

**Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. E. Herting**

---

**Einfluss von  
Perfluorocarbonen  
auf die Sauerstoffradikalausschüttung  
neutrophiler Granulozyten**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von  
**Alexander Herz**  
aus Auetal

**Lübeck 2009**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. E. Herting
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Anemüller

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2009

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 21.09.2009

# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung

1.1	Perfluorocarbone und Flüssigkeitsbeatmung	1
1.1.1	Perfluorocarbone: Definition und Charakteristika	1
1.1.2	Entwicklung und Anwendung der Flüssigkeitsbeatmung	2
1.1.3	Wirksamkeit und Nebenwirkungen der Flüssigkeitsbeatmung	4
1.1.4	Antiinflammatorische Effekte von Perfluorocarbonen	5
1.2	Polymorphkernige Neutrophile und akute Lungenschädigung	8
1.2.1	Polymorphkernige Neutrophile aus zytologischer Sicht	8
1.2.2	Respiratory Burst	9
1.2.3	PMN und ihre Bedeutung für die akute Lungenschädigung	11
1.3	Polymorphkernige Neutrophile und Perfluorocarbone	13
1.3.1	Auswirkungen von Perfluorocarbonen auf PMN	13
1.4	Fragestellung	15

## 2 Material und Methoden

2.1	Material	16
2.1.1	Polymorphkernige Neutrophile	16
2.1.2	Perfluorocarbone	16
2.1.3	Candida	17
2.1.4	Bakterien	17
2.1.5	Surfactant	17
2.2	Methoden	18
2.2.1	Isolierung der PMN aus Spenderblut	18
2.2.2	Nitroblautetrazolium Reduktionstest (NBT-Reduktionstest)	19
2.2.3	Viabilitäts- und Zellzahlbestimmung	21
2.2.3.1	Trypanblau	21
2.2.3.2	Cell Counter	22
2.2.3.3	Zellproliferationsreagenz WST-1	22
2.3	Versuchsablauf	23
2.3.1	Präinkubation der PMN mit PFC	23
2.3.2	Präinkubation der PMN mit PFC und nachfolgende Stimulation	24
2.3.3	Inkubation der PMN mit PFC bei gleichzeitiger Stimulation	25
2.3.4	Inkubation der PMN mit PFC bei gleichzeitiger Stimulation und Surfactantzugabe	26
2.3.5	Simultaninkubation von PMN, PFC, Candida und NBT	26

2.4	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	27
2.5	Statistische Methoden	28
3	Ergebnisse	
3.1	Auswirkungen einer Inkubation mit Perfluorocarbonen auf die Sauerstoffradikalausschüttung von PMN	29
3.1.1	Auswirkungen einer PFC- Präinkubation auf die Sauerstoffradikalausschüttung nicht stimulierter PMN	29
3.1.2	Auswirkungen einer PFC- Präinkubation auf die nachfolgende Stimulierbarkeit der PMN	32
3.1.3	Auswirkungen einer gleichzeitigen PFC- Inkubation und Stimulation auf die Sauerstoffradikalausschüttung der PMN	35
3.1.4	Auswirkungen einer Curosurfinkubation bei gleichzeitiger PFC Inkubation und antigener Stimulation auf die Sauerstoffradikalausschüttung der PMN	37
3.1.5	Auswirkungen einer Simultaninkubation von PMN, PFC und NBT auf die Ausschüttung von Sauerstoffradikalen bei gleichzeitiger Candida- Stimulation der PMN	39
3.2	Auswirkungen einer Inkubation mit PFC auf die Viabilität von PMN	40
3.2.1	Zellzählung und Viabilitätsbestimmung mittels Trypanblau und Cell Counter	40
3.2.2	Einfluss der Zellzahl auf das Ausmaß der optische Dichte im NBT- Reduktionstest	43
3.2.3	WST-1 Test	44
3.3	Elektronenmikroskopische Untersuchungen der PMN nach PFC- Inkubation	45
4	Diskussion	48
5	Zusammenfassung	60
6	Literaturverzeichnis	62
7	Danksagung	75
8	Curriculum vitae	76

## **Abkürzungsverzeichnis:**

ALI	acute lung injury = akuter Lungenschaden
ARDS	acute respiratory distress syndrome = akutes Atemnotsyndrom
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CMV	conventional mechanical ventilation = konventionelle mechanische Beatmung
CFU	colony forming unit = koloniebildende Einheit
GBS- HD	Gruppe B- Streptokokken- high density = hohe Dichte
IL	Interleukin
MPO	Myeloperoxidase
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblautetrazolium
OD	optische Dichte
PFC	Perfluorocarbone
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PLV	partial liquid ventilation = partielle Flüssigkeitsbeatmung
SD	standard deviation = Standardabweichung
SP-A/ SP-B	surfactant protein A/ B
TLV	total liquid ventilation = totale Flüssigkeitsbeatmung
TNF	Tumornekrosefaktor

# 1 Einleitung

## 1.1 Perfluorocarbone und Flüssigkeitsbeatmung

### 1.1.1 Perfluorocarbone: Definition und Charakteristika

Perfluorocarbone, im folgenden PFC abgekürzt, wurden in den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts im Rahmen des so genannten „Manhattan Projects“ – dem Projekt zur Entwicklung der Atombombe – als Isolationssubstanzen für hochreaktive Stoffe synthetisiert (Clark 1970).

PFC sind vollständig fluorierte, zyklische oder gradkettige Kohlenwasserstoffe, die Heteroatome wie Sauerstoff, Stickstoff oder Brom besitzen können. Zumeist bestehen sie aus 6-14 Kohlenstoffatomen. Makroskopisch sind PFC bei Raumtemperatur flüssig, klar im Aussehen, farb- und geruchlos, flüchtig, sowie nicht wasserlöslich.

Die Molekülzusammensetzung, d.h. die Länge der Kohlenstoffketten, der Grad der Substitution von Fluor durch andere Halogene, das Vorhandensein möglicher Seitenketten und die sterische Anordnung bedingen die spezifischen Eigenschaften der verschiedenen PFC.

Aufgrund ihrer thermischen und chemischen Stabilität, welche auf den relativ kurzen und meist unverzweigten Kohlenstoffketten und der hohen Bindungsenergie der Kohlenstoff-Fluor-Bindung (Geyer 1983) beruht, gelten PFC als inert gegenüber chemischen und biologischen Reaktionspartnern.

Es konnte bisher weder im tierischen noch im humanen Organismus eine Metabolisierung der PFC nachgewiesen werden (Smart et al. 1995).

Nach derzeitigem Kenntnisstand werden PFC nach intravenöser und auch intraalveolärer Anwendung nur in geringem Ausmaß vom retikulo- endothelialen System aufgenommen. Der überwiegende Anteil wird über die Lunge abgeatmet (Ragaller et al. 2000).

Zu ihren herausragenden Eigenschaften gehört die Fähigkeit, in hohem Maße Gase zu lösen. Die Löslichkeit der Gase in PFC nimmt in folgender Reihenfolge ab: Kohlenstoffdioxid >> Sauerstoff > Kohlenstoffmonoxid > Stickstoff. Dabei verhält sich die in gelöster Form transportierte Menge an Gas nach dem Gesetz von Henry direkt proportional zum Partialdruck des entsprechenden Gases in der Umgebung (Riess et al. 1992). In Regionen mit niedrigerem Partialdruck geben die PFC den gelösten Sauerstoff entsprechend der Partialdruckdifferenz an das umgebende Gewebe ab.

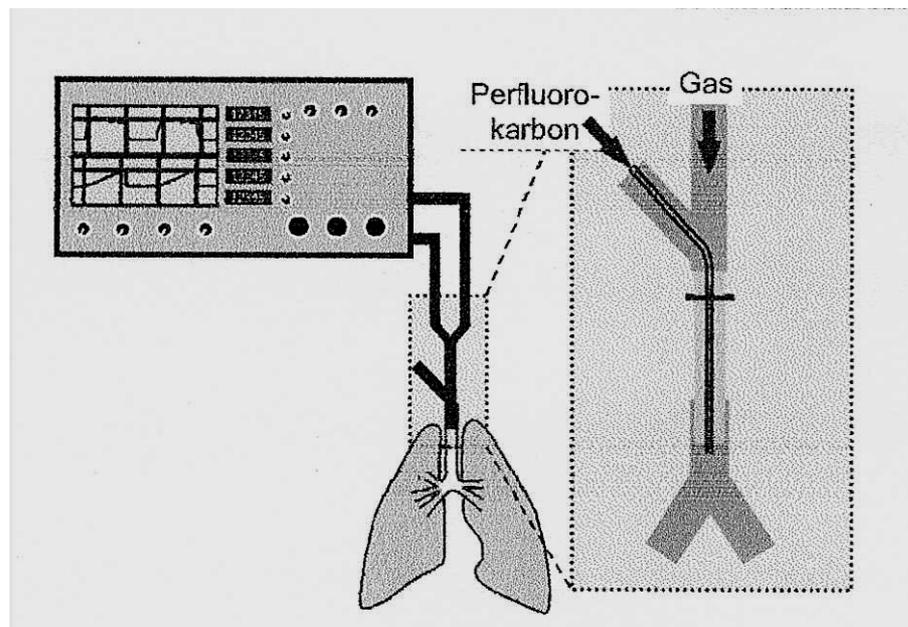
Ihr spezifisches Gewicht liegt bei 1,7- 1.93 g/ ml und ist somit fast doppelt so hoch wie das von Wasser. Eine weitere charakteristische Eigenschaft der PFC ist ihre geringe Oberflächenspannung, die je nach PFC zwischen 15- 18 mN/ m liegt (Smart et al. 1995). Zusätzlich zeichnen sich PFC durch eine geringe kinematische Viskosität, einen niedrigen Dampfdruck und einen hohen Spreitungskoeffizienten (die Eigenschaft, sich spontan auf Oberflächen auszubreiten) aus.

