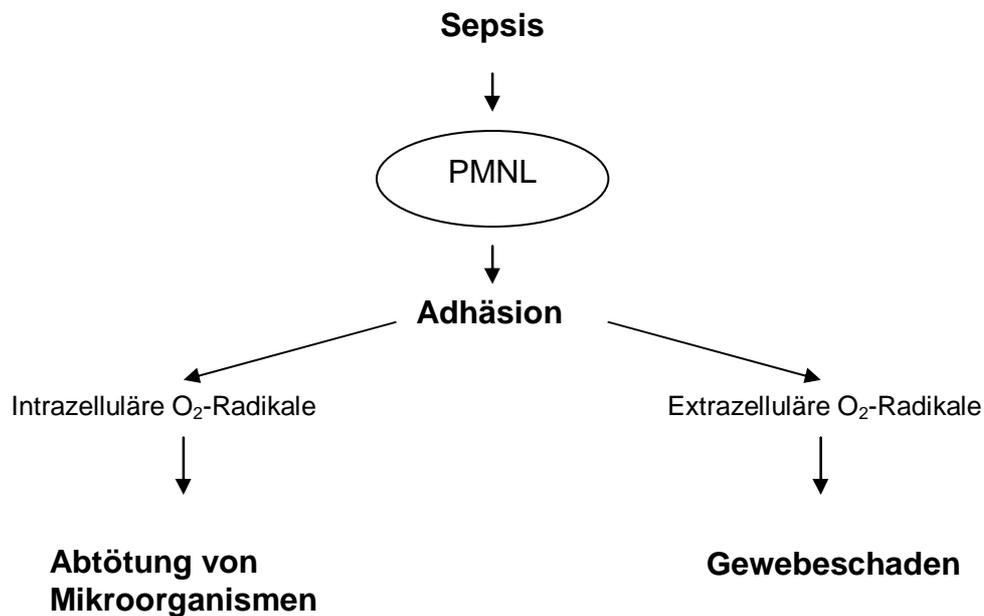


Abb.4: Ambivalente Reaktionen von Granulozyten. Der Fähigkeit von PMNL zu adhären und reagible O_2 -Radikale zu bilden kommt eine ambivalente Bedeutung zu. Einerseits ist die Adhäsion von PMNL an Bakterien eine wichtige Voraussetzung für die Aufnahme von Bakterien ins Zellinnere, andererseits führt die verstärkte Adhäsion an die Gefäßwand zu einer gesteigerten extrazellulären Freisetzung von zytotoxischen Superoxidanionen, welche durch die Schädigung von Zellen des Gefäßendothels Mikrozirkulationsstörungen verursachen.

Unter pathologischen Bedingungen hingegen, wie es im Verlauf einer Sepsis der Fall ist, kann es durch eine exzessive Freisetzung von löslichen Entzündungsmediatoren und bakteriellen Toxinen zu einer Überstimulation polymorphkerniger neutrophiler Leukozyten kommen. Bei den Stimuli handelt es sich um Lipopolysaccharide (LPS) bzw. Endotoxine, Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien, die nach dem Absterben von Mikroorganismen freigesetzt werden oder um Ektotoxine, Produkte lebender Bakterien. Diese Toxine und die in Reaktion darauf vom Organismus in

seinen humoralen und zellulären Mediatorsystemen gebildeten Entzündungsmediatoren können von PMNL nicht phagozytiert werden und aktivieren deshalb die membranständige NADPH-Oxidase direkt auf der gesamten Zellmembran mit der Freisetzung der Superoxidanionen in den Extrazellulärraum (4,56).

Befindet sich der aktivierte PMNL in dieser Phase am falschen Ort, d.h. ist er gerade dabei den Intravasalraum zu verlassen, dann führt die Interaktion numerisch und funktionell hochregulierter Adhäsionsmoleküle (z.B. β 2-Integrine) nicht nur zu einer weiteren Stimulation der Zellen („outside-in signaling“ (22,79)), sondern es kommt auch zur Bildung eines mikroskopisch kleinen Raumes zwischen den polymorphkernigen Leukozyten und den Endothelzellen, in den hinein abgegebene reagible Superoxidanionen und Proteasen vor Antioxidantien und inhibitorischen Enzymen aus dem Blutstrom geschützt sind. So können die vom PMNL freigesetzten Produkte ihre toxische Wirkung voll entfalten (13,33). Damit kommt der Fähigkeit von PMNL zu adhären und reagible Superoxidanionen zu bilden eine ambivalente Bedeutung zu (s. Abb.4). Einerseits stellt die Adhäsion der PMNL an opsonierte Bakterien eine wichtige Voraussetzung für deren Aufnahme durch Phagozytose und die nachfolgende Abtötung durch eine vorwiegend intrazellulär ablaufende Superoxidanionenproduktion dar, andererseits führt die verstärkte Adhäsion an die Gefäßwand und die nachfolgende extrazelluläre Freisetzung von zytotoxischen Superoxidanionen zur Destruktion von Endothelzellen als Ursache für Gewebeschäden durch Beeinträchtigung der Mikrozirkulation.

2. Fragestellung

Vor diesem pathophysiologischen Hintergrund einer ambivalenten Rolle der Funktionen polymorphkerniger Leukozyten stellt sich die Frage, wie sich die Fähigkeiten der Granulozyten Mikroorganismen abzutöten in Relation zu ihrer Fähigkeit körpereigenes Gewebe zu schädigen bei der Sepsis in Abhängigkeit des Schweregrades dieses Krankheitsbildes verändern.

In einer klinisch prospektiven deskriptiven Studie haben wir uns folgenden Fragen zugewandt:

1. Wie verhalten sich im Vergleich zu den Granulozyten von gesunden Probanden die mikrobiziden Funktionen von PMNL bei Patienten mit Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock?
2. Kommt es im Vergleich zu den PMNL von gesunden Probanden zu einer Steigerung der potenziell gewebeschädigenden zytotoxischen Funktionen von Granulozyten in Abhängigkeit des Schweregrades der Sepsis ?

3. Material und Methodik

3.1. Allgemeine Grundlagen

Zur Klärung dieser Fragen haben wir Methoden etabliert, um Auskunft über die durch partikuläre Stimuli ausgelösten mikrobiziden Teilfunktionen, wie Adhäsion, Phagozytose und die mit der Phagozytose einhergehende intrazelluläre H_2O_2 -Produktion zu erhalten. Ferner sollten durch die Reaktion der PMNL auf lösliche Entzündungsmediatoren Aussagen über die Kapazität von PMNL, potenziell gewebschädigende, zytotoxische Funktionen zu aktivieren, (CD18 Expression und extrazellulären H_2O_2 -Produktion) gewonnen werden.

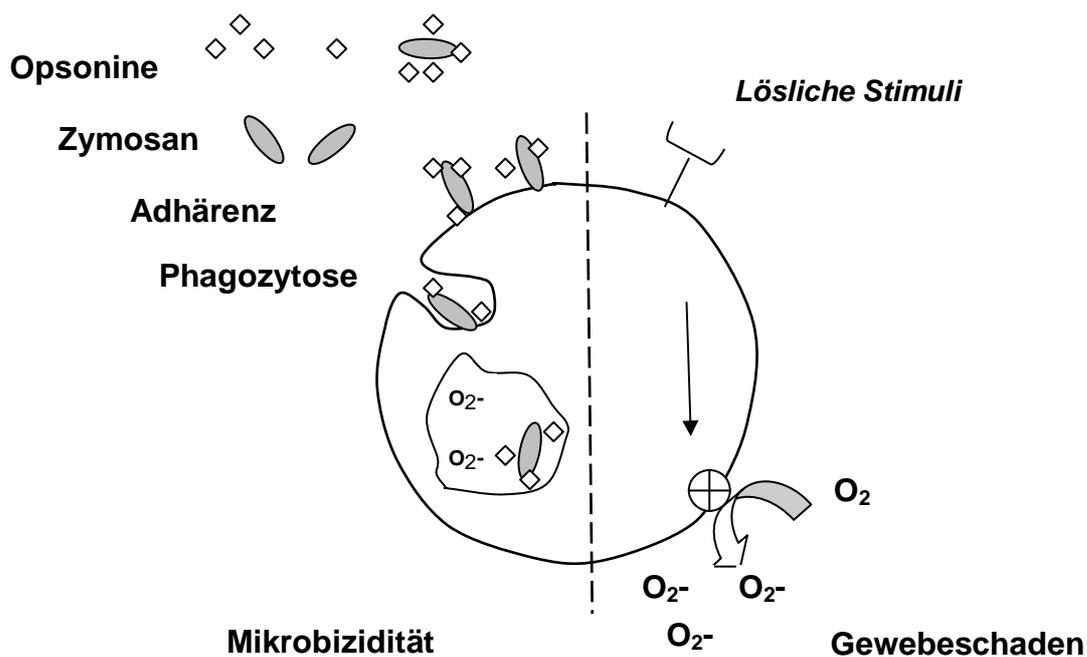


Abb.5: Aktivierung von PMNL durch partikuläre bzw. lösliche Stimuli. Während es nach Phagozytose von Mikroorganismen zu einer gerichteten Abgabe von Superoxidanionen in das neu gebildete Phagosom kommt, aktivieren humorale Stimuli (TNF, fMLP) die NADPH-Oxidase auf der gesamten Zelloberfläche mit der daraus resultierenden Sekretion zytotoxischer Superoxidanionen in den Extrazellulärraum.

Die Rationale der von uns gewählten Inkubationsbedingung zur ex vivo Analyse mikrobizider und zytotoxischer Teilfunktionen wurde dabei maßgeblich durch die Kenntnisse über die Rolle des β 2-Integrins CD11b/CD18 für die mikrobiziden Teilfunktionen polymorphkerniger Leukozyten bestimmt.

Vermittelt werden die in Abb. 4 und 5 als ambivalent in ihrer Bedeutung dargestellten Funktionen der Adhäsion von PMNL an opsonierte Bakterien und an das Gefäßendothel eben u. a. auch durch die Interaktion von β 2-Integrinen. Den β 2-Integrinen gehören die Komplementrezeptoren Typ 2 und 3 (CR2 und CR3) sowie das Lymphocyte Function Associated Antigen-1 (LFA-1) an. Weitere Rezeptoren für Opsonine sind Fc γ -Rezeptoren für Immunglobuline und der Komplementrezeptor Typ-1 (CR1) (s. Tab.1).

Tab.1: Komplement und Immunglobulin Fc- Rezeptoren auf Phagozyten

Komplement und Immunglobulin Fc-Rezeptoren auf Phagozyten			
Familie	CD	Liganden	Affinität
Fc γ RI	CD64	IgG1, IgG3	hoch
Fc γ RIIA	CD32	IgG1, IgG3	niedrig
Fc γ RIIIB	CD16	IgG1, IgG	niedrig
CR1	CD35	C3b, C4b>iC3b	
CR2	CD21	C3d	
CR3	CD11b/CD18	iC3b, β -Glukan>C3b	
CR4 (LFA-1)	CD11c/CD18	iC3b, C3dg	

Beide Rezeptorklassen (Fc γ -Rezeptoren und Komplementrezeptoren) vermitteln die Kontaktaufnahme und initiieren die Phagozytose sowie die Auslösung des „respiratory burst“, sofern die zu eliminierenden Mikroorganismen zuvor entweder mit Immunglobulinen oder Komplementspaltprodukten (C3b, C3bi) opsoniert worden sind (62). Eine gegenseitige Verstärkung der Funktionen von Fc γ -Rezeptoren und Komplementrezeptoren ist möglich (57). Unter den Komplementrezeptoren aus der Familie der β 2-Integrine spielt das β 2-Integrin CD11b/CD18 als Komplementrezeptor Typ 3 eine herausragende Rolle (25).

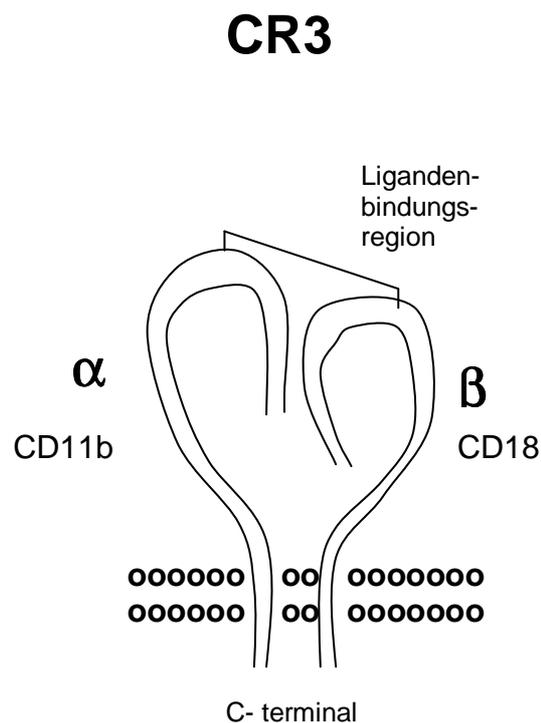
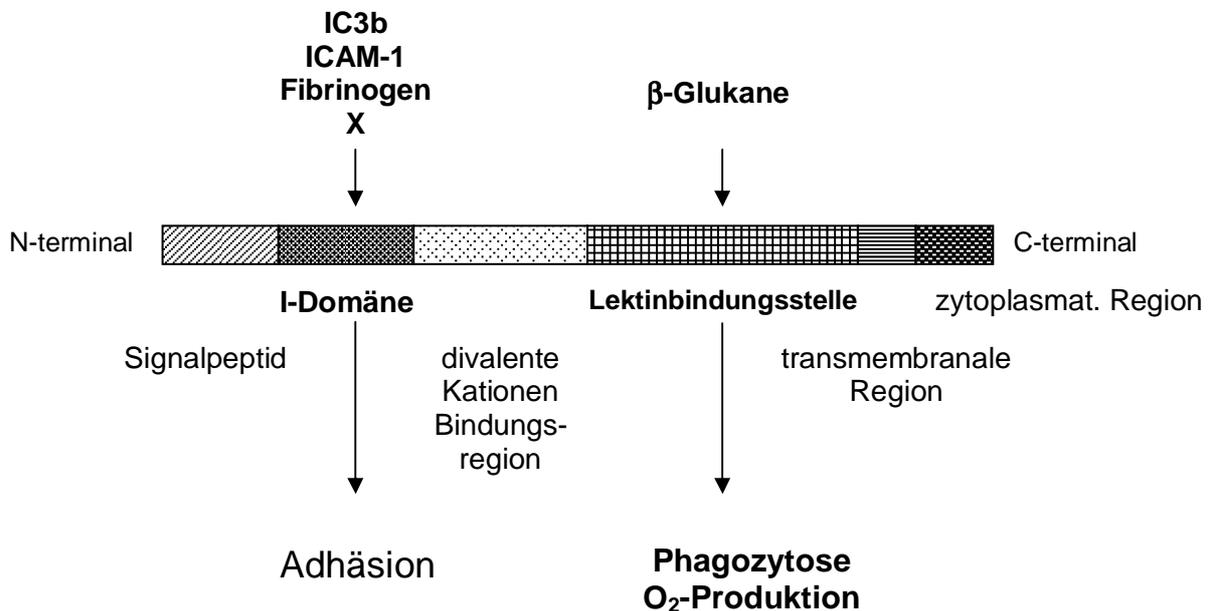


Abb.6: Komplementrezeptor Typ 3

Ebenso wie die anderen β 2-Integrine ist der Komplementrezeptor Typ 3 (CR3) ein heterodimeres Glykoprotein, welches aus einer allen drei β 2-Integrinen gemeinsamen β -Kette (CD18) und einer variablen α -Kette besteht, die im Falle des CR3 als CD 11b bezeichnet wird (s. Abb.6). In der älteren Literatur wurde der CR3 auch als Mac-1 Antigen beschrieben (10,25).

Die dem Komplementrezeptor Typ 3 eigene α -Kette verfügt über zwei voneinander unabhängige Bindungsregionen (s. Abb.7). Die dem N-terminalen Ende nähere I-Domäne ermöglicht durch die Interaktion mit ihren Liganden, dem Komplementfaktor C3bi, ICAM-1, Fibrinogen sowie dem Faktor X, eine effektive Adhäsion an Fremdpartikel und Gefäßendothelien (7,24).



