

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für
Herz- und Thoraxchirurgie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. R.-E. Silber)



Einfluss von Katecholaminen auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine in Monozyten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Philipp Konrad Röntgen
geboren am 02. Dezember 1974 in Rinteln

Betreuer: PD Dr. rer. nat. Andreas Simm

Gutachter:

PD Dr. rer. nat. Andreas Simm

Prof. Dr. med. Stefan Grond

PD Dr. med. Marius Dehne

Eröffnungsdatum des Promotionsverfahrens: 01.03.2005

Datum der Verteidigung: 04.07.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008668

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008668>]

Referat und bibliographische Beschreibung

Zielsetzung: Monozyten gelten als Hauptproduzenten von Zytokinen, wie Interleukin (IL)-6, IL-8 und Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α . Katecholamine, welche häufig in der Intensivtherapie der schweren Sepsis eingesetzt werden, haben möglicherweise einen Einfluss auf die Zytokin-Produktion von Monozyten. In dieser Studie wurden der Effekt von Adrenalin (Adr), Noradrenalin (Nor) und Dopexamin (Dop) auf die intrazelluläre Zytokinexpression von Monozyten untersucht.

Methoden: Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) wurde ein *in vitro* Modell der gram-negativen Sepsis evaluiert und die Zeitkinetiken von IL-6, IL-8 und TNF- α , sowie die Dosis-Wirkungs-Beziehung von Lipopolysaccharid (LPS) zu IL-8 und TNF- α ermittelt. Vollblut von fünf gesunden Probanden wurde mit LPS und Katecholaminen in verschiedenen Konzentrationen für Zeiträume von 45 Minuten bis zu 12 Stunden (Std) inkubiert. Mit Hilfe der Mehrfarbendurchflusszytometrie wurden CD14⁺ Monozyten im Vollblut phänotypisiert und deren intrazelluläre Expression von IL-6, IL-8 und TNF- α gemessen.

Ergebnisse: Die Expressionskinetiken zeigen, dass TNF- α als erstes Zytokin gefolgt von IL-8 und IL-6 von Monozyten nach LPS Stimulation produziert wird. IL-8 und TNF- α zeigen keinen Unterschied hinsichtlich ihrer Dosis-Wirkungs-Beziehung zu LPS. Adrenalin und Noradrenalin (10 μ M, 100 μ M) hemmen die Expression von IL-6 und TNF- α signifikant ($p < 0,05$). Die IL-8 Expression wird dagegen nicht beeinflusst. Es konnte kein Unterschied zwischen Adrenalin und Noradrenalin in Bezug auf die Zytokinexpression gezeigt werden. Dopexamin zeigt im Vergleich zu Noradrenalin eine geringere Inhibition bei hohen Katecholaminkonzentrationen (100 μ M, 300 μ M) ($p < 0,05$). Der inhibierende Effekt von Noradrenalin (10 μ M und 100 μ M) ist bei geringeren LPS-Konzentration (0,2 ng/ml versus (vs) 1 ng/ml vs 10 ng/ml) stärker ausgeprägt ($p < 0,05$).

Schlussfolgerung: Die intrazellulär gemessene Zytokinexpression in Monozyten folgt einer definierten Kinetik. Adrenalin, Noradrenalin und Dopexamin zeigen einen überwiegend hemmenden Einfluss auf die Zytokin-Expression, jedoch werden nicht alle Zytokine in der gleichen Weise beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die in der Sepsis notwendige Katecholamintherapie in unterschiedlichem Ausmaß zu einer Modulation der intrazellulären Zytokinsynthese beiträgt.

Röntgen, Philipp: Einfluss von Katecholaminen auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine in Monozyten. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 62 Seiten, 2005

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

A	Argon-Ionen Laser
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
Adr	Adrenalin
APACHE	acute physiology and chronic health evaluation
BD	Becton Dickinson
BFA	Brefeldin A
BP	Bindungsprotein
BSA	Rinderserum
C	Celsius
Ca	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CARS	compensatory antiinflammatory reaction syndrome
CD	cluster of differentiation
D	Dopamin
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
E	Escherichia
ED ₅₀	Effektdosis ₅₀
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
FACS	Durchflusszytometer
FITC	Fluoreszinoisothiocyannath
FL	Fluoreszenzkanal
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Erdanziehungskraft
G-Protein	Guaninnucleotid bindendes Protein
GM-CSF	macrophage-colony-stimulating-factor
HLM	Herzlungenmaschine
HZV	Herzzeitvolumen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1 assoziierten Kinasen
Kd	Equilibriumdissoziationskonstanze
KG	Körpergewicht
Kon	Kontrolle
LPB	Lipopolysacharid Bindungs Protein
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar

mCD14	membranständiger CD14-Rezeptor
MCSF	macrophage-colony-stimulating-factor
MDF88	Myeloid-Differenzierungs-Faktor-88
mean	Mittelwert
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
MOF	Multiorganversagen
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nor	Noradrenalin
O ₂	Sauerstoff
PBS	phosphate buffered sialine
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
rE	relative Einheit
RIA	radio immuno assay
RIO	region of interest
RNA	Ribonukleinsäure
RR	Blutdruck nach Riva Rocchi
RT	Reverse Transkriptase
sCD14	löslicher CD14-Rezeptor
sem	Standardfehler des Mittelwertes
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SSC	Seitwärtsstreulicht
Std	Stunden
Tab.	Tabelle
T ₅₀	Halbwertszeit
TGF	tumor growth factor
Th-Zellen	T-Helferzelle
TLR	toll like receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
vs	versus
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.1.1 Monozyten.....	2
1.1.2 Phagozytose, Zytotoxizität und Antigenpräsentation von Monozyten.....	3
1.1.3 Aktivierung von Monozyten.....	3
1.1.4 Sekretorische Fähigkeiten der Monozyten.....	4
1.2 Zytokine.....	5
1.2.1 Interleukin-6.....	5
1.2.2 Interleukin-8.....	6
1.2.3 Tumor Nekrose Faktor- α	6
1.3 Katecholamine.....	7
1.3.1 Adrenorezeptoren.....	7
1.3.2 Wirkung von Katecholaminen.....	8
1.4 Einfluss von Katecholaminen auf das Immunsystem.....	11
1.5 Sepsis und SIRS.....	12
1.5.1 Monozyten und Zytokine in der Sepsis.....	13
1.5.2 Katecholamine in der Therapie der Sepsis und dem eskalierenden SIRS.....	14
2 Zielstellung.....	15
3 Material und Methodik.....	16
3.1 Arbeitsmaterial und Chemikalien.....	16
3.2 Durchflusszytometrie.....	17
3.3 Vollblutprobengewinnung und Lagerung.....	20
3.4 Prinzip der intrazellulären Zytokinbestimmung.....	20
3.4.1 LPS-Stimulation.....	20
3.4.2 Monozyten Phänotypisierung.....	21
3.4.3 Fixierung und Permeabilisierung.....	21
3.4.4 Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	22
3.5 Detaillierte Versuchbeschreibung.....	22
3.5.1 Herstellung der Stammlösungen.....	22
3.5.2 Kinetik der intrazellulären Zytokinexpression in humanen Monozyten.....	23
3.5.3 Dosis-Wirkungs-Kurve für IL-8 und TNF- α	24
3.5.4 Einfluss von Adrenalin und Noradrenalin auf die Zytokinexpression.....	24
3.5.5 Einfluss von Adrenalin und Noradrenalin auf die Zytokinexpressionskinetik.....	24
3.5.6 Noradrenalin-und Dopexaminwirkung auf die Zytokinexpression.....	25

3.5.7 Einfluss von Noradrenalin auf die monozytäre Zytokinexpression bei verschiedenen LPS-Konzentrationen.....	25
3.6 Datenanalyse.....	25
3.7 Datenverarbeitung und Statistik.....	26
4 Ergebnisse.....	28
4.1 Einführung.....	28
4.2 Zeitkinetik der intrazellulären Zytokinproduktion.....	28
4.3 Dosis-Wirkungs-Beziehung von LPS und IL-8/TNF- α	29
4.4 Adrenalin- und Noradrenalineinfluss auf die Zytokinexpression von Monozyten. .	30
4.5 Vergleich der Wirkung von Noradrenalin und Dopexamin.....	35
4.6 Einfluss von Noradrenalin bei unterschiedlichen LPS-Konzentrationen.....	37
5 Diskussion.....	39
5.1 Methodenkritik.....	39
5.2 Methodenvergleich.....	40
5.3 Zeitkinetik der intrazellulären Zytokinexpression.....	41
5.4 Dosis-Wirkungs-Beziehung von LPS und IL-8/TNF- α	42
5.5 Einfluss von Katecholaminen auf die Zytokinproduktion von Monozyten.....	43
5.5.1 Einfluss von Katecholaminen auf die IL-6 Expression.....	43
5.5.2 Einfluss von Katecholaminen auf die IL-8 Expression.....	45
5.5.3 Einfluss von Katecholaminen auf die TNF- α Expression.....	46
5.5.4 Vergleich der Wirkung von Adrenalin, Noradrenalin und Dopexamin.....	48
5.5.5 Wirkung von Katecholaminen auf die Monozytenfunktion in der Sepsis.....	50
5.6 Einfluss von Noradrenalin bei verschiedenen LPS-Konzentrationen.....	51
6 Zusammenfassung.....	53
7 Literaturverzeichnis.....	54
8 Thesen.....	62

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der menschliche Körper hat sich täglich mit einer Vielzahl von Fremdorganismen auseinander zu setzen und sich den Angriffen von Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten zu erwehren. Grundlage für diese Abwehrprozesse ist die Fähigkeit, zwischen fremdem und körpereigenem Gewebe zu unterscheiden. Diese Aufgabe übernimmt das Immunsystem. Mit Hilfe der verschiedenen am Immunsystem beteiligten Zellen gelingt es, Mikroorganismen und andere Pathogene zu erkennen und den Körper vor Infektionskrankheiten und deren Folgen zu schützen. Die beteiligten Zellen und ihre Reaktionen auf das als fremd erkannte Material wird im Folgenden näher dargestellt.

Das Immunsystem kann in ein angeborenes Immunsystem und in ein erworbenes Immunsystem unterteilt werden. Das phylogenetisch ältere, angeborene Immunsystem bildet die erste Verteidigungslinie im Verlauf der Reaktion auf eine Infektion. Essentiell für die angeborene Immunantwort sind Monozyten/Makrophagen und Granulozyten, welche zur Phagozytose befähigt sind. Die Monozyten/Makrophagen nehmen neben der Phagozytose zahlreiche weitere wichtige Funktionen wahr, auf die im Verlauf noch genauer eingegangen wird.

Im Verlauf der Evolution hat sich zusätzlich das spezifische, adaptive und phylogenetisch jüngere Immunsystem entwickelt. Die Zellen des adaptiven Immunsystems sind die Lymphozyten. Das adaptive Immunsystem lernt nach einem Erstkontakt bestimmte antigene Strukturen des Fremdorganismus kennen. Durch klonale Expansion wird ein spezifischer Lymphozytenzellklon gebildet und vermehrt, der bei einem zweiten Kontakt mit dem Antigen in der Lage ist, schnell und gezielt auf das Pathogen zu reagieren. Auf diesem Weg wird eine zeitweise, eventuell sogar lebenslange Immunität gegen Pathogene erworben und das eigene Körpergewebe als nicht pathogen erkannt. Die Zellen des adaptiven Immunsystems sind die B- und T-Lymphozyten. T- bzw. B-Lymphozyten unterscheiden sich durch ihre Funktion, ihre Antigenrezeptoren und dem Ort, an dem sie ausdifferenzieren.

B-Lymphozyten produzieren Antikörper oder auch Immunglobuline (Ig), welche die humorale Immunität bewirken. T-Lymphozyten sind für die zelluläre spezifische Immunität zuständig. Sie können direkt auf ein Pathogen einwirken. Es existieren unterschiedliche Subpopulationen von T-Lymphozyten. Zytotoxische cluster of differentiation (CD)⁸⁺ T-Lymphozyten produzieren Substanzen, die Zielzellen lysieren oder Apoptose initiieren können. Helfer-T-Lymphozyten (Th-Zellen) modulieren über die

Produktion von Signalstoffen die Immunfunktion. Nullzellen, unter denen die Natürlichen-Killer-Zellen eine wichtige Funktion einnehmen, haben vornehmlich die Funktion virusinfizierte und entartete körpereigene Zellen zu töten.

1.1.1 Monozyten

Monozyten sind mit einem Durchmesser von 16-20 μm die größten Zellen der Leukozytenpopulation. Sie besitzen einen länglichen, meist nierenförmigen Kern. Ein ausgeprägter Golgiapparat deutet auf eine starke sekretorische Aktivität hin. Monozyten und Makrophagen stammen wie die Granulozyten von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark ab. In der Monozytopoese entwickeln sie sich im Knochenmark aus der myeloiden Vorläuferzelle über Monoblasten und Promonozyten zu reifen Monozyten. Diese Differenzierung und Reifung der Monozyten wird durch den granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor (GM-CSF) und dem macrophage-colony-stimulating-factor (MCSF) gesteuert [56]. Ausgereifte Monozyten verlassen das Knochenmark und zirkulieren für 8–70 Stunden (Std) im Blutkreislauf. Sie haben eine Halbwertszeit von (T_{50})= 15-20 Stunden [90]. Die Zirkulationsdauer ist abhängig von Entzündungsmediatoren, welche die Chemotaxis und die Diapedese an den Ort der Inflammation vermitteln. Monozyten differenzieren sich abhängig vom Zielgewebe in gewebespezifische Makrophagen, die für Monate bzw. Jahre im Gewebe persistieren können. Zu diesem Monozyten/Makrophagen-System gehören Alveolarmakrophagen, Peritonealmakrophagen, Kupffersche Sternzellen, Milzmakrophagen, Gelenkmakrophagen und die Mikroglia des Gehirns. Im Immunsystem nimmt das Monozyten/Makrophagen-System eine Schlüsselrolle ein. Es übernimmt vielseitige Aufgaben wie die Phagozytose, die Antigenpräsentation, Abtötung von Mikroorganismen durch immunglobulin abhängige zellvermittelte Zytotoxizität, sowie die Produktion von Entzündungsmediatoren, wie Zytokine und Interleukine, die der Steuerung des Immunsystems dienen [55].

Auf der Zelloberfläche der Monozyten finden sich eine Vielzahl an Rezeptoren, so z.B. für die Fc-Segmente der IgG Subklassen (Fc γ R1(CD64), Fc γ R2(CD32) Fc γ R3 (CD16)), für Komplementfaktoren (CD35), für zahlreiche Zytokine wie Interleukin (IL)-2 und Interferon (IFN)- γ und Hormone, wie unter anderem die für diese Arbeit wichtigen Katecholaminrezeptoren. Ebenso befinden sich die Lipopolysaccharidrezeptoren (CD14) auf der Zelloberfläche, die spezifisch für diese Leukozytensubpopulation sind.

1.1.2 Phagozytose, Zytotoxizität und Antigenpräsentation von Monozyten

Monozyten und Makrophagen nehmen Pathogene mittels Phagozytose auf. Grundvoraussetzung dafür ist die Bindung des Pathogens an die Zelloberfläche. Dies wird über die Bindung von antigenspezifischen Rezeptoren an Oberflächenstrukturen des Pathogens erreicht. Eine weitere Möglichkeit der Bindung besteht über Opsonierung von Fremdorganismen mittels IgG und IgD, an deren Fc-Segmente Monozyten mit Hilfe von Fc-Segment-Rezeptoren wie CD64 und CD16 binden. Durch Einstülpung der Zellmembran an der Kontaktstelle des Pathogens werden Phagosomen gebildet. Diese verschmelzen mit Lysosomen zu Phagolysosomen. Ein niedriger pH-Wert, reaktive Sauerstoffverbindungen und Enzyme wie Säurehydrolase, Myeloperoxidase und Muraminidase sorgen für die Abtötung und den Abbau von Mikroorganismen in den Phagolysosomen. Während der Antigenprozessierung in den Phagolysosomen binden Proteinstücke an MHC-Klasse-2 Moleküle. Dieser Komplex wird dann an der äußeren Zellmembran der Monozyten, T-Lymphozyten, wie auch den B-Lymphozyten präsentiert.

1.1.3 Aktivierung von Monozyten

Monozyten liegen, damit sie nicht unkontrolliert körpereigenes Gewebe angreifen, im inaktivierten Zustand vor. Erst bei Bedarf verläuft die Aktivierung in zwei Phasen. Die erste Phase ist eine Voraktivierung im Besonderen durch IFN- γ . Nach der Voraktivierung werden Monozyten in einem zweiten Aktivierungsschritt durch unterschiedliche Faktoren, wie Lipopolysaccharide (LPS), hitzeinaktivierte Mikroorganismen, Zytokine wie TNF- α und IL-1 zu vollständig aktivierten Monozyten.

Im Weiteren wird die Aktivierung durch gram-negative Mikroorganismen, wie *Escherichia (E) coli* und andere Enterobakterien, deren Zellmembranbestandteil das LPS ist, dargestellt. *E. coli* und Enterobakterien gehören zu den gram-negativen Erregern, den Verursachern der gram-negativen Sepsis. Um den Zusammenhang von Katecholaminwirkung und Zytokinexpression in Monozyten nachvollziehen zu können, ist die Kenntnis der Aktivierungssignalkaskaden wichtig. LPS besteht aus drei makromolekularen Anteilen, die von außen nach innen als Region I bis Region III beschrieben werden (siehe Abb. 1). Die Region III enthält das LPS typische Lipid A. Lipid A bildet den Membrananker des LPS und ist für die Zytokinstimulation in Monozyten verantwortlich. Es wird per Abgabe von Membranvesikeln oder durch den Zerfall absterbender gram-negativer Bakterien *in vivo* freigesetzt.

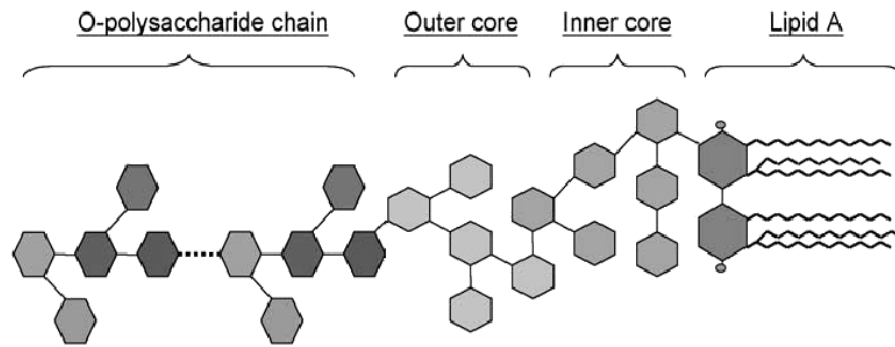


Abb. 1: Schematische Darstellung des Lipopolysaccharidmoleküls nach Erridge et al 2002 [19].

LPS interagiert mit dem LPS-bindenden Protein (LBP). Dieser LPS/LBP-Komplex bindet *in vivo* an den zellmembranständigen CD14 Rezeptor (mCD14) sowie an lösliche CD14 Rezeptoren (sCD14) im Serum. CD14 hat nach neuerer Auffassung die Aufgabe die Bindung von LPS an den toll like receptor (TLR)-4-MD-2-Rezeptorkomplex zu katalysieren bzw. die Endozytose von LPS in die Zellmembran von Monozyten zu ermöglichen. TLR-4 aktiviert über das Adapterprotein Myeloid-Differenzierungs Faktor-88 (MDF88) und mit Hilfe der Familie der Interleukin-1 assoziierten Kinasen (IRAK) den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Neben TLR-4 kann TLR-2 ebenso eine Aktivierung von NF- κ B bewirken [94]. NF- κ B aktiviert als Transkriptionsfaktor nach Translokation in den Nukleus der Zelle die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6, IL-8 und TNF- α [17].

1.1.4 Sekretorische Fähigkeiten der Monozyten

Über die oben angeführten Signaltransduktionswege werden viele verschiedene Entzündungsmediatoren von Monozyten exprimiert. Proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α sowie antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 werden in der Frühphase der Immunantwort auf Mikroorganismen gebildet. Monozyten besitzen neben Zytokinen eine große Bandbreite an sekretorischen Faktoren, darunter Komplementfaktoren, proteolytische Enzyme, aggressive Sauerstoffspezies, Gerinnungsfaktoren, Fibronektin und Wachstumsfaktoren [15, 55]. Mit Hilfe dieser Produkte werden von Monozyten eine Vielzahl immunologischer Prozesse, die Entzündungsreaktionen steuern und regulieren, beeinflusst.

1.2 Zytokine

Zytokine sind hormonähnliche Proteine, die von Leukozyten und einer Vielzahl weiterer Zellen produziert werden. Sie wirken regulatorisch auf entzündliche Prozesse. Im Gegensatz zu Hormonen, die von einem spezifischen Zelltyp gebildet werden, können Zytokine eines Typs auch von verschiedenen Zellen produziert werden. Sie haben pleiotrope und durch verschiedene Zellen redundant gewährleistete Funktionen. Zytokine wirken autokrin, parakrin, juxtakrin und nur selten endokrin [45]. Zu den Zytokinen zählen Interferone, koloniestimulierende Faktoren, Wachstumsfaktoren, Chemokine und Interleukine. Ihre pleiotropen Funktionen gaben den Ausschlag für die Bezeichnung Interleukin. Monozyten gelten als Hauptproduzenten pro- und antiinflammatorischer Zytokine [28]. In der Pathogenese des systemic inflammatory response syndrome (SIRS) und der Sepsis spielen die von Monozyten produzierten proinflammatorischen Zytokine wie IL-6, IL-8 und TNF- α eine besondere Rolle und zeigen bei erhöhten Plasmaspiegeln eine positive Korrelation mit der Mortalität der Patienten [64, 72, 82].

1.2.1 Interleukin-6

IL-6 wird von vielen Zellen produziert. Hauptproduzenten *in vivo* sind Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Die NF- κ B Bindungsstelle im Promotor ist mitverantwortlich für die Aktivierung der Genexpression von IL-6 [53].

Der IL-6 Rezeptor wird auf T-Zellen und mitogen aktivierten B-Zellen, Hepatozyten, peripheren Monozyten und einigen Makrophagen exprimiert. Die IL-6 Rezeptoren gehören zur Gruppe der alpha-helikalen Rezeptoren, die sich in drei Untergruppen unterteilen und gemeinsame intrazelluläre Signaltransduktionswege benutzen [45].

IL-6 zeigt sehr variable biologische Funktionen und besitzt pro- und antiinflammatorische Effekte [18]. Unter anderem induziert es in Hepatozyten Metallothionine, wirkt als neurotropher Faktor und stimuliert die ACTH-Produktion in der Hypophyse. IL-6 wirkt als B-Zell-Differenzierungsfaktor, welcher die Differenzierung von B-Zellen in Immunglobulin produzierende Plasmazellen anregt. Ebenso aktiviert IL-6 T-Zellen und induziert zusammen mit IL-2 die Transformation in zytotoxische T-Zellen. IL-6 induziert während der Inflammation die Akut-Phase-Reaktion [58]. Patienten, die an einem SIRS oder einer Sepsis leiden, zeigen erhöhte IL-6 Plasmaspiegel [72]. Im Rahmen der Sepsistherapie hat sich IL-6 als ein Marker für die Immundefunktion und als Outcomeparameter für das Multiorgan dysfunktionssyndrom (MODS) bewährt [39, 65].