### **1.1.2 Entwicklung und Anwendung der Flüssigkeitsbeatmung**

Erstmals in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde die Flüssigkeitsfüllung der Lunge mit physiologischer Kochsalzlösung als möglicher Therapieansatz bei Giftgas-Inhalationsopfern im 1. Weltkrieg erwähnt (Winternitz 1920). Der limitierende Faktor für das Überleben der Patienten war jedoch die geringe Kapazität von physiologischer NaCl-Lösung, unter normobaren Bedingungen Gase zu lösen ( $O_2$ - Löslichkeit 3 ml  $O_2$ / 100 ml NaCl). Kylstra und Mitarbeitern gelang es 1962 erstmals unter hyperbaren Bedingungen, Versuchstiere, in physiologische Kochsalzlösung getaucht, für einige Minuten am Leben zu erhalten, bevor sie an einer respiratorischen Azidose, bedingt durch  $CO_2$ - Retention, verstarben (Kylstra et al. 1962). Auf der Suche nach einem geeigneten Medium mit hoher Gaslöslichkeit unter atmosphärischen Drücken und geringer Oberflächenspannung zur intratrachealen Applikation wurden Substanzen wie Silikon und tierische sowie pflanzliche Öle getestet. In Versuchen erwiesen sich diese jedoch als toxisch. Perfluorocarbone erfüllten einige der geforderten Kriterien. 1966 gelang Clark und Gollan erstmals eine Perfluorocarbon- Flüssigkeitsatmung bei Säugetieren (Clark und Gollan 1966). Mäuse, die in 100 % Sauerstoff äquilibriertes Perfluorocarbon (Tetrahydrofuran FX 80®) für maximal 18 h eingetaucht wurden und in der Flüssigkeit spontan atmeten, zeigten eine ausreichende Gewebeoxygenierung. Der anschließende Wechsel zu Luftatmung gelang problemlos. In den darauf folgenden Jahren wurden verschiedene Systeme der Flüssigkeitsbeatmung entwickelt. In den 70er Jahren wurde ein Modell eingeführt, bei welchem man in die Lunge der intubierten Versuchstiere passiv mit Hilfe der Schwerkraft  $O_2$ - gesättigte PFC hinein- und zeitversetzt wieder hinauslaufen ließ (Gollan et al. 1970). Darauf aufbauend wurde das Modell der Totalen Flüssigkeitsbeatmung (TLV) entwickelt, bei der durch ein entsprechend konstruiertes Beatmungsgerät das aus PFC bestehende Tidalvolumen kontinuierlich ausgetauscht wird, und eine  $CO_2$ - Elimination und eine Oxygenierung des PFC gewährleistet werden konnte (Moskowitz et al. 1970).

Für die Durchführung der TLV wird ein spezielles Beatmungsgerät benötigt.

1991 wurde von Fuhrmann und Mitarbeiter ein Hybridsystem entwickelt, welches sie „Perfluorocarbon associated gas exchange“ (PAGE) oder „Partial Liquid Ventilation“ (PLV) nannten (Fuhrmann et al. 1991). Bei der PLV wird die intraalveoläre Perfluorocarbonapplikation mit einer konventionellen Beatmung kombiniert. Die Lunge wird dabei mit einem maximal der funktionellen Residualkapazität entsprechendem Volumen an PFC gefüllt und anschließend konventionell mit Gas beatmet.



**Abbildung 1:** Prinzip der partiellen Flüssigkeitsbeatmung. Bei der partiellen Flüssigkeitsbeatmung (PLV) wird die Lunge über ein spezielles Ansatzstück am Beatmungstubus mit Perfluorocarbon (PFC) gefüllt und anschließend mit einem Beatmungsgerät ventiliert. Die eingesetzten PFC-Volumina entsprechen maximal der funktionellen Residualkapazität der Lunge (aus Max et al. 2002).

Aufgrund von viel versprechenden tierexperimentellen Untersuchungen an verschiedenen Lungenschädigungsmodellen [„adult respiratory distress syndrome“ (ARDS) (Rotta et al. 1998); Mekonium-Aspirationssyndrom (Shaffer et al. 1994); Kongenitale Zwerchfellhernie (Wilcox et al. 1997), „acute lung injury“ (ALI) (Hirschl et al. 1995)], wurden erste unkontrollierte klinische Studien einer PLV durchgeführt. Bei dem in

humanen Studien eingesetzten PFC handelt es sich um Perflubron (LiquiVent<sup>®</sup>, Alliance Pharmaceutical Corporation, San Diego, USA).

1995 wurden von Hirschl und Mitarbeitern erstmals 19 Patienten mit akutem Lungenschaden aus pädiatrischem, neonatalem und erwachsenem Bereich im Rahmen einer unkontrollierten Studie mit PLV behandelt (Hirschl et al. 1995). Diesen ersten unkontrollierten humanen Studien folgten weitere multizentrische Phase- II und – III Studien. In einer ersten randomisierten, kontrollierten Pilotstudie an 90 adulten Patienten mit ARDS oder akutem Lungenschaden zeigte die PLV bezüglich der gewählten Hauptzielparameter (beatmungsfreie Tage und Mortalität) gegenüber einer konventionell beatmeten Patientengruppe (CMV) keinen Vorteil (Bartlett et al. 1997). 1998 wurde eine weitere internationale multizentrische Phase III Studie gestartet. Von 1998-2000 wurden 311 Patienten mit ARDS in die Therapiegruppen CMV und PLV (eingesetzt in niedriger und hoher Dosis) randomisiert. PLV führte zu keiner Verbesserung bezüglich beatmungsfreier Tage und Mortalität im Vergleich zur CMV- Gruppe (Kacmarek et al. 2006).

### **1.1.3 Wirksamkeit und Nebenwirkungen der Flüssigkeitsbeatmung**

In verschiedenen Tiermodellen eines induzierten Lungenschadens wurden PLV und konventionelle mechanische Gasbeatmung (CMV) miteinander verglichen. Im Vordergrund der meisten Studien standen die Beobachtung der Beatmungs- und Entzündungsparameter sowie der Lungenhistologie.

Es wurde beobachtet, dass es unter PLV zu einer Verbesserung der Oxygenierung und der Lungen- Compliance, sowie zu einer antiinflammatorischen Wirkung kam. Letztere Wirkung wird unter 1.1.4 ausführlich besprochen.

#### *Oxygenierung*

Bei einer akuten Lungenschädigung oder dem ARDS führen die pathophysiologischen Veränderungen zum alveolären Kollaps, zur Atelektasenbildung oder zum Einstrom von Flüssigkeit ins Interstitium bzw. in den Alveolarraum, dies besonders in den dorsalen, schwerkraftabhängigen Arealen (Pelosi et al. 1999; Dani et al. 2003). Unter PLV breiten sich die eingesetzten PFC aufgrund ihres hohen spezifischen Gewichts, ihrer niedrigen Oberflächenspannung und des positiven Spreitungskoeffizienten gut in den Alveolen aus. Besonders die dorsalen Areale werden dabei wieder eröffnet (Doctor et al. 1998), einer Ödembildung wird entgegengewirkt (Colton 1998), und man geht davon aus, dass dies zu einem Rekrutment von Gasaustauschfläche im Sinne eines „Liquid- PEEP“ (PEEP =

„positive endexpiratory pressure“) führt und so eine verbesserte Oxygenierung zur Folge hat.

### *Compliance*

Von Neergaard zeigte 1929, dass ein größerer Druck für die Expansion einer gasgefüllten als für eine flüssigkeitsgefüllte Lunge nötig ist (Von Neergaard 1929). Tütüncü und Mitarbeiter bestätigten einen positiven Effekt der PLV auf die Atemmechanik (Tütüncü et al. 1993). Sie beobachteten eine Verbesserung der statischen und dynamischen Compliance in der PLV.

Die Autoren diskutieren, dass die Verbesserung der Compliance zum einen durch die Abnahme des Eröffnungsdrucks in den Alveolen im Sinne des „Liquid- PEEP“, und zum anderen durch die niedrige Oberflächenspannung der PFC zu erklären sei (Hirschl et al. 1995). In der Literatur wird auch von einer „Surfactant- ähnlichen“ Wirkung gesprochen (Leach et al. 1995).