Nach Ross RG, 1999

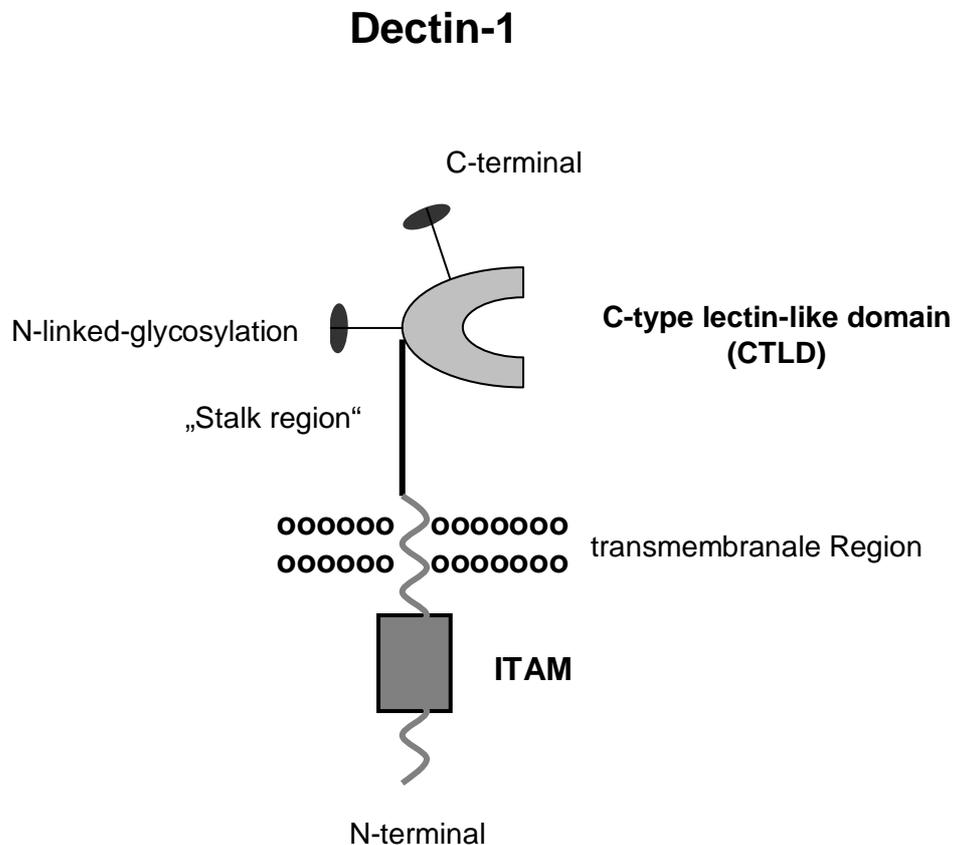
Abb.7: Struktureller Aufbau der α -Kette (CD11b): Das Molekül verfügt über zwei räumlich voneinander getrennte Bindungsregionen: Die am N-terminalen Ende lokalisierte I-Domäne und die am C-terminalen Ende lokalisierte Lektinbindungsstelle (80,92).

Neben der I-Domäne verfügt das CD11b-Molekül über eine Lektinbindungsstelle, welche von Ross und Mitarbeitern in ihrem Aufbau und ihrer Funktion genauer charakterisiert wurde (64,92). Diese Domäne, die am C-terminalen Ende lokalisiert ist, besitzt eine hohe Affinität zu β -Glukanen, komplexen Zuckermolekülen, die vorzugsweise auf der Oberfläche von Mikroorganismen zu finden sind (80,82). Während die I-Domäne lediglich die Adhärenz des PMNL an Strukturen (wie C3b-opsonierte Bakterien oder endotheliale ICAMs) ermöglicht, ohne den PMNL zu aktivieren (was im Falle der Adhäsion der PMNL an das Gefäßendothel sinnvoll ist), führt die Interaktion der Lektinbindungsstelle mit β -Glukanen von Bakterien zur Generierung eines den Phagozyten aktivierenden Signals, das nach intrazellulär fortgeleitet wird und so die Phagozytose des Fremdorganismus und seine anschließende intrazelluläre Abtötung durch H_2O_2 einleitet (91,93).

Neben dem Komplementrezeptor Typ 3 wurde vor kurzem von der Arbeitsgruppe um Brown und Gordon mit dem Dectin-1-TLR2/6 Komplex ein weiterer Rezeptor für β -Glukane identifiziert, bestehend aus Dectin-1 und den Toll-like Rezeptoren 2 und 6 (TLR2/6), welcher in seiner Bedeutung für die Aktivierung von PMNL dem Komplementrezeptor Typ 3 gleichzusetzen ist (14,15,34).

Dectin-1 wird wie der Komplementrezeptor Typ 3 als „non Toll-like“ Rezeptor den „pattern-recognition“ Rezeptoren (PRR) zugeordnet. PRRs binden an eine Vielzahl von für Mikroorganismen typischen Antigenen, den „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs), welche auf Grund ihrer vitalen Bedeutung keiner Mutation unterworfen, und somit sehr stabil sind. PRRs befähigen den Organismus durch die Detektion von PAMPs, welchen auch β -Glukane zugerechnet werden, ohne Zeitverlust eine primäre Zellantwort aus Phagozytose und der assoziierten H_2O_2 -Produktion zu generieren. Zudem fungieren sie durch die Produktion von Zytokinen als Bindeglied zur adaptiven Immunabwehr (14).

Dectin-1 ist beim Menschen vor allem auf der Oberfläche von PMNL, Monozyten und Makrophagen lokalisiert (16,75). Der Dectin-1-Rezeptor wird bedingt durch die Orientierung seines N-terminalen Endes zum Zytoplasma und seines C-terminalen Endes in den Extrazellulärraum zu den transmembranalen Zellrezeptoren Typ II gerechnet (s. Abb.8). Auf Grund seiner Struktur wird er als „C-Typ Lectine“ bezeichnet, einer Gruppe 14 unterschiedlicher Proteine, welche durch das Vorhandensein einer oder mehrerer charakterisiert sind.



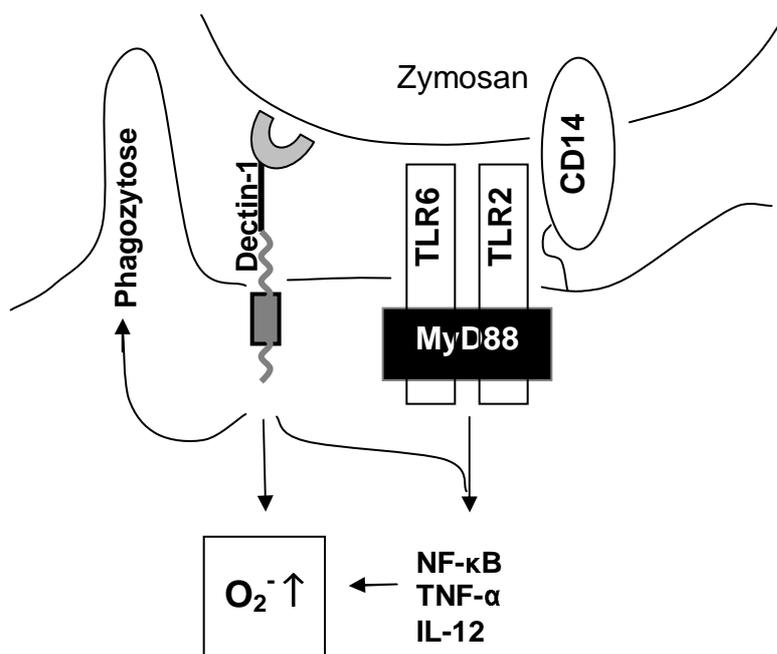
nach Brown GD 2006

Abb.8: Dectin-1 Rezeptor. Die Bindungsstelle des Dectin-1 Rezeptors für β -Glukane, die „carbohydrate-recognition domain“ (CRD), ist in der „C-type-lectin-like domain“ (CTLD) lokalisiert, die durch einen Stiel variabler Länge („stalk-region“) über die Zelloberfläche erhaben ist. Die intrazelluläre Signalweiterleitung erfolgt durch den zytoplasmatischen Anteil des Moleküls, dem sog. „immunoreceptor tyrosin-based activation motif“ (ITAM).

Seine für β -Glukane spezifische singuläre Bindungsregion („carbohydrate-recognition domain“, CRD) ist durch einen „Stiel“ („stalk-region“) von der Zellmembran abgehoben (s. Abb.8) (14,34). Durch die Interaktion dieser Region an β -Glukanstrukturen auf der Oberfläche von Mikroorganismen bzw. Zymosan ist der Dectin-1 Rezeptor selbständig in der Lage, eine Zellantwort zu generieren, die aus Phagozytose, der Bildung von Superoxidanionen sowie der Produktion proinflammatorischer Zytokine besteht. Die Signaltransduktion ins Zellinnere erfolgt durch die Phosphorylierung von Tyrosinkinase, welche im zytoplasmatischen Abschnitt die Interaktion des „immunoreceptor tyrosin-based activation motif“ (ITAM) mit der sog. „spleen tyrosine kinase“ (SYK) auslösen (34,61).

Allerdings ist die Produktion von $\text{TNF-}\alpha$, IL12 und möglicherweise IL2 an einen weiteren Signalweg über die simultane Bindung der Toll-like Rezeptoren 2 und 6 (TLR2/6) sowie CD14 gekoppelt (s. Abb.9). TLR2/6 besitzen nicht die Fähigkeit an β -Glukane zu binden. Der Ligand auf der Oberfläche von Mikroorganismen bzw. Zymosan, mit dem die TLR2/6-Rezeptoren interagieren, ist bisher nicht identifiziert. (29).

Die Signaltransduktion durch TLR2/6 erfolgt durch das „myeloid differentiation primary-response gene 88“ (MyD88) und NF- κ B (nuclear factor- κ B). Die auf diesem Weg gebildeten proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF-}\alpha$ und IL-12 entfalten ihre Wirkung unter anderem in der Verstärkung der von Dectin-1 generierten Zellantwort aus Phagozytose und „respiratory burst“ (29).



nach Ganter BN 2003

Abb.9: Modell der Interaktion von Dectin-1 mit den Toll-like Rezeptoren 2 und 6. Durch das im zytoplasmatischen Anteil lokalisierte ITAM ist der Dectin-1 Rezeptor selbständig in der Lage die Phagozytose eines Fremdorganismus, die daran assoziierte Bildung von H_2O_2 sowie die Ausschüttung unterschiedlicher Zytokine einzuleiten. Für die Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL12 (und evtl. IL2) ist zusätzlich die simultane Detektion durch TLR2/6 und CD14 notwendig. TLR 2/6 induzieren über MyD88 und NF- κ B die Ausschüttung von TNF- α und IL12 (IL2), welche die primär von Dectin-1 ausgelöste Zellantwort weiter verstärken.

Basierend auf diesen gut dokumentierten zellbiologischen Funktionen ist es möglich durch Verwendung von Partikeln, die reich an β -Glukanstrukturen sind, die Bindung an die Lectinbindungsstelle des Komplementrezeptors Typ 3 respektive an den Dectin-1-TLR2/6-Komplex und die dadurch ausgelösten mikrobiziden Partialfunktionen selektiv zu prüfen. Dies gilt insbesondere für die von der

β -Glukanbindungsstelle des CR3 bzw. vom Dectin-1-TLR2/6-Komplex ausgelöste Phagozytose und die einhergehende intrazellulär im Phagosom stattfindende H_2O_2 -Produktion (64).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde, wie von der Arbeitsgruppe um Ross et al charakterisiert, Zymosan - ein Produkt aus der Zellwand der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* - verwendet, welches einen hohen Anteil an β -Glukanen aufweist. Erfolgt die Durchführung der Analyse der mikrobiziden Partialfunktion nach vorhergehender Oponierung der Zymosanpartikel, so ergeben die Resultate im Vergleich zur Verwendung von nicht-opsoniertem Zymosan Aufschluss über die Verstärkung der von den β -Glukanrezeptoren (CR3 und Dectin-1-TLR2/6) abhängigen Funktionen durch Oponine (C3b, C3bi und reaktive Immunglobuline der IgG Klasse). Die Analysen mikrobizider und zytotoxischer Granulozytenfunktionen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt.

3.2. Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer sind optische Messgeräte, welche Streulicht und Fluoreszenzsignale einzelner Zellen detektieren können und so Rückschlüsse auf deren Herkunft sowie intrazelluläre Stoffwechselfvorgänge erlauben. Zu diesem Zweck wird eine Suspension von Zellen im „Gänsemarsch“ durch den Lichtstrahl eines Lasers geleitet. Hierbei entsteht abhängig von deren Größe, Querschnittsfläche und Granularität Streulicht, bei fluorochrommarkierten Zellen durch die Absorption energiereicher Strahlen Lichtemissionen niedrigerer Wellenlängen (Fluoreszenz). Das optische System des Durchflusszytometers erfasst in einem Winkelbereich zwischen 0° und 10° die entstandene Vorwärtslichtstreuung („Forward Angel Light Scatter“ [FSC]) sowie die Seitwärtslichtstreuung (Side Scatter [SSC]) in einem Winkel von 90° . Unterschiedliche Zellpopulationen lassen sich so auf Grund ihrer

spezifischen physikalischen Eigenschaften voneinander abgrenzen. Intrazelluläre Stoffwechselfvorgänge können durch die Verwendung fluoreszierender Substrate untersucht werden. Der verwendete Gerätetyp (Becton Dickinson FACScan, Argonlaser, 15 mW, Erregerwellenlänge 488 nm, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) erlaubt dabei quantitative Messungen von Fluoreszenzlicht mit drei unterschiedlichen Wellenbereichen (FI1: 515 - 445 nm, FI2: 564 - 606 nm, FI3: > 650 nm). Eine gesamte Analyse besteht demnach aus der Summe aller aufeinander folgenden Einzelmessungen.

Die zunächst im logarithmischen Modus gewonnenen Rohdaten wurden mit der Software FACScan Research (Version 2.1, 1989) ausgewertet. In Vorversuchen aus im logarithmischen sowie im linearen Modus paarweise durchgeführten Messungen mit Kalibrationspartikeln (CaliBRITE™ 3, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) konnte eine Regressionskurve mit der Formel $y = e^{0,01124 \cdot x}$ abgeleitet werden. Durch die Anwendung der Formel auf die logarithmischen Rohdaten wurden diese in den linearen Modus überführt und weiter ausgewertet. Einen Überblick der gewählten Geräteeinstellungen für die Erfassung der Adhärenz und Phagozytose, der H₂O₂-Produktion und der β2-Integrinexpression geben die Tabellen 2-4.

Tab.2: Geräteeinstellung zur quantitativen Erfassung von Adhärenz und Phagozytose

	FSC	SSC	FL1	FL2	FL3
Detector	E00	323	299	459	404
Amplifier Gain	1,00	1,62	LOG	LOG	LOG
Data Mode	Linear	Linear	Log	Log	Log
Threshold : 156					
	FL1-%FL2	FL2-%FL1	FL2-%FL3	FL3-%FL2	
Compensation	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	

Tab.3: Geräteeinstellung zur Messung der H₂O₂-Produktion

	FSC	SSC	FL1	FL2	FL3
Detector	E00	323	513	459	404
Amplifier Gain	1,07	1,00	LOG	LOG	LOG
Data Mode	Linear	Linear	Log	Log	Log
Threshold : 164					
	FL1-%FL2	FL2-%FL1	FL2-%FL3	FL3-%FL2	
Compensation	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	

Tab.4: Geräteeinstellung zur Bestimmung der β 2-Integrinexpression

	FSC	SSC	FL1	FL2	FL3
Detector	E00	300	760	550	450
Amplifier Gain	1,25	1,25	5,00	Log	Log
Data Mode	Linear	Linear	Linear	Log	log
Threshold : 152					
	FL1-%FL2	FL2-%FL1	FL2-%FL3	FL3-%FL2	
Compensation	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	

3.3. Präparation leukozytenreichen Plasmas und allgemeine Versuchsbedingungen

Für die Durchführung aller Tests wurden 3ml Vollblut aus einer peripheren Vene, falls vorhanden aus einem zentralen Venenkatheter oder einer arteriellen Verweilkanüle entnommen und heparinisiert (10 IE/ml Heparin). Humane Leukozyten (2×10^6 Zellen/ml) wurden anschließend mittels spontaner diskontinuierlicher Dichtegradientensedimentation bei Raumtemperatur isoliert (Ficoll-Histopaque, Dichte 1077g/l, Sigma, Deisenhofen, Deutschland).

Als Trägerlösung für alle folgenden Versuche wurde HBSS verwendet (Hank's balanced salt solution). HBSS-Trockenpulver (Hank's balanced salt solution without phenol red Nr.1387, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) wurde mit 5ml HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic)acid, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) aufgelöst und einem Liter Aqua dest. zugegeben. Der pH-Wert wurde auf 7,40 eingestellt. Die Inkubation der Proben erfolgte in Polypropylenröhrchen, die während der gesamten Dauer der Versuche auf 37°C temperiert wurden (Blockthermostat Grant Instruments, Cambridge, GB). Alle Stoffwechselfvorgänge wurden nach Beendigung der Versuche durch die Lagerung der Proben in Eiswasser gestoppt. Eisgekühlt waren die Ansätze bis zur Messung am Durchflusszytometer für 90min stabil. Die Identifizierung der Zellpopulationen von Monozyten, Lymphozyten und polymorphkernigen Leukozyten war durch die unterschiedliche Vorwärts (FSC)- und Seitwärtslichtstreuung (SSC), bedingt durch voneinander abweichende physikalische Eigenschaften, ermöglicht. Nach jedem Arbeitsschritt war das Durchmischen der Proben obligatorisch.

3.4. Präparation von nicht-opsoniertem und opsoniertem Zymosan

100mg trockenes Zymosan (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) wurden zunächst in einer Konzentration 10mg/ml in 0,9%iger NaCl für 2min gekocht und anschließend für 15min im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex Super RK 510H, Bandelin Elektronik, Berlin, Germany) behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit NaCl 0.9% wurden die Partikel in 100ml HBSS resuspendiert. Durch Sedimentieren wurden große Präzipitate abgetrennt, anschließend der Überstand gewonnen und bei 5000“G“ zentrifugiert.

Nach Bestimmung des Nassgewichtes wurden die Zymosanpartikel in HBSS resuspendiert und in einer Konzentration von 10mg/ml bei einer Temperatur von minus 80°C gelagert.

Die Fluoreszenzmarkierung der Partikel erfolgte durch einstündige Inkubation von 10mg (Nassgewicht) Zymosan in 1ml NaHCO₃ (Konzentration 0,1 mol/l, pH=8.5) mit 0,85mg Fluos (Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Germany) gelöst in 850µl Dimethylsulfoxyd (Fa. Merck, Darmstadt, Germany). Nach viermaligem Waschen mit 0,9%iger NaCl wurde das Pellet in HBSS resuspendiert und in einer Konzentration von 10mg/ml bei minus 80°C bis zur Messung gelagert.