1.2.2 Interleukin-8

IL-8 ist ein Chemokin, das verantwortlich für die Rekrutierung und Chemotaxis von Entzündungszellen ist. IL-8 wird von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und vielen weiteren Zellen produziert.

Der IL-8 Rezeptor gehört zur Familie der Guaninnukleotid bindenden (G)-Protein gekoppelten Rezeptoren. Der Rezeptor befindet sich auf Lymphozyten mit einer Dichte von 300/Zelle und auf neutrophilen Granulozyten mit einer Dichte von 20000/Zelle [54].

IL-8 unterscheidet sich von allen anderen Zytokinen durch seine Fähigkeit, neutrophile Granulozyten zu aktivieren. Es führt in neutrophilen Granulozyten zu einem transient erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel und führt dadurch zu einem verstärkten O_2 -Metabolismus mit Generierung von reaktiven O_2 -Spezies (Respiratory Burst) zu einer vermehrten Exozytose von Granula, einer verstärkten Chemotaxis, einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen und ist an der Vermittlung der Schmerz Wahrnehmung beteiligt. IL-8 hat einen chemotaktischen Einfluss auf alle migrationsfähigen Zellen des Immunsystems, jedoch führt IL-8 auch zu einer verminderten Adhäsion von Leukozyten an aktivierte Endothelzellen und scheint somit auch antiinflammatorische Effekte zu besitzen [69]. Erhöhte IL-8 Plasmaspiegel korrelieren in der schweren Sepsis mit dem Schweregrad einer Laktatazidose, mit der Ausprägung der dissiminierten intravasalen Gerinnung, dem Schweregrad einer Hypoxie und erhöhten „acute physiology and chronic health evaluation scores“ (APACHE)-II sowie der Mortalität von Sepsispatienten [32, 64, 85]. IL-8 scheint auch eine besondere Bedeutung in der Pathogenese des acute lung injury zu zukommen [75].

1.2.3 Tumor Nekrose Faktor- α

TNF- α wird von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, NK-Zellen und T-Zellen in Folge eines LPS-Stimulus produziert. Auch viele weitere Zellen und Tumorzellen, die nicht zum Immunsystem gezählt werden, können TNF- α produzieren. TNF- α wird mit Hilfe des TNF- α converting enzyme über ein Precursorprotein gebildet [24].

TNF- α -Rezeptoren befinden sich in einer Dichte von ca. 500-10000/Zelle auf allen somatischen Zellen, mit Ausnahme von Erythrozyten. Es wurden zwei unterschiedliche Rezeptoren für TNF- α beschrieben [25]. TNF-R1 scheint, wie im TNF-R1-knockout-Mausmodell gezeigt, eine bedeutende Rolle bei der Induktion der Immunantwort zu

spielen. Die Tiere sind immun gegenüber den Effekten tödlicher LPS Dosen, sterben jedoch an verabreichten tödlichen Dosen von *Lysteria monocytogenis* [59].

TNF- α ist ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort auf Mikroorganismen. In nicht aktivierten Monozyten induziert TNF- α die Synthese von IL-1 und Prostaglandin E₂. TNF- α stimuliert die Proliferation von T-Zellen in Abwesenheit von IL-2 und wirkt als Proliferationsfaktor bzw. Differenzierungsfaktor für B-Lymphozyten. Im Kaninchenmodell konnte gezeigt werden, dass TNF- α ein wichtiger Mediator der gram-negativen Sepsis ist. Es konnten in Tieren, denen tödlichen Dosen Endotoxin verabreicht wurden, stark erhöhte TNF- α Plasmaspiegel nachgewiesen werden. Dieser tödliche Effekt konnte durch TNF- α -Antikörper antagonisiert werden [61]. Die aufgetretenen Symptome ähneln denen der schweren gram-negativen Sepsis und dem schweren SIRS [76]. Es treten eine disseminierte intravasale Gerinnung, eine Mikroembolisation mit fibrinhaltigen Präzipitaten der Mikrozirkulation, lokale Entzündungssymptome, hämodynamische Dysregulation sowie Gewebnekrosen in Niere, Leber und Herz auf. TNF- α induziert beim Menschen in Kombination mit IL-1 verschiedene Veränderungen des Endothels. Es bewirkt eine Inhibition antikoagulatorischer Mechanismen und führt zur Hyperkoagulation und erhöht die Chemotaxis sowie die Endotheladhärenz von neutrophilen Granulozyten. In der schweren Sepsis und dem schweren SIRS des Menschen wird TNF- α neben IL-1 als erstes Zytokin produziert. Für TNF- α konnte ein kardiodepressorischer Effekt in der Sepsis nachgewiesen werden [40].

1.3 Katecholamine

Das sympathische Nervensystem kontrolliert zusammen mit dem Parasympathikus alle vegetativ innervierten Strukturen und Organe des Körpers. Adrenalin und Noradrenalin werden über die Vorstufe Dopamin (D) als körpereigene Katecholamine im sympathischen Nervensystem gebildet und entfalten ihre Wirkung über Adrenorezeptoren. In der Intensivtherapie werden Adrenalin, Noradrenalin und verschiedene synthetisch hergestellte Katecholamine, wie z.B. Dopexamin, verwendet. Die Wirkung der Katecholamine ist abhängig von ihren spezifischen Adrenorezeptoren und deren spezifischer Verteilung in den Zielorganen [67].

1.3.1 Adrenorezeptoren

Es werden drei Gruppen von Adrenorezeptoren unterschieden: α -Adrenorezeptoren, β -Adrenorezeptoren und dopaminerge Rezeptoren [67]. Diese Gruppen werden wiederum in weitere Subtypen unterteilt, denen unterschiedliche Funktionen zugeschrieben werden.

Die α_1 -Adrenorezeptoren vermitteln hauptsächlich die postsynaptischen Effekte an den sympathischen Zielorganen, während α_2 -Adrenorezeptoren für die negative Feedback-Hemmung der Noradrenalinfreisetzung aus den sympathischen Nervenendigungen zuständig sind [34, 77].

Für die β -Adrenorezeptoren findet sich eine unterschiedliche Verteilung in den Effektororganen [11]. Am Myokard überwiegen hauptsächlich β_1 -Adrenorezeptoren, an der glatten Muskulatur und an den endokrinen Organen β_2 -Adrenorezeptoren, wobei an Fettzellen und an der glatten Muskulatur des Magen Darm Traktes β_3 -Adrenorezeptoren gefunden wurden [44].

Bei den Dopaminrezeptoren unterscheidet man D_1 bis D_5 -Rezeptoren, unter denen die D_1 und D_2 -Rezeptoren überwiegen. Man findet diese hauptsächlich an den Gefäßen der Niere und des Mesenteriums [67].

Die unterschiedliche Verteilung der Adrenorezeptor-Subtypen und ihre unterschiedliche Spezifität für die adrenergen Liganden in den spezifischen Zielorganen sind für die vielfältigen Effekte der Katecholamine verantwortlich. Synthetisch hergestellte Katecholamine werden häufig in der Klinik im perioperativen Management, z.B. nach Operationen mit Hilfe der Herz-Lungen-Maschine bzw. zur Herz-Kreislauf-Unterstützung bei der Behandlung von kritisch Kranken, in erheblichem Umfang eingesetzt.

1.3.2 Wirkung von Katecholaminen

Das Prinzip der Wirkungsentfaltung von Katecholaminen ist, dass sie durch eine extrazelluläre Aktivierung von Adrenorezeptoren eine intrazelluläre Kopplung von Adrenorezeptor und Guaninnukleotid bindenden (G)-Proteinen auslösen. G-Proteine steigern oder erniedrigen die Synthese von „second messenger“, welche über mehrere Zwischenschritte die physiologische Antwort auf die Ligandenbindung auslösen. Die relative Wirkstärke von Adrenalin, Noradrenalin und Dopexamin an den verschiedenen Rezeptoren ist in Tab. 1 dargestellt. Die resultierende Wirkstärke ist von der Affinität des Katecholamins zum Rezeptorsubtyp, der intrinsischen Aktivierungspotenz und der Konzentration des Agonisten am Rezeptor abhängig [67]. Abgesehen davon ist die Stimulation eines Rezeptorsubtyps immer abhängig von den Konzentrationen aller Liganden am Rezeptor. Mehrere Liganden verdrängen sich gegenseitig durch kompetitive Bindung an den Rezeptoren und schwächen somit die spezifische Wirkung der einzelnen Liganden ab. Weitere Einflussgrößen sind die vorliegende Rezeptordichte und die Rezeptorreserve. Bei Abnahme der Rezeptordichte entfalten partielle Agonisten nicht mehr den vollen physiologischen Effekt. Unter Umständen wirken bei zu geringer Rezeptordichte partielle

Agonisten sogar als Antagonisten. Volle Agonisten können jedoch bei reduzierter Rezeptordichte noch einen maximalen physiologischen Effekt erreichen.

Adrenalin

Adrenalin aktiviert β - und α -Rezeptoren, hat jedoch keine Wirkung auf D-Rezeptoren. Bei geringer Konzentration werden primär β_1 - und β_2 -Rezeptoren stimuliert. Mit zunehmender Konzentration werden zusätzlich auch α -Rezeptoren besetzt. Diese Wirkung als voller Agonist an β - und α -Rezeptoren ist für Adrenalin charakteristisch. Die Wirkung kann durch β - und α -Antagonisten spezifisch beeinflusst werden. Adrenalin bewirkt einen dosisabhängigen Anstieg des Herzzeitvolumens (HZV) mit einer hundertfach stärkeren Wirkung als Dopamin [74]. Im höheren Dosisbereich überwiegt die α -mimetische Wirkung des Adrenalins, was sich in einem deutlichen Anstieg des peripheren Widerstandes zeigt und zu einem Anstieg des arteriellen Mitteldrucks führt. Adrenalin wird bei der akuten Herzinsuffizienztherapie als wirkungsvollstes Inotropikum verwendet. Weiterhin wird es häufig im Rahmen des perioperativen Managements von Operationen, die mit der Herz-Lungen-Maschine (HLM) durchgeführt werden, verwendet. Der Abgang von der HLM führt häufig zu einer hämodynamischen Dysbalance des Patienten, so dass Adrenalin wegen seiner inotropen Wirkung häufig eingesetzt wird, um den Abgang von der HLM zu ermöglichen. Die hohe Potenz des Adrenalins an den β_2 -Rezeptoren, die eine starke Bronchodilatation bewirken, sowie sein hämodynamisches Wirkprofil und die Hemmung der Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten macht es zum Medikament der Wahl in der Behandlung des anaphylaktischen Schocks [67]. Ebenso ist es das Medikament der Wahl bei der kardiopulmonalen Reanimation [30].

Noradrenalin

Die Wirkung von Noradrenalin an den α - und β_1 -Rezeptoren ist weitgehend mit der von Adrenalin vergleichbar, wobei die Wirkung an β_2 -Rezeptoren deutlich geringer ausfällt. Die Affinität von Noradrenalin an β_1 -Rezeptoren ist *in vitro* ungefähr zwanzigfach höher als an β_2 -Rezeptoren. Im Vergleich zu Dopexamin bewirkt Noradrenalin in hohen Konzentrationen über β_2 -Rezeptoren eine höhere intrazelluläre cAMP-Erhöhung [48]. Aufgrund seiner Wirkung an den α -Rezeptoren bewirkt Noradrenalin an den peripheren Gefäßen eine Vasokonstriktion. Der vorherrschende klinische Effekt ist eine Steigerung des systemischen Perfusionsdruckes. Das HZV bleibt über eine Steigerung der Kontraktilität über β_1 -Rezeptoren trotz einer Erhöhung des peripheren Widerstandes meist unbeeinflusst. Pressorezeptoren verhindern einen überschießenden Herzfrequenzanstieg

über bradykarde Einflüsse. Diese Eigenschaft macht Noradrenalin zum Therapeutikum der Wahl in der hyperdynamen Phase des schweren septischen Schocks, da bei diesem Krankheitsbild der verringerte systemische Perfusionsdruck ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Entwicklung eines Multiorganversagens (MOF) oder MODS ist [67].

	Intrinsische Aktivität	β_1	β_2	α_1	α_2	D ₁	D ₂
Adrenalin	Voller Agonist						
	>0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{KG}$	+++	+++	+++	+++	0	0
	0,05-0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{KG}$	+++	+++	++	++	0	0
	0,02-0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{KG}$	++	++	+	+	0	0
Noradrenalin	Voller Agonist	+++	(+)	+++	+++	0	0
Dopexamin	Partieller Agonist	+	++	0	0	++	+

Tab. 1: Die Tabelle zeigt die relativen Wirkstärken der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Katecholaminen an verschiedenen Adrenorezeptor-Subtypen. Voller Agonist bezeichnet Substanzen mit maximaler intrinsischer Aktivität. Partielle Agonisten führen bei gleicher Konzentration am Rezeptor zu einer geringeren intrinsischen Aktivität. Nach W. Schütz et al. 2000 [67].

Dopexamin

Dopexamin ist ein synthetisch hergestelltes, dem Dopamin ähnliches, Katecholamin. Es zeigt eine hauptsächliche Wirkung an β_2 -Rezeptoren sowie an D₁- und in geringerem Ausmaß an D₂-Rezeptoren. Dopexamin kann in der Therapie der Herzinsuffizienz eingesetzt werden, da es das HZV steigert. Dieser Effekt wird der Wirkung von Dopexamin an β_2 -Rezeptoren zugeschrieben. Aufgrund der geringen β_1 -Aktivität soll Dopexamin ein günstigeres arrhythmogenes Profil besitzen als andere Katecholamine [70]. Jedoch führt Dopexamin in höheren Dosen zu einer Tachykardie, vermutlich durch eine reflektorische Vasodilatation aufgrund seiner β_2 -Wirkung. Besondere Bedeutung erlangte das Dopexamin als im Tierversuch sowie im Menschen festgestellt wurde, dass es in der Lage ist, die Splanchnikusperfusion zu verbessern [66]. Während einer Endotoxinämie konnte mit Dopexamin der Blutfluss postkapillärer Venolen der Ratte und die endotheliale Integrität aufrecht erhalten, sowie die Leukozytenaktivierung und -adhärenz vermindert werden. Im septischen Schockmodell verschiedener Spezies wurde unter Dopexamin eine verbesserte Mukosadurchblutung des Darmes und ein günstiger Effekt auf die Gewebeoxygenierung in Darm und Leber gefunden [14, 46, 78].

1.4 Einfluss von Katecholaminen auf das Immunsystem

Loeper und Crouzon konnten 1904 als Erste anhand des Differentialblutbildes die Wirkung von Katecholaminen auf das Immunsystem nachweisen. Sie stellten fest, dass nach subkutaner Injektion von Adrenalin eine Granulozytose induziert wird. Dieser Einfluss ist bidirektional. Es werden nicht nur Immunfunktionen vom Nervensystem beeinflusst, sondern das Immunsystem hat ebenso einen Einfluss auf das Nervensystem [93]. Zytokine und Interleukine wirken auf das ZNS und das autonome Nervensystem unter anderem über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse. Das Nervensystem exprimiert Rezeptoren für Zytokine und beeinflusst über eine Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin das Immunsystem [6, 92]. Borovika et al. konnten zeigen, dass eine zentrale Stimulation des Parasympathikus zur Inhibition der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und zu einer gesteigerten IL-10 Expression *in vivo* führt [10]. Das Immunsystem hat Rezeptoren für neuroendokrine Hormone wie Glukokortikoide und Katecholamine. Teilweise ist auch eine eigenständige Produktion dieser möglich, welches Hinweis auf einen autokrinen Rückkopplungsmechanismus sein könnte [5].

Eine Vielzahl von Studien mit radioaktiv markierten Liganden zeigten, dass immunologische Zellen Adrenorezeptoren exprimieren, über die das sympathische Nervensystem Einfluss auf die Immunantwort nimmt. β -Rezeptoren und α -Rezeptoren sind auf Leukozyten beschrieben worden [37]. Abhängig vom Adrenorezeptorsubtyp, über welche die Katecholamine Einfluss auf immunkompetente Zellen nehmen, können sehr verschiedene Veränderungen der Immunfunktion beobachtet werden. Beim Menschen führt die Injektion von Noradrenalin zu einem Anstieg der Anzahl an zirkulierenden Monozyten im Blut [23]. Soweit bekannt findet die Interaktion von Katecholaminen und Zytokinexpression auf Ebene der second messenger statt. cAMP führt zu einer Stabilisierung des NF- κ B und vermindert somit die Genaktivierung proinflammatorischer Zytokine. Der Einfluss von Adrenalin, Noradrenalin und anderen cAMP stimulierenden Substanzen auf die pro- und antiinflammatorische Zytokinproduktion von Monozyten wurde in der Vergangenheit *in vitro* und *in vivo* untersucht. Es zeigten sich jedoch keine einheitlichen Ergebnisse hinsichtlich eines stimulierenden oder inhibierenden Einflusses der Katecholamine auf die Zytokinexpression in Monozyten. Die Wirkung von Katecholaminen ist unter anderem abhängig von den untersuchten Zytokinen, wie auch von den physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen [80, 79, 81, 49, 50, 38, 18].

1.5 Sepsis und SIRS

Jährlich erkranken in den USA 750.000 (300 pro 100.000 Einwohner) Patienten an einer Sepsis. In Europa (z.B. Deutschland, Österreich) wird die Inzidenz geringer geschätzt (54-116 pro 100.000 Einwohner) [13]. Es liegen jedoch keine gesicherten Daten zur Inzidenz der Sepsis in Deutschland vor. Die Mortalität in Amerika und Europa liegt zwischen 28-50 % [2, 12]. Aufgrund der zunehmenden demographischen Veränderung der Altersstruktur der westlichen Länder ist mit einer Zunahme der Inzidenz der Sepsis zu rechnen [22]. Diese Daten verdeutlichen nach den entmutigenden Therapieversuchen und der bleibend hohen Mortalität in den letzten Jahrzehnten, dass nach neuen Therapieansätzen, einem genaueren pathophysiologischen und pharmakologischen Verständnis, für die im Rahmen der Sepsistherapie eingesetzten Medikamente gesucht werden muss.

Das systemic inflammatory response syndrome (SIRS) kann als Folge vieler verschiedener pathologischer Einflüsse entstehen. Es ist anhand der Manifestation von mindestens zwei der folgenden klinischen Bedingungen definiert [8]: 1. Temperatur $> 38^{\circ}\text{C}$ oder $< 35^{\circ}\text{C}$; 2. Herzfrequenz > 90 Schläge/min; 3. respiratorischen Insuffizienz mit einem der folgenden Kriterien: a) Tachypnoe > 20 Atemzüge/min; b) Hyperventilation mit einem $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg (bei Spontanatmung); c) $\text{paO}_2 < 70$ mmHg; 4. Leukozyten von $> 12.000/\mu\text{l}$ oder $< 4000/\mu\text{l}$ oder $> 10\%$ stabkernige Granulozyten. Die Sepsis stellt ein SIRS aufgrund einer Infektion dar. Um die Definition der Sepsis zu erfüllen, muss neben zwei SIRS Kriterien der Nachweis einer Infektion erfolgen [8]. Eine schwere Sepsis ist definiert als eine Sepsis mit Zeichen der Organdysfunktion bzw. Hypoperfusion: Hypotension (Blutdruck (RR) < 90 mmHg oder Reduktion um > 40 mmHg vom Ausgangswert), Oligurie, Laktatazidose, Enzephalopathie, Thrombozytopenie bzw. Thrombozytensturz [8]. Die Komplikationen der Sepsis sind vielfältig und in der Aktivierung einer überschießenden Immunantwort zu suchen. Als Komplikation kann es zu einem Multiorganversagen mit folgendem Multiorgan dysfunktionssyndrom (MODS) kommen, das die gemeinsame Endstrecke der immunologischen Veränderung und Reaktionen auf eine Infektion oder ein Trauma darstellt. Das MODS ist definiert als Ausfall eines oder mehrerer Organe, die ohne intensivmedizinische Intervention einen letalen Ausgang für den Patienten zur Folge hätten [8]. Die Ausprägung des MODS bestimmt den Verlauf und bedingt die hohe Mortalität der Sepsis [7].

1.5.1 Monozyten und Zytokine in der Sepsis

Das Immunsystem spielt die zentrale Rolle in der Initiierung der pathophysiologischen Veränderungen in der Sepsis und dem SIRS. In der Frühphase reagiert der Körper mit einer proinflammatorischen Immunantwort. Diese Reaktion ist notwendig, um Fremdorganismen zu bekämpfen und ihre weitere Ausbreitung im Körper zu verhindern. Im Falle einer infektionsbegünstigenden Situation, wie Immunsuppression bei Tumorkranken, Patienten auf Intensivstationen oder Patienten nach Herzoperationen [88], kann dies zu einer überschießenden systemischen Freisetzung von Entzündungsmediatoren führen [47]. Entzündungsmediatoren sind unter anderem die von Monozyten und anderen Zellen produzierten proinflammatorischen Zytokine IL-1, TNF- α , IL-6 und IL-8 [32].

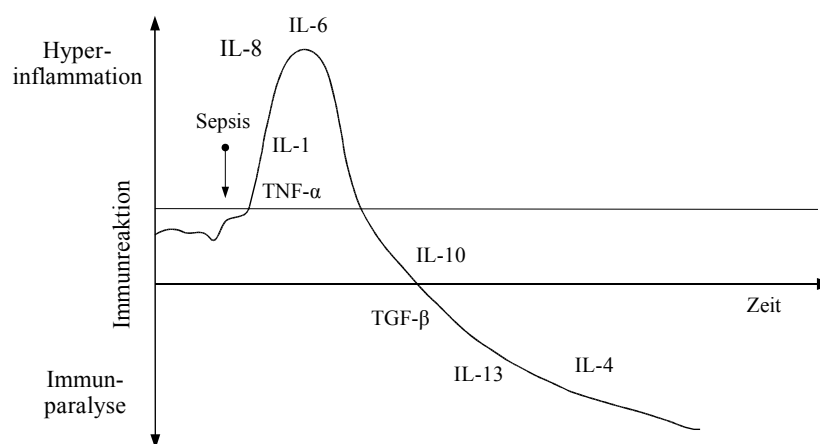


Abb. 2: Die Abbildung zeigt den hypothetischen Zeitverlauf der Immunreaktion in der Sepsis. In der Frühphase kommt es zur Hyperinflammation mit Dominanz von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-6 und IL-8, gefolgt von einer Immunparalyse, die durch antiinflammatorische Zytokine wie IL-10, tumor growth factor (TGF)- β , etc. gekennzeichnet ist. Nach Walmrath et al. 2001 [87].