### *Nebenwirkungen*

Zu den Nebenwirkungen, welche in Zusammenhang mit der Flüssigkeitsbeatmung in der Literatur erwähnt werden, gehören das Auftreten von Pneumothorax (Hirschl et al. 1995, Bartlett 1997), eine temporäre Laktazidose (Wolfson et al. 1992), eine mukusbedingte Blockierung des Tubus (Hirschl et al. 1995), sowie bei Verwendung bromhaltiger PFC eine Beeinträchtigung der radiologischen Bildgebung (Shaffer et al. 1992). PFC führen aufgrund ihrer hohen Röntgendichte zu einer symmetrischen Verschattung beider Lungen und zu dadurch bedingten Schwierigkeiten in der Interpretation radiologischer Thoraxaufnahmen (Infiltrate, Katheterlage etc.) (Kazerooni et al. 1996).

## **1.1.4 Antiinflammatorische Effekte von Perfluorocarbonen**

In Tierversuchen und in verschiedenen in vitro Studien wurde eine antientzündliche Wirkung von PFC beobachtet.

Anhand verschiedener Lungenschädigungsmodelle konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der pulmonalen Schädigung unter PLV signifikant geringer ist als unter konventionell mechanischer Beatmung.

So zeigten Rotta und Mitarbeiter, dass nach intravenöser Escherichia coli- Endotoxin Gabe die Lungen PLV beatmeter Tiere in der histologischen Untersuchung weniger interstitielle Entzündung, weniger Blutungen und eine geringere Anzahl an Atelektasen und Nekrosen aufwiesen (Rotta et al. 1998). Wird in einem ähnlichen experimentellen

Ansatz die Schädigung in unterschiedlichen Lungenbereichen miteinander verglichen, so zeigt sich, dass insbesondere die dorsalen Lungenbereiche von der PLV profitierten (Rotta et al. 1999). In einem Modell des neonatalen RDS (= „respiratory distress syndrom“) an frühgeborenen Lämmern ist auch unter TLV die histologische Schädigung deutlich geringer und die Gasaustauschfläche signifikant größer im Vergleich zur konventionellen Beatmung (Wolfson et al. 1998).

Weiterhin finden sich in der PLV- Gruppe im Vergleich zur CMV- Gruppe nach induziertem Lungenschaden im Tierexperiment weniger alveoläre Hämorrhagien, weniger Ödem und weniger hyaline Membranen (van Eeden et al. 1999). In einem Schädigungsmodell mittels Cobra Venom Faktor (CVF) zeigte sich, dass PLV außerdem zu einer verringerten alveolären Kapillarpermeabilität führt, wenn man die PLV- Gruppe mit der CMV- Gruppe nach CVF- Schädigung vergleicht (Younger et al. 1997).

Neben diesen morphologischen Parametern ist auch versucht worden, das Ausmaß der Schädigung biochemisch zu quantifizieren. Da im Rahmen der Schädigungskaskade insbesondere die oxidative Schädigung („respiratory burst“) eine Rolle spielt, wurde der Grad der Lungenschädigung über eine Quantifizierung der Lipid- und Proteinoxidation ermittelt. Nach Lungenschädigung konnte unter PLV im Vergleich mit der konventionellen Beatmung eine signifikante Reduzierung der oxidativen Schädigung von Lipiden und Proteinen aufgezeigt werden (Steinhorn et al. 1999; Rotta et al. 2000).

Dass PFC auch auf einzelne, im Entzündungsprozess involvierte Zellen, antiinflammatorisch wirkt, konnten in vitro Studien zeigen. So sezernierten bronchoskopisch gewonnene humane Alveolarmakrophagen, die nach PFC Inkubation mittels Lipopolysaccharid stimuliert wurden, signifikant weniger TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6 als Alveolarmakrophagen ohne PFC Inkubation (Thomassen et al. 1997). Auch die Aktivität von Alveolarmakrophagen wird durch den Kontakt mit PFC beeinflusst. Die Produktion von Hydrogenperoxid durch Alveolarmakrophagen ist nach 2h Inkubation mit PFC im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle signifikant reduziert (Smith et al. 1995).

Zu den weiteren Auswirkungen einer PFC Inkubation auf die Alveolarmakrophagen zählen eine verringerte Phagozytoseleistung (Steinhorn et al. 2000) und eine Abnahme der Chemolumineszenz, welche als Maß für die NADPH- Oxidase fungiert (Smith et al. 1995).

Da PFC in der Alveole mit dem endogenen Surfactantsystem in Kontakt kommt, ist es wichtig zu wissen, inwieweit Surfactant die beschriebenen antiinflammatorischen

Eigenschaften der PFC beeinflusst. Für Surfactant allein ist ein reduzierender Effekt auf den „respiratory burst“ neutrophiler Granulozyten beschrieben worden (Herting et al. 1995, Rauprich et al. 2004). Auch gibt es aus der Literatur Hinweise, dass Surfactant PFC spezifische Effekte beeinflussen kann. So reduziert eine PFC/ Surfactant- Emulsion in Bakterienproliferationsversuchen die toxischen Eigenschaften des PFC- Typs FO 6167 auf Gruppe B- Streptokokken (Rüdiger et al. 2001).

Auf der Suche nach Erklärungsmodellen, welche die beobachteten antientzündlichen Effekte möglichst umfassend beschreiben, werden unterschiedliche Hypothesen diskutiert.

Eine erste Hypothese geht davon aus, dass PFC im Sinne einer rein mechanischen Barriere agiert, indem es sich aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften zellulären Oberflächenstrukturen anlagert und so Zell-zu-Zell- bzw. Zell-zu-Protein- (extrazellulär) Interaktionen verhindert (Varani et al. 1996).

In einer zweiten Hypothese wird diskutiert, ob es während der PLV lediglich zu einer Lavage von Entzündungszellen, Mediatoren und Flüssigkeiten aus den distalen Alveolarbezirken in zentralere Regionen kommt, was sich dann als Reduktion der Lungenschädigung manifestiert (Hirschl et al. 1996; Colton et al. 1998).

Eine dritte Hypothese beschreibt ein auch als „open lung“ bezeichnetes Konzept. Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften halten PFC die Alveolen offen. Dies verhindert einerseits den Einstrom von Exsudat, Entzündungszellen und Mediatoren in den Alveolarraum, andererseits verbessert es im Sinne eines „liquid PEEP“ durch Rekrutierung atelektatischer Lungenbezirke und durch Verbesserung der Compliance den Gasaustausch (Amato et al. 1995, Colton et al. 1998).

Ergebnisse neuerer Studien geben Anlass dazu, in Betracht zu ziehen, dass PFC direkt antientzündliche Eigenschaften haben. Ein Grossteil der bisherigen Daten spricht dafür, dass PFC intrazelluläre, eventuell energieabhängige Prozesse, beeinflussen (Steinhorn et al. 1999, Obratsov et al. 2000; Woods et al 2000).

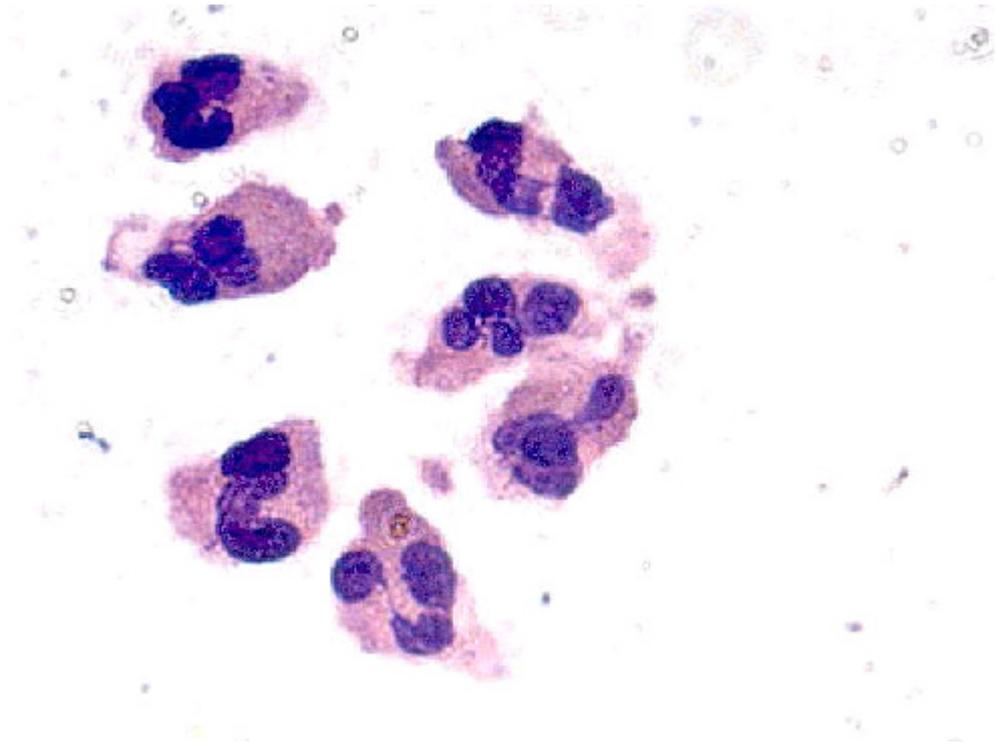
Obwohl diese neueren Studien einen direkten, wenn auch wahrscheinlich unspezifischen, Effekt von Perfluorocarbonen auf die Zielzellen zeigen, so ist der genaue Wirkmechanismus noch unklar, und eine wahrscheinlich multifaktoriell bedingte attenuierende Einflussnahme auf den Entzündungsprozess ist anzunehmen.