Um ein Agglutinieren der Partikel zu vermeiden, wurden die Proben vor jeder Messung erneut im Ultraschallbad behandelt. Die Präparation von Plasma-opsoniertem Zymosan erfolgte durch die Inkubation der Partikel in autologem Plasma für 30min. Im Anschluss wurden die Proben zweimal in HBSS gewaschen.

Da freie, nicht ingestierte FITC-markierte Zymosanpartikel ihre Fluoreszenzkraft durch Erniedrigung des pH-Wertes unter 4 verlieren (35), war nach Versuchende durch die Zugabe von HCL eine Differenzierung zwischen extrazellulären bzw. adhären und phagozytierten Zymosanpartikeln zuverlässig möglich.

3.5. Quantitative Erfassung von Adhärenz und Phagozytose polymorphkerniger Leukozyten

Die Messung wurde in zwei parallelen Ansätzen für nicht-opsonierte sowie für mit autologem Plasma opsonierte Zymosanpartikel durchgeführt. (s. Abb.10/Tab.5) Zunächst wurden PMNL bei 37°C für 10min in HBSS vorinkubiert. Anschließend wurden FITC(Fluoresceinthioisocyanat)-markierte Zymosanpartikel jeweils im Partikel- zu Zellverhältnis 10:1 zugegeben und für 30min mit den PMNL inkubiert. Nach der Lagerung der Proben auf Eis wurde der prozentuale Anteil von fluoreszierenden Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die Abgrenzung von ungebundenen Zymosanpartikeln war durch die um mehrere Zehnerpotenzen größere Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung von PMNL gewährleistet. In einer zweiten Messung wurde nach der Zugabe von HCl der Prozentsatz der PMNL, die Zymosanpartikel phagozytiert hatten, bestimmt. Der Anteil der PMNL die ausschließlich an Zymosan adhärert hatten wurde aus der Differenz des Anteils fluoreszenz-positiver Zellen bei pH 7.4 und bei pH < 4 wie folgt errechnet:

% Phagozytose = % der FL1-positiven PMNL nach Zugabe von HCL

% Adhäsion = % der FL1-positiven PMNL vor Zugabe von HCL **minus** % der FL1-positiven PMNL nach Zugabe von HCL

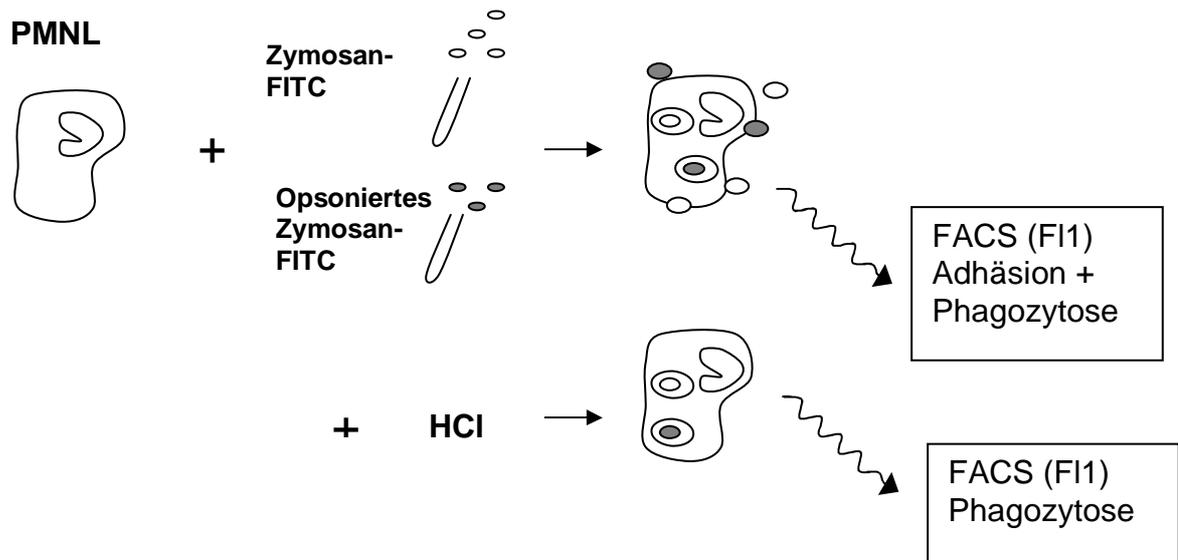


Abb.10: Monitoring von Adhärenz und Phagozytose. Die Inkubation von PMNL erfolgt in zwei parallelen Ansätzen mit nativem bzw. opsoniertem, FITC-markiertem Zymosan. Nach Beendigung der Inkubationszeit wird in einer ersten Messung der Anteil der PMNL erfasst, die sowohl adhärert als auch phagozytiert haben. Durch die Absenkung des pH unter 4 verlieren freie, nicht phagozytierte Zymosanpartikel ihre Fluoreszenzkraft. Somit kann in einer zweiten Messung der Prozentsatz der Zellen, die ausschließlich phagozytiert haben, detektiert werden. Der Anteil der Adhäsion wird wie im Abschnitt 2.5. beschrieben berechnet.

Tab.5: Inkubationsschema zum Monitoring von Adhärenz und Phagozytose

0min	10min	40min
37°C	37°C	4°C (Lagerung auf Eis)
0,5ml HBSS + 10µl leukozytenreiches Plasma	+ FITC markierte Zymosanpartikel nicht opsoniert	1. Messung am FACS-Zytometer + 10 µl HCL 2. Messung am FACS-Zytometer
0,5ml HBSS + 10µl leukozytenreiches Plasma	+ FITC markierte Zymosanpartikel opsoniert	1. Messung am FACS-Zytometer + 10 µl HCL 2. Messung am FACS-Zytometer

PMNL werden nach 10 min in auf 37°C temperiertem HBSS für 30 min in zwei parallelen Ansätzen mit nativen bzw. opsonierten, FITC-markierten Zymosanpartikeln inkubiert. Anschließend erfolgt die Unterbrechung aller Stoffwechselvorgänge durch die Lagerung auf Eis und die Messungen am FACS-Zytometer jeweils vor und nach der Zugabe von HCL.

3.6. Bestimmung der Phagozytose-assoziierten H₂O₂-Produktion polymorphkerniger Leukozyten

Der Nachweis der intrazellulären H₂O₂-Produktion von Granulozyten erfolgt durch die Oxidation des nichtfluoreszierenden Indikators Dihydrorhodamin 123 (DHR), zu grünfluoreszierendem Rhodamin. Die am Durchflusszytometer gemessene Intensität der Grünfluoreszenz ist ein Maß für die respiratorische Burstaktivität, ausgelöst durch die Phagozytose von Zymosan (67,85). Die Endkonzentration des zugesetzten Dihydrodamin 123 (MoBiTec GmbH, Göttingen, Deutschland, 1,1mM gelöst in DMF (Dimethylformamid, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)), mit welcher die Zellen für 10min bei 37°C vorinkubiert wurden, betrug 10⁻⁶M (s. Abb.11/Tab.6). Anschließend wurden die polymorphkernigen Leukozyten für 30min mit nicht-opsoniertem Zymosan im Partikel- zu Zellverhältnis 10:1 stimuliert. Ein zweiter Ansatz wurde analog mit opsonierten Zymosanpartikeln durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Lagerung der Proben bis zur Messung am Durchflusszytometer auf Eis.

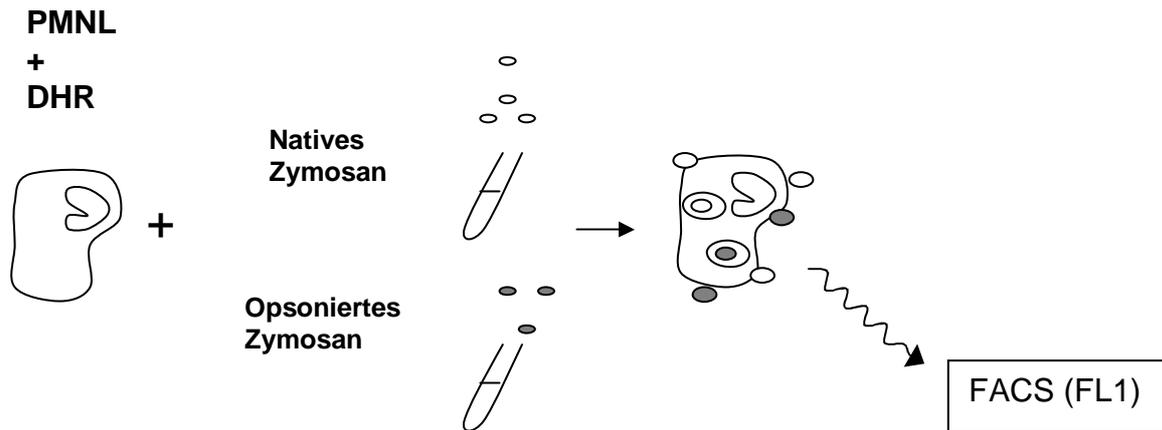


Abb.11: Monitoring der Phagozytose-assoziierten H_2O_2 -Produktion. Die intrazelluläre H_2O_2 -Produktion als Reaktion auf die Inkubation der PMNL mit nativen bzw. opsonierten, nicht markierten Zymosanpartikeln, kann durch die Verwendung von Dihydrorhodamin 123 (DHR) am FACS-Zytometer quantitativ erfasst werden. Die Intensität der Fluoreszenz des aus DHR in Anwesenheit von H_2O_2 gebildeten Rhodamin entspricht der respiratorischen Burstaktivität.

Tab.6: Inkubationsschema zum Monitoring der Phagozytose-assoziierten H_2O_2 -Produktion.

0min	10min	40min
37°C	37°C	4°C (Lagerung auf Eis)
0,5ml HBSS + 10µl leukozytenreiches Plasma + 5µl DHR	+ Zymosanpartikel nicht opsoniert	Messung am FACS-Zytometer
0,5ml HBSS + 10µl leukozytenreiches Plasma + 5µl DHR	+ Zymosanpartikel opsoniert	Messung am FACS-Zytometer

PMNL werden für 10 min in auf 37°C temperiertem HBSS mit DHR vorinkubiert und anschließend in zwei parallelen Ansätzen mit nativen bzw. opsonierten, nicht markierten Zymosanpartikeln versetzt. Nach 30 min werden alle Stoffwechselfvorgänge bis zur Messung am FACS-Zytometer durch die Lagerung auf Eis gestoppt.

3.7. Bestimmung der durch lösliche Stimuli induzierten potenziell zytotoxischen H₂O₂-Produktion

Zunächst wurden die polymorphkernigen Leukozyten bei 37°C mit Dihydrorhodamin (DHR) vorinkubiert. Zur Messung des Potenzials von Granulozyten, körpereigenes Gewebe zu schädigen, wurden die Zellen anschließend mit dem rezeptorabhängigen TNF- α und dem synthetischen Polypeptid fMLP stimuliert. Die Inkubation mit den Stimuli wurde in drei getrennten Ansätzen, für fMLP alleine, für fMLP in Kombination mit TNF- α sowie ohne jeden Stimulus durchgeführt (s. Tab.7). Durch die Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase werden Superoxidanionen vorwiegend nach extrazellulär sezerniert, die spontan zu längerlebigerem H₂O₂ dismutieren. H₂O₂ ist Zellmembran-permeabel und diffundiert in Folge nach intrazellulär zurück. Dort oxidiert es das sich in der Zelle befindliche Dihydrorhodamin zu grünfluoreszierendem Rhodamin, welches am FACS-Zytometer quantitativ erfasst werden kann (s. Abb.12). Nach der Inkubation erfolgten die Zugabe von Propidiumjodid (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland, Endkonzentration 3x10⁻⁵M) zur Gegenfärbung abgestorbener Zellen (F13) und die rasche durchflusszytometrische Messung der auf Eis gelagerten Proben (66).

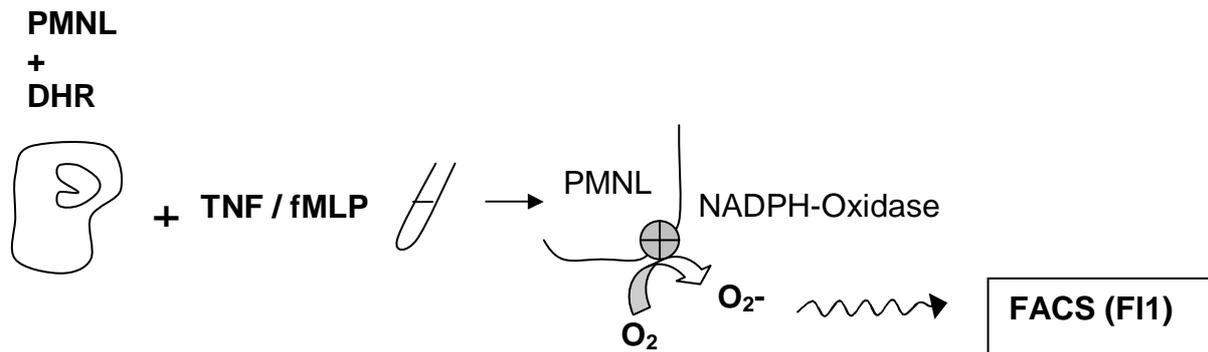


Abb.12: Monitoring spontaner und durch lösliche Stimuli induzierter H_2O_2 -Produktion.

In drei parallelen Ansätzen wird die spontane, sowie die H_2O_2 -Produktion nach Inkubation mit fMLP bzw. fMLP in Kombination mit TNF- α erfasst. Durch die direkte Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase werden Superoxidanionen zunächst vorwiegend nach extrazellulär sezerniert. Dort dismutieren sie spontan zu längerlebigerem H_2O_2 , welches daraufhin nach intrazellulär zurückdiffundiert. Das sich in der Zelle befindliche DHR wird zu Rhodamin oxigeniert, dessen Grünfluoreszenz am FACS-Zytometer quantitativ erfasst wird.

Tab.7: Inkubationsschema zum Monitoring der spontanen und durch lösliche Stimuli induzierten H_2O_2 -Produktion.

0min	5min	10min	25min
37°C	37°C	37°C	4°C
je 1ml HBSS + 10 μ l leukozytenreiches Plasma + 10 μ l DHR	ohne Stimulus		Lagerung auf Eis + 10 μ PI
	+ 10 μ l TNF- α	+ 10 μ l fMLP	
			+ 10 μ l fMLP

Die Erfassung der respiratorischen „Burstaktivität“ erfolgt neben einer Kontrolle ohne jeden Stimulus in Ansätzen mit fMLP bzw. mit fMLP in Kombination mit TNF- α . Nach 10 min Vorinkubation der PMNL mit DHR in auf 37° temperiertem HBSS erfolgt die Zugabe von TNF- α , nach weiteren 5 min die von fMLP. Nach 15 min Inkubation wird der Versuch durch die Lagerung der Proben auf Eis gestoppt. Die Gegenfärbung abgestorbener Zellen erfolgt durch die Zugabe von Propidiumjodid (PI).

3.8. Quantitative Erfassung von Immunglobulinen und der Aktivierungswege des Komplementsystems

Immunglobuline neutralisieren und agglutinieren pathogene Mikroorganismen und ihre toxischen Komponenten durch spezifische Bindung an deren Antigene und sind durch Opsonisation Vermittler mit nicht-antigenspezifischen Effektorzellen wie Phagozyten und natürlichen Killerzellen (vgl. Abschnitt 3.1). Des Weiteren aktivieren Immunglobuline der Klassen IgG und IgM durch Antigen/Antikörperkomplexe den klassischen, das Immunglobulin IgA den alternativen Weg des Komplementsystems. Die beiden Aktivierungswege münden in eine gemeinsame Endstrecke (terminaler Reaktionsweg), welcher über die Bildung von Membranporen die Zytolyse von Fremdorganismen auslöst. Die vor allem auf dem klassischen Aktivierungsweg gebildeten Komplementspaltprodukte C3b, iC3b und C4b zählen ebenfalls zu den Opsoninen und sind als Liganden der Komplementrezeptoren an der Initiierung von Adhärenz, Phagozytose und des „respiratory burst“ beteiligt (58) (vgl. Abschnitt 3.1).

Die Immunglobuline der Klassen IgG, IgA und IgM wurden routinemäßig in der klinischen Chemie des Klinikums Großhadern bestimmt.

Um die Aktivität des klassischen Aktivierungsweges des Komplementsystems zu erfassen wurde der CH100-Wert ermittelt. Er gibt Auskunft über die Fähigkeit des untersuchten Serums, mit Antikörpern vom Hasen behandelte Schaferythrozyten zu lysieren. Alle neun Komponenten (C1 bis C9) des klassischen Aktivierungsweges sind Voraussetzung für einen im Normbereich liegenden CH100-Wert (392-1019IE/ml). Ein CH100-Wert von 400 steht für eine 100%ige Lyse der opsonierten Schaferythrozyten durch das getestete Serum in einer Verdünnung von 1:400.

Analog wurde die Aktivität des alternativen Aktivierungsweges (AP100) durch die Erfassung der Lyse von nicht-opsonierten Hasen-Erythrozyten bestimmt (2,86).

3.9. Bestimmung der β 2-Integrinexpression

Blutproben wurden nach zweimaligem Waschen mit eisgekühlter HBSS-Lösung auf ihren Ausgangshämatokrit resuspendiert. Nach der Inkubation von je 20 μ l Zellsuspension mit 20 μ l Fluoreszeinisothiozyanat(FITC)-markierten, monoklonalen Antikörpern (zur Verfügung gestellt von Dr. K.-E. Arfors, Experimental Medicine Incorporation, New Jersey, Princeton, USA) wurden die Erythrozyten lysiert (FACS-Lysing Solution, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Die Messung am Durchflusszytometer wurde nach erneutem Waschen der Proben mit eisgekühlter HBSS-Lösung durchgeführt. Von einer spezifischen Bindung wurde dann ausgegangen, wenn das Fluoreszenzsignal einer markierten Zelle größer war als der Schwellenwert, unter dem die Signale von 99% aller unspezifischen Bindungen lagen. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindungen wurden PMNL nach Vorinkubation mit unmarkierten Antikörpern in 50-facher Konzentration mit markierten Antikörpern versetzt (76).