Sie führen zu einer Aktivierung der Blutgerinnung, der Bildung von Mikroembolisationen, Endothelschäden, Hypoperfusion, Hypotension und weiterer Freisetzung von Zytokinen [89]. In der Sepsis und dem eskalierendem SIRS ist die Regulation dieser frühen Immunantwort gestört. Es entsteht ein Zustand der Hyperinflammation, der die pathologischen Veränderungen weiter vorantreibt und somit am Ende zum MOF und MODS führen kann. Nach neuerer Auffassung reagiert der Körper im Sinne eines Regelkreises auf die unkontrollierte proinflammatorische Phase mit einer nach 2-3 Tagen einsetzenden endogenen Immunsuppression [7]. Die Freisetzung der Interleukine IL-10, IL-4 und Tumor Growth Factor- β können zu einer konsekutiven Immunparalyse und Anergie führen, indem unter anderem die Synthese

proinflammatorischer Zytokine gehemmt wird [20]. Dieses als compensatory antiinflammatory reaction syndrome (CARS) bezeichnete Phänomen führt wiederum zu einer erhöhten Empfänglichkeit des Körpers für Infektionen. Die schwere Sepsis mit ihren gravierenden Auswirkungen ist die Manifestation einer kaskadenartigen immunologischen Dissonanz, die sich im Verlauf der Krankheit einstellt [7].

1.5.2 Katecholamine in der Therapie der Sepsis und dem eskalierenden SIRS

Patienten, die an einer Infektion erkranken und bei denen sich das infektionsbedingte SIRS zu einer schweren Sepsis entwickelt, sind häufig auf die Gabe von vasoaktiven Substanzen angewiesen. Die Sepsis wird klassischerweise in zwei Phasen anhand der vorherrschenden hämodynamischen Situation eingeteilt. Zunächst kommt es aufgrund der Wirkung der proinflammatorischen Zytokine und anderen Entzündungsmediatoren zu einer hyperdynamen Phase, in welcher der mittlere arterielle Druck stark abfällt. Der periphere Widerstand kann somit so stark erniedrigt sein, dass durch eine Steigerung des HZV kein ausreichender Perfusionsdruck aufrechterhalten werden kann und es zur Organminderperfusion kommt. Erhöhte Plasmaspiegel an TNF- α und IL-1 schränken die Inotropie des Herzens zusätzlich ein, so dass die kardiale Kompensationsfähigkeit eingeschränkt ist [40]. Diese postulierte septische Kardiomyopathie trägt zum niedrigen systemischen Perfusionsdruck bei. In dieser Phase ist Noradrenalin häufig das Mittel der Wahl, um einen suffizienten Perfusionsdruck zu erreichen. Wie weiter oben angeführt, kann Noradrenalin *in vitro* wie *in vivo* die Zytokinproduktion beeinflussen. Da in der Sepsis besonders hohe Konzentrationen eingesetzt werden, ist von einem immunmodulatorischen Einfluss auszugehen. Nach Herzoperationen, bei denen die HLM verwendet wird, werden häufiger immunologische Veränderungen im Sinne eines SIRS mit anschließend gesteigerten Infektionsraten beobachtet [88]. Katecholamine werden im Rahmen von Operationen mit der HLM eingesetzt. Die Fähigkeit von Leukozyten, proinflammatorische Zytokine als Reaktion auf einen LPS-Stimulus zu produzieren, ist nach Operationen mit der HLM eingeschränkt. Grundmann et al. zeigten, dass diese häufig beobachtete Leukozytendesensibilisierung, die mit einer verminderten proinflammatorischen Zytokinexpression und einer gesteigerten Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 einhergeht, durch Katecholamine mit verursacht wird [27]. Die verminderte Expression proinflammatorischer Zytokine könnte einen begünstigenden Einfluss auf die Entwicklung von Infektion haben und an der Entwicklung eines eventuellen CARS beteiligt sein.

2 Zielstellung

Vor dem Hintergrund der geschilderten Beziehungen zwischen Immunsystem und Nervensystem und dem gegenwärtigen Forschungsstand beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dem Einfluss von Katecholaminen, speziell Adrenalin, Noradrenalin und Dopexamin, auf die proinflammatorische Immunantwort von Monozyten. Insbesondere geht es um die Produktion der proinflammatorischen Interleukine IL-6, IL-8 und TNF- α , die eine besondere Rolle in der Frühphase der Sepsis und des SIRS spielen. Die Expression der Zytokine wurde intrazellulär mittels Durchflusszytometrie gemessen, um so die Daten mit bereits vorhandenen Ergebnissen, die mit anderen Methoden gewonnen wurden, zu vergleichen.

Die Zytokinexpression in Monozyten wurde hinsichtlich der folgenden Ziele untersucht:

- Erstellen eines *in vitro* Sepsismodells im Vollblutansatz.
- Beschreibung der Expressionskinetiken von IL-6, IL-8 und TNF- α in einem Vollblut *in vitro* Sepsismodell.
- Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen LPS und den beiden Zytokinen, IL-8 und TNF- α .
- Evaluierung der Wirkung unterschiedlicher Katecholamine und von klinisch relevanten Katecholamindosen auf die proinflammatorische Zytokinexpression von Monozyten.
- Beschreibung der Wirkung von Noradrenalin bei unterschiedlichen LPS-Konzentrationen.

3 Material und Methodik

3.1 Arbeitsmaterial und Chemikalien

- FITC anti-human CD14-Antikörper, Pharmingen, Heidelberg
- PE anti-human TNF- α Antikörper, Pharmingen, Heidelberg
- PE anti-human IL-6 Antikörper, Pharmingen, Heidelberg
- PE anti human IL-8 Antikörper, Pharmingen, Heidelberg
- PE rat IgG_{2a} Isotypkontrolle, Pharmingen, Heidelberg
- Golgi Plug, Pharmingen, Heidelberg
- Cytotfix/Cytoperm Kit, Pharmingen, Heidelberg
- Lipopolysaccharide E. Coli 055: B5, SIGMA, Deisenhofen
- Phosphate buffered Sialine (PBS) w/o Ca²⁺ w/o Sodium Bicarbonat, GIBCO BRL/Lifetechnologies, Eggenstein
- Dimethyl Sulfoxide (DMSO), SIGMA, Deisenhofen
- RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin, GIBCO BRL/Lifetechnologies, Eggenstein
- FACS Clean, Becton Dickinson (BD), Heidelberg
- FACS Rinse, BD, Heidelberg
- Cellwash, BD, Heidelberg
- FACS Flow, BD, Heidelberg
- FACS-Calibur Cytometer, BD, Heidelberg
- Software Cellquest pro®, BD, Heidelberg
- Bovine Serum Albumin 0,2 %, SIGMA, Deisenhofen
- Natriumazid (Na⁺N₃), SIGMA, Deisenhofen
- Epinephrinhydrochlorid (Suprarenin®-Ampullen), Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main
- Norepinephrinhydrochlorid (Arterenol®-Ampullen), Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main
- Dopexamidihydrochlorid (Dopacard®-Ampullen), Elan Pharma GmbH, München
- 5 ml Polysterene round bottom tube, Falcon®, BD, Heidelberg
- 7,5 ml Natrium-Heparin-Monovetten®, Sarstedt, Nürnbergrecht
- BD Valuset, Butterfly-Blutabnahmebesteck, BD, Heidelberg
- HERAsafe HSPC, Sterilbank, Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau

3.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS) ist ein optisches Messverfahren zur Analyse von Partikeln bzw. von Zellen in Suspension. Sie ermöglicht es, eine große Anzahl von Zellen in kurzer Zeit zu untersuchen, wobei die Zellen einzeln an einer Lichtquelle in einem Flüssigkeitsstrom vorbeigeleitet werden. Dabei werden die Größe basierend auf der Vorwärtsstreuung, die interne Komplexität anhand der Seitwärtsstreuung des Lichts, sowie verschiedene potentielle Zelleigenschaften mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Antikörpern gleichzeitig gemessen.

Aufbau und Funktion eines Durchflusszytometers

Der grundsätzliche Aufbau eines Durchflusszytometers besteht aus einem Flüssigkeitssystem, das die Proben in der Flusskammer an einem Laserstrahl vorbeiführt. Als Lichtquelle werden ein oder mehrere Laser unterschiedlicher Wellenlänge verwendet, um damit mehrere Zelleigenschaften parallel zu erfassen. Das vom Partikel abgestrahlte Licht wird zu Photodetektoren und Photomultipliern gelenkt, die die Signale detektieren und digitalisieren. Der Aufbau eines Durchflusszytometers ist in Abbildung 3 dargestellt.

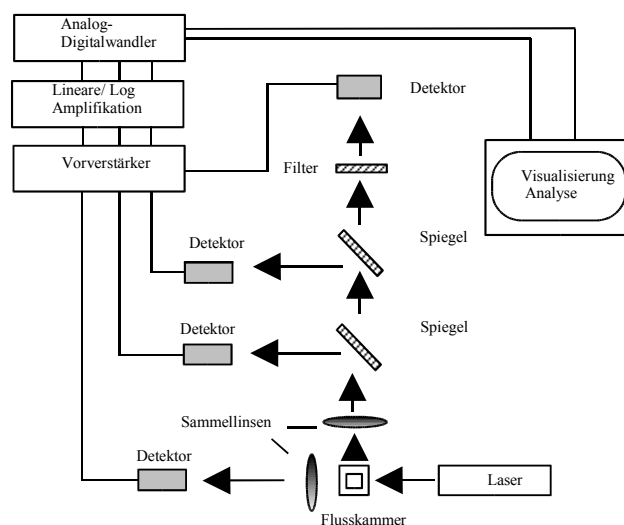


Abb. 3: Aufbau eines Durchflusszytometers

Flüssigkeitssystem

Das Flüssigkeitssystem besteht aus zwei Flüssigkeitszufuhren, welche die Flusskammer versorgen. Die Hüllflüssigkeit (sheath fluid) wird der Flusskammer, in welche die Probe injiziert wird, kontinuierlich zugeführt. Das Flüssigkeitssystem dient dazu, die in Suspension gehaltenen Partikel einzeln im Raum auszurichten und somit eine konstante Kreuzung des Probenstrahls mit dem Laserstrahl zu ermöglichen.

Optisches System

Im FACScalibur kommt ein luftgekühlter Argon-Ionen-Laser mit einer genutzten Wellenlänge von 488 nm und ein roter Diodenlaser der Wellenlänge 635 nm zum Einsatz. Der Laserstrahl trifft im rechten Winkel in der Photoküvette auf den Partikelstrom und wird an den Partikeln gestreut. Sammellinsen bündeln die in einem engen Winkel 1°-20° aufgefangene Vorwärtsstreuung (FSC) und die im 90°-Winkel registrierte Seitwärtsstreuung (SSC) sowie emittierte Fluoreszenzsignale.

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitationsmaximum[nm]	Emmissionsmaximum [nm]	Laser [nm]
FITC	495	520	488 A
PE	564 / 495	576	488 A

Tab. 2: Die Tabelle zeigt die spektralen Eigenschaften, Exzitationsmaxima, Emmissionsmaxima und geeigneten Lasertypen für Fluoreszeinisothiocyanath FITC und Phycoerythrin (PE). A=Argon-Ionen Laser.

In der Durchflusszytometrie werden Fluoreszenzfarbstoffe zumeist in Form von an Antikörpern konjugierten Markern genutzt. Diese werden eingesetzt um Zellstrukturen, Immunphänotypisierungen und intrazelluläre Ziele zu markieren. Als Fluoreszenzfarbstoffe werden unter anderem Fluoreszeinisothiocyanath (FITC) und Phycoerythrin (PE) verwendet. Die spektralen Eigenschaften für FITC und PE sind in Tabelle 2 dargestellt.

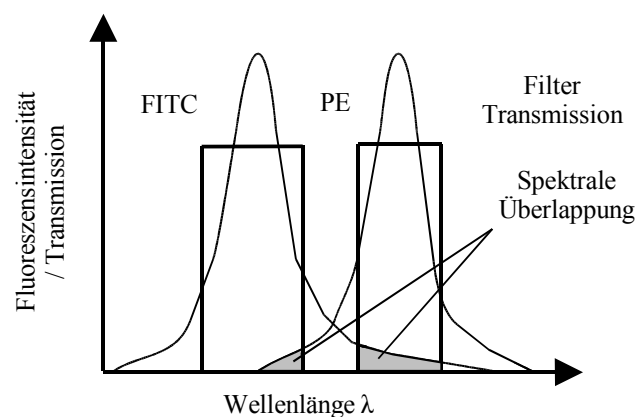


Abb. 4: Fluoreszenzspektren von Phycoerythrin (PE) und Fluoreszeinisothiocyanath (FITC).

Bei der Mehrfarbendurchflusszytometrie werden mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig verwendet und registriert. Dies ist möglich, da die Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedliche Emissions- sowie Absorptionsspektren besitzen. Technische Grenzen sind durch die spektrale Überlappung gesetzt. Spektrale Überlappung tritt auf, wenn es zur Überschneidung der Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe kommt. Die Emissionsspektren von FITC und PE sind in Abbildung 4 dargestellt. In der Abbildung ist zu erkennen, dass trotz der idealen Wahl von entsprechenden Transmissionsfiltern eine restliche spektrale Überlappung nicht verhindert werden kann.

Analyse und Darstellung

Zwei grundlegende Darstellungen werden am häufigsten genutzt. Das Streudiagramm und die Histogrammdarstellung. Das Streudiagramm ist eine zweidimensionale Erweiterung des Histogramms. Ein typisches Histogramm wie auch ein Streudiagramm sind in Abbildung 5 dargestellt.

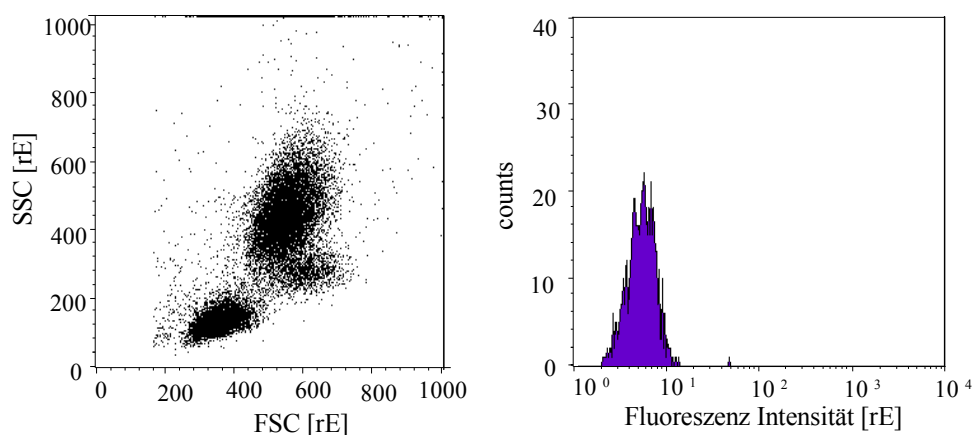


Abb. 5: Darstellung eines typischen Streudiagramms (links) und eines Histogramms (rechts). Im links dargestellten Streudiagramm erkennt man die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen im humanen Vollblut. Die unterste Population entspricht den Lymphozyten. Die mittlere Population repräsentiert die Monozyten und die oberste Population die neutrophilen Granulozyten. Am oberen Rand des Streudiagramms finden sich die eosinophilen Granulozyten. Das Histogramm gibt die Häufigkeit von Signalen in den einzelnen Fluoreszenzkanälen an.

Mit Hilfe des Computerprogramms Cellquest pro® wurde die statistische Auswertung vorgenommen. Durch Setzen von Grenzwerten (Markern) wird der Anteil positiver Partikel gegenüber der Gesamtzahl bzw. deren mittlere Fluoreszenzintensität „mean fluorescence intensity“ (MFI) gemessen. Die mittlere Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Menge gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Partikel. Mit der „Region of

interest“ (RIO)-Technik können Ereignisse, die innerhalb einer gewählten Region liegen, weiter ausgewertet werden.

3.3 Vollblutprobengewinnung und Lagerung

Die Vollblutproben wurden mit Hilfe von Butterfly Blutentnahmesystemen und Na⁺-Heparin-Monovetten® mittels percutaner Venenpunktion von den Probanden entnommen. Um eventuellen zirkadianen Veränderungen in der Zytokinproduktion vorzubeugen, erfolgte die Entnahme immer zur gleichen Zeit, zwischen 7.30 Uhr und 8.00 Uhr. Die Probanden waren gesund und zeigten keine klinischen Zeichen einer Infektion. Bekannte Autoimmunerkrankungen, fieberhafte Infekte in den letzten zwei Wochen, Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus und regelmäßige Einnahme von Medikamenten galten als Ausschlusskriterien.

Es wurden Vollblutproben von einer Gruppe von 9 Probanden gewonnen. Die Gruppe bestand aus 2 weiblichen und 7 männlichen Freiwilligen bei einem mittleren Lebensalter von 31 ± 8 Jahren.

Um das Risiko einer Kontamination gering zu halten, wurden die Arbeitsschritte von der Blutentnahme bis zum Abschluss der Vollblutstimulation unter einer Sterilbank durchgeführt.

3.4 Prinzip der intrazellulären Zytokinbestimmung

Monozyten beginnen unmittelbar nach Stimulation mit LPS Zytokine wie IL-6, IL-8 und TNF- α zu sezernieren. Um die Exkretion der Zytokine zu verhindern, wurde der intrazelluläre Proteintransport mittels Brefelidin A (BFA) blockiert. BFA blockiert den vesikulären Proteintransport vom rauen endoplasmatischen Retikulum zum Golgiapparat und führt so zu einer Akkumulation von Zytokinen in Zellen. Die Zytokinproduktion kann somit in Zellen, nach intrazellulärer Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, mittels FACS gemessen werden. Die Phänotypisierung von Monozyten im Vollblut erfolgte durch spezifische fluorochromkonjugierte Antikörper gegen das CD14-Oberflächenantigen.

3.4.1 LPS-Stimulation

200 μ l Vollblut wurden in einem Verhältnis von 1:5 mit 790 μ l RPMI gemischt. Brefeldin A wurde entsprechend dem Protokoll von Becton Dickinson eingesetzt (Golgiplug, Endkonzentration von 3,5 μ M) und LPS wurde in verschiedenen

Konzentrationen zugesetzt. Die eingesetzte Konzentration richtete sich nach der Fragestellung des einzelnen Versuchansatzes.

Um den Einfluss von Adrenalin, Noradrenalin und Dopexamin auf die Zytokinproduktion zu untersuchen, wurden diese in einem Konzentrationsbereich von 10^{-7} bis 3×10^{-4} M zugesetzt.

Die Proben wurden gemischt und bei 37° C in einem Inkubator (5 % CO_2 , 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Die Inkubationszeit richtete sich nach der Fragestellung des einzelnen Versuchansatzes.

3.4.2 Monozyten Phänotypisierung

Nach der Inkubationszeit wurden die Vollblutproben zum Waschen in 1 ml CellWash/BD aufgenommen und gemischt. Anschließend wurden sie bei 500 x Erdanziehungskraft (g) für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 1 ml Stainingbuffer resuspendiert und wiederum bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Das resuspendierte Pellet wurde in einem zweiten Waschgang mit 1 ml Stainingbuffer gewaschen. Stainingbuffer wird eingesetzt, um eine ungewollte Hintergrundfärbung im Probenansatz zu minimieren.

Die Zellen wurden in 100 μ l Stainingbuffer resuspendiert. Zur Oberflächenfärbung der Monozyten wurden 10 μ l CD14 anti-human-konjugierte Antikörper zugegeben und gemischt. Die Proben wurden 10 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert und die Proben zweimal nach Zentrifugation bei 500 x g mit 1 ml Stainingbuffer gewaschen.

3.4.3 Fixierung und Permeabilisierung

Damit die Oberflächenfärbung, bzw. die Fluoreszenz der Monozyten in den weiteren Arbeitsschritten erhalten blieb, wurden die Antikörper auf der Zelloberfläche fixiert. Zur Fixation wurde Cytofix/Cytoperm-Lösung der Firma Becton Dickinson eingesetzt. Cytofix/Cytoperm enthält Paraformaldehyd, welches eine Denaturierung und Präzipitation von Proteinen und deren Seitenketten verursacht. Es stabilisiert die Oberflächenantikörper auf den Monozyten und erhält ihre Fluoreszenz. Zusätzlich wird mit diesem Reagenz die Permeabilisierung der Zellwand durch Detergentien erreicht.

Das Pellet wurde unter Mischen in 250 μ l Cytofix/Cytoperm-Lösung aufgenommen und bei 4° C für 10 min im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal bei 500 x g für 5 min zentrifugiert und mit jeweils 1 ml Perm/Wash-Lösung gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 100 μ l Perm/Wash-Lösung resuspendiert.

3.4.4 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Die intrazelluläre Zytokinfärbung basiert auf der Identifikation intrazellulärer Antigene mit Hilfe monoklonaler Antikörper. In der vorliegenden Arbeit wurden PE konjugierte anti-human-IL-6-Rat-IgG_{2a}, PE konjugierte anti-human-IL-8-Mouse-IgG_{2b} und PE konjugierte anti-human-TNF- α -Mouse-IgG1 Antikörper verwendet.

10 μ l des jeweiligen IL-Antikörpers wurden zu 100 μ l Probensuspension gegeben und gründlich gemischt. Darauf folgte eine 30-minütige Inkubation bei 4° C im Dunkeln. Im Anschluss wurden die Proben unter Zugabe von 1 ml Perm/Wash-Lösung gemischt und für 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt. Danach wurden die Proben in 300 μ l Stainingbuffer resuspendiert und umgehend per FACS gemessen.

PE konjugierte Antikörper unspezifischer Relevanz wurden als Isotypkontrolle für die spezifische Bindung der Zytokin-Antikörper eingesetzt. Durch Subtraktion der Isotypkontrolle und durch die Platzierung von Grenzmarken in der Histogramm- auswertung kann der Anteil Interleukin positiver Zellen bestimmt werden. Die Isotypkontrollen werden in gleicher Konzentration wie die Interleukin-Antikörper verwendet, um kohärente Ergebnisse zu erhalten. Es wurden jeweils 5 Probanden untersucht (n = 5). Jede Probe eines Probanden wurde zweifach gemessen.