## 1.2 Polymorphkernige Neutrophile und Akute Lungenschädigung

### 1.2.1 Polymorphkernige Neutrophile aus zytologischer Sicht

Polymorphkernige Neutrophile (PMN) stellen 55-70 % der im Blut zirkulierenden Leukozyten dar und haben einen Durchmesser von 12-15  $\mu\text{m}$ . Morphologisch charakteristisch für den ausgereiften segmentkernigen Granulozyten ist der aus 2-5 Segmenten, untereinander durch schmale Brücken miteinander verbunden, bestehende Zellkern. Das Zytoplasma der PMN enthält zahlreiche Granula, wovon die meisten zu den so genannten spezifischen Granula gehören. Ihr Inhalt besteht zum größten Teil aus Lysozym, Laktoferrin und Myeloperoxidase. Die Bildungsstätte der PMN ist das Knochenmark, von dort aus wandern sie ins Blut, wo ihre Halbwertszeit 6- 7 h beträgt und gelangen so zu ihrem Wirkort, dem Gewebe. Ihre Funktion liegt hauptsächlich in der Abwehr akuter bakterieller Infektionen sowie im Abbau nekrotischen Gewebes. Hierzu bedienen sie sich ihrer Fähigkeit zur Phagozytose und Bildung mikrobiozider Sauerstoffradikale („respiratory burst“), welche intrazellulär in Phagosomen und sezerniert im Extrazellularraum wirken. Mittels Phago- oder Pinozytose aufgenommene Partikel werden im Zellinneren in Vakuolen, dem sogenannten Phagosom gespeichert. Dieses fusioniert mit Lysosomen zum Phagolysosom.

Die Abtötung der Bakterien erfolgt durch das Zusammenwirken verschiedener Faktoren der Lysosomen. Zu den sauerstoffunabhängigen Mechanismen gehören zum Beispiel die Senkung des pH- Wertes, Lysozym, Proteasen und Defensine. Zu den sauerstoffabhängigen Mechanismen dagegen zählen die Halogenisierung essentieller bakterieller Komponenten durch das  $\text{H}_2\text{O}_2$ - Myeloperoxidase- Halogen- System und die Bildung hochreaktiver  $\text{O}_2^-$  Radikale („respiratory burst“) (Junqueira et al. 2005).



**Abbildung 2:** Gruppe polymorphkerniger Neutrophiler in lichtmikroskopischer Darstellung (Färbung: Pappenheim, Vergrößerung: 1000x)

### 1.2.2 Respiratory Burst

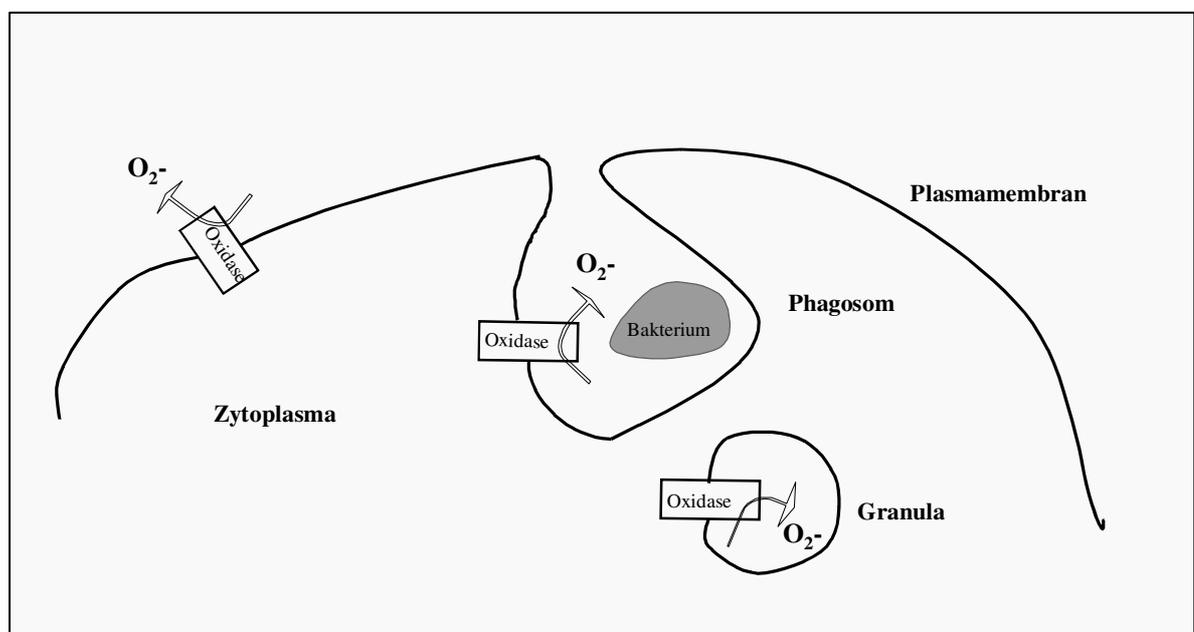
1933 beschrieben Baldrige und Gerard, dass PMN während der Phagozytose von Bakterien ihren Verbrauch an molekularem Sauerstoff erhöhen (Baldrige et al. 1933). Die eigentliche Bedeutung dieses später als „respiratory burst“ bezeichneten Prozesses wurde deutlich, als Holmes und Mitarbeiter 1967 aufzeigen konnten, dass es beim Syndrom der chronischen Granulomatose, welches sich klinisch durch gehäuft auftretende bakterielle Infekte und Pilzinfekte auszeichnet, zu einem verminderten Verbrauch an molekularem Sauerstoff und unzureichender Mikrobenabtötung kommt (Holmes et al. 1967).

Bei dem für den „respiratory burst“ verantwortlichen Enzym handelt es sich um eine NADPH- Oxydase. Sie besteht im nicht- aktivierten Zustand aus einer membrangebundenen und vier sich im Zytosol befindenden Komponenten. Nach Aktivierung, getriggert z.B. durch Phagozytose oder Zytokinexposition, bilden die Komponenten ein membrangebundenes Multikomponenten- Elektronen- Transfer System (Babior et al. 1999). Die NADPH- Oxidase transferiert Elektronen vom sich im Zytosol

befindenden NADPH über die Zell- bzw. über die Phagosomenmembran auf Sauerstoff (De Leo et al. 1996). Zu den primär entstehenden Produkten zählen Superoxid- Anion ( $O_2^-$ ) und Hydrogenperoxid, welche sich im Extrazellularraum bzw. im Phagolysosom ansammeln. Diese besitzen eine relativ geringe mikrobiozide Aktivität und in nachfolgenden enzymatischen Reaktionen werden stärker toxische Produkte katalysiert. Hierzu zählen die Hydroxylradikale ( $OH^\cdot$ ), das „singlet oxygen“ ( $^1O_2$ ) und Hypochlorsäure (HOCL) (Junqueira et al. 1996).

HOCL gilt als das am stärksten mikrobiozid wirkende Oxydant, welches von PMN generiert wird (Klebanoff et al. 1968). Das für diesen Prozess verantwortliche Enzym ist die in den azurophilen zytoplasmatischen Granula lokalisierte Myeloperoxidase (Bainton et al. 1971).

Die so generierten Produkte des „respiratory burst“ tragen entscheidend zur Abtötung eindringender Mikroorganismen bei. Andererseits beschränkt sich ihre Aggressivität nicht ausschließlich auf körperfremdes Material, sondern sie können im Rahmen der ablaufenden Entzündungsreaktion Schaden an Zellen und Gewebe des eigenen Organismus verursachen (Gallin et al.1999).



**Abbildung 3:** Mögliche Lokalisationen der NADPH- Oxidase und Aktivität [Generierung von Sauerstoffradikalen ( $O_2^-$ )] in humanen neutrophilen Granulozyten (in Anlehnung an Dahlgren et al. 1999).

### 1.2.3 PMN und ihre Bedeutung für die akute Lungenschädigung

Der akute Lungenschaden (ALI) und das ARDS, als dessen schwerste Manifestationsform, lassen sich definieren anhand ihres akuten Beginns, bilateraler Verschattungen im Thorax- Röntgenbild, eines pulmonalkapillären Verschlussdrucks  $< 18$  mmHg, sowie einer schweren Hypoxie mit  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$  mmHg (Bernard et al. 1994). Ihre Mortalitätsraten liegen auch heute noch, trotz verbesserter Behandlungsstrategien, bei 50% - 60%, und beide gehören zu den am schwierigsten zu behandelnden pulmonalen Erkrankungen pädiatrischer und adulter Intensivstationen.

Histologisch charakteristisch sind eine Zerstörung des Alveolarepithels, der Basalmembran und des Kapillarendothels, was zu einer erhöhten Permeabilität und Bildung eines proteinreichen intraalveolären Ödems führt. Zu den Hauptrisikofaktoren der Ausbildung eines ALI bzw. ARDS- Syndroms zählen Pneumonie, Magensaftaspiration, Sepsis und Polytrauma in Verbindung mit hypovolämischem Schock (Ware et al. 2000).