3.10. Studiendesign und Patientenkollektiv

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine deskriptive Studie mit 50 gesunden, freiwilligen Probanden und 60 Patienten anästhesiologischer und chirurgischer Intensivstationen (Stationen H2 und F0 des Klinikums Großhadern, München; Chirurgische Intensivstation [Station 65] der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Innenstadt, München). In die Studie wurden volljährige, geschäftsfähige Patienten und Probanden nach Aufklärung und Einverständniserklärung aufgenommen. War die Zustimmung zur Teilnahme an der Studie durch nicht geschäftsfähige Patienten nicht möglich, so wurde der mutmaßliche Wille bei deren Angehörigen oder gesetzlichen Vertretern eingeholt.

Die Patienten wurden nach den klinischen Kriterien der ACCP/SCCM Consensus Conference der Society of Critical Care Medicine (12) in Gruppen mit Sepsis (n=15), schwerer Sepsis (n=12) und septischem Schock (n=33) eingeteilt. Für alle Patienten wurden im Routinelabor der klinischen Chemie CRP, PCT, IL6, Laktat, Serumbilirubin und Serumkreatinin bestimmt, des Weiteren der Katecholaminbedarf erfasst und der Apache-II Score berechnet.

Kriterien, die zum Ausschluss aus der Studie führten, waren ein Alter unter 18 Jahren, ein bestehende Schwangerschaft, eine Behandlung mittels ECMO, sowie eine bestehende Intoxikation. Eine Immunsuppression infolge der Therapie mit Steroiden, PGI₂, PGE_{1/2}, Pentoxifyllin oder Theophyllin, sowie Erkrankungen aus dem leukämischen Formenkreis, finale Tumorleiden, Organtransplantationen und nachgewiesene HIV-Infektionen führten ebenfalls zum Ausschluss.

3.11. Statistik

Die deskriptive und vergleichende Statistik erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 10.5, 2003. Nach Prüfung auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test wurden nicht normal-verteilte, unverbundene Stichproben mit Kruskal-Wallis und post-hoc Mann-Whitney Test und normal-verteilte Stichproben mit ANOVA und post-hoc Students T-Test auf Unterschiede geprüft. Im Falle verbundener Stichproben wurde bei nicht vorliegender Normalverteilung ein Friedmann-Test mit post-hoc Wilcoxon Test und bei gegebener Normalverteilung ein ANOVA für Messwiederholungen mit post-hoc paired T-test durchgeführt. Bei Mehrfachvergleichen erfolgte eine Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferoni. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Die Signifikanzniveaus wurden im Sinne einer einseitigen Fragestellung angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Patientengruppen

Die Patientengruppen sowie die Gruppe der gesunden Probanden waren vergleichbar bezüglich Körpergewicht und Altersstruktur (s. Tab.8). Die Dauer der Sepsis in den Patientengruppen war ähnlich und lag bei etwa 27 Stunden (keine signifikanten Unterschiede).

Tab.8: Charakteristik gesunder Probanden und septischer Patienten

	Gesunde Probanden (n= 50)	Einfache Sepsis (I) (n= 15)	Schwere Sepsis (II) (n= 12)	Septischer Schock (III) (n=33)
Alter (Jahre)	56.8 ± 1.9	54.3 ± 5.3	61.4 ± 5.7	61.4 ± 3.3
Geschlecht (w/m)	18 / 32	9 / 6	5 / 7	12 / 21
Dauer der Sepsis (h)	-	26.6 ± 7.5	27.7 ± 3.0	26.5 ± 3.0

MW ± SEM

4.2. Klinische Parameter

Zur Evaluierung der Einteilung der Patienten nach den Kriterien der ACCP/SCCM in Gruppen wurden zusätzlich Entzündungsparameter, organspezifische Laborwerte, der Katecholaminbedarf und der APACHE-II Score erfasst (s. Tab.9)

Steigende Werte von Serumbilirubin, Serumkreatinin und Laktat, letzteres als Maß für anaeroben Stoffwechsel, zeigten sich mit zunehmender Schwere der Erkrankung. Parallel hierzu verhielten sich die Entzündungsparameter CRP, PCT und IL-6. Des Weiteren ergaben sich bei zunehmender Schwere der Sepsis ein erhöhter Katecholaminbedarf und steigende Werte des Apache-II Scores. Signifikanzniveau

($p < 0,05$) gegenüber den Werten für einfache Sepsis wurden für den Noradrenalinbedarf sowie für den Apache-II Score im Stadium der schweren Sepsis erreicht. Bei Patienten im septischen Schock galt dies sowohl für den Apache-II Score, als auch für PCT, IL6, Serumkreatinin, Laktat und den Noradrenalinbedarf. Die Werte für IL6, Laktat, den Noradrenalinbedarf sowie für den Apache-II Score der Patienten im septischen Schock waren gegenüber den Werten der Patienten mit schwerer Sepsis signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Tab.9: Klinische Parameter der Patientengruppen

	Referenzwert	Einfache Sepsis (n = 15)	Schwere Sepsis (n = 12)	Septischer Schock (n= 33)
Noradrenalin (mg/h)	-	0.2 ± 0.1	0,6 ± 0,2 **	1,7 ± 0,2** ***
Apache-II	-	7.6 ± 1.1	15.1 ± 1.5 **	26.5 ± 0,9 ** ***
CRP (mg/dl)	< 0.5	14.6 ± 1.5	18.7 ± 3.0	23.1 ± 1.9
PCT (ng/ml)	<0.6	3.7 ± 1.7	11.7 ± 9.4	13.2 ± 6.9 **
IL-6 (pg/ml)	<12.5	105.7 ± 32.1	209.9 ± 76.7	817.4 ± 512.6 ** ***
Serumkreatinin (mg/dl)	<1,1	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.6 ± 0.2**
Serumbilirubin (mg/dl)	<1,1	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.3	1.9 ± 0.3
Laktat (mmol/l)	1,2 - 2,1	0.9 ± 0.1	1.3 ± 0.3	3.0 ± 0.9** ***

MW ± SEM; Kruskal-Wallis-Test und posthoc Mann-Whitney-U-Test: ** $p < 0.05$ versus einfache Sepsis, *** $p < 0.05$ versus schwere Sepsis

4.3. Adhärenz und Phagozytose von Zymosan

Die Fähigkeit polymorphkerniger Leukozyten an nicht-opsoniertes Zymosan zu adhären war in allen Patientengruppen im Vergleich untereinander und im Vergleich zu gesunden Probanden unverändert.

Die Phagozytosefähigkeit von Granulozyten der Patienten im septischen Schock war im Vergleich zur Gruppe der gesunden Probanden und zur Gruppe der Patienten mit schwerer Sepsis signifikant reduziert ($p < 0,05$) (s. Abb.13).

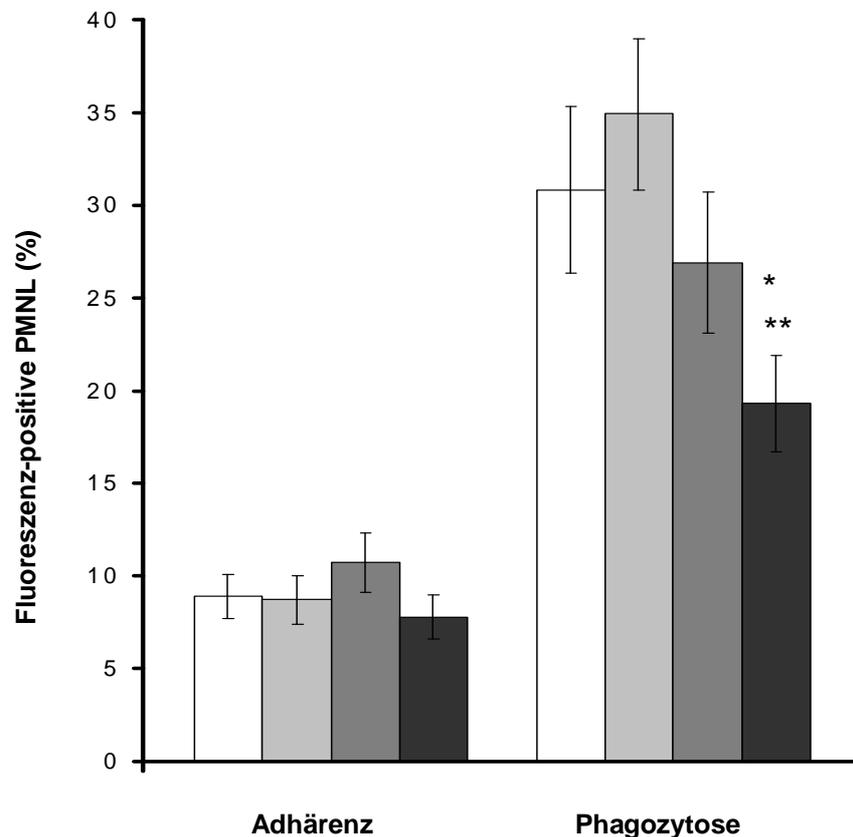


Abb.13: Adhärenz und Phagozytose von Zymosan

□ gesunde Probanden (n=51), □ einfache Sepsis (n=15), ■ schwere Sepsis (n=12), ■ septischer Schock (n=33). MW ± SEM; Kruskal-Wallis-Test und posthoc Mann-Whitney-U-Test: * $p < 0.05$ versus gesunde Probanden, ** $p < 0.05$ versus einfache Sepsis,

4.4. Adhärenz und Phagozytose von opsoniertem Zymosan

Nach Opsonisation der Zymosanpartikel stieg die Fähigkeit von PMNL zu adhären in den Gruppen der Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock im Vergleich zur Gruppe der gesunden Probanden signifikant an ($p < 0,05$) (s. Abb.14). Der Vergleich bezüglich der Fähigkeit opsoniertes Zymosan zu phagozytieren ergab für die Gruppe der Patienten mit einfacher Sepsis bzw. septischem Schock eine signifikante Zunahme gegenüber den gesunden Probanden ($p < 0,05$).

Der bei Patienten im septischen Schock zu beobachtende Verlust der Phagozytosefähigkeit von nativem Zymosan (s. Abb.13) konnte bei Verwendung von opsonierten Partikeln somit vollständig kompensiert werden (s. Abb.14).

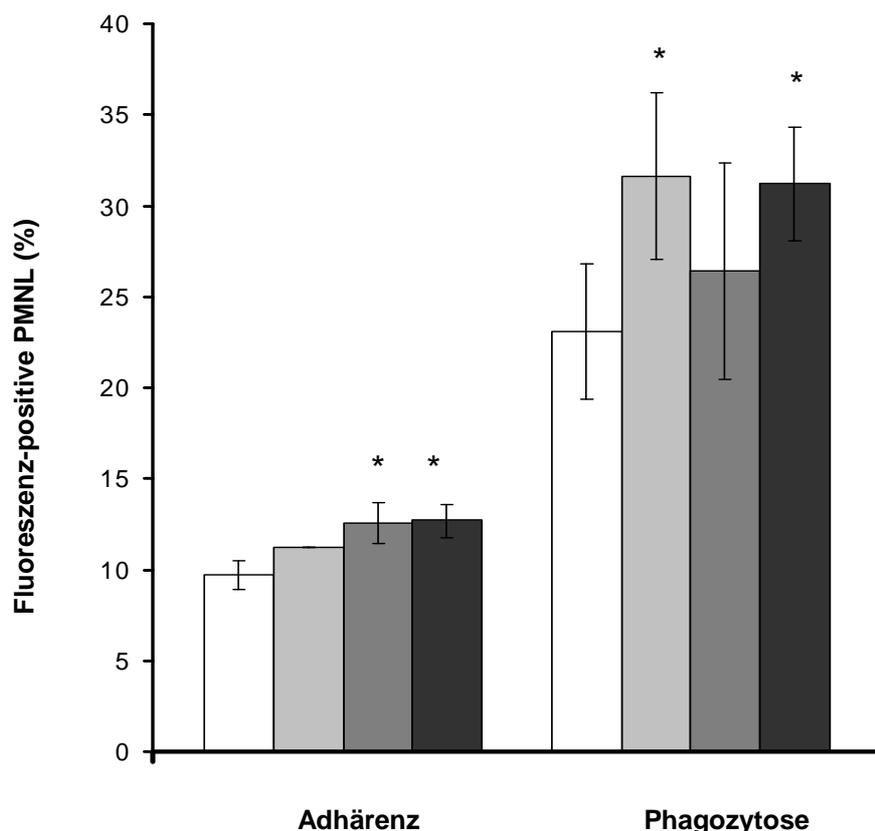


Abb.14: Adhärenz und Phagozytose von opsoniertem Zymosan

□ gesunde Probanden (n=51), □ einfache Sepsis (n=15), ■ schwere Sepsis (n=12), ■ septischer Schock (n=33). MW ± SEM; Kruskal-Wallis-Test und posthoc Mann-Whitney-U-Test: * $p < 0,05$ versus gesunde Probanden

4.5. Phagozytose-assoziierte H₂O₂-Produktion

Der Vergleich der spontanen Wasserstoffperoxidproduktion ergab zwischen den gesunden Probanden und den Patienten keinen Unterschied (s. Kontrolle Abb.15). Nach Stimulation der PMNL mit nativem Zymosan zeigte sich für Patienten mit schwerer Sepsis sowie mit septischem Schock ein signifikanter Rückgang der Phagozytose-assoziierten H₂O₂-Produktion gegenüber der Gruppe mit unkomplizierter Sepsis ($p < 0,05$). Durch die Opsonisation der Zymosanpartikel konnte die verminderte intrazelluläre H₂O₂-Produktion, die in der Testreihe mit nativem Zymosan bei Patienten im septischen Schock auftrat, kompensiert werden (keine signifikanten Unterschiede in der Testreihe mit opsoniertem Zymosan) (s. Abb.15).

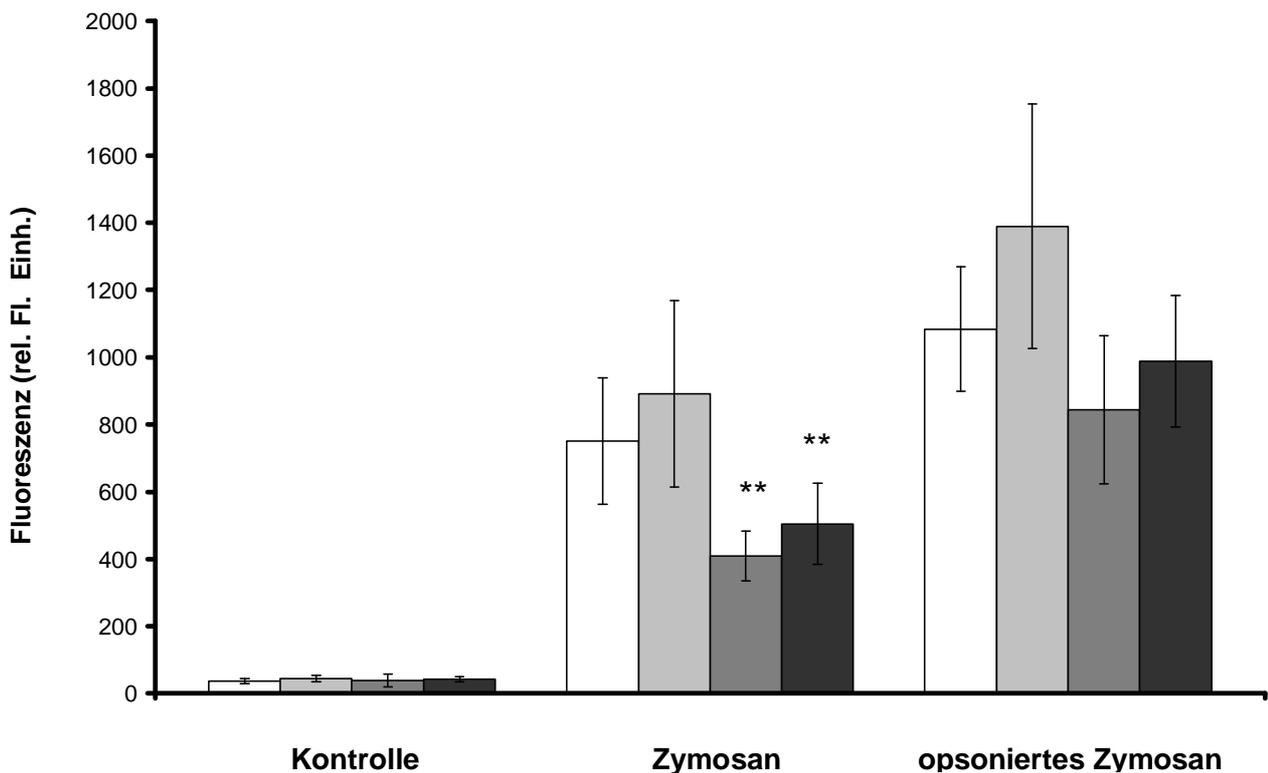


Abb.15: Phagozytose-assoziierte H₂O₂-Produktion

□ gesunde Probanden (n=51), □ einfache Sepsis (n=15), ■ schwere Sepsis (n=12), ■ septischer Schock (n=33). MW ± SEM; Kruskal-Wallis-Test und posthoc Mann-Whitney-U-Test: ** $p < 0.05$ versus einfache Sepsis

4.6. Immunglobuline und Aktivität des klassischen und alternativen Komplementsystems

Für die Aktivität des klassischen (CH100: total hemolytic complement) und des alternativen Weges des Komplementsystems (AP100: alternative pathway) im Plasma zeigten sich im Vergleich zu gesunden Probanden in den Patientengruppen mit zunehmender Schwere der Sepsis verminderte Aktivitätswerte (s. Tab.10). Signifikanzniveau konnte für CH100 im Stadium der einfachen Sepsis, bzw. des septischen Schocks erreicht werden ($p < 0,05$). Die Aktivität des alternativen Aktivierungsweges (AP100) war für Patienten im septischen Schock im Vergleich zu Gesunden und Patienten mit schwerer Sepsis signifikant reduziert ($p < 0,05$).