3.5 Detaillierte Versuchbeschreibung

3.5.1 Herstellung der Stammlösungen

Herstellung von LPS-Stammlösung:

1 mg LPS (E. Coli; 055:B5; SIGMA) + 1 ml PBS = LPS 1 mg/ml

Herstellung von 10 μ l Aliquots, Einfrieren bei - 80° C

Stammlösung bei Gebrauch: Auftauen und Verdünnen mit 990 μ l PBS = 100 μ g/ml

für Konzentration im Probenansatz:

10 ng/ml = 10 μ l Stammlösung in 990 μ l Probenvolumen

1 ng/ml = 1 μ l in 999 μ l Probenvolumen

0,2 ng/ml = 2 μ l von 1:10 verdünnter 1 ng/ml- Lösung

Herstellung von BFA-Stammlösung:

Molekulargewicht Brefeldin A: 240,3 g/l = 1 M (mol/l)

Golgiplug: 1 mg Brefeldin A gelöst in 1 ml DMSO = Brefeldin A 3,5 mM

Um Pipettierfehler zu minimieren: 1:10 verdünnen (30 μ l BFA + 270 μ l RPMI)

10 µl BFA pipettieren (Probenvolumen 1000 µl) = Brefeldin A Konzentration: 3,5 µM

Herstellung Adrenalin-Stammlösung

Molekulargewicht Epinephrinhydrochlorid 183,2 g/l = 1 M (mol/l)

Stammlösung Epinephrinhydrochlorid (Suprarenin®-Ampullen) 1 mg/ml = 5,5 mM

Zugabe von 1,8 µl/1 ml entspricht 10 µM Endkonzentration

Herstellung der Noradrenalin-Stammlösung

Molekulargewicht Norepinephrinhydrochlorid 319,3 g/l = 1 Mol (mol/l)

Stammlösung Norepinephrinhydrochlorid (Arterenol®-Ampullen) 1 mg/ml = 3,13 mM

Zugabe von 3,2 µl/1 ml entspricht 10 µM Endkonzentration

Herstellung von Dopexamin-Stammlösung

Molekulargewicht Dopexamin 429,5 g/l = 1 M (mol/l)

Stammlösung Dopexamin 10 mg/ml = 23,28 mM

1 ml Aliquots: 429,5 µl Dopexamin + 570 µl PBS = 10 mM Dopexamin

Im Ansatz: 1 µl pipettiert = 10 µM

Herstellung von Stainingbuffer:

500 ml PBS

0,2 % BSA

0,1 % Na⁺N₃

pH-Wert 7,4 bis 7,6

3.5.2 Kinetik der intrazellulären Zytokinexpression in humanen Monozyten

Um die Zeitkinetik und den besten Zeitpunkt für weitere Messungen zu bestimmen, wurde die Zytokinexpression von IL-6, IL-8 und TNF- α über einen Zeitraum von 12 Stunden bestimmt. 10 µl BFA und 10 ng/ml LPS wurden in 780 µl RPMI in einem 5 ml Polyethylenröhrchen vorgelegt und gemischt. 200 µl Blut des Probanden wurden dazu gegeben und gemischt. Die Stimulationszeiten betragen 45 Minuten; 1,5; 3; 6 und 12 Stunden. Als Kontrollen wurden ein Leerwert ohne LPS-Stimulus und eine Isotypkontrolle mit PE rat IgG_{2a} Isotypkontrolle verwendet. Die Daten wurden als Anteil [%] Zytokin positiver Monozyten an der Gesamtzahl der Monozyten registriert.

3.5.3 Dosis-Wirkungs-Kurve für IL-8 und TNF- α

Die LPS Dosis-Wirkungs-Beziehung für IL-8 und TNF- α wurde bestimmt und die Effektdosis (ED)₅₀ ermittelt. 10 μ l BFA und 780 μ l RPMI wurden in einem 5 ml Polyethylenröhrchen vorgelegt und gemischt. LPS wurde in folgenden Konzentrationen zugegeben 1×10^{-3} , 3×10^{-3} , 1×10^{-2} , 3×10^{-2} , 1×10^{-1} , 3×10^{-1} , 1, 3, 10, 30, 100 ng/ml. Danach wurden 200 μ l Probandenblut hinzugegeben. Eine Inkubationszeit von 3 Stunden wurde auf Grundlage der gemessenen Zytokinkinetik gewählt. Es wurde der Anteil [%] der Interleukin positiven Zellen ermittelt. Zur besseren Darstellung sind die relativen Werte bezogen auf die 3 ng/ml (100 %) LPS Stimulation dargestellt.

3.5.4 Einfluss von Adrenalin und Noradrenalin auf die Zytokinexpression

Der Einfluss von Adrenalin und Noradrenalin auf die Produktion von IL-6, IL-8 und TNF- α wurde verglichen. Weiterhin wurde der mögliche Einfluss der Reihenfolge der Katecholamingabe bezüglich des LPS-Stimulus untersucht. 10 μ l BFA und 10 ng/ml LPS wurden in 780 μ l RPMI in einem 5 ml Polyethylenröhrchen vorgelegt und gemischt. 200 μ l Vollblut wurden zugegeben. Die Proben wurden mit 10 μ M Adrenalin bzw. Noradrenalin 15 min vorinkubiert und nach LPS-Stimulus mit weiteren 10 μ M Adrenalin und Noradrenalin inkubiert. Weiterhin wurden jeweils 10 μ M Adrenalin bzw. Noradrenalin vor und nach LPS-Stimulus ohne Vorinkubation zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 3 Stunden und 6 Stunden. Kontrollen: Leerwert und 10 μ l PE rat IgG_{2a} Isotypkontrolle. Stimulation ohne Katecholamin vs Stimulation mit Katecholamin diente als negativ Kontrolle. Die Ergebnisse wurden als MFI [relative Einheiten] und als Anteil [%] der Interleukin positiven Monozyten an der Gesamtzahl der Monozyten registriert.

3.5.5 Einfluss von Adrenalin und Noradrenalin auf die Zytokinexpressionskinetik

Der mögliche Effekt von Adrenalin und Noradrenalin auf die Kinetik der IL-6, IL-8 und TNF- α Produktion wurde untersucht. 10 μ l BFA und 10 ng/ml LPS wurden in 780 μ l RPMI und jeweils 10 μ M Adrenalin und Noradrenalin in einem 5 ml Polyethylenröhrchen vorgelegt und gemischt. 200 μ l Vollblut wurde hinzugegeben und gemischt. Inkubationszeiten waren 45 Minuten, 1,5; 3 und 6 Stunden. Als Kontrollen dienten mit Isotypantikörper gefärbte Zellen. Stimulation ohne Katecholamin vs Stimulation mit Katecholamin diente als Negativkontrolle. Es wurde der Anteil [%] für IL-6, IL-8 und TNF- α positiven Monozyten an der Gesamtzahl der Monozyten erfasst.

3.5.6 Noradrenalin-und Dopexaminwirkung auf die Zytokinexpression

Noradrenalin und Dopexamin wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die IL-8 und TNF- α Expression in Monozyten verglichen. Das Blut von 5 Probanden wurde untersucht. 10 μ l BFA und 10 ng/ml LPS wurden in 780 μ l RPMI vorgelegt. Die Noradrenalin und Dopexamin Konzentrationen betragen 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100; 300 μ M. 200 μ l Vollblut wurden zugegeben und gemischt. Die Inkubationszeit betrug 3 Stunden. 10 μ l CD14 FITC antihuman CD14-Antikörper, wurden zur Phänotypisierung verwendet. 10 μ l PE antihuman IL-8 Antikörper und 10 μ l PE antihuman TNF- α Antikörper wurden zur Zytokinbestimmung benutzt. Leerwert und 10 μ l PE rat IgG_{2a} Isotypkontrolle wurden als Negativkontrollen verwendet. Es wurden die MFI [relative Einheiten], sowie der Anteil [%] der Interleukin positiven Zellen an den CD14⁺ Zellen registriert.

3.5.7 Einfluss von Noradrenalin auf die monozytäre Zytokinexpression bei verschiedenen LPS-Konzentrationen

Der Einfluss von Noradrenalin auf die IL-6, IL-8 und TNF- α Expression in Monozyten wurde bei maximalem und halbmaximalem LPS-Stimulus untersucht. 10 μ l BFA und 780 μ l RPMI wurden in einem 5 ml Polyethylenröhrchen vorgelegt und gemischt. 0,2 ng/ml LPS (ED₅₀), 1 ng/ml LPS (klinisch relevante Konzentration) und 10 ng/ml LPS (maximaler Stimulus) wurden dazu gegeben, sowie 10 μ M und 100 μ M Noradrenalin. Die Inkubationszeit betrug 3 Stunden. 10 μ l CD14 FITC antihuman CD14-Antikörper wurden zur Phänotypisierung verwendet. 10 μ l PE antihuman IL-6 Antikörper, 10 μ l PE antihuman IL-8 Antikörper und 10 μ l PE antihuman TNF- α Antikörper wurden zur Zytokinbestimmung benutzt. Leerwert und Isotypkontrolle wurden als Negativkontrollen verwendet. Es wurde der Anteil [%] Zytokin positiver Monozyten an der Gesamtzahl der Monozyten gemessen. Zur besseren Darstellung wurden die Ergebnisse als prozentualer Anteil der Interleukin positiven Monozyten ohne Noradrenalin dargestellt.

3.6 Datenanalyse

Es wurden 20.000 Zellen pro Messung registriert. FSC und SSC wurden in einem Streudiagramm dargestellt, um die Schwellenwerte für den FSC festzulegen. In einem weiteren Streudiagramm FSC vs Fluoreszenzkanal (FL)-1 (CD14-FITC) wurden die CD14 positiven Zellen mittels „Region of interest“ markiert, siehe Abbildung 6. Die CD14 positiven Zellen wurden in einem Histogramm für FL-2 (PE Interleukinfluoreszenz) dargestellt. Die Marker M1 und M2 zur Bestimmung der Interleukin positiven Monozyten wurden anhand der Isotypkontrollen in den Histogrammen gesetzt. In Abbildung 7 ist als Beispiel eine Auswertung für IL-6, IL-8

und TNF- α dargestellt. Die Gesamtzahl der CD14 positiven Zellen wurde erfasst, sowie der Anteil Interleukin positiver CD14⁺ Zellen als Anteil der gesamten Monozytenpopulation. Die MFI sowie der Median der Fluoreszenzintensität wurde registriert.

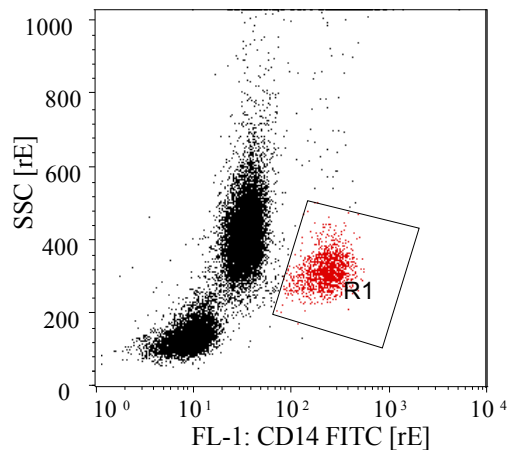


Abb. 6: Beispiel einer Markierung der Monozyten mittels „Region of interest“- Technik. R1 stellt die Population der CD 14⁺ Zellen dar.

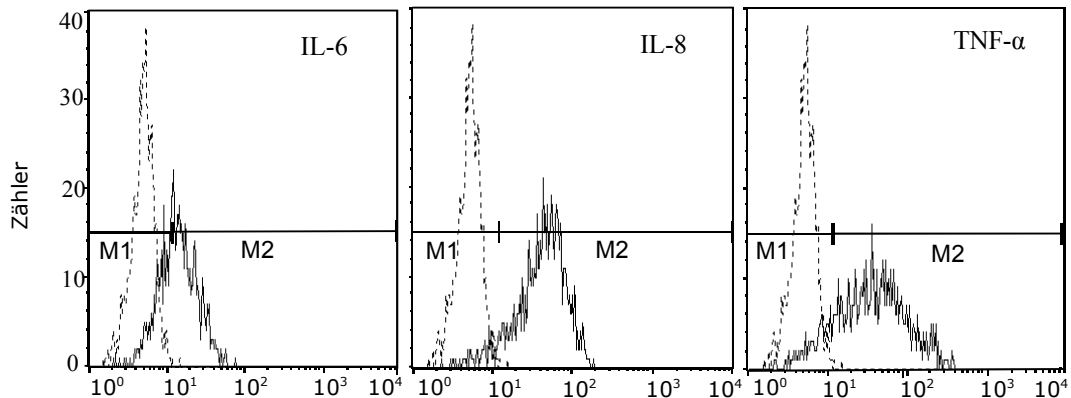


Abb. 7: Beispiel einer Auswertung der Zytokin positiven Zellen mittels Histogrammdarstellung. Gestrichelte Kurve stellt die Isotypkontrolle dar. Die Marker M1 und M2 wurden anhand der Isotypkontrolle festgelegt. Die durchgehende Linie zeigt die Zytokin positiven Monozyten. M1: Zytokin negative Zellen M2: Zytokin positive Zellen.

3.7 Datenverarbeitung und Statistik

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Werte wird das Datenanalyse und Datenvisualisierungs-Programm Origin® der Firma Originlab (Northampton, MA, USA) verwendet. Als statistisches Verfahren wird der studentisch gepaarte t-test genutzt, um die

Mittelwerte der Doppelbestimmungen miteinander zu vergleichen. Als signifikant unterschiedlich gilt ein p-Wert von $p < 0,05$ (*) und als hochsignifikant ein p-Wert von $p < 0,01$ (**). Die Daten sind als Mittelwert (mean) \pm Standardfehler des Mittelwertes (sem) angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Einführung

Da bereits die Kontrollmessungen bei der intrazellulären Zytokinmessung stark schwanken und die Expression infolge der Stimulation stark variiert, werden nicht nur die Absolutwerte miteinander verglichen, sondern teilweise Prozentwerte, bezogen auf einen Ausgangsmesswert.

4.2 Zeitkinetik der intrazellulären Zytokinproduktion

Interleukine folgen nach einer Stimulation von Zellen unterschiedlichen Expressionskinetiken. Diese Variabilität ist unter anderem abhängig vom untersuchten Zelltyp, vom Interleukin und vom eingesetzten Stimulus. In einem ersten Schritt sollte der ideale Zeitpunkt für weitere Untersuchungen bestimmt werden. In Abbildung 8 sind die Kinetiken von IL-6, IL-8 und TNF- α in Folge eines LPS-Stimulus [10 ng/ml] dargestellt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde die LPS-Konzentration aus Literaturdaten gewählt [49]. Der Anteil der Zytokin-positiver CD14⁺ wurde nach 45 Minuten 1,5; 3; 6 und 12 Stunden bestimmt.

a) TNF- α Kinetik

TNF- α ⁺ Zellen waren als erste nach 45 min signifikant nachweisbar ($14,09 \pm 5,75$ % ($p < 0,05$)). Das Maximum des Anteils TNF- α ⁺ Zellen mit $64,52 \pm 5,85$ % der CD14⁺ Zellen war nach 3 Stunden erreicht. Im weiteren Verlauf blieb der Anteil TNF- α ⁺ Zellen bis zum 6-Stunden-Wert auf einem vergleichbaren Niveau. Nach 12 Stunden nahm der Anteil der TNF- α ⁺ Zellen wieder signifikant ab ($p < 0,01$).

b) IL-8 Kinetik

IL-8⁺ Zellen waren erst nach 1,5 Stunden nachweisbar und überstiegen im Verlauf die TNF- α ⁺ Zellen nach 3 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt waren $84,39 \pm 3,06$ % CD14⁺ Zellen positiv für IL-8. Im weiteren Verlauf fiel der Anteil IL-8⁺ Zellen bis zum Zeitpunkt von 12 Stunden auf $68,4 \pm 10,8$ % ab. Der Anteil IL-8⁺ Monozyten war jedoch im Vergleich zum Anteil der IL-6⁺ und TNF- α ⁺ immer am höchsten.

c) IL-6 Kinetik

Der Anstieg IL-6⁺ Zellen fand verzögert statt. Erst nach 3 Stunden war dieser mit einem Wert von $45,74 \pm 11,8$ % positiver Zellen signifikant. Der Anteil der IL-6⁺ Zellen nahm bis zu einem Spitzenwert von $72,67 \pm 8,59$ % nach 6 Stunden zu, um nach 12 Stunden auf $39,74 \pm 13,07$ % ($p < 0,01$) abzufallen.

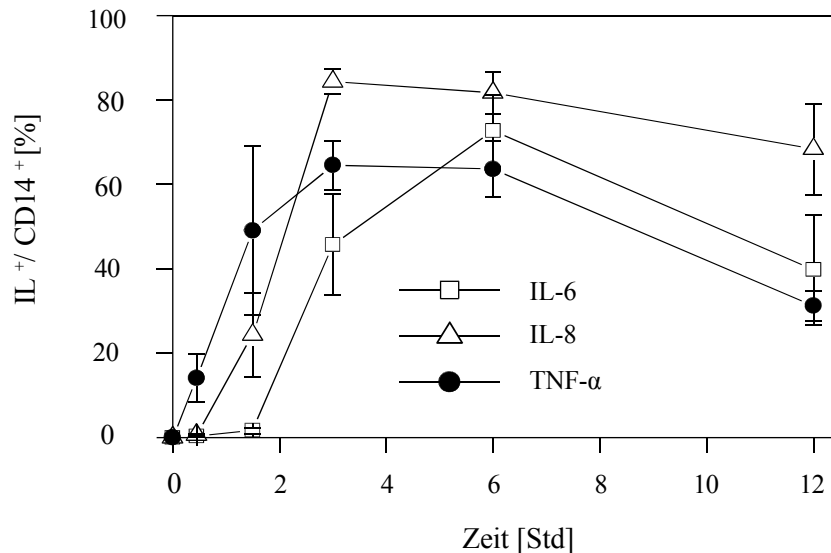


Abb. 8: Die Abbildung zeigt die Kinetik der intrazellulären Zytokinexpression von IL-6, IL-8 und TNF- α in Monozyten. Vollblut wurde mit Lipopolysaccharid (LPS) (10 ng/ml) für 45 Minuten, 1,5; 3; 6 und 12 Stunden, stimuliert. Die dargestellten Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm sem, der Interleukin positiven Monozyten (%).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden für weitere Untersuchungen Stimulationszeiträume von 3 bzw. 6 Stunden gewählt.

4.3 Dosis-Wirkungs-Beziehung von LPS und IL-8/TNF- α

Zur Bestimmung der ED₅₀ für LPS wurden die Anzahl TNF- α bzw. IL-8 positiver Zellen nach Stimulation mit LPS in einem Konzentrationsbereich von 0,001 bis 100 ng/ml untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt. Beide Zytokine folgten der gleichen Dosis-Wirkungs-Beziehung. Die IL-8 Expression nahm ab einer LPS-Konzentration von 1×10^{-2} ng/ml und die TNF- α Expression ab 3×10^{-2} ng/ml signifikant zu ($p < 0,05$). Mit weiterer Zunahme der LPS-Konzentrationen nahm auch der Anteil der IL⁺-Zellen stetig zu. Oberhalb einer Konzentration von 1 ng/ml erreichte die Stimulation ein Maximum.

Die ED₅₀ war mit 0,02 ng/ml LPS für beide Zytokine vergleichbar. Weitere Untersuchungen wurden mit 1 ng/ml LPS durchgeführt, um einerseits einen maximalen Stimulationserfolg zu erreichen und andererseits eine Überstimulation zu vermeiden.

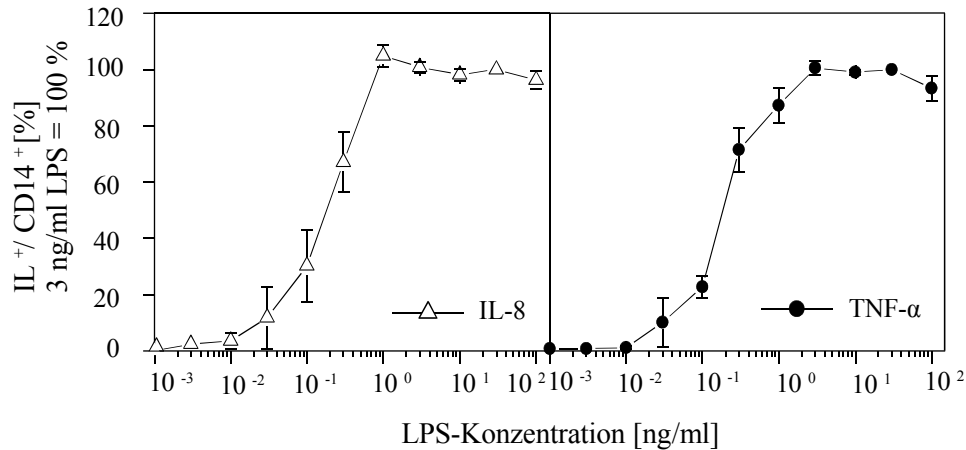


Abb. 9: Die Abbildung zeigt die Dosis-Wirkungskurve von Lipopolysaccharid (LPS) und IL-8/TNF- α . Vollblut wurde für 3 Stunden mit LPS-Konzentrationen von 1×10^{-3} bis 1×10^2 ng/ml stimuliert. Die dargestellten Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm sem, der Interleukin positiven Monozyten (%). Der Stimulationserfolg bei 3 ng/ml LPS wurde als 100 % gesetzt.

4.4 Adrenalin- und Noradrenalineinfluss auf die Zytokinexpression von Monozyten

a) Einfluss von Adrenalin und Noradrenalin ohne LPS-Stimulation

Adrenalin und Noradrenalin zeigten ohne LPS-Stimulation keinen Einfluss auf die intrazelluläre Zytokinexpression. Es wurden hierfür beide Katecholamine in Konzentrationen von 10 μ M und 100 μ M untersucht. Der Anteil von IL-6⁺, IL-8⁺ und TNF- α ⁺ Monozyten blieb unverändert. Ebenso zeigten die MFI-Werte, sowie der Median der Fluoreszenz keine Unterschiede zu den Negativkontrollen. Als Negativkontrolle wurde unstimuliertes Vollblut ohne Katecholamin verwendet. Diese Daten sind nicht dargestellt.

b) Vorinkubation für 15 Minuten mit Adrenalin und Noradrenalin

Um zu testen, ob eine Vorinkubation der Zellen für die Katecholaminwirkung notwendig ist und zu einer erhöhten Inhibition führt, wurde das Vollblut vor LPS Stimulation für 15 Minuten vorbehandelt. In Tabelle 3 und Tabelle 4 ist zu erkennen,

dass die Vorinkubation 15 min vor LPS Gabe mit 10 μ M bzw. 100 μ M Adrenalin und Noradrenalin keinen verstärkt hemmenden Effekt auf die intrazelluläre Zytokinexpression der CD14⁺ Zellen im Vergleich zu einer Gabe direkt vor oder nach der LPS-Gabe, hatte. Auch die Variation der Gabe von Katecholaminen direkt vor und direkt nach dem LPS-Stimulus zeigte keinen Unterschied auf den Anteil der IL-6⁺, der IL-8⁺ und der TNF- α ⁺ Zellen.

c) Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin auf die LPS-Stimulation von Monozyten (3 Stunden-Werte)

Nach Stimulation mit 10 ng/ml LPS für 3 Stunden zeigte sich eine signifikante Abnahme des Anteils der IL-6⁺ Zellen ($p < 0,05$) durch 10 μ M Adrenalin bzw. Noradrenalin. Ebenso reduzierten sich die MFI. Der Anteil IL-6⁺ Zellen wurde, bezogen auf den LPS Stimulationswert ohne Katecholamin, durch Adrenalin und Noradrenalin um 12,9 % reduziert. Die Abnahme der MFI betrug 15,1 %. Es ließ sich kein Unterschied hinsichtlich des hemmenden Einflusses auf die IL-6 Expression der CD14⁺ Zellen zwischen Adrenalin und Noradrenalin nachweisen.