Als ein elementarer Baustein in der Pathogenese des ALI/ ARDS werden die PMN und ihre Funktion im akuten Entzündungsprozess angesehen (Luce et al. 1998).

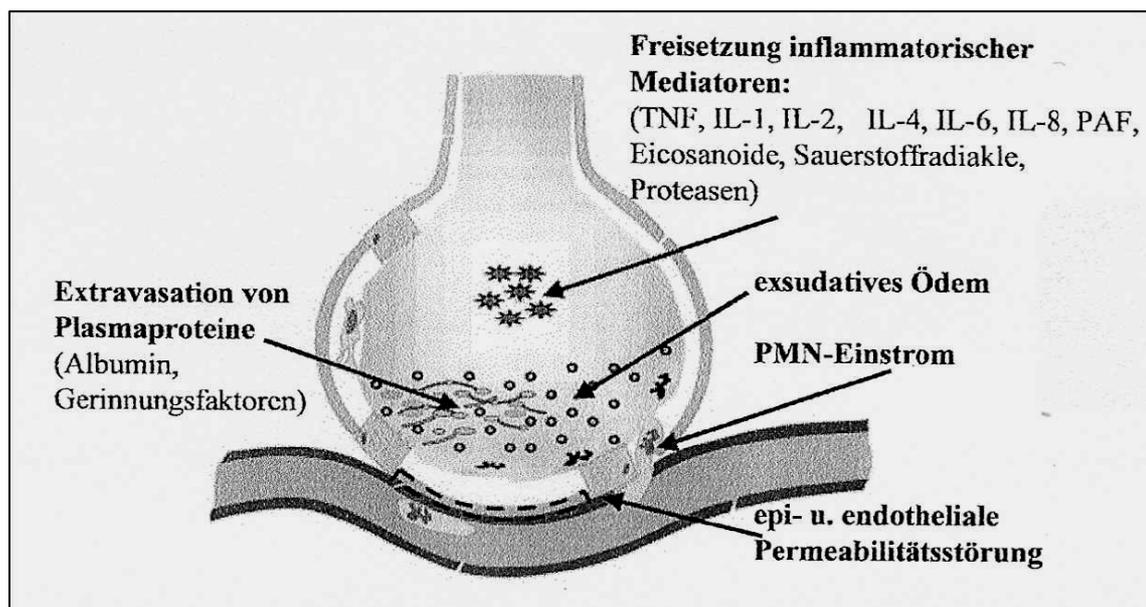
In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass nach hypovolämischem Schock (Hierholzer et al. 1998) und Endotoxin- Instillation (Parsey et al. 1998) schon nach kurzer Zeit PMN ins Lungenparenchym einwandern. Weiland et al. konnten 1986 in Untersuchungen an ARDS Patienten zeigen, dass die aus einer frühzeitig im Krankheitsverlauf durchgeführten Bronchoalveolären Lavage (BAL) gewonnene Zellpopulation zu etwa 70 % aus PMN besteht im Vergleich zu 0,2 % PMN in der BAL gesunder freiwilliger Probanden.

In die Lunge eingewanderte PMN modulieren entscheidend den akuten Entzündungsprozess, indem sie proinflammatorische Zytokine wie z. B.  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-8 (Shenkar et al. 1999), Wachstumsfaktoren und zytotoxische Produkte sezernieren. Zu letzteren zählen die Gruppe der Sauerstoffradikale (Holman et al. 1988) und die der Proteasen, im Besonderen die Neutrophilen Elastase und die Matrix-Metalloproteinasen (Carden et al. 1998).

Auf der einen Seite ist dies die physiologische und protektive Antwort des Organismus auf eine schwere Infektion oder Verletzung im Rahmen eines ablaufenden Entzündungsprozesses bestehend aus Endothelzellaktivierung, Leukozytenrekrutierung und Aktivierung sowie Permeabilitätserhöhung. Dieser physiologische Entzündungsprozess kann zu einer Reparatur des Lungenschadens (restitutio ad integrum)

führen. Unter Umständen kann er aber auch die pulmonale Schädigung potenzieren, ein Prozess, in welchem PMN und ihre sezernierten Produkte wahrscheinlich einen großen Anteil haben (Moraes et al. 2003).

Ergebnisse verschiedener Studiengruppen bestätigen die zentrale Bedeutung von PMN in der Pathogenese des akuten Lungenschadens. Zum Beispiel reduziert induzierte Neutropenie in einem anschließenden Lungenschädigungsmodell Gefäßpermeabilität und Sauerstoffradikalbildung (Heflin et al. 1981; Till et al. 1982). Auch konnten Parsey et al. 1998 zeigen, dass Neutropenie den typischen Anstieg des proinflammatorischen IL-1 $\beta$  nach Endotoxin- Gabe fast vollständig, den Anstieg von TNF- $\alpha$  signifikant reduziert. Im akuten Lungenschaden ist IL-1 $\beta$  der häufigste proinflammatorische Mediator in der BAL (Pugin et al. 1996). Über die potentiell destruktiven Eigenschaften sezernierter Neutrophilen- Elastase im Entzündungsprozess berichten Carden und Mitarbeiter (Carden et al. 1998), und eine Korrelation der Neutrophilen- Elastase- Aktivität im Serum mit dem Ausmaß des Lungenschadens konnte aufgezeigt werden (Donnelly et al. 1995).



**Abbildung 4:** Veränderungen der endo- und epithelialen Permeabilität beim ARDS mit Einwanderung von neutrophilen Granulozyten (PMN) in die Alveole, alveolärer Ödembildung, Freisetzung inflammatorischer Mediatoren (TNF = Tumor- Nekrose- Faktor; IL- 1, IL- 8 = Interleukine; PAF = Plättchen aktivierender Faktor) sowie Extravasation von plasmatischen Gerinnungsfaktoren (aus Walmrath et al. 2001).

### 1.3 Polymorphkernige Neutrophile und Perfluorocarbone

PMN spielen als wichtiger Baustein im Entzündungsprozess eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der akuten Lungenschädigung. Für Perfluorocarbone konnten in verschiedenen Studien antiinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden. Sie wirken, in der PLV eingesetzt, pulmoprotektiv und reduzieren nach Inkubation mit Alveolarmakrophagen unter anderem deren Phagozytoseleistung und Sauerstoffradikalausschüttung (Smith et al. 1995).

Infolgedessen war es insbesondere von Interesse zu untersuchen, welche Auswirkungen Perfluorocarbone auf PMN haben.

#### 1.3.1 Auswirkungen von Perfluorocarbonen auf PMN

Einer der ersten Schritte in der Entzündungskaskade stellt die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in der Alveole dar. Im Rahmen eines Schockmodells konnte an Ratten gezeigt werden, dass unter PLV die Menge der in die Lunge eingewanderten PMN, gemessen als Myeloperoxidase Aktivität, deutlich im Vergleich zur konventionellen Beatmung reduziert ist (Younger et al. 1997). Wurden Schweine nach Durchführung eines einstündigen kardiopulmonalen Bypasses mittels TLV beatmet, so zeigte sich in der BAL eine signifikant niedrigere PMN-Anzahl als unter CMV (Jiang et al. 2006).

Colton konnte in einem Schädigungsmodell mit Cobra Venom Faktor zeigen, dass eine Therapie mit PLV die Anzahl an PMN in der Lunge (histologisch per Zählung) und die Aktivität der MPO im Vergleich zur konventionellen Beatmung als Therapiestrategie deutlich reduziert. Wird die PLV erst 5 Minuten nach der Schädigung mittels CVF initiiert, sind diese Ergebnisse interessanterweise nicht mehr so ausgeprägt. Die Autoren schließen daraus, dass die PLV den frühen Inflammationsprozess unterdrückt (Colton et al. 1998).

In in vitro Versuchen wurden die Auswirkungen von PFC auf PMN weiter untersucht. So konnte gezeigt werden, dass eine Präinkubation der PMN mit PFC zu einer reduzierten Phagozytosefähigkeit führt (Virmani et al. 1984). Auch neuere Untersuchungen konnten eine signifikant reduzierte Phagozytoseleistung der PMN nach dreißigminütiger Inkubation mit PFC beobachten (Fernandez et al. 2001). Neben einer Einschränkung ihrer Phagozytoseleistung konnte aufgezeigt werden, dass PMN nach PFC- Inkubation in ihren chemotaktischen Eigenschaften deutlich reduziert sind (Virmani et al. 1984; Rossman et

al. 1996). Gleiches gilt für die Aktivierbarkeit neutrophiler Granulozyten, gemessen als Menge an freiem  $H_2O_2$  intrazellulär. Bereits nach kurzzeitigem PFC- Kontakt (2,5 min) ist die Menge an freiem intrazellulärem  $H_2O_2$  signifikant geringer als in der PFC-freien Kontrollgruppe. Ein zytotoxischer Effekt der PFC konnte nicht nachgewiesen werden (Rossman et al. 1996).