Tab.10: Aktivität des alternativen bzw. des klassischen Aktivierungsweges des Komplementsystems

	Referenzwert	Gesunde Probanden	Einfache Sepsis	Schwere Sepsis	Septischer Schock
CH100	(392-1019 IE/ml)	1140 ± 27	913 ± 76 *	963 ± 90	900 ± 49 *
AP100	(66-129%)	128 ± 1	121 ± 6	129 ± 3	113 ± 4 * ***

MW ± SEM; Kruskal-Wallis-Test und posthoc Mann-Whitney-U-Test: * $p < 0.05$ versus gesunde Probanden, *** $p < 0.05$ versus schwere Sepsis

Bei der quantitativen Erfassung der Immunglobuline wurden für IgG und IgM signifikant verminderte Werte in allen Patientengruppen im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt ($p < 0,05$) (s. Tab.11). Bei der Bestimmung von IgA konnten keine signifikanten Unterschiede der Patientengruppen untereinander sowie im Vergleich mit den gesunden Probanden ermittelt werden.

Tab.11: Immunglobuline gesunder Probanden und septischer Patienten

	Referenzwert	Gesunde Probanden	Einfache Sepsis	Schwere Sepsis	Septischer Schock
IgG	(7-16g/l)	9,9 ± 0,3	6,4 ± 0,9 *	7,5 ± 1,2 *	5,2 ± 0,4 *
IgA	(0,7-4g/l)	1,6 ± 0,1	2,2 ± 0,5	2,1 ± 0,3	2,1 ± 0,3
IgM	(0,4-2,3g/l)	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1 *	0,6 ± 0,1 *	0,6 ± 0,1 *

MW ± SEM; Kruskal-Wallis-Test und posthoc Mann-Whitney-U-Test: * $p < 0,05$ versus gesunde Probanden

4.7. Numerische Expression von $\beta 2$ -Integrinen auf PMNL

Gegenüber gesunden Probanden war die Expression von $\beta 2$ -Integrinen bei Patienten mit Sepsis signifikant erhöht und zeigte eine mit dem Schweregrad der Sepsis ansteigende Tendenz (s.Tab.12).

Tab.12: Expression von $\beta 2$ -Integrinen

	Gesunde Probanden	Einfache Sepsis	Schwere Sepsis	Septischer Schock
$\beta 2$-Integrine (rel. Fl. Einh.)	28,2 ± 2,9	42,8 ± 2,8 *	49,8 ± 5,5 *	53,7 ± 5,8 *

MW ± SEM; Kruskal-Wallis-Test und posthoc Mann-Whitney-U-Test: * $p < 0,05$ versus gesunde Probanden

4.8. H₂O₂-Produktion nach Aktivierung von PMNL mit löslichen Stimuli

In der Kontrollreihe ohne Stimulation der Zellen ergab sich parallel zur zunehmenden Schwere der Sepsis eine Steigerung der spontanen H₂O₂-Produktion der PMNL (s. Kontrolle Abb.16). Die Werte für Patienten im septischen Schock waren gegenüber der Gruppe der Gesunden sowie der Gruppe der Patienten mit einfacher Sepsis signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Die Fähigkeit von PMNL Wasserstoffperoxid in Reaktion auf lösliche Entzündungsmediatoren zu produzieren, zeigte analog zur Kontrollreihe mit zunehmender Schwere der Erkrankung steigende Messwerte (s. Abb.16). Nach Stimulation mit fMLP alleine war die H₂O₂-Produktion für alle Patientengruppen im Vergleich mit gesunden Probanden signifikant angestiegen ($p < 0,05$). Die Gruppe der Patienten im septischen Schock erreichte zudem Signifikanzniveau gegenüber den Patienten mit einfacher Sepsis ($p < 0,05$).

Ausgelöst durch die Vorinkubation der Granulozyten mit TNF- α konnte in allen Gruppen nach Stimulation durch fMLP eine Zunahme der H₂O₂-Produktion beobachtet werden (s. Abb.16). Signifikanzniveau wurde nach kombinierter TNF- α /fMLP-Stimulation für alle Patientengruppen gegenüber gesunden Probanden erreicht ($p < 0,05$). Die Werte der Patienten im septischen Schock waren im Vergleich zu den Werten der Patienten mit einfacher Sepsis signifikant erhöht ($p < 0,05$).

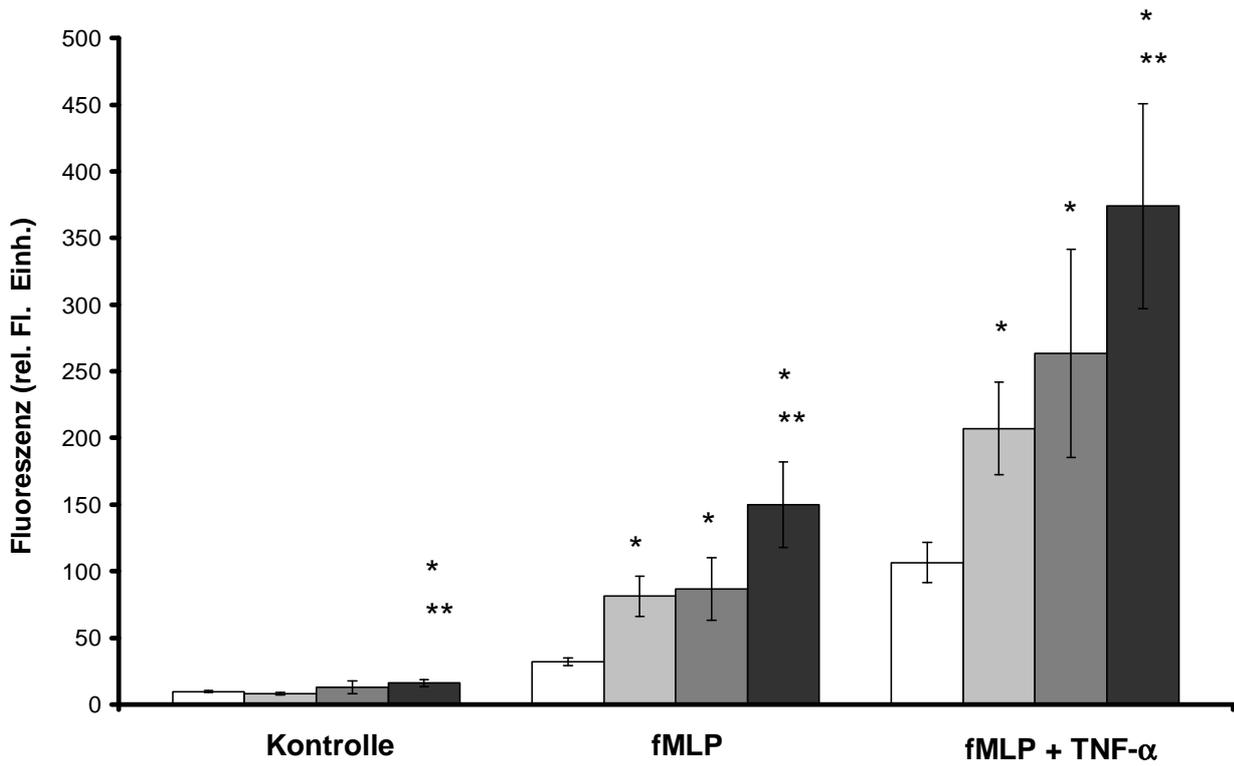


Abb. 16: Spontane, fMLP und TNF- α /fMLP stimulierte H₂O₂-Produktion

□ gesunde Probanden (n=51), □ einfache Sepsis (n=15), □ schwere Sepsis (n=12), □ septischer Schock (n=33). MW \pm SEM; Kruskal-Wallis-Test und posthoc Mann-Whitney-U-Test: * p<0.05 versus gesunde Probanden, **p<0.05 versus einfache Sepsis

5. Diskussion

Seit der ACCP/SCCM Consensus Conference wird das Krankheitsbild der Sepsis als eine systemische inflammatorische Antwort des Organismus auf eine Infektion verstanden. In der Pathogenese dieser generalisierten Entzündungsreaktion spielen polymorphkernige Leukozyten als Hauptvertreter der unspezifischen Abwehr durch ihre ambivalente Reaktion bestehend aus einer mikrobiziden als auch einer potenziell gewebeschädigenden Wirkkomponente eine zentrale Rolle. Die mikrobiziden Partialfunktionen umfassen das Auffinden und die Adhärenz an Fremdorganismen sowie deren Phagozytose und Abtöten im Zellinneren durch ein Arsenal bakterizider Substanzen.

Unter pathologischen Bedingungen, wie es im Rahmen einer Sepsis der Fall ist, besitzen Granulozyten nach überschießender Stimulation das Potenzial körpereigenes Gewebe zu schädigen. Dieser zytotoxische Effekt beruht auf einer extrazellulären Freisetzung von Sauerstoffradikalen und ist durch eine Beeinträchtigung der Mikrozirkulation an der Genese des Multiorganversagens beteiligt.

Aus dieser in der Pathogenese der Sepsis ambivalenten Stellung von PMNL zwischen einer einerseits physiologischen Mikrobizidität und einer andererseits für den Organismus potenziell schädlichen Zytotoxizität leiten sich die Fragestellungen dieser Arbeit ab.

1. Wie verhalten sich im Vergleich zu den Granulozyten von gesunden Probanden die mikrobiziden Funktionen von PMNL bei Patienten mit Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock?

2. Kommt es im Vergleich zu den PMNL von gesunden Probanden zu einer Steigerung der potenziell gewebeschädigenden, zytotoxischen Funktionen von Granulozyten in Abhängigkeit des Schweregrades der Sepsis ?

Um diese Fragen zu beantworten wurden unterschiedliche Tests für die Bestimmung mikrobizider sowie zytotoxischer Partialfunktionen von PMNL entwickelt, die in ihrer Summe ein funktionelles Immunmonitoring von PMNL ermöglichen. Mit der Analyse der vom Komplementrezeptor Typ III sowie der vom Dectin-1-TLR2/6 Komplex vermittelten Reaktionen sollten zwei zentrale Schaltstellen für die suffiziente Funktion polymorphkernigen Leukozyten bei der Abwehr von Infektionen auf mögliche Defekte hin untersucht werden. Als Messmethode wurde die Durchflusszytometrie gewählt, die bereits seit längerem Bestandteil der klinischen Zelldiagnostik ist (50,65,67).

5.1. Charakterisierung der Patientenkollektive

Die Identifizierung eines SIRS nach den Kriterien der ACCP/SCCM Consensus Conference erfolgte anhand der klinischen Parameter Atemfrequenz (>20 Atemzüge/min oder $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg), Herzfrequenz (>90 /min), Temperatur ($>38^\circ$ oder $<36^\circ\text{C}$) und Leukozytenzahl (>12.000 / mm^3 oder $<4000/\text{mm}^3$, oder $>10\%$ unreife Zellformen).

Die zur Evaluation der Einteilung der Patienten bestimmten humoralen Entzündungsparameter CRP, IL6 und PCT spiegeln eine mit zunehmender Schwere der Erkrankung gesteigerte Inflammation wider. Im Allgemeinen zeichnet sich das CRP mit einer hohen Sensitivität aus, jedoch kann wegen seiner geringen Spezifität sowie seinem verzögerten An- und Abfluten keine Vorhersage hinsichtlich Prognose und Überlebensrate getroffen werden (20). Im Gegensatz hierzu verfügt IL6 bei systemischen Infektionen über einen schnellen Anstieg, eine kurze Halbwertszeit und

eine gleichsam hohe Sensitivität und Spezifität. Dies qualifiziert diesen Parameter zur Früherkennung wie zur Beurteilung der Schwere einer Sepsis und erlaubt bei Korrelation zur Überlebensrate Aussagen zur Prognose einer Erkrankung (26,63). PCT ist hinsichtlich seiner Aussagekraft mit IL6 vergleichbar. Da ein Anstieg von PCT bei lokalen Prozessen ausbleibt, sind erhöhte Werte nahezu beweisend für das Vorliegen einer systemischen Infektion (26,60).

Die im Verlauf einer Sepsis auftretenden Organdysfunktionen bis hin zum Organversagen fanden ihr Korrelat in steigenden Werten für Serumkreatinin und in der Tendenz erhöhten Werten für Serumbilirubin.

Der bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock gesteigerte Katecholaminbedarf spiegelt die zunehmende Kreislaufinsuffizienz bis hin zum septischen Schock wieder. Analog hierzu verhält sich Laktat, welches vor allem in der Gruppe der Patienten mit septischen Schock einen deutlichen Anstieg zeigte, als Marker für anaerobe Stoffwechselfvorgänge. Schließlich entsprachen die aus unterschiedlichen klinischen Parametern und dem individuellen Risikoprofil ermittelten Werte des Apache-II Scores, der über eine hohe Aussagekraft bezüglich Schwere und Prognose einer Sepsis verfügt (23,43,44), der Einteilung der Patienten in Gruppen nach den Kriterien der ACCP/SCCM Consensus Conference.

Die von uns gewählte ACCP/SCCM Klassifikation des Schweregrades der Sepsis zeigt somit gute Übereinstimmung mit klinischen Größen einer Inflammation bzw. Störungen multipler Organfunktionen.

5.2. Mikrobizide Partialfunktionen zirkulierender PMNL bei Sepsis

Unterschiedliche Funktionen polymorphkerniger Leukozyten, wie Adhärenz und Phagozytose von Mikroorganismen und deren Abtötung durch Sauerstoffradikale werden durch eine Vielzahl von Rezeptoren vermittelt (vgl. Abschnitt 3.1.). Insbesondere der Komplementrezeptor Typ III spielt mit seinen beiden voneinander unabhängigen Bindungsregionen eine zentrale Rolle bei der Initiierung unterschiedlicher mikrobizider Partialfunktionen des PMNL. Die auf der α -Kette lokalisierte I-Domäne des Komplementrezeptors Typ III adhärert unter der Vermittlung des Opsonins C3bi an Fremdorganismen ohne deren Phagozytose durch den Granulozyten auszulösen (7,24). Die komplementunabhängige Lektinbindungsstelle des CR3, die funktionell durch Xia et al charakterisiert wurde, löst dagegen durch direkte Interaktion mit komplexen Zuckermolekülen, die auf der Oberfläche von Mikroorganismen lokalisiert sind, deren Phagozytose und Abtötung durch Sauerstoffradikale aus (91,93).

Ross und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Zymosan reich an β -Glukanen ist, welche spezifische Liganden der Lektinbindungsstelle sind (80,82).

In jüngerer Zeit wurde von Brown und Mitarbeitern mit dem Dectin-1-TLR2/6 Komplex ein weiterer β -Glukanrezeptor auf PMNL identifiziert und in seiner Funktion charakterisiert (14). Der Dectin-1-Rezeptor ist analog zur Lektinbindungsstelle des CR 3 in der Lage durch Bindung an β -Glukanstrukturen auf der Oberfläche von Mikroorganismen deren Phagozytose und die daran assoziierte intrazelluläre H_2O_2 -Produktion einzuleiten. Die Ausschüttung der Zytokine TNF- α und IL12, welche die vom Dectin-1 -Rezeptor getriggerten mikrobiziden Partialfunktionen weiter verstärken, ist an die Interaktion mit den Toll-like Rezeptoren 2/6 sowie CD14 gekoppelt (29).

Der Arbeitsgruppe um Herre gelang der Nachweis einer spezifischen Bindung des Dectin-1-Rezeptors an die an β -Glukanen reiche Oberflächenstruktur von Zymosan (34).

In unserem Testsystem war durch die Verwendung von Zymosan somit eine Beurteilung der durch die Lektinbindungsstelle des CR3 und/oder der durch den Dectin-1-TLR2/6 Komplex ausgelösten Partialfunktionen möglich.

Bei der Inkubation von Granulozyten mit nativem Zymosan ergab sich für Patienten im septischen Schock im Vergleich zu Patienten mit unkomplizierter Sepsis sowie gesunden Probanden eine signifikant verminderte Phagozytosefähigkeit (vgl. Abschnitt 4.3). Gleichzeitig war die Phagozytose-assoziierte Sauerstoffradikalproduktion bei schwerer Sepsis und im septischen Schock gegenüber einfacher Sepsis signifikant verringert (vgl. Abschnitt 4.5.). Da es sich hierbei um zwei Funktionen handelt, welche durch die Lektinbindungsstelle auf der CD11b-Kette des CR3 als auch durch den Dectin-1-TLR2/6 Rezeptorkomplex vermittelt werden, ist folglich ein funktioneller Defekt dieser Regionen wahrscheinlich. Die gleichzeitig unveränderte Adhäsion an natives Zymosan für die Patientengruppen im Vergleich zu Gesunden lässt bei normaler Bindung auf eine gestörte bzw. beeinträchtigte Signaltransduktion des CR3 und/oder des Dectin-1-TLR2/6 Rezeptorkomplexes schließen (vgl. Abschnitt 4.3).