Der Anteil IL-8⁺ Zellen wurde weder durch Adrenalin 10 μ M noch durch Noradrenalin 10 μ M signifikant beeinflusst. Auch die MFI veränderten sich durch den Katecholamineinfluss nicht signifikant.

TNF- α ist das am stärksten gehemmte Zytokin. 10 μ M Adrenalin bzw. Noradrenalin zeigten einen hochsignifikanten hemmenden Effekt auf den Anteil TNF- α ⁺ Zellen. Die MFI wurde ebenso gehemmt. Die Abnahme des Anteils TNF- α ⁺ positiver Zellen um 24,4 % war signifikant ($p < 0,05$) geringer als die Abnahme der MFI um 41 %.

Tab. 3: Einfluss von Adrenalin und Noradrenalin 10 µM zu unterschiedlichen Zeitpunkten (%)

	Adr	Adr	Adr	Nor	Nor	Nor
LPS	IL-6 [%]	IL-8 [%]	TNF-α [%]	IL-6 [%]	IL-8 [%]	TNF-α [%]
Ohne LPS	80,77 ± 1,65	91,22 ± 2,69	89,76 ± 1,95	80,77 ± 1,65	91,22 ± 2,69	89,76 ± 1,95
15 min Vor	66,57 ± 3,58 **	93,14 ± 2,42	61,30 ± 3,86 *	64,67 ± 4,25**	94,17 ± 1,53	55,98 ± 9,65 *
Kat. vor LPS	71,66 ± 1,62 **	93,61 ± 0,99	64,86 ± 4,49 *	69,48 ± 1,84 **	92,89 ± 1,64	63,11 ± 3,28 *
Kat. nach LPS	70,36 ± 1,16 **	93,17 ± 1,89	67,86 ± 4,14 *	66,66 ± 3,48 **	94,34 ± 1,56	67,27 ± 4,05 *

Tab. 3: Anteil der Zytokin positiven Zellen am Anteil der CD14⁺ nach Stimulation für 3 Std mit 10 ng/ml LPS unter dem Einfluss von 10 µM Adrenalin und 10 µM Noradrenalin. Vollblut wurde mit Adrenalin und Noradrenalin 10µM 15 min vor LPS Stimulus (Vorinkubation), direkt vor LPS Stimulus und nach LPS Stimulus inkubiert. Daten stellen Mittelwert ± sem dar. Signifikant unterschiedliche Werte (LPS vs LPS + Katecholamin) gekennzeichnet: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; Adr = Adrenalin; Nor = Noradrenalin.

Tab. 4: Einfluss von Adrenalin und Noradrenalin 10 µM zu unterschiedlichen Zeitpunkten (MFI)

	Adr	Adr	Adr	Nor	Nor	Nor
LPS	IL-6 [rE]	IL-8 [rE]	TNF-α [rE]	IL-6 [rE]	IL-8 [rE]	TNF-α [rE]
Ohne LPS	19,15 ± 0,32	28,47 ± 2,49	43,75 ± 6,90	19,15 ± 0,32	28,47 ± 2,49	43,75 ± 6,90
15 min Vor	15,62 ± 0,68 *	29,09 ± 1,85	19,41 ± 1,40 *	15,00 ± 0,55 *	30,20 ± 2,07	24,39 ± 7,02 *
Kat. vor LPS	16,04 ± 0,08 *	30,38 ± 2,16	25,50 ± 1,66 *	16,01 ± 0,16 *	30,03 ± 2,25	24,35 ± 1,65 *
Kat. nach LPS	16,26 ± 0,34 *	30,40 ± 2,52	26,09 ± 1,22 *	15,72 ± 0,78 *	30,77 ± 1,82	25,52 ± 2,53 *

Tab. 4: Dargestellt ist die Mean fluorescence intensity (MFI) der CD14⁺ Zellen nach Stimulation für 3 Std mit 10 ng/ml LPS unter Einfluss von 10 µM Adrenalin und 10 µM Noradrenalin. Vollblut wurde mit Adrenalin und Noradrenalin 10 µM 15 min vor LPS Stimulus (Vorinkubation), direkt vor LPS Stimulus und nach LPS Stimulus inkubiert. Daten stellen Mittelwerte ± sem dar. Signifikant unterschiedliche Werte (LPS vs LPS + Katecholamin) gekennzeichnet: * = p < 0,05; Adr = Adrenalin; Nor = Noradrenalin.

d) Einfluss von 10 μM und 100 μM Adrenalin und Noradrenalin (6 Stunden-Werte)

Nach Stimulation für 6 Stunden mit LPS und einer Behandlung mit 10 μM bzw. 100 μM Adrenalin, war lediglich noch eine tendenzielle Reduktion des Stimulationserfolges mit IL-6 nachweisbar ($p > 0,05$). Die Werte der MFI unterstützen die Annahme einer hemmenden Tendenz für Adrenalin. 10 μM Adrenalin induzierte eine signifikante Abnahme ($p < 0,05$) der IL-6 MFI. 100 μM Adrenalin zeigte eine nicht signifikanten Effekt. Für Noradrenalin war die Abnahme der IL-6⁺ Zellen und die Abnahme der MFI vergleichbar. 100 μM Noradrenalin zeigte eine signifikante ($p < 0,05$) Abnahme der IL-6⁺ Zellen und der MFI. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem hemmenden Einfluss von Adrenalin und Noradrenalin auf die IL-6 Expression in Monozyten gefunden werden.

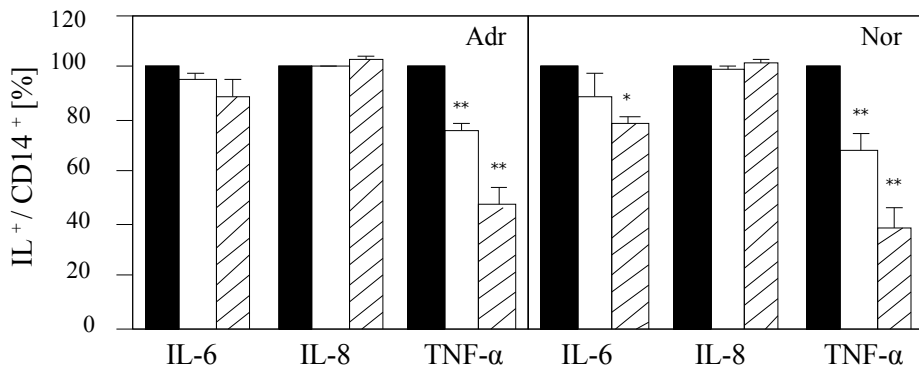


Abb. 10: Die Abbildung zeigt den Effekt von Adrenalin (Adr) und Noradrenalin (Nor) auf die intrazelluläre IL-6, IL-8 und TNF- α Expression in CD14⁺ Monozyten nach 6 stündiger Stimulation mit LPS (10 ng/ml). Schwarze Balken zeigen die LPS-Kontrolle (ohne Katecholamin). Die weißen Balken zeigen den Einfluss von Adr und Nor 10 μM . Schraffierte Balken zeigen den Einfluss von 100 μM Adr und Nor. Die dargestellten Werte sind der Mittelwert \pm sem des Anteils IL-positiver (IL⁺) Monozyten [%]. Die LPS-Kontrolle wurde als 100 % gesetzt. Signifikant unterschiedliche Werte (LPS-Kontrolle vs LPS+Katecholamin): * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Weder Adrenalin noch Noradrenalin hatten nach 6 Stunden Stimulation einen Einfluss auf die Zahl IL-8⁺ Monozyten. Die MFI zeigte bei niedrigen Katecholaminkonzentrationen eine tendenzielle Hemmung bzw. bei hohen Konzentrationen eine tendenzielle Induktion der IL-8 Expression.

TNF- α war das Zytokin, welches wieder konzentrationsabhängig am stärksten auf Katecholamingabe reagierte. Der Anteil der TNF- α ⁺ Monozyten wurde durch 10 μM Noradrenalin auf $68,13 \pm 5,93$ % und durch 100 μM Noradrenalin auf $39,05 \pm 7,52$ %

signifikant ($p < 0,01$) gesenkt. Adrenalin zeigte einen vergleichbaren Effekt (Reduktion von 100 % auf $75,4 \pm 3,33$ % (10 μM), sowie auf $46,77 \pm 7,05$ % (100 μM)). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Adrenalin und Noradrenalin in Bezug auf den $\text{TNF-}\alpha^+$ Zellanteil der CD14^+ Zellen gefunden. Die MFI für $\text{TNF-}\alpha$ wurden ebenfalls konzentrationsabhängig hoch signifikant gehemmt ($p < 0,01$).

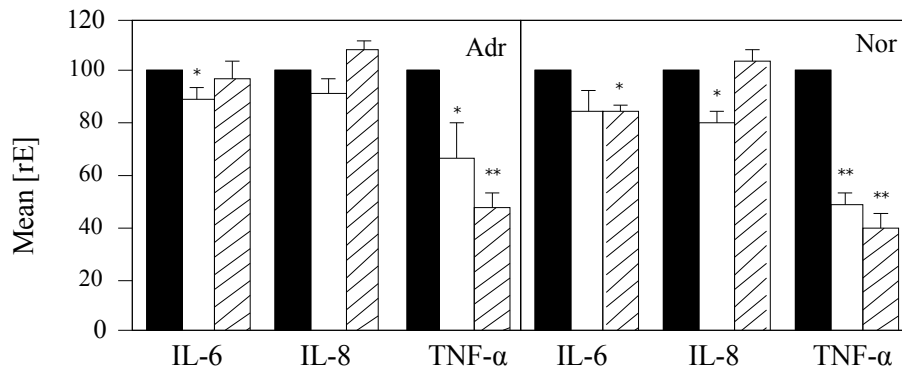


Abb. 11: Die Abbildung zeigt den Effekt von Adrenalin (Adr) und Noradrenalin (Nor) auf die intrazelluläre IL-6, IL-8 und $\text{TNF-}\alpha$ Expression in CD14^+ Monozyten nach 6 stündiger Stimulation mit LPS (10 ng/ml). Schwarze Balken zeigen die LPS-Kontrolle (ohne Katecholamin). Die weißen Balken zeigen den Einfluss von Adr und Nor 10 μM . Schraffierte Balken zeigen den Einfluss von 100 μM Adr und Nor. Die dargestellten Werte sind der Mittelwert \pm sem der mittleren Fluoreszenz [rE] der IL-positiven (IL^+) Monozyten (%). Die LPS-Kontrolle wurde als 100 % gesetzt. Signifikant unterschiedliche Werte (LPS-Kontrolle vs LPS+Katecholamin): * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

e) Einfluss von Adrenalin und Noradrenalin auf die Kinetik der Zytokinepression

In der gesamten Stimulationszeit von 45 Minuten bis 6 Stunden mit 1 ng/ml LPS war kein Unterschied in der Inhibition durch Adrenalin (10 μM) und Noradrenalin (10 μM) nachweisbar. Der hemmende Einfluss war für beide Interleukine nach einer Stimulationszeit von 3 Stunden am größten. Zu diesem Zeitpunkt war eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der IL-6^+ Monozyten von $77,95 \pm 1,73$ % (Kontrolle) auf $67,54 \pm 1,36$ % (Adrenalin), sowie auf $63,85 \pm 4,07$ % (Noradrenalin) nachweisbar.

Wie bereits oben beschrieben wurde, ist die Induktion von IL-8 durch LPS von keinem der beiden Katecholaminen beeinflusst.

Die Zahl $\text{TNF-}\alpha^+$ Zellen war bereits nach 45 Minuten signifikant von $12,44 \pm 3,93$ % $\text{TNF-}\alpha^+$ (Kontrolle) durch Adrenalin (10 μM) auf $7,65 \pm 2,12$ % $\text{TNF-}\alpha^+$ und durch Noradrenalin (10 μM) auf $6,34 \pm 1,83$ % $\text{TNF-}\alpha^+$ ($p < 0,05$) reduziert. Nach 1,5 Stun-

den Stimulation war der inhibierende Effekt der Katecholaminwirkung maximal. Die TNF- α^+ Monozyten zeigten eine Abnahme von $52,27 \pm 16,53$ % (Kontrolle) auf $16,58 \pm 4,79$ % (Adrenalin) bzw. $18,69 \pm 5,18$ % (Noradrenalin) ($p < 0,01$). Nach 3 und 6 Stunden war die Inhibition nicht mehr so stark ausgeprägt wie nach 1,5 Stunden Stimulationszeit. Nach 3 Stunden zeigte sich eine relative Abnahme der TNF- α^+ Zellen von 21,06 % für Adrenalin und 21,78 % für Noradrenalin. Nach 6 Stunden zeigten Adrenalin und Noradrenalin eine stärkere relative Abnahme der TNF- α^+ Zellen um 25,39 % und 31,88 %. Die Unterschiede zwischen den Katecholaminen waren nicht signifikant.

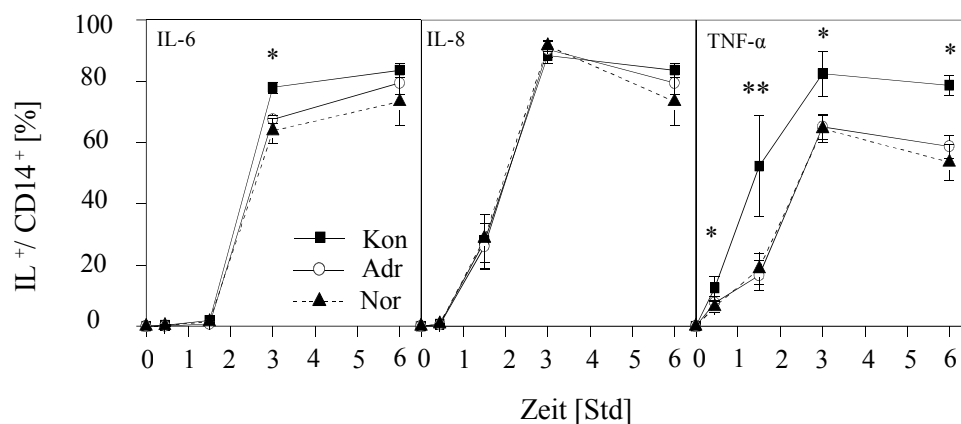


Abb. 12: Die Abbildung zeigt den Einfluss von Adrenalin (Adr) und Noradrenalin (Nor) auf die IL-6-, IL-8-, und TNF- α -Expression von mit LPS (1 ng/ml) stimulierten Monozyten. Die dargestellten Werte entsprechen dem Mittelwert \pm sem des Anteils der Interleukin positiven Monozyten [%]. Signifikant unterschiedliche Werte (LPS ohne Katecholamin vs LPS+Katecholamin): * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

4.5 Vergleich der Wirkung von Noradrenalin und Dopexamin

In einem weiteren Ansatz wurde Dopexamin mit dem Katecholamin Noradrenalin verglichen. Auf Adrenalin wurde verzichtet, da die bisherigen Ergebnisse keine Unterschiede zu Noradrenalin zeigten. Die IL-8 Expression wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,01 μ M bis 100 μ M Noradrenalin und Dopexamin, hinsichtlich des Anteils IL-8 $^+$ Zellen an der Population der Monozyten, nicht signifikant beeinflusst. Bei hohen Konzentrationen fällt der Anteil IL-8 $^+$ Zellen von $81,18 \pm 2,4$ % (30 μ M Noradrenalin) auf $74,12 \pm 2,62$ % (100 μ M Noradrenalin) und $48,38 \pm 3,38$ % (300 μ M Noradrenalin) ab. Dopexamin zeigt auch bei diesen Konzentrationen keine Wirkung.

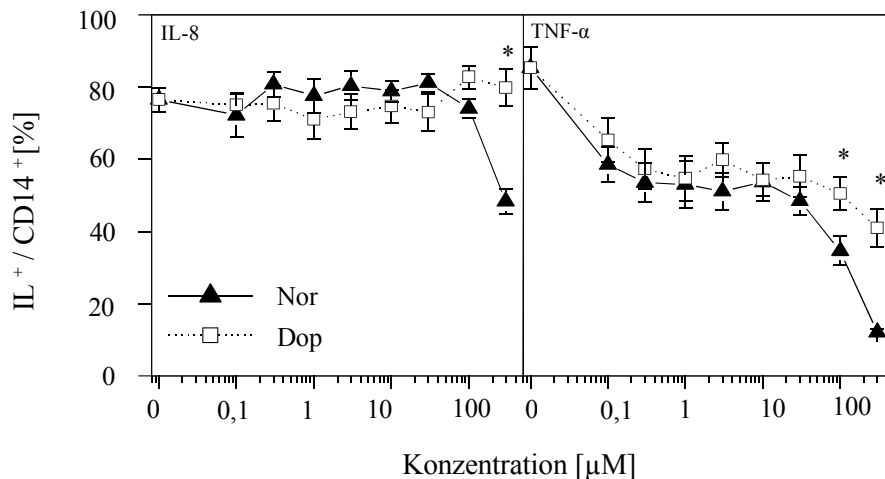


Abb. 13: Der Einfluss von Dopexamin (Dop) und Noradrenalin (Nor) auf die IL-8 und TNF- α -Expression von LPS (1 ng/ml) stimulierten Monozyten ist in Abb. 13 dargestellt. Dop und Nor wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,1-300 μ M eingesetzt. Es sind die Mittelwerte \pm sem, des Anteils Interleukin positiver Monozyten [%] dargestellt. Signifikante Unterschiede (Nor vs Dop): * = $p < 0,05$.

Bis zu einer Konzentration von 30 μ M gibt es keine signifikanten Unterschiede beim MFI zwischen Noradrenalin und Dopexamin. Dopexamin führte bei hohen Konzentrationen zu einem tendenziellen ($p < 0,07$) Anstieg der IL-8 MFI. Noradrenalin zeigte dagegen einen signifikanten Abfall der IL-8 MFI von $24,63 \pm 1,36$ [rE] (30 μ M Noradrenalin) auf $20,73 \pm 1,17$ [rE] (100 μ M Noradrenalin) und auf $14,51 \pm 0,51$ [rE] (300 μ M Noradrenalin). Der Einfluss von Noradrenalin und Dopexamin auf die MFI war im Konzentrationsbereich von 100 μ M bis 300 μ M signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$).

Der Anteil der TNF- α^+ Zellen nahm unter dem Einfluss von Noradrenalin und Dopexamin in einem Konzentrationsbereich von 0,01 μ M bis 30 μ M ab. Es liessen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. 0,01 μ M Noradrenalin sowie 0,01 μ M Dopexamin hemmen bereits den Anteil TNF- α^+ Zellen hoch signifikant ($p < 0,01$). Bis zu einer Konzentration der Katecholamine von 100 μ M nahm der hemmende Einfluss weiter zu. Die MFI verhielt sich vergleichbar dem Anteil der TNF- α^+ Zellen. Bei 100 μ M und 300 μ M Noradrenalin und Dopexamin, hemmte Noradrenalin den Anteil TNF- α^+ Zellen signifikant mehr im Vergleich zu Dopexamin. Die MFI der TNF- α^+ Zellen zeigte bei einer Konzentration von 300 μ M Noradrenalin und Dopexamin einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$).

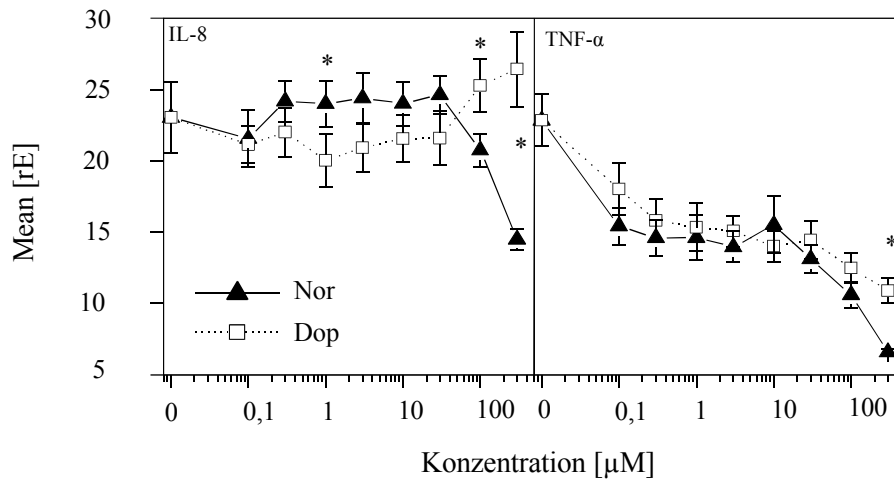


Abb. 14: Der Einfluss von Dopexamin (Dop) und Noradrenalin (Nor) auf die IL-8 und TNF- α -Expression von LPS (1 ng/ml) stimulierten Monozyten ist in Abb. 14 dargestellt. Dop und Nor wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,1-300 μ M eingesetzt. Es sind die Mittelwerte \pm sem, der MFI [rE] dargestellt. Signifikante Unterschiede (Nor vs Dop): *= p < 0,05.

4.6 Einfluss von Noradrenalin bei unterschiedlichen LPS-Konzentrationen

In Abbildung 15 ist der Einfluss von 10 μ M und 100 μ M Noradrenalin über 3 Stunden bei halbmaximaler Stimulation (0,2 ng/ml LPS), klinischer LPS-Konzentration (1 ng/ml LPS) und voll maximaler Stimulation (10 ng/ml LPS) dargestellt.

Der Anteil IL-6⁺ Monozyten zeigte eine konzentrationsabhängige Abnahme für 10 μ M Noradrenalin von 100 % \pm 0 (Kontrolle) um 24,93 % (10 ng/ml LPS), um 32,77 % (1 ng/ml LPS) sowie um 58,25 % (0,2 ng/ml LPS). Bei einer Konzentration von 10 ng/ml LPS war der Effekt signifikant (p < 0,05). Für 1 ng/ml LPS und 0,2 ng/ml LPS war der Effekt hoch signifikant (p < 0,01). Der hemmende Einfluss von 100 μ M Noradrenalin war gegenüber dem Einfluss von 10 μ M Noradrenalin signifikant stärker ausgeprägt (p < 0,05). Der Unterschied zwischen 1 ng/ml LPS und 0,2 ng/ml LPS war für beide Noradrenalin Konzentrationen signifikant.

Nach einer Stimulation mit 10 μ M Noradrenalin zeigte der Anteil der IL-8⁺ Monozyten keine signifikante Veränderung für die verschiedenen LPS-Konzentrationen. 100 μ M Noradrenalin hemmten den Anteil IL-8⁺ Monozyten signifikant bei niedrigen LPS-Konzentrationen. Bei einer LPS-Konzentration von 10 ng/ml zeigte sich eine tendenzielle nicht signifikante Abnahme des Anteils der IL-8⁺ Monozyten von 100 % auf 93,33 \pm 2,04 %. Eine signifikante Hemmung fand sich bei 1 ng/ml LPS von 100 % \pm 0 auf 83,96 \pm 3,44 % (p < 0,05) und bei 0,2 ng/ml auf 43,11 \pm 3,34 % (p < 0,01).