Zu den Auswirkungen einer Präinkubation mit PFC auf die Sauerstoffradikalausschüttung neutrophiler Granulozyten gibt es widersprüchliche Ergebnisse. So konnte gezeigt werden, dass eine Präinkubation isolierter, humaner neutrophiler Granulozyten mit einer PFC- Emulsion zu einer signifikant reduzierten Sauerstoffradikalausschüttung nach Stimulation mittels Phorbol- Myristat- Acetat (= TPA: Tetra- Phorbol- Acetat) im Vergleich zu einer nicht PFC inkubierten Kontrollgruppe führt (Messverfahren: Chemilumineszenz). Hierbei korrelierte das Ausmaß der Abnahme mit der eingesetzten PFC- Menge (Lowe et al. 1998). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen McDonagh und Mitarbeiter. In einem extrakorporalen Kreislaufmodell führte die Anwesenheit einer Perflubronemulsion während der Zirkulation zu einer signifikanten Abnahme der Sauerstoffradikalproduktion, wenn die anschließend isolierten PMN antigen stimuliert wurden (McDonagh et al. 2001). Allerdings zeigten ähnliche Untersuchungen an Blutneutrophilen ein anderes Ergebnis. Nach einstündiger Inkubation mit PFC ergab die Bestimmung der Superoxid- und Hydrogenperoxidproduktion keine Unterschiede zur Kontrollgruppe. Auch PMN, welche von ARDS Patienten aus der Bronchoalveolären Lavage (BAL) isoliert wurden, zeigten bezüglich der Superoxidanionenproduktion keinen Unterschied zwischen PLV und konventioneller Beatmungstherapie (Younger et al. 1997).

## 1.4 Fragestellung

Perfluorocarbone werden seit Jahren in der Flüssigkeitsbeatmung eingesetzt. Neben einer Verbesserung der Lungencompliance und der Oxygenierung konnten antiinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden.

Studien haben gezeigt, dass eine Inkubation neutrophiler Granulozyten mit Perfluorocarbonen zu einer Reduktion ihrer Aktivierbarkeit und ihrer phagozytotischen und chemotaktischen Eigenschaften führt. Bezüglich der granulozytären Sauerstoffradikalausschüttung nach PFC- Inkubation gibt es unterschiedliche Beobachtungen. In Studien wird sowohl eine Reduktion, als auch keine Beeinflussung der Sauerstoffradikalausschüttung diskutiert.

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, den Einfluss von Perfluorocarbonen auf den „respiratory burst“ und die Viabilität humaner Blutneutrophiler zu untersuchen.

Weiterhin sollte eine mögliche Beeinflussung der PFC spezifischen Effekte auf neutrophile Granulozyten durch Surfactant untersucht werden.

Folgende Fragen sollten daher beantwortet werden:

- Welche Auswirkungen hat eine PFC- Präinkubation auf die basale Sauerstoffradikalausschüttung nicht stimulierter PMN? Sind die Effekte abhängig von der eingesetzten PFC- Konzentration und von der Inkubationsdauer?
- Welche Auswirkungen hat eine Präinkubation mit PFC auf die nachfolgende Stimulierbarkeit der PMN? Besteht eine Abhängigkeit der Effekte von der PFC- Konzentration und Inkubationsdauer?
- Wie wirkt sich eine PFC-Präsenz während der Antigenstimulation auf den „respiratory burst“ aus? Welche Unterschiede bestehen zur reinen PFC- Präinkubation?
- Beeinflusst die Anwesenheit eines Surfactantpräparates die beobachteten Effekte einer PFC/ PMN Inkubation?
- Welche Auswirkungen hat eine Inkubation mit PFC auf die Viabilität von PMN?
- Bestehen Unterschiede im Wirkungsausmaß auf Sauerstoffradikalausschüttung und Viabilität zwischen den eingesetzten PFC (PF 5080 und FO 6167)?
- Zeigen sich in der elektronenmikroskopischen Untersuchung Hinweise auf PFC- bedingte morphologische Veränderungen der PMN?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Polymorphkernige Neutrophile

Die in den Versuchen eingesetzten neutrophilen Granulozyten wurden aus dem Blut freiwilliger gesunder adulter Spender nach dem von Bøyum beschriebenen Verfahren isoliert (Bøyum 1968). Eingesetzt wurden sie in der Konzentration  $1 \times 10^6$ / ml.

#### 2.1.2 Perfluorocarbone

In den Versuchen dieser Arbeit kamen die Perfluorocarbone FO 6167 (ABCR, Karlsruhe, Germany) und PF 5080 (3M, Neuss, Germany) zur Anwendung. FO 6167 ist Perfluorooctylbromide (Strukturformel  $C_8F_{17}Br$ ) in nicht medizinischem Reinheitsgrad. In Versuchen anderer Arbeitsgruppen wurden bereits toxische Eigenschaften des FO 6167 aufgezeigt (Rüdiger et al. 1998; Rüdiger et al. 2001). Perfluorooctylbromide (Perflubron) von medizinischem Reinheitsgrad wurde in verschiedenen Tierversuchen und klinischen Studien ohne toxische Effekte zu zeigen eingesetzt (LiquiVent, Alliance Pharmaceutical, San Diego, CA). PF 5080 (Strukturformel  $C_8F_{18}$ ) wurde bereits erfolgreich in der Flüssigkeitsbeatmung bei Tieren (Rüdiger et al. 2003) und in in vitro Versuchen (Rüdiger et al. 2001) eingesetzt ohne toxische Eigenschaften zu zeigen.

Die nachfolgende Tabelle 1 fasst die physikalisch- chemischen Eigenschaften der eingesetzten PFC zusammen.

**Tabelle 1:** (Datenquelle: 3M Speciality Fluids Newsletter Vol 1 No. 1, April 1995 und ABCR Karlsruhe)

<b>Eigenschaft</b>	<b>PF 5080</b>	<b>FO 6167</b>
Chemische Formel	$C_8F_{18}$	$C_8F_{17}Br$
Molekulargewicht (Dalton)	438	499
Dichte ( $g/cm^3$ bei $25^\circ C$ )	1,76	1,89
Oberflächenspannung (dyn/ cm bei $25^\circ C$ )	15	18
Kohlenstoffdioxidlöslichkeit (ml Gas/ 100 ml PFC bei $37^\circ C$ )	160	210

### **2.1.3 Candida**

Bei dem in Versuchen zur Stimulierung verwendeten Candida- Antigen handelt es sich um hitzeinaktivierte *Candida albicans*. In den Versuchen wurden sie zur Stimulation der PMN in einer Konzentration von  $3 \times 10^9$  Zellen/ ml (Versuchsreihen 3.1.2, 3.1.3) bzw.  $3 \times 10^8$  Zellen/ ml (Versuchsreihen 3.1.4, 3.2) eingesetzt. Ihre Konzentration wurde mittels photometrisch eingestellter optischer Dichte ermittelt.

### **2.1.4 Bakterien**

In einigen Versuchsreihen wurden zur Stimulation der PMN unbekapselte  $\beta$ -hämolyisierende Gruppe- B- Streptokokken (*Streptococcus agalactiae*) eingesetzt. Diese unbekapselte „high density“ Variante, im folgenden als GBS-HD bezeichnet, wurde mittels Gradientenzentrifugation in hypotonem Percoll<sup>®</sup> von dem bekapselten LD („low density“)- Stamm separiert.

Der Referenzstamm GBS 090 Ia HD Colindale wurde freundlicherweise von Stellan Håkansson (Abteilung für Pädiatrie, Umeå, Schweden) zur Verfügung gestellt. Die Bakterien wurden durch Hitze abgetötet und auf die Endkonzentration von  $1 \times 10^{10}$  CFU/ ml verdünnt und in 0,9 % NaCl aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei  $-70^\circ\text{C}$ .

### **2.1.5 Surfactant**

In den unter 3.1.4 beschriebenen Versuchen wurde den Ansätzen Surfactant zur Inkubation hinzugesetzt. Es wurde ausschließlich das modifizierte, natürliche Surfactantpräparat Curosurf<sup>®</sup> (Nycomed Arzneimittel GmbH, Ismaning) verwendet.

Curosurf<sup>®</sup> wird über mehrere Herstellungsschritte, die Waschen, Zentrifugieren, Chloroform- Methanol- Extraktion und Flüssigkeitschromatographie beinhalten, aus zerkleinerten Schweinelungen gewonnen (Robertson et al. 1990).

Curosurf<sup>®</sup> enthält etwa 99% polare Lipide und 1% hydrophile niedermolekulare Apoproteine (SP-B und SP-C). Das molare Verhältnis von SP-B zu SP-C beträgt etwa 1:2 (Schürch et al. 1995).

Das verwendete Material enthielt 80 mg Phospholipidfraktion pro Milliliter. In den Versuchen wurde Curosurf<sup>®</sup> mit RPMI- Medium auf eine Konzentration von 3 mg Phospholipid/ ml verdünnt und verwendet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolierung der PMN aus Spenderblut

Die Isolierung neutrophiler Granulozyten aus menschlichem Spenderblut erfolgte nach der von Bøyum entwickelten Separationsmethode (Bøyum 1968), welche im folgenden Abschnitt im Detail erläutert wird.