Der durch die Verwendung von nicht opsoniertem Zymosan aufgezeigte funktionelle Defekt der Lektinbindungsstelle des Komplementrezeptors Typ III bzw. des Dectin-1-TLR2/6 Komplexes bezüglich Phagozytose und der daran assoziierten Sauerstoffradikalproduktion war durch Opsonisation der Partikel komplett reversibel (vgl. Abschnitt 4.4).

Unter Opsonisation versteht man die Beladung der Oberfläche von Mikroorganismen durch humorale Faktoren, wie beispielsweise die Immunglobuline

IgG und IgM sowie die Komplementkomponenten C4b und C3b. Durch die Expression von Fc- und C3b-Rezeptoren auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen und Granulozyten resultiert, vermittelt durch die Opsonisation mit Immunglobulinen und Komplementfaktoren, eine gesteigerte Adhäsion und Phagozytose von Fremdorganismen. Um diese wesentlichen Schritte in der Abwehr extrazellulärer Mikroorganismen nachzuvollziehen wurden Zymosanpartikel mit autologem Plasma opsoniert. Nach der Inkubation der Granulozyten konnte in der Gruppe der Patienten mit schwerer Sepsis als auch mit septischem Schock ein signifikant erhöhter Prozentsatz für die Adhärenz im Vergleich mit gesunden Probanden ermittelt werden. Für die Phagozytose von opsoniertem Zymosan ergab sich ein signifikanter Anstieg für Patienten mit einfacher Sepsis bzw. septischem Schock gegenüber der Gruppe der Gesunden (vgl. Abschnitt 4.4). Bei der Phagozytose-assoziierten H_2O_2 -Produktion ergab sich beim Vergleich der Patientengruppen untereinander, sowie beim Vergleich mit der Gruppe der gesunden Probanden kein Unterschied (vgl. Abschnitt 4.5).

Obwohl durch Opsonisation die mit nativem Zymosan aufgezeigten funktionellen Defekte der Granulozyten voll kompensiert wurden, ergab die quantitative Erfassung von Immunglobulinen für alle Krankheitsstadien einen signifikanten Abfall von IgG und IgM gegenüber gesunden Probanden. Gleichzeitig war die Aktivität des klassischen und des alternativen Aktivierungsweges im septischen Schock signifikant vermindert (vgl. Abschnitt 4.6). Da IgM und IgG-Subklassen sowie bei der Aktivierung des Komplementsystems entstehende Komplementspaltprodukte wie C4b und C3b aktive Opsonine sind, bedeuten diese Messergebnisse einen Verlust an Opsonisationskapazität.

Zusammenfassend kann damit postuliert werden, dass Granulozyten mit zunehmender Schwere eines septischen Krankheitsbildes einen zellulären Defekt

entwickeln, der durch einen Funktionsverlust der Lektinbindungsstelle des Komplementrezeptors Typ III und/oder des Dectin-1-TLR2/6 Komplexes charakterisiert ist. Gleichzeitig kommt es durch den Verbrauch von Immunglobulinen und eine verringerte Komplementaktivität zu einem Verlust der Oponisationskapazität des Plasmas. Trotz dieser Einschränkung vermag die Oponisation mit autologem Plasma die Beeinträchtigung der Phagozytosefähigkeit und der assoziierten Sauerstoffradikalproduktion vollständig zu kompensieren. Offenbar ist der zirkulierende Granulozyt dazu befähigt sogar unter suboptimaler Oponisation eine adäquate Zellantwort bezüglich Phagozytose und daran assoziierter Sauerstoffradikalproduktion zu generieren und so Defekte im Bereich der Bindungsstellen für Zymosan auszugleichen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich des von uns postulierten Defekts der Lektinbindungsstelle des Komplementrezeptors Typ III und/oder des Dectin-1-TLR2/6 Komplexes stehen im Einklang mit unterschiedlichen Studien von Wenisch und Mitarbeitern. Wenisch et al konnte bei Patienten mit gram-negativer Sepsis analog zu unseren Ergebnissen eine Reduktion der Phagozytoserate von nicht opsonierten E. coli sowie der assoziierten Sauerstoffradikalproduktion von zirkulierenden Granulozyten im Vergleich mit gesunden Probanden feststellen (87,88,89). Ein in vitro Austausch von Patientenplasma gegen Plasma gesunder Spender resultierte in einer Erholung der Zellfunktionen für PMNL septischer Patienten. Bei PMNL gesunder Probanden ergab sich eine vorübergehende Einschränkung von Phagozytose und der assoziierten Sauerstoffradikalproduktion (87). Die in vitro Präparation der verwendeten E. coli Bakterien mit polyklonalen Immunglobulinen ergab in einer zweiten Untersuchung eine signifikante Verbesserung der beobachteten mikrobiziden Partialfunktionen (89). Diese Ergebnisse erlauben den Schluss, dass die in unserer Arbeit festgestellte verringerte Aktivität des

Komplementsystems sowie die verringerte Konzentration von Immunglobulinen den Defekt der Bindungsstelle für Zymosan zwar maskieren kann, aber unter optimalen Opsonisationsbedingungen eine weit bessere mikrobizide Funktion von PMNL zu erwarten gewesen wäre.

Diese Annahme wird durch die Ergebnisse einer Arbeit von Polk et al gestützt. In einer Studie an polytraumatisierten Patienten ergab sich eine initial signifikant verringerte Opsonisationskapazität bei Verläufen mit letaler Sepsis im Vergleich mit überlebenden Patienten der gleichen Gruppe (59).

In einer anderen Studie an Patienten mit rezidivierenden Harnwegsinfekten unter Verwendung von opsonierten E. coli zeigte sich eine reduzierte Phagozytoserate bzw. Phagozytose-assoziierte H₂O₂-Produktion. Zusätzlich konnte im Vergleich mit gesunden Probanden eine signifikant reduzierte CD16-Expression auf der Zelloberfläche zirkulierender PMNL nachgewiesen werden (21). Da die Opsonisationskapazität des Patientenplasmas nicht Gegenstand dieser Untersuchung war, lässt sich nur mutmaßen welchen Anteil sie neben der verringerten Expression von CD16 an der beobachteten Funktionsstörung zirkulierender PMNL hat.

Da in unserer Studie nur zirkulierende PMNL erfasst wurden, bleibt die Frage offen, ob aus der Blutbahn emigrierte Granulozyten am Ort einer Infektion nicht noch zusätzliche funktionelle Defekte aufweisen. Holzer und Mitarbeiter konnten für Patienten mit Peritonitis eine reduzierte Phagozytoserate für zirkulierende als auch für in die Bauchhöhle emigrierte PMNL im Vergleich zu Patienten mit abdominalchirurgischen Eingriffen ohne Peritonitis zeigen (s. Tab.13). Zusätzlich trat in der Patientengruppe mit Peritonitis ein weiterer Verlust der Phagozytosefähigkeit von aus Peritoneallavage isolierten Granulozyten im Vergleich zu in der Blutbahn zirkulierenden Granulozyten auf. Als Ursache wurde bei optimaler Opsonisation von

experimentell eingesetzten *E. coli* Bakterien eine verminderte Expression von CD16 postuliert (36). In einer weiteren klinischen Studie derselben Arbeitsgruppe konnte zusätzlich zu den schon beschriebenen funktionalen Defekten eine reduzierte Phagozytose-assoziierte Sauerstoffradikalproduktion für in die Bauchhöhle emigrierte PMNL bei Patienten mit Peritonitis im septischen Schock beschrieben werden (38). Als Ursache könnte der trotz optimaler Opsonisation unter diesen Bedingungen demaskierte Defekt der Lektinbindungsstelle des CR3 und/oder des Dectin-1-TLR2/6 Komplexes diskutiert werden.

Die vorangegangenen Überlegungen bezüglich zellulärer Defekte des PMNL in lokalen Prozessen gelten in gleicher Weise für die Opsonisationskapazität. So kann bei dem von uns beobachteten Verbrauch humoraler Faktoren im peripheren Blut auf nicht ausreichende Konzentrationen in Infektionsherden geschlossen werden. Gestützt wird diese Annahme durch Untersuchungen, die in purulenten Exudaten aus Pleuraempyemen eine verminderte Aktivität für den klassischen als auch für den alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems sowie reduzierte Spiegel für IgG und die Komplementkomponenten C3, C4 und Faktor B ergaben (51,71,84).

Billing et al postulierten einen ausgeprägten Verlust der Opsonisationskapazität im Peritonealraum bei Patienten mit Peritonitis. Durch die lokale Applikation von Spenderserum in den Bauchraum konnte in diesem Patientenkollektiv eine deutlich erhöhte Überlebensrate erzielt werden (11). Gestützt wird diese Hypothese durch eine weitere Untersuchung an Patienten mit Peritonitis, welche die Opsonisationskapazität infizierter Intraabdominalexudate betrachtete. In einem Phagozytosemodell mit *E. coli* ergab sich eine reduzierte Fähigkeit zur Abtötung der Mikroorganismen nach Opsonisation mit infizierten Intraabdominalexudaten, welche durch in vitro Opsonisation mit dem Serum Gesunder komplett reversibel war (48).

Die Bedeutung einer adäquaten Opsonisation von Fremdorganismen insbesondere durch C3 zeigt sich bei angeborenen oder erworbenen C3-Defekten, die mit schwersten bakteriellen Infektionen assoziiert sind (71). Ein C4-Defekt manifestiert sich dagegen in einer verminderten Elimination von Immunkomplexen und ist mit Autoimmunerkrankungen wie Glomerulonephritis und Lupus erythematodes vergesellschaftet.

Die Frage, ob eine verminderte Komplementaktivität gleichzeitig einen Verlust von Anaphylatoxinen (C3a, C4a, C5a) bedeutet, der unter Umständen mit einer Einschränkung der Diapedese sowie der Chemotaxis von PMNL einhergeht, war

Tab.13: Veränderungen mikrobizider Teilfunktionen von PMNL bei Infektion und Sepsis. Vergleich zirkulierender PMNL (cPMNL) mit emigrierten PMNL (ePMNL)

		Phagozytose		Phagozytose- assoz. H ₂ O ₂ - Produktion		
		cPMNL	ePMNL	cPMNL	ePMNL	
Mensch	Holzer(36,38)	↓	↓		↓	schwere Peritonitis
	Lam (48)				↓	
	Wehnisch (87,88,89)	↓		↓		Sepsis vs. Gesunde
	Condron (21)	↓		↓		rezidivierende Harnwegsinfekte
Tiermodell	Griswold (30)	↔	↓			Toxinämie
	Seekamp (70)			↓		
	Spitzer (73)	↑	↑↑	↑	↑	
	Thiel (77)	↑		↓		
	Kahn (42)	↓	↑			fäkale Peritonitis
	Freischlag (27)	↔	↓			Peritonitis nach Ligatur

nicht Gegenstand unsere Studie und kann somit nicht beantwortet werden. Es liegen jedoch Arbeiten vor, die für Patienten mit Sepsis eine verringerte Chemotaxis von Granulozyten beschreiben (19,74). Gleiches gilt für die komplementvermittelte Zytolyse (C5b-9) bestimmter Mikroorganismen und die Elimination von zirkulierenden Immunkomplexen (68).

Der Großteil der im Tiermodell gewonnenen Daten zeige im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Untersuchungen am Menschen eine gesteigerte Phagozytosefähigkeit für zirkulierende als auch für in lokale Prozesse emigrierte PMNL. Die letztlich für die intrazelluläre Abtötung von Mikroorganismen entscheidende Phagozytose-assoziierte H_2O_2 -Produktion war jedoch in fast allen Studien reduziert. Als Ursache für die von den Untersuchungen am Menschen abweichenden Ergebnisse ist der im Tierversuch kürzere Krankheitsverlauf, der durch die Induktion einer Toxinämie bzw. Bakteriämie bedingt ist, zu diskutieren.

Die aufgeführten Beispiele zeigen, dass PMNL am Ort einer Infektion weiteren funktionellen Einschränkungen unterliegen, die den Defekt des CR3 und/oder des Dectin-1-TLR2/6 Komplexes möglicherweise verstärken. Wahrscheinlich ist die zusätzlich verringerte Konzentration von Oponinen am Infektionsort zu einer Kompensation der unterschiedlichen Defekte nicht mehr in der Lage, und es resultieren in ihrer Funktion insuffiziente PMNL. Der Gegenstand zukünftiger Studien sollte somit die umfassende Funktionsprüfung von PMNL aus lokalen Infektionsherden wie Abszessen, Peritoneallavagen bei Peritonitis oder Bronchiallavagen im Rahmen eines ARDS sein. Gleichzeitig sollte die Oponisationskapazität des Blutes einem Vergleich mit der in lokal begrenzten Infektionsherden unterzogen werden.

5.3. Potenziell gewebeschädigende, zytotoxische Partialfunktionen von PMNL

Im Gegensatz zum bereits beschriebenen Verlust mikrobizider Partialfunktionen kann mit zunehmender Schwere einer Sepsis eine Steigerung potenziell zytotoxischer PMNL-Funktionen beobachtet werden. Die Expression von β 2-Integrinen auf der Oberfläche von PMNL wurde indirekt über die quantitative Erfassung von CD18 mittels spezifischer Antikörper gemessen. Der Komplementrezeptor Typ 3 reagiert als einziges β 2-Integrin auf eine Stimulation mit einer numerischen Hochregulation, während die übrigen Vertreter der Integrine eine funktionelle Aktivitätssteigerung erfahren. Somit ist eine hohe Korrelation der Konzentrationen von CD11b/CD18 und CD18 gewährleistet (79). Die von uns beobachtete numerische Hochregulation von β 2-Integrinen auf der Oberfläche von Granulozyten ist Ausdruck einer gesteigerten Aktivierung der Zellen im Rahmen einer Inflammation (25,78). Durch die Interaktion von CD11b/CD18 (CR3) mit ihren Liganden wie dem ICAM1-Rezeptor an Endothelien der Endstrombahn erhalten Granulozyten im Rahmen der Diapedese einen weiteren Impuls zur Freisetzung gewebeschädigender Substanzen (17,22).

Des Weiteren konnte mit zunehmender Schwere einer Sepsis eine gesteigerte Produktion von H_2O_2 in Reaktion auf humorale Stimuli beobachtet werden. Das verwendete chemotaktische Tripeptid fMLP führte mit zunehmendem Schweregrad der Sepsis zu steigenden Werten für die Bildung von Wasserstoffperoxid. Dieses entsteht nach direkter Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase durch humorale Stimuli infolge Dismutation der primär gebildeten Superoxidanionen, welche in weiteren Reaktionen zu einem breiten Spektrum an reaktiven Sauerstoffspezies wie dem Hydroxylradikal ($\bullet OH$) reagieren. Letztere sind Hauptverursacher von Schäden an körpereigenen Strukturen (6,9,22). Durch die Vorinkubation der Granulozyten mit $TNF-\alpha$ kann ein Priming-Effekt ausgelöst werden, der das zytotoxische Potenzial verdeutlicht, welches im Verlauf einer Sepsis

durch das Zusammenwirken unterschiedlichster humoraler Aktivatoren getriggert werden kann (4). Tabelle 14 zeigt, dass sowohl klinische als auch tierexperimentelle Untersuchungen vorwiegend über eine Steigerung potenziell zur Gewebeschädigung beitragender Granulozytenfunktionen berichten.

Tab.14: Veränderungen zytotoxischer Partialfunktionen von PMNL. Vergleich zirkulierender PMNL (cPMNL) mit emigrierten PMNL (ePMNL) bei Sepsis und Infektionen.

		CD11b/CD18		H ₂ O ₂		
		cPMNL	ePMNL	cPMNL	ePMNL	
Mensch	Holzer (37)			↑	↔	Schwere Peritonitis
	Holzer (36)	↑	↑↑			
	Holzer (38)			↑		
	Muller (55)	↑				Sepsis vs. Gesunde
	Martins (53)			↑		
	Chisti (19)	↑				
	Thiel (78)	↑				
	Russwurm (69)	↑				Sepsis vs. ICU ohne Sepsis
	Wagner (83)	↑	↔			Osteomyelitis vs. Gesunde
	Condron(21)	↑		↑		rezidivierende Harnwegsinfekte
Tiermodell	Holzer (39)	↑				Toxinämie
	Klut (45)	↑		↑		
	Spitzer (73)	↑	↑↑	↑	↑	
	Thiel (77)	↑		↑		
	Mori (54)	↑	↑↑	↑	↓	Peritonitis
	Guo (31)	↑				
	Freischlag (27)			↔	↔	

5.4. Die Granulozytendysfunktion bei Sepsis

Die vorliegende Studie beschreibt eine von der Schwere einer Sepsis abhängige Dysfunktion polymorphkerniger Granulozyten, die durch eine Einschränkung mikrobizider Partialfunktionen bei gleichzeitiger Steigerung zytotoxischer Teilfunktionen charakterisiert ist.

Die durch den Verlust an mikrobiziden Teilfunktionen von PMNL ineffektive unspezifische Abwehr birgt die Gefahr einer inadäquaten Bekämpfung systemisch auftretender Erreger im Rahmen einer Sepsis, und könnte ursächlich für die Persistenz von Fremdorganismen in lokalen Prozessen sein. Des Weiteren könnte eine nicht funktionsfähige unspezifische Abwehr der Wegbereiter erneuter Infektionen hospitalisierter Patienten sein. Insbesondere der Funktionsverlust des Komplementrezeptors Typ III und des Dectin-1-TLR2/6 Komplexes, welcher in diesem Zusammenhang noch nicht beschrieben wurde, könnte in Kombination mit anderen Defekten, wie zum Beispiel einer verminderten Expression von CD16 (21,36), ursächlich für die bei Sepsis auftretenden Dysfunktionen sein.