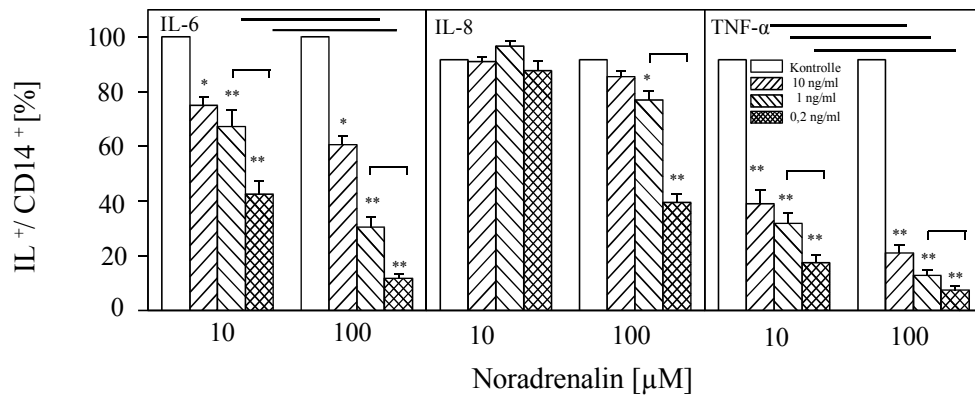


Abb. 15: Die Abbildung zeigt den Vergleich des Einflusses von 10 μM vs 100 μM Noradrenalin (Nor) auf die IL-6, IL-8 und TNF-α Expression von Monozyten, welche mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen (0,2 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml) stimuliert wurden. Die dargestellten Werte entsprechen dem Mittelwert ± sem, des Anteils Interleukin positiver Monozyten an der gesamten Monozytenpopulation [%]. LPS-Stimulation ohne Katecholamineinfluss wurde als 100 % gesetzt. Signifikante Unterschiede (10 vs 100 μM Nor): breite schwarze Striche = $p < 0,05$. Signifikante Unterschiede (LPS ohne Katecholamin vs LPS mit Katecholamin): * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. Signifikanter Unterschied (LPS 1 ng/ml vs LPS 0,2 ng/ml): Klammern = $p < 0,05$.

10 μM Noradrenalin zeigten nach 3 Stunden Stimulation auf den Anteil der TNF-α⁺ Zellen einen hemmenden Einfluss. Die hemmende Wirkung nahm mit sinkender LPS-Konzentration zu. 10 ng/ml LPS reduzierten den Anteil TNF-α⁺ Monozyten hoch signifikant auf $42,70 \pm 5,27$ % ($p < 0,01$). Bei einer Stimulation mit 1 ng/ml LPS findet sich ein Anteil von $34,80 \pm 4,02$ % TNF-α⁺ ($p < 0,01$) Monozyten. Der hemmende Effekt von 10 μM Noradrenalin war bei niedrigen LPS-Konzentrationen am ausgeprägtesten. Eine maximale Abnahme um 80,98 % fand sich somit bei einer LPS-Konzentration von 0,2 ng/ml. Eine Konzentration von 100 μM Noradrenalin reduzierte die TNF-α⁺ Zellen von 100 % signifikant auf $22,93 \pm 3,06$ % (LPS 10 ng/ml), auf $13,73 \pm 1,83$ LPS (1 ng/ml), sowie auf $8,43 \pm 1,61$ % (LPS 0,2 ng/ml) ($p < 0,01$). Der Unterschied zwischen 1 ng/ml LPS und 0,2 ng/ml LPS war für beide Noradrenalin-Konzentrationen signifikant. Der hemmende Einfluss von 100 μM Noradrenalin war gegenüber dem Einfluss von 10 μM Noradrenalin signifikant stärker ausgeprägt ($p < 0,05$).

5 Diskussion

5.1 Methodenkritik

Es gibt eine Vielzahl an schwer erfassbaren Einflüssen, die Monozyten aktivieren und damit die Produktion von Zytokinen beeinflussen können. Zum Teil sind dies physiologische Einflussgrößen wie vorausgegangene Stressreaktionen, Übermüdung, Ernährung, Alkoholkonsum und weitere, die teilweise schwer zu kontrollieren sind. Da Blutproben von klinisch gesunden Probanden benutzt wurden, ist zumindest von einem Einfluss schwerwiegender Krankheiten, die zu einer deutlichen Beeinflussung des Immunsystems führen können, nicht auszugehen.

Um Lagerungsartefakte zu vermeiden, wurden die gewonnenen Vollblutproben bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert und innerhalb einer Stunde verwendet. Der Kontakt mit Fremdmaterialien kann zu einer Kontaktaktivierung von Leukozyten führen. Durch Adhärenz an Oberflächen können Monozyten für Analysen verloren gehen. In den vorliegenden Untersuchungen war der Anteil von CD14⁺ Zellen an der Gesamtzellzahl für alle verwendeten Stimulationszeiten jedoch unverändert.

Eine Kontamination mit Erregern kann eine Aktivierung der untersuchten Zellen und damit Einfluss auf die Produktion der gemessenen Zytokine zur Folge haben. Um dies zu verhindern, wurde unter einer Sterilbank gearbeitet. Von einer Antibiotikazusatzung in die Kulturmedien wurde abgesehen, da Hinweise über eine Beeinflussung der Zytokinproduktion durch Antibiotika bestehen [16].

Die Bestimmung von Zytokinen und die Untersuchung von Einflüssen auf die Zytokinproduktion ist schwierig, da die Zytokinproduktion ein sehr dynamischer Prozess ist, welcher vielen Einflussfaktoren unterliegt. Um die Fehlerbreite von Einzelmessungen gering zu halten, wurden die Messwerte jeweils doppelt bestimmt und der Mittelwert beider Messungen verwendet.

Ein weiteres Problem bei der FACS-Analyse ist, dass mit der üblichen Angabe, des prozentualen Anteils positiver Zellen eine qualitative Aussage über den Anteil zytokinpositiver Zellen möglich ist, jedoch keine quantitative Aussage über die Menge an produzierten Zytokinen getroffen werden kann. Auch die MFI ist lediglich ein qualitatives Mass für die Zytokinexpression pro Zelle, die aber zumindest einen Hinweis auf die Menge des exprimierten Zytokins gibt.

5.2 Methodenvergleich

In den letzten 20 Jahren der immunologischen Forschung sind Zytokine immer mehr in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses gerückt. Zytokine können mittels verschiedener Messverfahren wie dem enzyme linked immunosorbant assay (ELISA), radio immuno assay (RIA), messenger (m)RNA, Westernblot-Technik und FACS bestimmt werden. Alle Verfahren bieten individuelle Vor- und Nachteile und geben die Möglichkeit, verschiedene Funktionen der immunkompetenten Zellen zu untersuchen.

Die überwiegende Zahl an Studien hat den Einfluss von Katecholaminen auf Monozytenaktivierung und Zytokinexpression mittels ELISA bestimmt. Mit dieser Methode kann in einem Vollblutsystem nur ein Durchschnittswert aller Zellen im Überstand gemessen werden. Um die spezifische Produktion von einem einzelnen Zelltyp wie z.B. den Monozyten zu untersuchen, ist man mit ELISA auf reine Monozytenkulturen und damit auf eine vorherige Isolierung angewiesen. Damit geht jedoch der mögliche Einfluss von wichtigen Kofaktoren verloren. Weiterhin führt eine Isolierung in den meisten Fällen bereits zu einer zusätzlichen Aktivierung der Monozyten.

Die Bestimmung der mRNA mittels reverse transkriptase (RT)-PCR ist eine weitere Möglichkeit, den Effekt von immunmodulatorischen Substanzen zu untersuchen. Sie birgt das Problem, dass mögliche posttranskriptionelle Veränderungen des Proteoms unberücksichtigt bleiben. Die quantitative Bestimmung der mRNA gibt zwar einen Hinweis auf die Transkriptionsaktivität eines Gens, bietet jedoch nicht die Möglichkeit, eine Aussage auf die „wahre“ Expression eines Proteins zu geben. Ebenso besteht wie bei dem ELISA das Problem, dass die Zellpopulationen vorher isoliert werden müssen.

Die Westernblot-Technik erlaubt die Messung der Expression von Proteinen in Lysaten. Nachteil dieser Technik ist, dass sie wie die ELISA nur den Durchschnitt einer Probe wiedergeben kann.

Die intrazelluläre Durchflusszytometrie gestattet dagegen die individuelle Untersuchung großer Zellpopulationen auf Basis einzelner Zellen [57]. Die Mehrfarben-FACS-Analyse erlaubt als einzige Methode die Identifizierung von gewünschten Zellpopulationen in heterogenen Suspensionen (Vollblut) [41, 52]. Dies vermindert wiederum eine mögliche Alteration der Ergebnisse durch weitere Arbeitsschritte zur Isolierung der Zellen. Mittels intrazellulärer FACS-Analyse und Blockierung des Golgiapparates können auch sekretorische Proteine analysiert werden.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die mittels FACS gewonnen Ergebnisse vergleichbar mit den Ergebnissen aus publizierten Untersuchungen mit ELISA und anderen Methoden sind.

5.3 Zeitkinetik der intrazellulären Zytokinexpression

In den vorliegenden Ausführungen wurde die Kinetik der Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α nach Stimulation von Monozyten im Vollblut mit LPS bestimmt. Die Kenntnis der Kinetik war Grundvoraussetzung für alle folgenden Versuche.

Ein signifikanter Anstieg der TNF- α Expression war bereits nach 45 Minuten zu beobachten (siehe Abb. 8). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Beobachtungen der Arbeit von Kwak et al., in der die Zytokinexpression ebenso mit intrazellulärer Durchflusszytometrie gemessen wurde [41]. Kwak et al. beobachteten, dass TNF- α und IL-6 erst nach 2 Stunden eine tendenzielle Zunahme der Expression zeigten. Nach 4 Stunden konnte erst ein signifikanter Anstieg beobachtet werden. IL-8 zeigte überhaupt erst nach 4 Stunden einen signifikanten Anstieg auf sein Expressionsmaximum. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen bereits früher einen Anstieg der Zytokinexpression für alle untersuchten Zytokine.

Ein weiterer Unterschied zu der genannten Arbeit ist, dass die maximale Expression von IL-6, IL-8 und TNF- α bereits nach vier Stunden erreicht wurde. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass TNF- α sein Expressionsmaximum bereits nach drei Stunden erreicht. Die Expression von IL-6 und IL-8 erfolgte zeitverzögert, was die Rolle von TNF- α als primäres Zytokin unterstreicht. Das Expressionsmaximum von IL-6 war nach sechs Stunden und von IL-8 von drei bis sechs Stunden zu beobachten.

Für diese Unterschiede zur Arbeit von Kwak et al. kann es verschiedene Erklärungen geben: Zum Einen verwendete Kwak et al. einen unterschiedlichen LPS Serotyp und zum Anderen eine hundertfach höhere LPS-Konzentrationen (1 $\mu\text{g/ml}$) im Vergleich zur vorliegenden Arbeit (10 ng/ml). In den Ansätzen dieser Arbeit war bei einer Stimulation mit ca. 1 ng/ml LPS bereits das Maximum der Zytokinexpression erreicht. Diese entsprechen den von Van Deventer et al. in septischen Patienten gemessenen Konzentrationen von 1 ng/ml LPS [83]. Daher wurden die Versuche in der vorliegenden Arbeit bewusst bei physiologischen Konzentrationen durchgeführt. Ein weiterer Unterschied war, dass Kwak et al. mittels Dichte-Gradienten-Zentrifugation isolierte Monozyten benutzten. Dies führt im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit verwendeten Vollblutmodell zum Verlust von wichtigen Kofaktoren [51].

Lin et al. untersuchten die proinflammatorische Zytokinexpression *in vivo* mittels ELISA-Technik [43]. Fünf gesunden Probanden wurden 2 ng/ml LPS als Bolusinjektion verabreicht und die Expression von IL-6, IL-8 und TNF- α im Vollblutüberstand gemessen. Es zeigte sich die gleiche Expressionssequenz wie in dieser Arbeit. Für TNF- α wurde als frühes Zytokin ein Expressionsmaximum nach 1,5 Stunden gefunden. Es folgten zeitverzögert IL-6 und IL-8, wobei im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit IL-8 deutlich weniger exprimiert wurde. In der vorliegenden Untersuchung wurde IL-8 von nahezu allen Monozyten am stärksten exprimiert (gemessen an %-positiven Zellen, wie auch an der MFI). Diese Unterschiede könnten dadurch bedingt sein, dass Lin et al. nicht spezifisch Monozyten in ihrem Vollblutsystem untersuchten. Die gemessenen Plasmaspiegel mittels ELISA stellen im Gegensatz zur FACS-Methode eine Summe vieler individueller Immunreaktionen der Organsysteme auf einen inflammatorischen Stimulus dar.

Diese Ergebnisse zeigen damit auch, dass *in vitro* gewonnene Ergebnisse nur beschränkt auf die Situation *in vivo* transferiert werden dürfen. Halbwertszeiten, individuelle Kinetiken sowie die Art des Stimulus müssen hinsichtlich der Relevanz von *in vitro* Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Ein weiterer Punkt ist, dass die hier vorliegenden Versuche mit Vollblut von gesunden Probanden durchgeführt wurden. Es ist davon auszugehen, dass unter länger bestehenden pathologischen Bedingungen wie in der Sepsis, in denen sich pro- und anti-inflammatorische Reize überlagern, es zu Veränderungen der Zeitkinetiken kommt. Wilhelm et al. zeigten, dass 20 Minuten nach Operationen mit HLM und in den ersten acht Tagen der Sepsis die Antwort von Vollblut auf einen LPS-Stimulus signifikant inhibiert ist [91]. Die *in vivo* und *in vitro* gewonnenen Ergebnisse könnten damit unter physiologischen Bedingungen nicht den pathologischen Umständen entsprechen.

5.4 Dosis-Wirkungs-Beziehung von LPS und IL-8/TNF- α

Die Dosis-Wirkungs-Kurve wurde für TNF- α und IL-8 in einem Konzentrationsbereich von 10^{-3} ng/ml bis 10^2 ng/ml LPS bestimmt (siehe Abb. 9). Die ED₅₀ war bei ca. 0,2 ng/ml LPS, das Maximum bei 1 ng/ml erreicht. Für die weiteren Versuche zur Wirkung von Katecholaminen wurde 1 ng/ml eingesetzt, um einerseits nicht zu überdosieren und andererseits die Variabilität der Ergebnisse bei geringeren LPS-Konzentrationen zu reduzieren.

5.5 Einfluss von Katecholaminen auf die Zytokinproduktion von Monozyten

5.5.1 Einfluss von Katecholaminen auf die IL-6 Expression

Die vorliegende Arbeit zeigt einen konzentrationsabhängigen hemmenden Einfluss von Katecholaminen auf die intrazelluläre IL-6 Expression in Monozyten nach Stimulation mit LPS. Obwohl Adrenalin und Noradrenalin über eine unterschiedliche Affinität zu den Adrenorezeptor-Subtypen verfügen, konnte kein Unterschied bezüglich ihrer inhibierenden Potenz gefunden werden. Der hemmende Effekt ist nur nach drei Stunden Stimulationszeit signifikant; bei kürzeren bzw. längeren Inkubationszeiten kann nur von einer hemmenden Tendenz gesprochen werden.

Untersuchungen zum Einfluss von Katecholaminen auf die IL-6 Produktion zeigen widersprüchliche Ergebnisse. Katecholamine können dabei einen hemmenden, stimulierenden oder gar keinen Einfluss haben. Liao et al. untersuchten den Einfluss von Katecholaminen auf Kupffersche Sternzellen. Adrenalin stimulierte, β -rezeptorvermittelt die Produktion von IL-6, sofern die Zellen parallel mit LPS behandelt wurden. Wie in der vorliegenden Arbeit hatten die Katecholamine für sich allein keinen messbaren Einfluss [42]. Bailly et al. zeigten, dass Substanzen, die die Konzentration an intrazellulärem cAMP erhöhen, wie Prostaglandin E₂, Dibutyryl-cAMP und Isobutyl-1-Methyl-Xanthin, die LPS vermittelte IL-6-Produktion verstärkten [3]. Diese Ergebnisse widersprechen den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit. Die gegensätzlichen Ergebnisse könnten dadurch bedingt sein, dass kein Vollblutsystem verwendet wurde und dass Liao et al. keine Monozyten, sondern Kupffersche Sternzellen untersuchten, die aufgrund einer Umdifferenzierung zu ortsständigen Makrophagen auch eine mögliche Veränderung in ihrer Reaktion auf Katecholamine zeigen könnten.

Weitere Hinweise auf eine differenzierte Wirkung von Katecholaminen auf die IL-6 Expression geben zahlreiche Versuche mit Zellen anderer Körpergewebe. Katecholamine und andere das intrazelluläre cAMP erhöhende Substanzen regen ebenso bei in Kultur genommenen Thymusepithelien wie auch in Hepatozyten, in Endothelzellen und in von Ratten gewonnenen glatten Muskelzellen die IL-6 Expression an [26, 42, 86]. Andere Arbeiten berichten von einem inhibierenden Einfluss auf die IL-6 Expression von Monozyten [35, 36]. Van der Poll et al. fanden eine dosisabhängige Inhibition der IL-6 Expression von Monozyten nach Inkubation mit Noradrenalin *in vitro* [80]. Die IL-6 Expression wurde mittels ELISA in einem Vollblutsystem gemessen. Vollblutproben wurden für vier Stunden mit 1 ng/ml und 10 ng/ml LPS sowie mit Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-6} M Noradrenalin stimuliert. In der vorliegenden Arbeit wurden höhere

Katecholamindosen verwendet, die Ergebnisse zeigen jedoch ebenso eine dosisabhängige Inhibition der IL-6 Expression.

Maes et al. konnten in einem Vollblutmodell zeigen, dass 10^5 M Noradrenalin die IL-6 Expression in Monozyten signifikant hemmt. Es konnte jedoch kein signifikanter Einfluss für 10^6 und 10^7 M Noradrenalin gefunden werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den durchgeführten Untersuchungen, in denen ebenso eine Inhibition der IL-6 Expression für 10^5 M gefunden werden konnte.

Nach körperlichen und geistigen Stressbelastungen finden sich erhöhte IL-6 Plasmaspiegel und erhöhte endogene Katcholaminserumspiegel als Antwort auf physiologische Reize. Rhind et al. konnten zeigen, dass es nach extremer Kältebelastung und starker körperlicher Anstrengung zu einem Anstieg der intrazellulären IL-6 Expression in Monozyten *in vivo* und zu erhöhten Adrenalin- und Noradrenalinplasmaspiegeln kommt [62]. Rhind et al. verwendeten ein Vollblutmodell, in dem Monozyten mit LPS stimuliert und die intrazelluläre Zytokinexpression mittels FACS gemessen wurde. Weiterhin wurden erhöhte IL-6 Plasmaspiegel im Überstand mittels ELISA gemessen, so dass Rhind et al. postulieren, dass Monozyten mitverantwortlich für die gefundenen gesteigerten IL-6 Plasmaspiegel sind. Diese Ergebnisse widersprechen den Beobachtungen von Starkie et al., die zwar einen signifikanten Anstieg der IL-6 und Katecholaminspiegel im Plasma nach starker physiologischer Belastung (Marathonlauf) fanden, jedoch keine erhöhte intrazelluläre IL-6 Expression in Monozyten messen konnten [73]. Die intrazelluläre IL-6 Expression wurde im Vollblut nach Stimulation mit LPS mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse unterstützen die Ansichten von Starkie et al., dass Monozyten unter Einfluss von Katecholaminen nicht an den resultierenden erhöhten IL-6 Plasmaspiegeln nach extremer physiologischer Belastung beteiligt sind. Jedoch wurden in der vorliegenden Arbeit extrem hohe Dosen an Katecholaminen verwendet, welche die endogen produzierten Katecholaminspiegel um ein Vielfaches überschreiten und so nicht die Situation *in vivo* widerspiegeln [73]. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass geringere Katecholaminkonzentrationen, wie sie unter physiologischen Bedingungen zu finden sind, tatsächlich zu einem Anstieg der IL-6 Expression führen.

Unter pathophysiologischen Bedingungen finden sich *in vivo*, wie in der Sepsis, dem SIRS, der chronischen Herzinsuffizienz und Operationen mit HLM erhöhte IL-6-, sowie erhöhte Katecholaminspiegel [27, 33, 58]. Besonders IL-6 steht im Mittelpunkt vieler Untersuchungen, da es in den letzten Jahren zu einem etablierten klinischen Marker für systemische Entzündungsreaktionen geworden ist. Im Tiermodell (Maus) bewirkt

Adrenalin einen Anstieg der IL-6 Serumspiegel mittels eines β -rezeptorvermittelten Effektes [84]. Im menschlichen Organismus zeigen sich bei geringer Adrenalininfusionsrate (0,03 $\mu\text{g/ml/Std}$) keine Veränderung der IL-6 Spiegel [79], jedoch mehren sich die Hinweise darauf, dass Katecholamine bei höheren Infusionsraten, welche in der Intensivmedizin nicht ungewöhnlich sind, zu einem Anstieg der IL-6 Plasmaspiegel führen können. Soondergaard et al. fanden einen 2- bis 3-fachen Anstieg der IL-6 Plasmaspiegel nach einer Infusion von 1 $\mu\text{g/ml/Std}$ Adrenalin in gesunden Probanden [71]. Die vorliegende Arbeit weist darauf hin, dass Monozyten wahrscheinlich nicht an diesem Anstieg der IL-6 Spiegel beteiligt sind, da die IL-6 Expression signifikant durch Katecholamine gehemmt werden konnte.

5.5.2 Einfluss von Katecholaminen auf die IL-8 Expression

Der Einfluss von Katecholaminen auf die monozytäre Produktion des Chemokins IL-8 ist in mehreren Studien untersucht worden. Jedoch zeigen die Untersuchungen auch hier keine einheitlichen Ergebnisse, die auf einen eindeutig stimulierenden oder inhibierenden Einfluss hinweisen. Farmer et al. fanden eine Abnahme der IL-8 Expression nach Stimulation mit Isoproterenol [21]. Dagegen konnten Kavelaars et al. einen Anstieg der IL-8 Produktion als Antwort auf eine β_2 -Rezeptorstimulation finden [38]. Van der Poll et al. untersuchten die Produktion von IL-8 unter Einfluss von Adrenalin in einem Vollblut-*in vitro*-System mittels ELISA. Vergleichbar mit der vorliegenden Arbeit wurden von van der Poll et al. Monozyten im Vollblut mit 10 ng/ml LPS unter Einfluss von Adrenalin (10^{-8} bis 10^{-5} M) inkubiert. Es konnte eine positive Dosis-Wirkungsbeziehung im Sinne eines Anstiegs zwischen der eingesetzten Adrenalkonzentration und der gemessenen IL-8 Expression beobachtet werden. Der von van der Poll et al. beobachtete Anstieg war nach 4 Stunden Stimulationszeit und bei Konzentrationen von 10^{-7} bis 10^{-5} M Adrenalin signifikant. In der vorliegenden Arbeit konnte weder eine signifikante Veränderung der IL-8 Expression durch Adrenalin, noch durch Noradrenalin innerhalb von 6 Stunden nachgewiesen werden. Dieser Unterschied zur Arbeit von van der Poll et al. könnte dadurch bedingt sein, dass nicht spezifisch Monozyten im Vollblut untersucht wurden. Möglicherweise reagieren andere Zytokin bildende Bestandteile des Vollblutes, wie zum Beispiel neutrophile Granulozyten, mit einer früheren Änderung der IL-8 Expression auf den Einfluss von Adrenalin und Noradrenalin.