Die Arbeitsschritte zur Isolierung der neutrophilen Granulozyten finden zum Schutz vor Kontamination unter einer Sterilbank (Micro Flow Biological Safety Cabinet; NUNC; Wiesbaden- Bieberich) statt. Das venöse Vollblut wurde uns freundlicherweise von freiwilligen Spendern des Blutspendedienstes des Universitätsklinikum Göttingen zur Verfügung gestellt.

36 ml Blut in vier 9 ml Serum- Monovetten (SARSTEDT; Nümbrecht) werden auf zwei mit jeweils 10 ml Hemohe 6 % (BRAUN, Melsungen) gefüllte Perfusorspritzen aufgezogen und für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> aufrecht stehend inkubiert (Inkubator CYTOPERM, HERAEUS, Hannover).

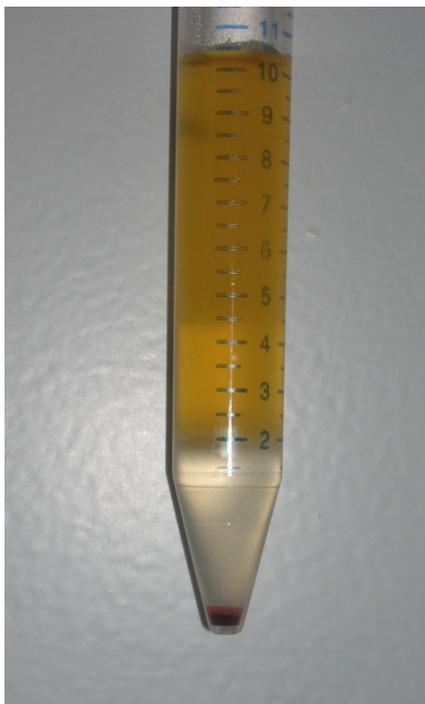
Während dieser Zeit kommt es zur Sedimentation. Das Sediment, bestehend aus den in die Hemohe- Lösung sedimentierten Erythrozyten, wird verworfen, und der Überstand mit den enthaltenen Plasmakomponenten und Zellen aus der Leukozytenfamilie werden vorsichtig, zu ungefähr gleichen Teilen, auf vier mit je 2 ml Ficoll- Plaque (PHARMACIA BIOTECH, Uppsala, Schweden) gefüllte 15 ml Röhrchen (SARSTEDT; Nümbrecht) überschichtet und anschließend für eine Zeitdauer von 30 min bei 428 g ohne Bremse zentrifugiert (Minifuge GL, HERAEUS-CHRIST GmbH, Osterode).

Dieser als Gradientenzentrifugation bezeichnete Vorgang dient der Separation von Lympho- und Monozyten, welche sich aufgrund ihrer geringeren Dichte oberhalb des Gradienten anlagern. Die Überstände werden verworfen, und die Pellets, bestehend aus PMN, Thrombozyten und restlichen Erythrozyten, werden in je 3 ml Lysispuffer (NH<sub>4</sub>CL 155 mM, KHCO<sub>3</sub> 10 mM, EDTA 0,1 mM) resuspendiert, gepoolt und auf je 10ml mit Lysis Puffer aufgefüllt. Sie werden für 5 min bei 4°C gekühlt bevor sie für 10 min bei 293 g mit Bremse zentrifugiert werden.

Der aus lysierten Erythrozyten bestehende Überstand wird verworfen, und die Pellets werden in 10 ml PBS- Dulbecco Puffer w/o Ca<sup>2+</sup> /Mg<sup>2+</sup> (BIOCHROM KG, Berlin) resuspendiert. Die anschließende Zentrifugation bei 203 g hat das Herauswaschen der Thrombozyten zum Ziel, welche sich nach der Zentrifugation im Überstand befinden, anschließend abgesaugt und verworfen werden. Das nun aus Granulozyten bestehende

Pellet wird in 10ml Kulturmedium (RPMI 1640 HEPES, Seromed, Berlin) resuspendiert und gemischt (Vortex Genie, BENDER & HOHEIN AG; Zürich; Schweiz). Es werden 50µl aus dem Inhalt in ein 1,5ml Reagiergefäß (PP; SARSTEDT; Nümbrecht) mit 450µl Kulturmedium RPMI überführt, anschließend werden aus dieser Zellsuspension 50 µl entnommen und mit 50 µl Trypanblau (SEROMED; Berlin) in einem neuen 1,5 ml Reagiergefäß gemischt. Aus dem Trypanblauansatz wird die Viabilität der PMN und die vorliegende Zellzahl durch Auszählen unter dem Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer (BRAND; Germany) ermittelt. Die restlichen 9,95ml Zellsuspension werden bei 293 g 10 min mit Bremse zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Das thrombozytenfreie Pellet wird mit RPMI- Medium so resuspendiert, um eine finale PMN- Konzentration von  $1 \times 10^6$  /ml zu erhalten.



**Abbildung 5:** Gradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque im Rahmen der PMN- Isolierung aus Vollblut. Zellschichten (von unten nach oben): Erythrozyten, Thrombozyten und PMN, Ficoll- Paque, Monozyten/ Lymphozyten, Plasma.

### 2.2.2 Nitroblautetrazolium Reduktionstest (NBT- Reduktionstest)

Um den oxidativen Metabolismus der PMN und die Auswirkungen einer PFC- Inkubation der PMN auf diesen beurteilen zu können, wurde der Nitroblautetrazolium (NBT)-Reduktionstest angewandt.

Das zugrunde liegende Prinzip des Testes ist die Reduktion des gelblichen, wasserlöslichen Tetrazolium- Farbstoffes zu dem bläulichen, nicht wasserlöslichen

Formazanfarbstoff. Induziert wird diese Reaktion durch die von PMN freigesetzten Sauerstoffradikale, wie es zum Beispiel im Rahmen des „respiratory burst“ bei der Phagozytose als Erregerabwehr geschieht (siehe Kapitel 1.2.2).

Der NBT- Reduktionstest wurde bereits mehrfach im Rahmen von Untersuchungen eingesetzt (Jarstrand et al. 1981, Herting et al. 1995).

In 1,5 ml Reagiergefäßen werden 50 µl einer 0,1 % NBT- Lösung (gelöst in HANKS-SALT- SOLUTION und sterilfiltriert) vorgelegt. Dem NBT- Reagenz werden dann 100 µl PMN (in RPMI), welche zu den jeweiligen Zeitabnahmen (t1, t30, t60) aus den Versuchsansätzen entnommen werden, hinzugefügt.

Bei den unter 3.1.2 beschriebenen Versuchen wurde dem vorgelegten NBT- Reagenz zur antigenen Stimulation der PMN zusätzlich 10 µl hitzeinaktivierte Candida bzw. GBS-HD zugefügt.

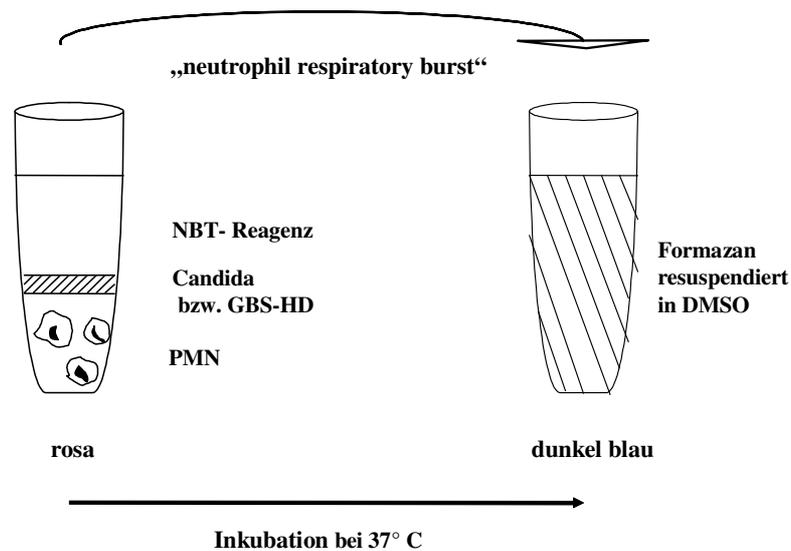
Anschließend werden die Reagiergefäße bei 37°C für 30 min im Schüttelinkubator (180 upm) (THERMOSHAKE; Gerhardt; Bonn) inkubiert und nach Ablauf der Zeit durch Zugabe von 100 µl 0,5 M HCL abgestoppt. Im Anschluss werden die Proben bei 814 g für 10 min zentrifugiert.

Das nun blau umgewandelte Formazan ist pelletiert, so dass der Überstand abpipettiert werden kann. Zur Resuspendierung werden 200 µl Dimethylsulfoxid (DMSO; Merck; Darmstadt) dem Formazan zugeführt, kurz gemischt und für 6 min im Ultraschallbad (Sonorex RK 100H, BANDELIN, Berlin) belassen und wiederholt durchmischt.