Darüber hinaus gilt die mit der Schwere einer Sepsis zunehmende Freisetzung potenziell zytotoxischer Substanzen, bevorzugt im Bereich der Endstrombahn, als ursächlich für das Entstehen von Mikrozirkulationsstörungen und konsekutiven Organdysfunktionen bis hin zum Multiorganversagen. Die Kombination aus einer ineffektiven unspezifischen Abwehr und Organdysfunktionen bzw. Multiorganversagen, sind die zentralen Aspekte der Pathophysiologie einer Sepsis und könnten durch die „septische Granulozytendysfunktion“ mitverursacht sein.

Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit denen einer Vielzahl anderer Untersuchungen (s. hierzu Tab. 13 und 14), welche Granulozytenfunktionen am Menschen u.a. bei Sepsis, septischem Schock und schwerer Peritonitis sowie im Tiermodell bei Endotoxinämie und Bakteriämie beschrieben haben. Allerdings beschränkt sich der Grossteil dieser Studien auf die Untersuchung nur jeweils eines der beiden Aspekte der Granulozytendysfunktion, dem Verlust mikrobizider Partialfunktionen auf der einen oder der Zunahme zytotoxischer Funktionen auf der anderen Seite. Lediglich die Arbeitsgruppen von Condron (21) und Holzer (36,38),

bezogen beide Aspekte in ihre klinische Studien ein und kamen zu Ergebnissen, die sich mit denen der vorliegenden Studie decken.

Zudem waren in keiner der bisher publizierten Arbeiten die Veränderungen von Granulozytenfunktionen in Abhängigkeit von der Schwere einer Sepsis Gegenstand der Untersuchungen. Das von uns neu etablierte Immunmonitoring, welches die stadienabhängige Untersuchung von mikrobiziden Partialfunktionen auf der einen und von zytotoxischen Partialfunktionen auf der anderen Seite beinhaltet, wird zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie der Sepsis beitragen. Zudem könnte es ein wichtiger Beitrag bei der Klassifikation dieses überaus heterogenen Kollektives septischer Patienten sein.

5.5. Methodenkritik

Um die tatsächliche Mikrobizidität von PMNL ex vivo zu erfassen müssten Testansätze mit lebenden Bakterien gewählt werden. Dabei ließe sich die tatsächliche Fähigkeit von PMNL Keime abzutöten als die Differenz zwischen der initial hinzugefügten und der am Ende der Co-Inkubation bestimmten Bakterienzahl ermitteln (48). Die tatsächliche Fähigkeit von PMNL körpereigenes Gewebe zu schädigen müsste durch in vivo Untersuchungen der Mikrozirkulation erfolgen (18). Beides war für die Durchführung der vorliegenden Arbeit nicht praktikabel und zu aufwendig. Stattdessen bedienen wir uns der in der klinischen Zelldiagnostik etablierten Durchflusszytometrie, mittels der eine differenzierte Analyse von Partialfunktionen der mikrobiziden bzw. zytotoxischen Zellantwort gelingt (65,66,67).

Eine der am weitesten verbreiteten Methoden zur quantitativen Erfassung von Phagozytose und Adhärenz ist die Verwendung von Fluoresceinisocyanat (FITC)-markierten Bakterien, Pilzen oder Zymosanpartikeln (50). Die Verwendung von FITC-

markierten Zymosanpartikeln erfolgte um die Lektinbindungsstelle des Komplementrezeptors Typ III und den Dectin-1-TLR2/6 Komplex einer isolierten Beurteilung zugänglich zu machen. Die funktionelle Charakterisierung sowie der Nachweis der Spezifität der Interaktion von Zymosan und der Lektinbindungsstelle wurden von der Arbeitsgruppe um GD Ross erbracht (80,81,92,93). Der Dectin-1-TLR2/6 Komplex als Rezeptor für β -Glukane, seine Spezifität für Zymosan, sowie seine Funktion als Aktivator von Granulozyten wurden in jüngerer Zeit von Brown und Mitarbeitern beschrieben (14,15,16,29,34).

Erste Hinweise auf das Vorhandensein einer Zymosan-spezifischen Bindungsregion, welche für die Initiierung von Phagozytose und Auslösung eines respiratory burst verantwortlich ist, resultierten aus der Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope der α -Kette (CD11b) des Komplementrezeptors Typ III (CR3) (64). Letztlich gelang der Arbeitsgruppe um Ross die Identifizierung der Lektinbindungsstelle und der Nachweis ihrer Spezifität für β -Glukane und Zymosan nicht nur durch den Einsatz monoklonaler Antikörper gegen das C-terminale Ende von CD11b (80), sondern auch durch die funktionelle Charakterisierung von gentechnisch hergestellten Mutanten (92). Die funktionelle Bedeutung der von Ross et al charakterisierten Moleküleabschnitte (Domänen) der α -Kette (CD11b) des CR3 wird durch deren Zusammenspiel auch bei der Abwehr von malignen Zellen deutlich. So bewirkt das Priming des CR3 auf natürlichen Killerzellen durch β -Glukane als auch durch Zymosan die Vernichtung von C3bi-opsonierten Tumorzellen. Für den Angriff auf Zielzellen ist somit die gleichzeitige Interaktion der I-Domäne mit dem Oponin C3bi und der Kontakt der Lektinbindungsstelle mit Polysacchariden auf der Oberfläche von Fremdorganismen Voraussetzung (81,82,93).

Dectin-1 wurde von Brown und Gordon erstmalig als neuer non Toll-like Rezeptor für β -Glukane beschrieben, sowie der Nachweis seiner Spezifität für Zymosan erbracht

(14,15,16,34). Durch die Interaktion mit β -Glukanstrukturen auf der Oberfläche von Mikroorganismen bzw. Zymosan ist Dectin-1 in der Lage eine mikrobizide Zellantwort bestehend aus Phagozytose, assoziierter H_2O_2 -Produktion und der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zu generieren. Die Signaltransduktion ins Zellinnere erfolgt über die Phosphorylierung von Tyrosinkinase im zytoplasmatischen Anteil des Rezeptors und die Interaktion des dort lokalisierten „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“ (ITAM) mit spleen tyrosine kinase SYK (61). Zudem konnte gezeigt werden, dass Dectin-1 durch die Kooperation mit dem TLR 2/6-MyD88 Signalkomplex über einen weiteren von Zymosan getriggerten Aktivierungsweg zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine verfügt (61).

Durch die Verwendung von Zymosan in nativer als auch C3bi-opsonierter Form liegt damit eine Versuchsanordnung vor, mit der die globale Funktion des CR3 sowie die Funktion seiner Lektinbindungsstelle bzw. des Dectin-1-TLR2/6 Komplexes betrachtet werden kann.

Analog zur Erfassung der mikrobiziden Wirkkomponente wurden in der vorliegenden Studie nicht die tatsächliche Zytotoxizität von PMNL untersucht, sondern wesentliche Partialfunktionen betrachtet, die maßgeblich an der Entstehung von inflammatorischen Gewebeschäden beteiligt sind. So hat sich bei der Erfassung reaktiver Sauerstoffradikale in der Durchflusszytometrie die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Dihydrorhodamin 123 (DHR) im direkten Vergleich mit 2',7'-Dichlorfluorescein Diacetat (DCFH), Hydroethidin (HE) sowie der Chemolumineszenz als die sensitivste und effektivste Methode erwiesen (72,85).

6. Zusammenfassung

In der Pathogenese von Sepsis, septischem Schock und konsekutivem Multiorganversagen nehmen polymorphkernige, neutrophile Leukozyten (PMNL) eine zentrale Stellung ein. Um ihrer komplexen Aufgabe, der Bekämpfung eingedrungener Mikroorganismen, gerecht zu werden antworten PMNL nach Stimulation mit einem breiten Spektrum mikrobizider Reaktionen bestehend aus Chemotaxis, Adhärenz, Phagozytose und abschließender intrazellulärer Abtötung der Mikroorganismen durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Neben diesen physiologischen Funktionen zeigen polymorphkernige Granulozyten nach unphysiologisch hoher Aktivierung durch inflammatorische Mediatoren im Rahmen einer Sepsis aber auch ein hohes Potenzial zur Schädigung von körpereigenem Gewebe. Dies äußert sich in einer vor allem in der Endstrombahn lokalisierten, unkontrollierten, extrazellulären Freisetzung von toxischen Sauerstoffspezies. Letztere sind entscheidende Faktoren in der Genese von Mikrozirkulationsstörungen aus denen sich Organdysfunktionen und das zu einem hohen Prozentsatz letale Multiorganversagen entwickeln können. Damit nehmen polymorphkernige Granulozyten in der Pathogenese der Sepsis eine ambivalente Stellung ein. Die Ambivalenz zwischen einerseits effektiver Mikrobizidität und dem andererseits erheblichen zytotoxischen Potenzial war der Ausgangspunkt dieser Untersuchungen.

Zur Klärung der Frage in wieweit es in den verschiedenen Stadien einer Sepsis zur Einschränkung mikrobizider Partialfunktionen von PMNL kommt, haben wir funktionelle Tests zur Erfassung von Adhärenz und Phagozytose von Fremdpartikeln sowie zur Erfassung der Phagozytose-assoziierten Sauerstoffradikalproduktion für die Anwendung beim Menschen etabliert. Die Aktivierung der Zelle und die daran gekoppelte Phagozytose und Phagozytose-assoziierte Sauerstoffradikalproduktion wird durch die für β -Glukane spezifische Lektinbindungsstelle des

Komplementrezeptors Typ III sowie den Dectin-1-TLR2/6 Komplex ausgelöst. Die auf dem CR3 von der Lektinbindungsstelle räumlich getrennte I-Domäne vermittelt durch Opsonine die Adhärenz an Fremdorganismen, während der Dectin-1 Rezeptor direkt an β -Glukane auf der Oberfläche von Mikroorganismen bindet. Durch die Verwendung von an β -Glukanstrukturen reichen Zymosanpartikel, in nativer als auch in opsonierter Form, waren die an die Lektinbindungsstelle bzw. an den Dectin-1-TLR2/6 Komplex gekoppelten Funktionen sowie ihre Verstärkung durch Opsonisation einer getrennten Beurteilung zugänglich.

Zur Erfassung der Opsonisationskapazität des Patientenplasmas, welche einen potenziellen Einflussfaktor auf mikrobizide wie auch zytotoxische Partialfunktionen darstellt, wurden die Immunglobuline IgA, IgG und IgM und die Aktivität des klassischen sowie alternativen Aktivierungsweges des Komplementsystems bestimmt.

Für die Erfassung potenziell zytotoxischer Partialfunktionen wurde die Expression von β 2-Integrinen auf der Oberfläche von Granulozyten mittels fluoreszenzmarkierter CD18-Antikörper und die NADPH-Oxidase abhängige Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bestimmt. Die Messung der H_2O_2 -Produktion erfolgte in einem ex vivo Ansatz unter Kontrollbedingungen ohne zusätzliche Stimulation um Auskunft über die spontane H_2O_2 -Produktion zu erhalten. Ferner wurden die Zellen mit TNF- α und fMLP aktiviert.

Die Auswertung der Tests für mikrobizide Partialfunktionen ergab mit zunehmender Schwere der Sepsis eine verminderte Fähigkeit der PMNL zur Phagozytose von nativem Zymosan sowie der daran assoziierten Sauerstoffradikalproduktion. Dieser Funktionsverlust war durch Opsonisation der Partikel mit Patientenserum komplett reversibel, wenngleich sich eine verminderte Opsonisationskapazität des im Messansatz autolog eingesetzten Plasmas herausstellte. Dies beruhte vor allem auf

einem Verbrauch von Immunglobulinen und einer Verringerung der Komplementaktivität.

Unsere Messungen ergaben somit einen im Verlauf einer Sepsis zunehmenden Verlust der durch die Lektinbindungsstelle des CR3 sowie des Dectin-1-TLR2/6 Komplex vermittelten mikrobiziden Partialfunktionen, wie der Phagozytose sowie der Phagozytose-assoziierten Sauerstoffradikalproduktion. Da sich die Adhäsion als stabil erwies, ist ein Defekt in der nachgeschalteten Signaltransduktion der Lektinbindungsstelle des CR3 und/oder des Dectin-1-TLR2/6 Komplexes wahrscheinlich. Dieser sich parallel zur Schwere einer Sepsis entwickelnde zelluläre Defekt von PMNL ist trotz eines Verlustes an Immunglobulinen und einer reduzierten Komplementaktivität durch Opsonisation mit autologem Plasma komplett reversibel. Da andere Untersucher für in lokale Infektionsherde emigrierte PMNL weitere zelluläre Defekte und einen zusätzlichen Mangel an Opsoninen aufgezeigt haben, ist es wahrscheinlich, dass der in der vorliegenden Studie für zirkulierende PMNL nachgewiesene Funktionsverlust der Lektinbindungsstelle und/oder des Dectin-1-TLR2/6 Komplexes unter Bedingungen einer lokalen Infektion im Gewebe zum tragen kommt.

Bei der Untersuchung der potenziell zytotoxischen Funktionen zirkulierender PMNL zeigte sich parallel zur zunehmenden Schwere der Sepsis eine numerische Hochregulation von β 2-Integrinen als Zeichen einer Aktivitätssteigerung bedingt durch inflammatorische Mediatoren. Des Weiteren konnte mit zunehmender Schwere der Erkrankung eine gesteigerte H_2O_2 -Produktion spontan und ausgelöst durch Inkubation der PMNL mit humoralen Stimuli wie $TNF-\alpha$ und fMLP beobachtet werden.

Humorale Entzündungsmediatoren führen zu einer direkten Aktivierung der NADPH-Oxidase auf der Zelloberfläche von Granulozyten und verursachen eine

extrazelluläre Freisetzung von Superoxidanionen und deren Dismutation zu Wasserstoffperoxid. Dieser hauptsächlich in der Endstrombahn lokalisierte Prozess ist ein wichtiger Co-Faktor der Genese von Mikrozierulationsstörungen sowie des Multiorganversagens. Verstärkt wird dieser Vorgang und somit die Wirkung von reagiblen Sauerstoffspezies durch die Adhärenz der PMNL an das Endothel. Da die Interaktion von β 2-Integrinen mit endothelialen ICAM1-Rezeptoren bei der Diapedese einen zusätzlichen Impuls für die Bildung und Freisetzung von reagiblen Sauerstoffspezies bedeutet, zeigt unsere Beobachtung einer mit der Schwere der Sepsis zunehmenden Hochregulation der β 2-Integrinexpression nicht nur eine weitere Aktivierung, sondern auch ein gesteigertes zytotoxisches Potenzial polymorphkerniger Leukozyten an.

Damit legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den Schluss nahe, dass es mit zunehmender Schwere der Sepsis, beginnend mit der unkomplizierten Sepsis bis hin zum septischen Schock, zur Entwicklung einer Granulozytendysfunktion kommt. Charakteristisch für die septische Granulozytendysfunktion ist dabei die Abnahme mikrobizider Teilfunktionen (Phagozytose und Phagozytose-assoziierte H_2O_2 -Produktion), bei gleichzeitiger Steigerung der Mikrozierulation und potenziell das Gewebe schädigender zytotoxischer Partialfunktionen (β 2-Integrinexpression und TNF- α /fMLP induzierte H_2O_2 -Produktion). Ursächlich liegt der verringerten Fähigkeit zur Phagozytose und Phagozytose-assoziierten H_2O_2 -Produktion bei erhaltener Adhäsion an Zymosan ein Defekt in der Signaltransduktion der Lektinbindungsstelle des CR3 und/oder des Dectin-1 Rezeptors zu Grunde.

6.1. Perspektiven

Da in unserer Studie ausschließlich im peripheren Blut zirkulierende Granulozyten erfasst wurden, sollte der Gegenstand zukünftiger Studien eine umfassende Charakterisierung funktioneller, mikrobizider und zytotoxischer Eigenschaften von Granulozyten sein, die aus Infektionsherden isoliert werden. Zudem sollte die im intravasalen Blut dokumentierte verringerte Opsonisationskapazität auf weitere Defizite in lokalen Prozessen untersucht, und ihre additiven Auswirkungen auf zelluläre Defekte von Granulozyten erfasst werden. Schließlich bedarf der Mechanismus, der zum Funktionsverlust in der Signalweiterleitung des Komplementrezeptors Typ III und des Dectin-1-TLR2/6 Komplexes führt, einer exakten Charakterisierung. Zu diesem Zweck könnte das von uns etablierte Immunmonitoring in einer modifizierten Form zum Einsatz kommen. Es wäre zudem denkbar mit diesem Immunmonitoring neue Therapiestrategien wie die Behandlung von Sepsispatienten mit Hydrocortison oder aktiviertem Protein C auf ihre funktionellen Auswirkungen auf Granulozyten zu überprüfen. Da der Granulozyt sowohl durch den Verlust an mikrobiziden Fähigkeiten als auch durch sein hohes zytotoxisches Potenzial im Zentrum der Pathogenese von Sepsis bis hin zum Multiorganversagen steht, wäre er der ideale Ansatzpunkt neuer Therapiestrategien. Wie bereits für bestimmte Therapieansätze der Sepsis im tierexperimentellen Modell der hyperdynamen Endotoxinämie gezeigt werden konnte, sollten neue Therapieansätze der septischen Granulozytendysfunktion eine Suppression der gegen körpereigene Strukturen gerichteten extrazellulären Sauerstoffradikalproduktion bei vollständig erhaltender Mikrobizidität zum Ziel haben (76,77).