Die nicht einheitlichen Ergebnisse zwischen den genannten Arbeiten könnten auch durch Unterschiede in den Stimulationszeiträumen zu erklären sein. Kavelaars et al. zeigten eine beginnende IL-8 Expression erst nach 8 Stunden mit einem Maximum nach 18 Stunden Stimulation von isoliert stimulierten Monozyten [38]. In kultivierten THP-1

Prämonozyten fanden Farmer et al. eine verminderte IL-8 Expression nach einer Stimulationszeit von 8 Stunden. Die IL-8 Expression war um 80 % reduziert unter dem Einfluss von 10^{-5} M Adrenalin und Noradrenalin. In der vorliegenden Arbeit war kein signifikanter Einfluss auf die IL-8 Expression nachweisbar. Dies könnte daran liegen, dass die Stimulationsdauer zu kurz gewählt wurde. Weiterhin könnten IL-8 induzierende Signalkaskaden in den ersten sechs Stunden in Relation zu den inhibierenden oder stimulierenden Signalkaskaden zu stark aktiviert sein, so dass sich kein Einfluss der Katecholamine auf die IL-8 Expression nachweisen lässt. Ebenso könnte IL-8, wie andere proinflammatorische Zytokine, der Regulation von antiinflammatorischen Einflüssen wie z.B. IL-10 unterliegen. Für IL-10 ist beschrieben, dass Adrenalin im Vollblut sowie auch in Monozyten zu einem Anstieg der IL-10 Expression *in vitro* nach Stimulation mit LPS führt [60, 79]. In der frühen Phase der IL-8 Aktivierung könnte dieser antiinflammatorische Einfluss fehlen, da die Expression von IL-10 erst deutlich später im Vergleich zur IL-8 Produktion beginnt. Dieses könnte unter anderem Ursache dafür sein, dass innerhalb der ersten sechs Stunden kein Effekt auf die IL-8 Expression zu beobachten war.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Unterschiede auf die verwendeten Monozytensubtypen zurückgeführt werden können, die in den genannten Arbeiten verwendet wurden.

5.5.3 Einfluss von Katecholaminen auf die TNF- α Expression

TNF- α wird von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und T-Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit LPS gebildet. Aufgrund seiner vielen biologischen Wirkungen steht es seit Anfang seiner Entdeckung im Mittelpunkt des Interesses vieler Untersuchungen. Als primäres Zytokin, das im Verlauf der Inflammation als erstes in Monozyten gebildet wird, wird dem TNF- α eine besondere Rolle in der Initiation einer Entzündungsreaktion beigemessen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass auch in Monozyten im Zeitverlauf TNF- α vor IL-8 und IL-6 als erstes gebildet wird. Weiterhin wurde die TNF- α Expression in Monozyten durch Katecholamine am stärksten gehemmt.

Ein Vergleich der Wirkung von Katecholaminen bezüglich des Anteils der TNF- α^+ -Zellen und der MFI zeigte, dass Katecholamine insbesondere die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), das heißt die mittlere Produktion von TNF- α pro Zelle, inhibieren. Katecholamine beeinflussen damit nicht nur den Anteil zytokin-positiver Monozyten, sondern vermindern in den Monozyten, die nach Katecholaminexposition noch TNF- α^+ sind, die TNF- α Expression. Dieser Effekt ließ sich nicht für IL-6 beobachten, bei dem

die Reduktion der MFI und der Anteil IL-6⁺-Zellen gleich waren. Diese Beobachtung könnte dadurch erklärt werden, dass die IL-6 Produktion von TNF- α stimuliert wird und die Reduktion der IL-6 Expression in Monozyten vom Einfluss der Katecholamine auf die TNF- α Produktion abhängt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen generell mit den Daten überein, die in der Literatur gefunden werden konnten. Van der Poll et al. fanden nach einer Stimulation von Vollblut mit 10 ng/ml LPS und NoradrenalinKonzentrationen von 10⁻⁸ bis 10⁻⁵ M eine dosisabhängige Inhibition der TNF- α Expression *in vitro* [80]. Die Stimulationszeit betrug 16 Stunden; die TNF- α Expression wurde mit ELISA im Überstand gemessen. Es zeigte sich eine maximale Hemmung der TNF- α Produktion bei einer Konzentration von 10⁻⁶ M. Diese Beobachtungen stimmen mit vorliegenden Ergebnissen überein, jedoch wurden in der vorliegenden Arbeit Vollblutproben für maximal 6 Stunden mit 1 ng/ml LPS und 10 μ M bzw. 100 μ M Adrenalin inkubiert. Ein Unterschied ist, dass der prozentuale Anteil der TNF- α Hemmung in der Arbeit von van der Poll et al. um 80 % lag, im Gegensatz zu einer 25-prozentigen Inhibition nach 6 Stunden in der vorliegenden Arbeit (siehe Abb. 12). Zum Einen sind die Stimulationszeiten unterschiedlich, zum Anderen könnte dieser Unterschied auch durch die spezifische Betrachtung der Expression von TNF- α in Monozyten bedingt sein.

Van der Poll et al. untersuchten die TNF- α Expression ebenso *in vivo* [79]. Nach Infusion von Adrenalin wurden Vollblutproben mit LPS stimuliert und TNF- α mittels ELISA gemessen. Es wurden Vollblutproben nach 4, 8, 12 und 24 Stunden nach Beginn einer Adrenalininfusion entnommen. Die vorliegenden Untersuchungen konnten zeigen, dass die TNF- α Expression bereits nach vier Stunden signifikant gesenkt wurde. Die Ergebnisse stimmen mit den durchgeführten Beobachtungen, der vorliegenden Untersuchungen in Monozyten, tendenziell überein. Innerhalb von vier Stunden reagierte die TNF- α Expression *in vivo*, ebenso wie in der vorliegenden Arbeit in Monozyten *in vitro*, mit einer deutlichen Hemmung der TNF- α Produktion. Somit könnten Monozyten an der Katecholamin induzierten TNF- α Inhibition im Vollblut beteiligt sein. Andere Arbeiten zeigen ebenfalls eine Korrelation zwischen dem adrenergen Effekt auf die Zytokinexpression im Vollblut und in Monozyten [63, 68, 92]. Für die TNF- α Expression von Leukozyten konnte von Grundmann et al. gezeigt werden, dass der inhibierende Effekt von Katecholaminen zumindest zu einem Teil durch die Blockade von IL-10 Rezeptoren antagonisiert werden konnte, was deutlich macht, dass antiinflammatorische Effekte von Katecholaminen die Expression proinflammatorischer Zytokine beeinflussen [27].

5.5.4 Vergleich der Wirkung von Adrenalin, Noradrenalin und Dopexamin

Die vorliegenden Ergebnisse konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen Adrenalin und Noradrenalin auf die intrazelluläre Zytokinexpression zeigen, obwohl Katecholamine über unterschiedliche adrenerge Rezeptoren, wie α - und β -Rezeptoren und deren Subtypen ihre Wirkung entfalten. Ein direkter Vergleich der Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin auf die intrazelluläre Zytokinexpression in Monozyten ist jedoch bisher nicht beschrieben worden. Beide Katecholamine zeigten einen inhibierenden Einfluss auf die TNF- α und IL-6 Expression in Monozyten. Die IL-8 Expression blieb von beiden Katecholaminen unbeeinflusst.

Diese Ergebnisse sind mit Beobachtungen anderer Studien vereinbar, in denen gezeigt werden konnte, dass der adrenerge Effekt in peripheren mononukleären Zellen vornehmlich über β -Rezeptoren vermittelt wird [68, 80, 81]. Maes et al. konnten zeigen, dass der hemmende Effekt von Noradrenalin nicht nur durch β -Rezeptoren induziert wird, sondern auch durch α_2 -Rezeptoren vermittelt wird [49, 50]. Es scheinen somit verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden an der Vermittlung der Katecholaminwirkung beteiligt zu sein. Da die Affinität der Katecholamine zu den verschiedenen Adrenorezeptorsubtypen von der Konzentration die am Rezeptor vorliegt und von den chemischen Eigenschaften des Agonisten abhängig ist, könnte es möglich sein, dass Adrenalin und Noradrenalin zwar den gleichen Effekt zeigen, dieser jedoch durch unterschiedliche Adrenorezeptoren vermittelt wird. Weiterhin wird bei einer gleichzeitigen Stimulation von α - und β -Rezeptoren angenommen, dass der inhibierende Einfluss von β -Rezeptoren überwiegt [95]. Die Equilibiriumsdissoziationskonstante (K_d) des β -Rezeptors für Adrenalin und Noradrenalin liegt bei $1,0 \times 10^{-5}$ und $2,5 \times 10^{-5}$ M in peritonealen Makrophagen der Ratte und in humanen S49-Lymphomzellen [1]. Die K_d gibt diejenige Konzentration an, bei der die Hälfte der Rezeptoren vom Agonisten besetzt ist. Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ an Adrenalin und Noradrenalin entsprachen der K_d des β -Rezeptors, so dass von einem hauptsächlich durch β -Rezeptoren vermittelten Effekt ausgegangen werden kann.

Mc Gregor et al. konnten zeigen, dass cAMP induzierende Katecholamine eine unterschiedliche Potenz besitzen, die Produktion von intrazellulärem cAMP zu fördern. Adrenalin führte vor Noradrenalin, gefolgt von Dopexamin zum stärksten Anstieg von cAMP in Lymphozyten [48]. Es konnte gezeigt werden, dass Dopexamin eine deutlich geringere Wirkung am β_2 -Rezeptor zeigt. Da die Stabilisierung des I- κ B/NF- κ B-Komplexes, welcher mitverantwortlich für die Induktion der Transkription von proinflammatorischen Zytokinen ist, von einem Anstieg des cAMP abhängt, wäre jedoch

ein Unterschied der immunmodulierenden Wirkung zwischen den Katecholaminen zu erwarten gewesen.

Hinweise für unterschiedliche Effekte der Katecholamine auf die proinflammatorische Zytokinexpression konnten in dieser Arbeit doch gezeigt werden. Der Vergleich der Wirkung von Noradrenalin und Dopexamin zeigte für die IL-8 Expression zumindest tendenziell einen Unterschied. Dopexamin führt in einem Konzentrationsbereich von 0,1 μM und 3 μM zu einer geringeren IL-8 Expression als Noradrenalin. Dieser Unterschied ist bei 1 μM signifikant ($p < 0,05$). Der Effekt kehrte sich ab einer Konzentration von 100 μM Noradrenalin und Dopexamin um. Noradrenalin zeigte ab 30 μM eine konzentrationsabhängige Inhibition, wohingegen Dopexamin einen Anstieg der IL-8 Expression bewirkte. Für TNF- α zeigte sich ein Unterschied von Noradrenalin und Dopexamin ab einer Katecholaminkonzentration von 100 μM . Diese Unterschiede könnten durch die unterschiedliche Besetzung der Adrenorezeptoren bedingt gewesen sein. Zusätzlich ist Dopexamin ein Agonist am D₁- und D₂-Rezeptor. Für Dopaminrezeptoren ist ein immunsuppressiver Effekt beschrieben. Im Endotoxin-Mausmodell zeigte Dopamin einen immunsuppressiven Effekt auf TNF- α Serumspiegel [31]. Diese zusätzliche Komponente könnte den Unterschied der immunmodulierenden Wirkung von Noradrenalin, das keine Wirkung am Dopaminrezeptor besitzt, erklären. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten eine Stimulation der IL-8 Expression bei hohen Konzentrationen, was durch eine Besetzung von anderen Adrenorezeptoren, welche zu einer Stimulation der IL-8 Expression führen, erklärt werden könnte. Diese Beobachtungen sollten in weiteren Untersuchungen mittels spezifischer Rezeptor-antagonisten geklärt werden.

Von Severn et al. konnte gezeigt werden, dass eine Vorinkubation von Vollblut und THP-1-Zellen für 24 Stunden mit Adrenalin zu einem Anstieg der TNF- α Produktion sowie zu erniedrigten intrazellulären cAMP-Spiegeln führt [68]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Inkubationszeit von 15 Minuten gewählt, um zu untersuchen, ob die Voraktivierung der adrenorezeptorgekoppelten Signalkaskaden wichtig für die immunmodulatorische Wirkung von Katecholaminen ist. Dieses war nicht nachweisbar (siehe Tab. 3 und Tab. 4). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Voraktivierung der adrenergen Signalkaskaden keinen direkten Einfluss auf die Zytokinexpression in Monozyten hat.

5.5.5 Wirkung von Katecholaminen auf die Monozytenfunktion in der Sepsis

Versuche einer immunmodulatorischen Therapie bei Sepsispatienten mit TNF- α Antikörpern und löslichem TNF- α -Rezeptor haben wider erwarten trotz der ermutigenden Ergebnisse im Tiermodell keine positiven Ergebnisse gezeigt. Neuere Therapieansätze konzentrieren sich auf die Erhaltung der Gerinnungshomöostase mittels aktiviertem Protein C und auf intrazellulär cAMP steigernde Medikamente, wie das Methylxanthin Pentoxifyllin, welches TNF- α und IL-6 Plasmaspiegel reduzieren kann. Vor diesem Hintergrund ist das Verständnis des Einflusses anderer cAMP steigernder Substanzen, wie Katecholamine, Iloprost und Phosphodiesterasehemmer von besonderem Interesse.

Die hämodynamische Situation des Patienten, der an einer schweren Sepsis oder einem eskalierendem SIRS erkrankt ist, macht die Gabe von Katecholaminen häufig unausweichlich. Auch in der Herzchirurgie werden häufig Katecholamine wie Adrenalin und Noradrenalin sowie andere Medikamente, die die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöhen, eingesetzt. Nach HLM-Operationen wird häufiger die Entwicklung eines SIRS bzw. einer Sepsis beobachtet [29]. Weiterhin finden sich erhöhte TNF- α und IL-6 Spiegel nach Operationen mit HLM, die zu einer Imbalance des Immunsystems führen können [9]. In diesem Zusammenhang wird eine der proinflammatorischen Immunantwort folgende Immunsuppression als Ursache diskutiert [32]. Als Auslöser gelten antiinflammatorische Zytokine, die zu einer Hyporeaktivität des Immunsystems führen. Im Verlauf einer Sepsis bzw. eines SIRS entwickelt sich eine Desensitivierung von Monozyten für LPS.

Grundman et al. konnten zeigen, dass nach Operationen mit HLM die Fähigkeit von peripheren mononukleären Zellen nach LPS-Stimulation IL-1 und TNF- α zu produzieren, eingeschränkt ist. Dabei wurden maximale Katecholaminspiegel von 10^8 M nach HLM-Operationen gemessen. Noradrenalin zeigte in der vorliegenden Arbeit in diesem Konzentrationsbereich einen hemmenden Einfluss auf die Expression von IL-6 und TNF- α , so dass von einer Beteiligung der Katecholamine an der Hyporeaktivität von Monozyten nach Operationen mit HLM auszugehen ist. Verschiedene Wege dieser verminderten Entzündungsmediatorexpression in Monozyten können diskutiert werden. Zum Einen wird die Interleukinexpression auf der Ebene des „second messenger“ cAMP reguliert, zum Anderen auf der Ebene der Proteinexpression [3]. Katecholamine führen über den Anstieg von intrazellulärem cAMP zu einer vermehrten Expression von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 [63]. Grundman et al. konnten nachweisen, dass, um den gleichen antiinflammatorischen Effekt zu zeigen, die benötigten IL-10 Konzentrationen *in vitro* höher als die *in vivo* sind. An diesen Ergebnissen ist zu

erkennen, dass nicht nur ein Mechanismus an der Desensitivierung von Leukozyten nach HLM-Operationen beteiligt ist, sondern eine Kombination verschiedener Mechanismen wahrscheinlich ist.

5.6 Einfluss von Noradrenalin bei verschiedenen LPS-Konzentrationen

Zytokine wie IL-6, IL-8 und TNF- α sind notwendige Faktoren bei der Initiation einer Entzündungsreaktion. Der menschliche Körper reagiert auf physiologische und pathophysiologische Stressreize mit einem Anstieg der Katecholaminspiegel. Es wird ein immunmodulatorischer neurohumoraler Regelkreis angenommen [4], welcher unter solchen Bedingungen eine erhöhte Empfänglichkeit des Wirtsorganismus gegenüber Erregern erklären könnte.

In der frühen Phase der Invasion und Vermehrung von Mikroorganismen im Wirtskörper ist davon auszugehen, dass niedrigere LPS-Konzentrationen im Wirt vorhanden sind. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Noradrenalin für 3 Stunden bei niedrigen (0,2 ng/ml, 1 ng/ml) und hohen (10 ng/ml) LPS-Konzentrationen untersucht (siehe Abb. 15). Es konnte gezeigt werden, dass der hemmende Einfluss von Noradrenalin bei geringeren LPS-Konzentrationen stärker als bei hohen Konzentrationen ist. Dieser hemmende Effekt nimmt mit steigender NoradrenalinKonzentration (100 μ M) weiter zu.

In der Literatur wurden keine Arbeiten gefunden, die sich mit dem Einfluss von Katecholamin auf die Zytokinexpression von Monozyten bei besonders niedrigen LPS-Konzentrationen *in vitro* befassen. Die vorliegenden Daten der durchgeführten Experimente deuten an, dass Katecholamine wie Noradrenalin, insbesondere in der frühen Phase der Immunantwort, eine verminderte Zytokinexpression auslösen könnten. Dieses beeinflusst möglicherweise zum Einen die systemischen Zytokinspiegel, zum Anderen würden sie auch die regulatorischen Eigenschaften der Monozyten beeinträchtigen. Somit könnte die Empfindlichkeit des Wirtsorganismus gegenüber Pathogenen gesteigert werden, da eine adäquate Abwehrreaktion zu spät ausgelöst wird und sich der Fremdorganismus somit relativ lange unbeeinflusst im Wirt ausbreiten kann. Eine weitere Möglichkeit der pathophysiologischen Deutung der Ergebnisse ist, dass Katecholamine einer unkontrollierten Entzündungsmediatorexplosion, wie sie in der Sepsis und dem eskalierenden SIRS gefunden wird, entgegenwirken. Insbesondere in der frühen Phase der Sepsis, in der die proinflammatorische Immunantwort dominiert, könnte eventuell auch von einem additiven positiven Effekt ausgegangen werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Noradrenalin auf die Monozytenfunktion positive wie auch negative Auswirkungen im Verlauf der Sepsis haben könnte, welche von der vorliegenden Konzentration an LPS beeinflusst werden.

6 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass LPS die Synthese von IL-6, IL-8 und TNF- α in Monozyten *in vitro* induziert. Die Expression der Zytokine in Monozyten folgt eigenen Kinetiken. TNF- α war als erstes Zytokin gefolgt von IL-8 und IL-6 nachweisbar. Diese Expressionkinetik ähnelt den *in vivo*, mit anderen Methoden gemessenen Kinetiken. Die Untersuchungen zeigen, dass die Methode der Durchflusszytometrie ein geeignetes Untersuchungsverfahren darstellt, um ein *in vitro* Vollblut-Modell der Sepsis zu untersuchen. Es wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung von LPS untersucht. Für TNF- α und IL-8 lag die ED₅₀ bei 0,2 ng/ml.

Weiterhin wurde der Einfluss von Adrenalin und Noradrenalin auf die Zytokinexpression von Monozyten in einem Vollblutmodell der Sepsis untersucht. Es konnte ein hemmender Einfluss von Katecholaminen auf die IL-6- und TNF- α -Synthese von Monozyten gezeigt werden, während die IL-8 Expression unbeeinflusst blieb. Monozyten könnten somit an den erniedrigten Zytokinspiegeln, die *in vivo* unter Stressbedingungen auftreten, beteiligt sein. Es ließ sich kein Unterschied zwischen Adrenalin und Noradrenalin auf die Zytokinsynthese in Monozyten nachweisen. Dagegen zeigte sich ein unterschiedlicher Effekt zwischen dem synthetischen Katecholamin Dopexamin und Noradrenalin. Noradrenalin führte im Vergleich zu Dopexamin bei geringen Konzentrationen zu einer tendenziell höheren IL-8 Expression. Bei besonders hohen Katecholaminkonzentrationen kehrte sich der Effekt um.

Es konnte nachgewiesen werden, dass der Einfluss von Katecholaminen auf die Zytokinsynthese von Monozyten von der LPS-Konzentration abhängig ist. Noradrenalin hatte, insbesondere bei niedrigen LPS-Konzentrationen, einen besonders ausgeprägten hemmenden Einfluss auf die Zytokinexpression. Diese Beobachtungen könnten von Bedeutung für das Verständnis des Einflusses von Katecholaminen auf die Reaktionen des angeborenen Immunsystems in der Sepsis sein.

7 Literaturverzeichnis

1. Abrass C K, O'Connor S W, Scarpace P J, Abrass I B: Characterization of the beta-adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage. *J Immunol*, 1985. 135 (2): S. 1338-41.
2. Angus D C, Linde-Zwirble W T, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky M R: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 2001. 29 (7): S. 1303-10.
3. Bailly S, Ferrua B, Fay M, Gougerot-Pocidallo M A: Differential regulation of IL 6, IL 1 A, IL 1 beta and TNF alpha production in LPS-stimulated human monocytes: role of cyclic AMP. *Cytokine*, 1990. 2 (3): S. 205-10.
4. Bergmann M, Sautner T: Immunomodulatory effects of vasoactive catecholamines. *Wien Klin Wochenschr*, 2002. 114 (17-18): S. 752-61.
5. Bergquist J, Tarkowski A, Ekman R, Ewing A: Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91 (26): S. 12912-6.
6. Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E, Dinarello C A: Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science*, 1986. 233 (4764): S. 652-4.
7. Bone R C: Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med*, 1996. 125 (8): S. 680-7.
8. Bone R C, Balk R A, Cerra F B, Dellinger R P, Fein A M, Knaus W A, Schein R M , Sibbald W J: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 1992. 101 (6): S. 1644-55.
9. Borgermann J, Friedrich I, Flohe S, Spillner J, Majetschak M, Kuss O, Sablotzki A, Feldt T, Reidemeister J C, Schade F U: Tumor necrosis factor-alpha production in whole blood after cardiopulmonary bypass: downregulation caused by circulating cytokine-inhibitory activities. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002. 124 (3): S. 608-17.
10. Borovikova L V, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina G I, Watkins L R, Wang H, Abumrad N, Eaton J W, Tracey K J: Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 2000. 405 (6785): S. 458-62.
11. Brodde O E: [The importance of the myocardial adrenoreceptors and their therapeutic significance]. *Klin Anasthesiol Intensivther*, 1991. 41: S. 72-80.

12. Brun-Buisson C: The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med*, 2000. 26 (Suppl 1): S. S64-74.
13. Burchardi H, Schneider H: Economic aspects of severe sepsis: a review of intensive care unit costs, cost of illness and cost effectiveness of therapy. *Pharmacoeconomics*, 2004. 22 (12): S. 793-813.
14. Cain S M, Curtis S E: Systemic and regional oxygen uptake and delivery and lactate flux in endotoxic dogs infused with dopexamine. *Crit Care Med*, 1991. 19 (12): S. 1552-60.
15. Cavaillon J M: Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother*, 1994. 48 (10): S. 445-53.
16. Choi J H, Song M J, Kim S H, Choi S M, Lee D G, Yoo J H, Shin W S: Effect of moxifloxacin on production of proinflammatory cytokines from human peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. 47 (12): S. 3704-7.
17. Dobrovolskaia M A, Vogel S N: Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect*, 2002. 4 (9): S. 903-14.
18. Elenkov I J, Wilder R L, Chrousos G P, Vizi E S: The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*, 2000. 52 (4): S. 595-638.
19. Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton I R: Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect*, 2002. 4 (8): S. 837-51.
20. Ertel W, Kremer J P, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg F W: Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood*, 1995. 85 (5): S. 1341-7.
21. Farmer P, Pugin J: beta-adrenergic agonists exert their "anti-inflammatory" effects in monocytic cells through the IkappaB/NF-kappaB pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. 279 (4): S. L675-82.
22. Friedman G, Silva E, Vincent J L: Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med*, 1998. 26 (12): S. 2078-86.
23. Gader A M: The effects of beta adrenergic blockade on the responses of leucocyte counts to intravenous epinephrine in man. *Scand J Haematol*, 1974. 13 (1): S. 11-6.
24. Goeddel D V, Aggarwal B B, Gray P W, Leung D W, Nedwin G E, Palladino M A, Patton J S, Pennica D, Shepard H M, Sugarman B J, et al., Naylor S L, Sakaguchi A Y, Smith D, Jarrett-Nedwin J: Tumor necrosis factors: gene structure and biological activities. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986. 51 Pt 1 (17): S. 597-609.

25. Goodwin R G, Anderson D, Jerzy R, Davis T, Brannan C I, Copeland N G, Jenkins N A, Smith C A: Molecular cloning and expression of the type 1 and type 2 murine receptors for tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol*, 1991. 11 (6): S. 3020-6.
26. Gornikiewicz A, Sautner T, Brostjan C, Schmierer B, Fugger R, Roth E, Muhlbacher F, Bergmann M: Catecholamines up-regulate lipopolysaccharide-induced IL-6 production in human microvascular endothelial cells. *Faseb J*, 2000. 14 (9): S. 1093-100.
27. Grundmann U, Rensing H, Adams H A, Falk S, Wendler O, Ebinger N, Bauer M: Endotoxin desensitization of human mononuclear cells after cardiopulmonary bypass: role of humoral factors. *Anesthesiology*, 2000. 93 (2): S. 359-69.
28. Hagiwara E, Abbasi F, Mor G, Ishigatsubo Y, Klinman D M: Phenotype and frequency of cells secreting IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN and TNF-alpha in human peripheral blood. *Cytokine*, 1995. 7 (8): S. 815-22.
29. Hall R I, Smith M S, Rocker G: The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations. *Anesth Analg*, 1997. 85 (4): S. 766-82.
30. Handley A J, Monsieurs K G, Bossaert L L: European Resuscitation Council Guidelines 2000 for Adult Basic Life Support. A statement from the Basic Life Support and Automated External Defibrillation Working Group(1) and approved by the Executive Committee of the European Resuscitation Council. *Resuscitation*, 2001. 48 (3): S. 199-205.
31. Hasko G, Szabo C, Merkel K, Bencsics A, Zingarelli B, Kvetan V, Vizi E S: Modulation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production by dopamine receptor agonists and antagonists in mice. *Immunol Lett*, 1996. 49 (3): S. 143-7.
32. Haveman J W, Muller Kobold A C, Tervaert J W, van den Berg A P, Tulleken J E, Kallenberg C G, The T H: The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment. *Neth J Med*, 1999. 55 (3): S. 132-41.
33. Hill G E: The inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Int Anesthesiol Clin*, 1996. 34 (2): S. 95-108.
34. Insel P A: Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Adrenergic receptors--evolving concepts and clinical implications. *N Engl J Med*, 1996. 334 (9): S. 580-5.
35. Izeboud C A, Mocking J A, Monshouwer M, van Miert A S, Witkamp R F: Participation of beta-adrenergic receptors on macrophages in modulation of LPS-induced cytokine release. *J Recept Signal Transduct Res*, 1999. 19 (1-4): S. 191-202.

36. Izeboud C A, Monshouwer M, van Miert A S, Witkamp R F: The beta-adrenoceptor agonist clenbuterol is a potent inhibitor of the LPS-induced production of TNF-alpha and IL-6 *in vitro* and *in vivo*. *Inflamm Res*, 1999. 48 (9): S. 497-502.
37. Johnson D L, Ashmore R C, Gordon M A: Effects of beta-adrenergic agents on the murine lymphocyte response to mitogen stimulation. *J Immunopharmacol*, 1981. 3 (2): S. 205-19.
38. Kavelaars A, van de Pol M, Zijlstra J, Heijnen C J: Beta 2-adrenergic activation enhances interleukin-8 production by human monocytes. *J Neuroimmunol*, 1997. 77 (2): S. 211-6.
39. Khabar K S, elBarbary M A, Khouqeer F, Devol E, al-Gain S, al-Halees Z: Circulating endotoxin and cytokines after cardiopulmonary bypass: differential correlation with duration of bypass and systemic inflammatory response/multiple organ dysfunction syndromes. *Clin Immunol Immunopathol*, 1997. 85 (1): S. 97-103.
40. Kumar A, Haery C, Parrillo J E: Myocardial dysfunction in septic shock. *Crit Care Clin*, 2000. 16 (2): S. 251-87.
41. Kwak D J, Augustine N H, Borges W G, Joyner J L, Green W F, Hill H R: Intracellular and extracellular cytokine production by human mixed mononuclear cells in response to group B streptococci. *Infect Immun*, 2000. 68 (1): S. 320-7.
42. Liao J, Keiser J A, Scales W E, Kunkel S L, Kluger M J: Role of epinephrine in TNF and IL-6 production from isolated perfused rat liver. *Am J Physiol*, 1995. 268 (4 Pt 2): S. R896-901.
43. Lin E, Lowry S F: Inflammatory cytokines in major surgery: a functional perspective. *Intensive Care Med*, 1999. 25 (3): S. 255-7.
44. Lonnqvist F, Krief S, Strosberg A D, Nyberg S, Emorine L J, Arner P: Evidence for a functional beta 3-adrenoceptor in man. *Br J Pharmacol*, 1993. 110 (3): S. 929-36.
45. Loppnow H: [Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action]. *Internist (Berl)*, 2001. 42 (1): S. 13-4, 17-27.
46. Lund N, de Asla R J, Cladis F, Papadakos P J, Thorborg P A: Dopexamine hydrochloride in septic shock: effects on oxygen delivery and oxygenation of gut, liver, and muscle. *J Trauma*, 1995. 38 (5): S. 767-75.
47. Lynn W A, Cohen J: Adjunctive therapy for septic shock: a review of experimental approaches. *Clin Infect Dis*, 1995. 20 (1): S. 143-58.
48. MacGregor D A, Prielipp R C, Butterworth J F t, James R L, Royster R L: Relative efficacy and potency of beta-adrenoceptor agonists for generating cAMP in human lymphocytes. *Chest*, 1996. 109 (1): S. 194-200.

49. Maes M, Lin A, Kenis G, Egyed B, Bosmans E: The effects of noradrenaline and alpha-2 adrenoceptor agents on the production of monocytic products. *Psychiatry Res*, 2000. 96 (3): S. 245-53.
50. Maes M, Lin A, Kenis G, Egyed B, Bosmans E: Negative immunoregulatory effects of noradrenaline through alpha2- adrenoceptor activation. *Neuroendocrinol Lett*, 2000. 21 (5): S. 375-382.
51. Martin T R, Mathison J C, Tobias P S, Leturcq D J, Moriarty A M, Maunder R J, Ulevitch R J: Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. Implications for cytokine production in normal and injured lungs. *J Clin Invest*, 1992. 90 (6): S. 2209-19.
52. Mascher B, Schlenke P, Seyfarth M: Expression and kinetics of cytokines determined by intracellular staining using flow cytometry. *J Immunol Methods*, 1999. 223 (1): S. 115-21.
53. Miyamoto S, Schmitt M J, Verma I M: Qualitative changes in the subunit composition of kappa B-binding complexes during murine B-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91 (11): S. 5056-60.
54. Mukaida N, Matsushima K: Regulation of IL-8 production and the characteristics of the receptors for IL-8. *Cytokines*, 1992. 4: S. 41-53.
55. Nathan C F: Secretory products of macrophages. *J Clin Invest*, 1987. 79 (2): S. 319-26.
56. Nicola N A, Peterson L: Identification of distinct receptors for two hemopoietic growth factors (granulocyte colony-stimulating factor and multipotential colony-stimulating factor) by chemical cross-linking. *J Biol Chem*, 1986. 261 (26): S. 12384-9.
57. Pala P, Hussell T, Openshaw P J: Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods*, 2000. 243 (1-2): S. 107-24.
58. Papanicolaou D A, Wilder R L, Manolagas S C, Chrousos G P: The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med*, 1998. 128 (2): S. 127-37.
59. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig T M, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi P S, Kronke M, Mak T W: Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell*, 1993. 73 (3): S. 457-67.
60. Platzer C, Meisel C, Vogt K, Platzer M, Volk H D: Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs. *Int Immunol*, 1995. 7 (4): S. 517-23.
61. Ralston D R, St John R C: Immunotherapy for sepsis. *Clin Chest Med*, 1996. 17 (2): S. 307-17.

62. Rhind S G, Castellani J W, Brenner I K, Shephard R J, Zamecnik J, Montain S J, Young A J, Shek P N: Intracellular monocyte and serum cytokine expression is modulated by exhausting exercise and cold exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001. 281 (1): S. R66-75.
63. Riese U, Brenner S, Docke W D, Prosch S, Reinke P, Oppert M, Volk H D, Platzer C: Catecholamines induce IL-10 release in patients suffering from acute myocardial infarction by transactivating its promoter in monocytic but not in T-cells. *Mol Cell Biochem*, 2000. 212 (1-2): S. 45-50.
64. Rodriguez-Gaspar M, Santolaria F, Jarque-Lopez A, Gonzalez-Reimers E, Milena A, de la Vega M J, Rodriguez-Rodriguez E, Gomez-Sirvent J L: Prognostic value of cytokines in sirs general medical patients. *Cytokine*, 2001. 15 (4): S. 232-6.
65. Sablotzki A, Borgermann J, Baulig W, Friedrich I, Spillner J, Silber R E, Czeslick E: Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and markers of acute-phase response in patients with multiple organ dysfunction syndrome (MODS) following open heart surgery. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2001. 49 (5): S. 273-8.
66. Schmidt H, Secchi A, Wellmann R, Bach A, Bhrer H, Martin E: Dopexamine maintains intestinal villus blood flow during endotoxemia in rats. *Crit Care Med*, 1996. 24 (7): S. 1233-7.
67. Schutz W, Anhaupl T, Gauss A: [Principles of catecholamine therapy. 1. Characterization of clinically relevant sympathomimetics]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 2000. 35 (2): S. 67-81.
68. Severn A, Rapson N T, Hunter C A, Liew F Y: Regulation of tumor necrosis factor production by adrenaline and beta-adrenergic agonists. *J Immunol*, 1992. 148 (11): S. 3441-5.
69. Simonet W S, Hughes T M, Nguyen H Q, Trebasky L D, Danilenko D M, Medlock E S: Long-term impaired neutrophil migration in mice overexpressing human interleukin-8. *J Clin Invest*, 1994. 94 (3): S. 1310-9.
70. Smith G W, O'Connor S E: An introduction to the pharmacologic properties of Dopacard (dopexamine hydrochloride). *Am J Cardiol*, 1988. 62 (5): S. 9C-17C.
71. Sondergaard S R, Ostrowski K, Ullum H, Pedersen B K: Changes in plasma concentrations of interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonists in response to adrenaline infusion in humans. *Eur J Appl Physiol*, 2000. 83 (1): S. 95-8.
72. Spittler A, Razenberger M, Kupper H, Kaul M, Hackl W, Boltz-Nitulescu G, Fugger R, Roth E: Relationship between interleukin-6 plasma concentration in patients with sepsis, monocyte phenotype, monocyte phagocytic properties, and cytokine production. *Clin Infect Dis*, 2000. 31 (6): S. 1338-42.

73. Starkie R L, Rolland J, Angus D J, Anderson M J, Febbraio M A: Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF-alpha levels after prolonged running. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. 280 (4): S. C769-74.
74. Steen P A, Tinker J H, Pluth J R, Barnhart D A, Tarhan S: Efficacy of dopamine, dobutamine, and epinephrine during emergence from cardiopulmonary bypass in man. *Circulation*, 1978. 57 (2): S. 378-84.
75. Takala A, Jousela I, Takkunen O, Kautiainen H, Jansson S E, Orpana A, Karonen S L, Repo H: A prospective study of inflammation markers in patients at risk of indirect acute lung injury. *Shock*, 2002. 17 (4): S. 252-7.
76. Tanaka T, Tsujinaka T, Kambayashi J, Higashiyama M, Sakon M, Mori T: Sepsis model with reproducible manifestations of multiple organ failure (MOF) and disseminated intravascular coagulation (DIC). *Thromb Res*, 1989. 54 (1): S. 53-61.
77. Terzic A, Puceat M, Vassort G, Vogel S M: Cardiac alpha 1-adrenoceptors: an overview. *Pharmacol Rev*, 1993. 45 (2): S. 147-75.
78. Tighe D, Moss R, Heywood G, al-Saady N, Webb A, Bennett D: Goal-directed therapy with dopexamine, dobutamine, and volume expansion: effects of systemic oxygen transport on hepatic ultrastructure in porcine sepsis. *Crit Care Med*, 1995. 23 (12): S. 1997-2007.
79. Van der Poll T, Coyle S M, Barbosa K, Braxton C C, Lowry S F: Epinephrine inhibits tumor necrosis factor-alpha and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *J Clin Invest*, 1996. 97 (3): S. 713-9.
80. Van der Poll T, Jansen J, Endert E, Sauerwein H P, van Deventer S J: Noradrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin 6 production in human whole blood. *Infect Immun*, 1994. 62 (5): S. 2046-50.
81. Van der Poll T, Lowry S F: Lipopolysaccharide-induced interleukin 8 production by human whole blood is enhanced by epinephrine and inhibited by hydrocortisone. *Infect Immun*, 1997. 65 (6): S. 2378-81.
82. Van der Poll T, van Deventer S J: Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am*, 1999. 13 (2): S. 413-26, ix.
83. Van Deventer S J, Buller H R, ten Cate J W, Sturk A, Pauw W: Endotoxaemia: an early predictor of septicaemia in febrile patients. *Lancet*, 1988. 1 (8586): S. 605-9.
84. Van Gool J, van Vugt H, Helle M, Aarden L A: The relation among stress, adrenalin, interleukin 6 and acute phase proteins in the rat. *Clin Immunol Immunopathol*, 1990. 57 (2): S. 200-10.

85. Van Zee K J, DeForge L E, Fischer E, Marano M A, Kenney J S, Remick D G, Lowry S F, Moldawer L L: IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration. *J Immunol*, 1991. 146 (10): S. 3478-82.
86. Von Patay B, Loppnow H, Feindt J, Kurz B, Mentlein R: Catecholamines and lipopolysaccharide synergistically induce the release of interleukin-6 from thymic epithelial cells. *J Neuroimmunol*, 1998. 86 (2): S. 182-9.
87. Walmrath D, Grimminger F, Seeger W: [Severe sepsis--new therapeutic options]. *Internist (Berl)*, 2001. 42 (12): S. 1619-20, 1623-30.
88. Wan S, LeClerc J L, Vincent J L: Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest*, 1997. 112 (3): S. 676-92.
89. Wheeler A P, Bernard G R: Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med*, 1999. 340 (3): S. 207-14.
90. Whitelaw D M: Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling. *Cell Tissue Kinet*, 1972. 5 (4): S. 311-7.
91. Wilhelm W, Grundmann U, Rensing H, Werth M, Langemeyer J, Stracke C, Dhingra D, Bauer M: Monocyte deactivation in severe human sepsis or following cardiopulmonary bypass. *Shock*, 2002. 17 (5): S. 354-60.
92. Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Eberhardt B, Platzer C, Schoning B, Glockner F, Lanksch W R, Volk H D, Docke W D: Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat Med*, 1998. 4 (7): S. 808-13.
93. Woiciechowsky C, Schoning B, Lanksch W R, Volk H D, Docke W D: Mechanisms of brain-mediated systemic anti-inflammatory syndrome causing immunodepression. *J Mol Med*, 1999. 77 (11): S. 769-80.
94. Zhang F X, Kirschning C J, Mancinelli R, Xu X P, Jin Y, Faure E, Mantovani A, Rothe M, Muzio M, Arditi M: Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem*, 1999. 274 (12): S. 7611-4.
95. Zhang H, De Jongh R, De Backer D, Cherkaoui S, Vray B, Vincent J L: Effects of alpha - and beta -adrenergic stimulation on hepatosplanchnic perfusion and oxygen extraction in endotoxic shock. *Crit Care Med*, 2001. 29 (3): S. 581-8.

8 Thesen

1. Monozyten als Bestandteil des angeborenen Immunsystems können *in vitro* durch Lipopolysaccharid zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6, IL-8 und TNF- α angeregt werden.
2. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Monozyten in einem Vollbutmodell phänotypisiert und deren intrazelluläre Zytokinexpression untersucht werden.
3. Die IL-6, IL-8 und TNF- α Expression von Monozyten in einem *in vitro* Vollblutmodell folgt einer eigenen Kinetik, welche der Kinetik der Zytokinplasmaspiegel in der Sepsis *in vivo* ähnlich sind. Die intrazelluläre Durchflusszytometrie kann zur Evaluierung eines *in vitro* Sepsismodell verwendet werden.
4. Die unter klinischen Bedingungen gemessenen LPS-Plasmaspiegelkonzentrationen führen *in vitro* zu einer maximalen Stimulation der Zytokinexpression in Monozyten.
5. Katecholamine, welche häufig im Verlauf der schweren Sepsis zur hämodynamischen Stabilisierung eingesetzt werden, haben einen hemmenden Einfluss auf die Expression von IL-6 und TNF- α in Monozyten.
6. Die IL-8 Expression wird durch Katecholamine nicht in der gleichen Weise beeinflusst, wie IL-6 und TNF- α .
7. Katecholamine haben allein keinen Einfluss auf die Zytokinexpression von Monozyten. Eine Aktivierung der Signalkaskaden vor einer Stimulation mit LPS hat keinen vermehrten Einfluss auf die Hemmung der IL-6, IL-8 und TNF- α Expression.
8. Proinflammatorische Zytokine werden unterschiedlich stark durch Katecholamine beeinflusst. Der Einfluss ist konzentrationsabhängig. TNF- α wird am stärksten durch Adrenalin und Noradrenalin gehemmt. Es besteht kein Unterschied zwischen Adrenalin und Noradrenalin in ihrer hemmenden Potenz. Der Einfluss von Dopexamin führt zu einer tendenziell geringen IL-8 Expression in Monozyten im Vergleich zu Noradrenalin.
9. Der Einfluss von Noradrenalin auf die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen in Monozyten ist von der vorherrschenden LPS-Konzentration abhängig. Der Einfluss von Noradrenalin hat einen besonders starken Einfluss bei geringen LPS-Konzentrationen.

Lebenslauf

Persönliche Informationen

Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 02.12.1974
Geburtsort: Rinteln

Ausbildung

1981 – 1986 **Grundschule** Extertal
Grundschule Gauting

1986 – 1995 **Gymnasium** Otto von Taube, Gauting
Gymnasium Ernestinum, Rinteln
Abschluss: Abitur am 16.05.1995

1995 – 1997 **Zivildienst**, Ausbildung zum Rettungssanitäter, DRK Rinteln

1997 – 2003 **Studium der Humanmedizin**
Martin-Luther-Universität (MLU) Halle-Wittenberg
Abschluss: Physikum am 06.09.1999

2000 Abschluss: 1. Staatsexamen am 29.08.2000

2002 Abschluss: 2. Staatsexamen am 13.09.2002

2003 Abschluss: 3. Staatsexamens am 18.11.2003

2004 Assistenzarzt an der Medizinischen Hochschule Hannover,
Abteilung Kardiologie, bei Prof. Dr. med. H. Drexler

Praktische Weiterbildung

1 Monat Praktikum Unfallchirurgische Praxis Dr. Kalbe

1 Monat Famulatur Chirurgie, 2000, Krankenhaus Rinteln

1 Monat Famulatur Innere Medizin/Kardiologie, 2001, MLU/
Halle

1 Monat Famulatur Herz-Thorax-Chirurgie, 2002, MLU/Halle

1 Monat Famulatur Anästhesie und Intensivmedizin, 2002,
MLU/Halle

4 Monate **Praktisches Jahr (PJ)** Herz-Thorax-Chirurgie bei
Prof. Silber, 2002, MLU/Halle,

4 Monate **PJ** Innere Medizin/Kardiologie bei Prof. Werdan, 2003,
MLU/Halle

4 Monate **PJ** Neurologie bei Chefarzt Dr. med. Hoffmann, 2003,
Krankenhaus Dölau

Hinweis auf Publikationen

Röntgen P, Czeslick E, Sablotzki A, Simm A, Einfluss von Noradrenalin auf die intrazelluläre Zytokinexpression in Monozyten, Abstractband, Deutscher Anästhesie Kongress (DAK), S. 180, 2002, Posterpräsentation

Czeslick E, Röntgen P, Simm A, Sablotzki A, Katecholamine beeinflussen die Synthese proinflammatorischer Zytokine in Monozyten, Abstractband, DAK, S. 121, 2002, Kurzvortrag

Röntgen P, Czeslick E, Simm A, Hofmann S, Sablotzki A, Influence of norepinephrine on the intracellular cytokine expression in monocytes, Infection, 31 (4), 2004, Posterpräsentation

Röntgen P, Sablotzki A, Simm A, Silber RE, Czeslick E, Effect of catecholamines on intracellular cytokine synthesis in human monocytes, Eur cytokine Netw 2004, 15, (1) S. 14-23

Erklärung

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selber angefertigt habe und versichere, dass ich keine anderen als die angegebenen Mittel und Quellen benutzt habe.

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.