7. Abkürzungen

- Apache II: acute physiology and chronic health evaluation
- ARDS: acute respiratory distress syndrome
- CD: cluster of differentiation
- CR: Komplementrezeptor (complement receptor)
- CRD: carbohydrate-recognition domain
- CRP: C-reaktives Protein
- CTLD: C-type-lectin-like domain
- DHR: Dihydrorhodamin
- ECMO: extracorporeal membrane oxygenator
- FACS: Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorter)
- FITC: Fluoreszeinisothiocyanat
- Fc: fragment crystalline (frz.)
- fMLP: N-formyl-methionyl-phenyl-alanin
- HBSS: Hank's balanced salt solution
- H₂O₂: Wasserstoffperoxid
- ICAM1: intercellular adhesion molecule 1 (CD54)
- Ig: Immunoglobulin
- IL: Interleukin
- ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif
- LFA: lymphocyte function associated antigen
- LPS: Lipopolysaccharid
- NF-κB: nuclear factor κB
- MODS: Multiorganversagen (multiple organ dysfunction syndrom)
- MOV: Multiorganversagen
- MyD88: myeloid differentiation primary response gene 88
- NADPH: Nicotinamidadenindinucleotid
- PAF: platelet-activating factor
- PCT: Procalcitonin
- PAMPs: pathogen-associated molecular patterns
- Pg: Prostaglandin
- PI: Propidiumjodid
- PMNL: Polymorphkerniger Leukozyt (polymorphonuclear leukocyte)
- PPRs: pattern-recognition receptors
- SIRS: systemisches inflammatorisches Antwortsyndrom (systemic inflammatory response syndrome)
- SYK: spleen tyrosin kinase
- TLR: toll-like receptor
- TNF-α: Tumor-Nekrose-Faktor-α

8. Literaturverzeichnis:

1. Abraham E.: Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. *Intensive Care Med* 1999;25:556-566
2. Ahmed AE, Peter JB.: Clinical utility of complement assessment. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995;2:509-517
3. Alberti C, Brun-Buisson C, Goodman SV, Guidici D, Granton J, Moreno R, Smithies M, Thomas O, Artigas A, Le Gall JR.: Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:77–84
4. Aldridge AJ.: Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome. *Eur J Surg* 2002;168:204-214
5. Arndt P, Abraham E.: Immunological therapy of sepsis: experimental therapies. *Intensive Care Med* 2001;27:104-115
6. Babior BM.: Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000;109:33-44
7. Balsam LB, Liang TW, Parkos CA.: Functional mapping of CD11b/CD18 epitopes important in neutrophil-epithelial interactions: a central role of the I domain. *J Immunol* 1998;160:5058-5065
8. Baue EA.: Multiple organ failure – the discrepancy between our scientific knowledge and understanding and the management of our patients. *Arch Surg* 2000;385:441-453
9. Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M.: Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Live Sci* 1999;65:1865-1874
10. Berton G, Lowell CA.: Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cell Signal* 1999;11:621-635
11. Billing AG, Fröhlich D, Konecny G, Schildberg FW, Machleidt W., Fritz H, Jochum M.: Local serum application: restoration of sufficient host defense in human peritonitis. *Eur J Clin Invest* 1994;24:28-35
12. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, et al.: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992;20:864-874
13. Brigham KL.: Oxygen radicals – an important mediator of sepsis and septic shock. *Klin Wochenschr* 1991;69:1004-1008
14. Brown GD.: Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Rev Immunol* 2006;6:33-43

15. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Experiment Med* 2003;197:1119-1124
16. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, Wong SYC, Gordon S. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Experiment Med* 2002;196:407-412
17. Carlos TM, Harlan JM.: Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. *Immunol Rev* 1990;114:5-28
18. Childs EW, Udobi KF, Wood JG, Hunter FA, Smalley DM, Cheung LY.: In vivo visualization of reactive oxidants and leukocyte-endothelial adherence following hemorrhagic shock. *Shock* 2002;18:423-427
19. Chishti AD, Shenton BK, Kirby AJ, Baudouin SV.: Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med* 2004;30:605-611
20. Clays R, Vinken S, Spanan H, ver Elst K, Decochez K, Huyghens L, Gorus FK.: Plasma procalcitonin and C-reactive protein in acute septic shock: Clinical and biological correlates. *Crit Care Med* 2002;30:757-762
21. Condron C, Toomey D, Casey RG, Shaffii M, Creagh T, Bouchier-Hayes D.: Neutrophil bactericidal function is defective in patients with recurrent urinary tract infections. *Urol Res* 2003;31:329-334
22. Dallegri F, Ottonello L.: Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm Res* 1997;46:382-391
23. Del Bufalo C, Morelli A, Bassein L, Fasano L, Quarta CC, Pacilli AM, Gunella G.: Severity scores in respiratory intensive care: APACHE II predicted mortality better than SAPS II. *Respir Care* 1995;40:1042-1047
24. Diamond MS, Garcia-Aguilar J, Bickford JK, Corbi AL, Springer TA.: The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol* 1993;120:1031-1043
25. Ehlers RW.: CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect* 2000;2:289-294
26. Fraunberger P, Walli AK, Seidel D.: Zytokinanalytik Was ist machbar - was ist sinnvoll. *Internist* 2001;42:35-46
27. Freischlag J, Backstrom B, Kelly D, Keehn G, Busuttill RW.: Comparison of blood and peritoneal neutrophil activity in rabbits with and without peritonitis. *J Surg Res* 1986;40:145-151
28. Friedmann G, Silva E, Vincent JL.: Has the mortality of septic shock changed with the time? *Crit Care Med* 1998;26:2078-2086

29. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and toll-like receptor 2. *J Experiment Med* 2003;197:1107-1117
30. Griswold J, Maier RV.: Neutrophil phagocytosis during endotoxin-induced lung injury. *J Surg Res* 1988;44:417-424
31. Guo RF, Riedemann NC, Laudes IJ, Sarma VJ, Kunkel RG, Dilley KA, Paulauskis JD, Ward PA.: Altered neutrophil trafficking during sepsis. *J Immunol* 2002;169:307-314
32. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC.: Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998;92:3007-3017
33. Harlan JM.: Neutrophil-mediated vascular injury. *Acta Med Scand* 1987;715:123-129
34. Herre J, Gordon S, Brown GD. Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. *Mol Immunol* 2004;40:869-876
35. Hiramoto R, Bernecky J, Jurand J, Hamlin M.: The effect of hydrogen ion concentration on fluorescent labelled antibodies. *J Histochem Cytochem* 1964;12:271-274
36. Holzer K, Konietzny P, Wilhelm K, Encke A, Henrich D.: Phagocytosis by emigrated, intra-abdominal neutrophils is depressed during human secondary peritonitis. *Eur Surg Res* 2002;34:275-284
37. Holzer K, Richter A, Henrich D, Wilhelm K, Encke A.: Oxygen radical generation by emigrated, intra-abdominal, and circulating PMNLs during human secondary peritonitis. *Shock* 2001;15:90-94
38. Holzer K, Richter A, Konietzny P, Schübel F, Wilhelm K, Henrich D.: Functions of circulating and intra-abdominal polymorphonuclear leukocytes during human secondary peritonitis. *Zentralbl Chir* 2003;128:291-297
39. Holzer K, Thiel M, Moritz S, Kreimeier U, Messmer K.: Expression of adhesion molecules on circulating PMN during hyperdynamic endotoxemia. *J Appl Physiol* 1996;81:341-348
40. Hotchkiss RS, Karl IE.: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl Med* 2003;348:138-150
41. Kaufmann I, Hoelzl A, Schliephake F, Hummel T, Chouker A, Peter K, Thiel M.: Polymorphonuclear Leukocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity. Accepted *Shock* 2006
42. Khan HA.: Zymosan-induced luminol-dependent chemiluminescence response of circulating and extravasated leukocytes in experimental sepsis. *Mediators Inflamm* 2004;13:123-125

43. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE.: APACHE II: A severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13:818-829
44. Knaus WA, Zimmerman JE, Wagner DP, Draper EA, Lawrence DE.: APACHE-acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system. *Crit Care Med* 1981;9:591-597
45. Klut ME, Wahlen BA, Hogg JC.: Dynamic changes in neutrophil defensive during endotoxemia. *Infect Immun* 2001;69:7793-7799
46. Kobayashi SD, Voyich JM, DeLeo FR.: Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect* 2003;5:1337-1344
47. Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD.: Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med* 2000;26:124-128
48. Lam C, Schulz F, Laber G, Schütze E.: Opsonic activity of the alternative complement pathway in infected human intra-abdominal fluid. *Infection* 1985;13:8-11
49. Leclerc J, Pu Q, Weil E, Vallet B.: Vascular endothelial cell dysfunction in septic shock. *Intensivmed* 2000;37:93-99
50. Lehmann AK, Steinar S, Halstensen A.: Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2000;243:229-242
51. Lew DP, Despont JP, Perrin LH, Aguado MT, Lambert PH, Waldvogel FA.: Demonstration of a local exhaustion of complement components and of an enzymatic degradation of immunoglobulins in pleural empyema: a possible factor favouring the persistence of local bacterial infections. *Clin Exp Immunol* 1980;42:506-514
52. Marshall JC.: Clinical trials of mediator-directed therapy in sepsis: what have we learned? *Intensive Care Med* 2000;26:75-83
53. Martins PS, Kallas EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salomao R.: Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock* 2003;20:208-212
54. Mori T, Masuda M, Takahashi H, Hioki K.: Functional properties of circulating and transmigrated neutrophils in a rat peritonitis model. *Eur Surg Res* 2000;32:331-336
55. Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CGM, Cohen Tervaert JW.: Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med* 2000;26:883-892
56. Nussler AK, Wittel UA, Nussler NC, Beger HG.: Leukocytes, the janus cells in inflammatory disease. *Arch Surg* 1999;348:222-232

57. Ortiz-Stern A, Rosales C.: Cross-talk between Fc-receptors and integrins. *Immunol Lett* 2003;90:137-143
58. Parkin J, Cohen B.: An overview over the immune system. *Lancet* 2001;357:1777-1789
59. Polk HC, George CD, Hershman MJ, Wellhausen SR, Cheadle WG.: The capacity of serum to support neutrophil phagocytosis is a vital host defense mechanism in severely injured patients. *Ann Surg* 1988;207:686-692
60. Reinhart K, Karzai W, Meisner M.: Procalcitonin as a marker of the systemic inflammatory response to infection. *Intensive Care Med* 2000;26:1193-1200
61. Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, Williams DL, Gordon S, Tybulewicz VL, Brown GD, Sousa CRE.: Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 2005;22:507-517
62. Roos D, Bot AM, van Schaik LJ, de Boer M, Daha MR.: Interaction between human neutrophils and zymosan particles: the role of opsonins and divalent cations. *J Immunol* 1981;126:433-440
63. Rosenbloom AJ, Pinsky MR, Bryant JL, Shin A, Tran T, Whiteside T.: Leukocyte activation in the peripheral blood of patients with cirrhosis of the liver and SIRS. Correlation with serum interleukin-6 levels and organ dysfunction. *JAMA* 1995;274:58-65
64. Ross GD, Cain JA, Lachmann PJ.: Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin and functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *J Immunol* 1985;134:3307-3315
65. Rothe G, Emmendorffer A, Oser A, Roesler J, Valet G.: Flow cytometric measurement of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J Immunol Methods* 1991;138:133-135
66. Rothe G, Kellermann W, Schaerer B, Valet G.: Messung der phagosomalen Wasserstoffperoxidproduktion von Granulozyten und Monozyten mit Dihydrorhodamin 123. In: Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Eds. Schmitz G, Rothe G. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH 1994, 331–350
67. Rothe G, Valet G: Flow cytometric assays of oxidative burst activity in phagocytes. *Methods Enzymol* 1994;233:539-548
68. Rus H, Cudrici C, Niculescu F.: The role of the complement system in innate immunity. *Immunol Res* 2005;33:103-112
69. Russwurm S, Vickers J, Meier-Hellmann A, Spangenberg P, Bredle D, Reinhart K, Lösche W.: Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock* 2002;17:263-268

70. Seekamp A, Dwenger A, Weidner M, Regel G, Sturm JA.: Phagocytic cell function in recurrent endotoxemia in sheep. *Cir Shock* 1992;37:263-269
71. Sese E, Xiol X, Castellote J, Rodríguez-Fariñas E, Tremosa G.: Low complement levels and opsonic activity in hepatic hydrothorax; Its relationship with spontaneous bacterial empyema. *J Clin Gastroenterol* 2003;36:75–77
72. Smith JA, Weidemann MJ.: Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993;162:261-268
73. Spitzer JA, Zhang P, Mayer AMS.: Functional characterization of peripheral circulating and liver recruited neutrophils in endotoxic rats. *J Leukoc Biol* 1994;56:166-173
74. Tavares-Murta BM, Zaparoli M, Ferreira RB, Silva-Vergara ML, Oliveira CH, Murta EF, Ferreira SH, Cunha FQ.: Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit Care Med* 2002;30:1056-1061
75. Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, Wong SYC. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* 2002;169:3876-3882
76. Thiel M, Chambers JD, Chouker A, Fischer S, Zourelidis C, Bardenheuer HJ, Arfors KE, Peter K.: Effect of adenosine on the expression of β_2 integrins and L-selectin of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *J Leukoc Biol* 1996;59:671-682
77. Thiel M, Holzer K, Kreimeier U, Moritz S, Peter K, Messmer K.: Effects of adenosine on the functions of circulating polymorphonuclear leucocytes during hyperdynamic endotoxemia.: *Infect Immun* 1997;65:2136-2144
78. Thiel M, Zourelidis C, Chambers JD, von Andrian UH, Arfors KE, Messmer K, Peter K.: Expression of β_2 -integrins and L-selectin on polymorphonuclear leucocytes in septic patients. *Eur Surg Res* 1997;29:160-175
79. Thiel M, Zourelidis C, Peter K.: Die Rolle der polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten in der Pathogenese des akuten Lungenversagens (ARDS). *Anaesthesist* 1996;45:113-130
80. Thornton BP, Větvička V, Pitman M, Goldman RC, Ross GD.: Analysis of the sugar specificity and molecular location of the β -glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18).: *J Immunol* 1996;156:1235-1246
81. Větvička V, Thornton BP, Ross GD.: Soluble β -glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *J Clin Invest* 1996;98:50-61

82. Větvička V, Thornton BP, Wieman TJ, Ross GD.: Targeting of natural killer cells to mammary carcinoma via naturally occurring tumor cell-bound iC3b and beta-glucan-primed CR3 (CD11b/CD18). *J Immunol* 1997;159:599-605
83. Wagner C, Kondella K, Bernschneider T, Heppert V, Wentzensen A, Hänsch GM.: Post-traumatic osteomyelitis: Analysis of inflammatory cells recruited into the site of infection. *Shock* 2003;20:503-510
84. Waldvogel FA, Vaudaux P, Lew PD, Zwahlen A, Suter S, Nydegger U.: Deficient phagocytosis secondary to breakdown of opsonic factors in infected exudates. *Adv Exp Med Biol* 1982;141:603-610
85. Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligot P, Chassagne J, Vasson MP.: Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta* 2003;331:103-110
86. Wen L, Atkinson JP, Giclas PC.: Clinical and laboratory evaluation of complement deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:585-593
87. Wenisch C, Graninger W.: Are soluble factors relevant for polymorphonuclear leukocyte dysregulation in septicemia? *Clin Diagn Lab Immunol* 1995;2:241-5
88. Wenisch C, Parschalk P, Hasenhüendl M, Griesmacher A, Graninger W.: Polymorphonuclear leucocyte dysregulation in patients with gram-negative septicemia assessed by flow cytometry. *Eur J Clin Invest* 1995;25:418-424.
89. Wenisch C, Parschalk B, Patruta S, Brustbauer R, Graninger W.: Effect of polyclonal immunoglobulins on neutrophil phagocytic capacity and reactive oxygen production in patients with gram-negative septicemia. *Infection* 1999;27:183-186
90. Wichmann MW, Inthorn D, Andress HJ, Schildberg FW.: Incidence and mortality of severe sepsis in surgical intensive care patients: the influence of patient gender on disease process and outcome. *Intensive Care Med* 2000;26:167-172
91. Xia Y, Borland G, Huang J, Mizukami IF, Petty HR, Todd III RF, Ross GD.: Function of the lectin domain of mac-1/complement receptor type 3 (CD11b/CD18) in regulating neutrophil adhesion. *J Immunol* 2002;169:6417-6426
92. Xia Y, Ross GD.: Generation of recombinant fragments of CD11b expressing the functional β -glucan-binding lectin site of CR 3 (CD11b/CD18). *J Immunol* 1999;162:7285-7293
93. Xia Y, Větvička V, Yan J, Hanikýřová M, Mayadas T, Ross GD.: The β -glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. *J Immunol* 1999;162:2281-2290

9. Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. M. Thiel für seine große Geduld und beste fachliche Betreuung in allen Phasen meiner Arbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. I. Kaufmann für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor und die große Hilfe beim Erstellen dieser Arbeit.

Für die andauernde Unterstützung und das freundschaftliche Arbeitsklima im Forschungslabor möchte ich mich bei Marion Hörl, Gaby Kröger und Stefan Meindl bedanken.

10. Lebenslauf:

Florian Schliephake

- 1975 Geboren am 05.01.1975 als Sohn der Eheleute Peter Schliephake und Lisa Schliephake, geb. Grote, in München, Deutschland
- 1981 Einschulung in der Volksschule Altomünster
- 1985 Besuch des Ignaz-Taschner-Gymnasiums Dachau
- 1994 Erlangen der Hochschulreife am Ignaz-Taschner-Gymnasium Dachau
- 1994 Zivildienst beim Malteser Hilfsdienst München
- 1996 Immatrikulation im Fach Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1998 Ärztliche Vorprüfung
- 1999 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 2001 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 2002 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 2002 Arzt im Praktikum in der Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses München-Harlaching
- 2004 Approbation als Arzt
- 2004 Assistenzarzt am Herzzentrum der Universität Leipzig