Anschließend werden je 180 µl aus dem Reagiergefäß entnommen und in eine Mikrotiter Elisa Platte (NALGE NUNC INT; Wiesbaden; Germany) überführt, und die optische Dichte (OD) wird mittels ELISA- Spektrophotometer (Sunrise Remote, TECAN, Österreich) bei 540 nm Wellenlänge gemessen. Als Leerwertkontrolle dient die OD von reinem Dimethylsulfoxid, welche nach Bestimmung von allen Ansätzen subtrahiert wird.

Die im ELISA- Spektrophotometer gemessene optische Dichte korreliert mit der gebildeten und freigesetzten Menge an reaktiven Sauerstoffradikalen durch die PMN (Jarstrand et al. 1981). Die individuell unterschiedliche basale Sauerstoffradikalausschüttung sowie die Sauerstoffradikalausschüttung nach Antigenkontakt der einzelnen Spender-PMN sind bei der Betrachtung der Ergebnisse zu bedenken.

Um mögliche Interaktionen des NBT- Reduktionstestes mit PFC zu untersuchen, wurde in Kontrollversuchen NBT allein mit PFC inkubiert, ohne dass es durch PFC zu einer Reduktion des Nitroblautetrazoliums kommt.



**Abbildung 6:** Schematisches Diagramm des Nitroblautetrazolium Reduktionstests (NBT- Test) nach Herting 1995. (PMN = Polymorphkernige Neutrophile, GBS-HD = „high density“ Variante der Gruppe B Streptokokken, DMSO = Dimethylsulfoxid)

### 2.2.3 Viabilitäts- und Zellzahlbestimmung

Da sich die vorliegende Arbeit mit den Auswirkungen von PFC auf den „respiratory burst“ neutrophiler Granulozyten befasst, war es von Bedeutung, eingehend zu untersuchen, wie sich eine PFC Inkubation auf die Viabilität und Zellzahl der PMN auswirkt. Hierzu haben wir uns folgender Testmethoden bedient.

#### 2.2.3.1 Trypanblau

PMN wurden mit PFC inkubiert und zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde den Proben ein Aliquot entnommen. Dieses wurde mit Trypanblau (SEROMED; Berlin), welches 1:2 mit PBS verdünnt und steril filtriert wurde, 3 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Auszählung der Zellen in einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop (Typ IM; Zeiss; Germany). Das Zytoplasma von Zellen, deren

Zellmembran nicht mehr intakt ist, lässt sich durch Trypanblau violett-blau anfärben. Diese Zellen, galten als avital und flossen nicht in die Zählung mit ein.

### **2.2.3.2 Cell Counter**

Analog zu der Trypanblau- Zellzählung wurde den Ansätzen nach erfolgter Inkubation zu den angegebenen Abnahmezeiten ein Aliquot entnommen, und im Anschluss wurde sofort die Zellzahl im Cell Counter (Micros 45, ABX- Diagnostics, Montpellier) bestimmt.

### **2.2.3.3 Zellproliferationsreagenz WST-1**

Mit dem WST-1 Test (WST = Water-soluble tetrazolium salt) lässt sich neben der Zellproliferation auch die Zellviabilität nachweisen. Das zugrunde liegende Prinzip des WST-1 Tests ist die Reduktion von WST-1 Reagenz zu wasserlöslichem Formazan durch lebende Zellen.

WST-1 gehört zu der Gruppe der Tetrazolium- Salze, die in Mitochondrien lebender Zellen durch das „Succinat- Tetrazolium Reductase“ System, das seinerseits Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette ist, in Formazan umgewandelt werden (Slater et al. 1963).

Die Gesamtaktivität der mitochondrialen Dehydrogenase korreliert hierbei mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen (Cory et al. 1991). Hohe Zellzahl im Gegensatz zu geringer Zellzahl lässt eine erhöhte Gesamtzymaktivität erwarten, was zu einer vermehrten Umwandlung von gelbem WST-1 zu wasserlöslichem, rotem Formazan führt. Umgekehrt lässt eine geringe Umwandlung in Formazan auf eine niedrige Zellzahl bzw. eine in ihrer enzymatischen Aktivität eingeschränkte Zellpopulation schließen. Eine genaue Differenzierung ist nicht möglich. Quantifiziert wird das von lebenden Zellen produzierte Formazan durch Messung der optischen Dichte im Multiwell- Spektrophotometer (Sunrise Remote, TECAN, Österreich) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm.

In dieser Arbeit wurde der WST-1 Test im Anschluss an die PFC- PMN Inkubation durchgeführt. 10 µl wurden aus den Ansätzen entnommen, in eine Microwell- Platte, in der bereits 50 µl WST-1 Reagenz vorgelegt waren, überführt und unter Schütteln bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte photometrisch gemessen.

## 2.3 Versuchsablauf

Gegenstand dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer Inkubation der PMN mit PFC auf den „respiratory burst“ zu untersuchen. Weiterhin wurden Viabilitätsbestimmungen (3.2) und elektronenmikroskopische Untersuchungen der PMN nach PFC Inkubation (3.3) durchgeführt. In allen Versuchen wurden PMN in der Ausgangskonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ ml eingesetzt.

Um einen guten Kontakt der PMN mit dem hydrophoben PFC zu gewährleisten, wurden PMN und PFC unter permanenter Rotation (Sample Mixer Model MXIC 1, DYNAL, Oslo) bei 37 °C miteinander inkubiert. Nach 1', 30' bzw. 60 min Inkubationszeit wurde der NBT- Reduktionstest mit anschließender Messung der optischen Dichte als Maß für die Sauerstoffradikalausüttung durchgeführt. Grundsätzlich wurden zu allen Versuchsreihen mindestens fünf Messungen, je in Form von Doppelbestimmungen, durchgeführt. Für die einzelnen Messungen und Versuchsreihen wurden PMN verschiedener Spender verwendet.

Um spezielle Fragestellungen zu untersuchen, wurde dieser Basis- Versuchsablauf modifiziert bzw. erweitert, auf welches im Folgenden näher eingegangen werden soll.

### 2.3.1 Präinkubation der PMN mit PFC

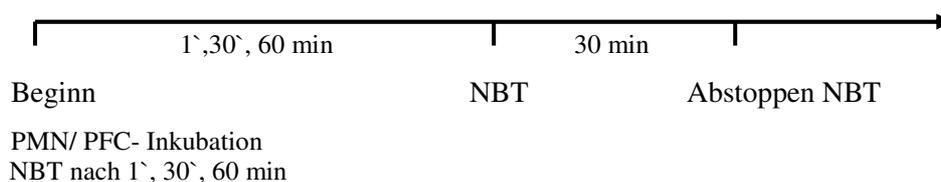
Um zu untersuchen, welchen Einfluss PFC auf die Sauerstoffradikalfreisetzung der neutrophilen Granulozyten haben, wurden PMN mit PFC inkubiert.

Die drei Ansätze bestehen aus einer PFC- freien Kontrolle (PMN in RPMI), sowie den beiden PFC-Ansätzen (PMN + PF 5080 und PMN + FO 6167). Zunächst wurden PMN und PFC in gleichen Mengen (Mischungsverhältnis PMN/PFC 1:2) miteinander inkubiert. In der Vorbereitung wurde zuerst das PFC in 15 ml Sarstedt Röhren vorgelegt, anschließend erfolgte die PMN Zugabe. Jeder der Ansätze wurde zu Versuchsbeginn kurz durchmischt.

Zu definierten Zeitpunkten ( $t_1 = 1$  min,  $t_{30} = 30$  min,  $t_{60} = 60$  min nach Zugabe der PMN) wurden aus diesen Ansätzen 100  $\mu$ l der Zellsuspension entnommen. In der Zeit zwischen den Abnahmen erfolgt eine kontinuierliche Durchmischung bei 37 °C durch Rotation. Vor jeder Abnahme wurden die Ansätze für 10 sec stehen gelassen, so dass sich das schwere PFC am Boden absetzen konnte, und Zellen aus dem Überstand entnommen werden konnten.

Die abgenommene 100 µl PMN-Suspension wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß, in dem bereits 50 µl NBT- Reagenz vorgelegt waren, überführt. Der NBT- Reduktionstest lief im Anschluss wie unter 2.2.2 beschrieben ab.

In einer anschließenden Versuchsreihe wurde der PFC-Effekt dann auf eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit hin untersucht. Die PFC wurden dazu in den Verhältnissen 1:2, 1:4 und 1:10 mit den PMN inkubiert. Es wurden ansonsten keine Änderungen in der Durchführung vorgenommen.

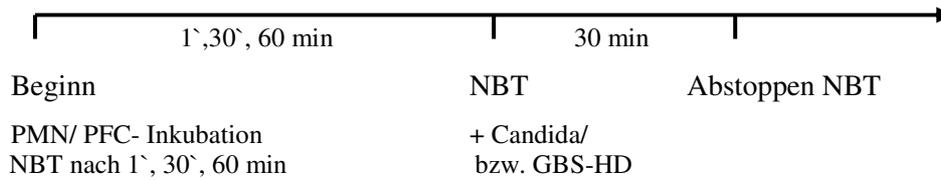


**Abbildung 7:** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs: Präinkubation der PMN mit PFC

### 2.3.2 Präinkubation der PMN mit PFC und nachfolgende Stimulation

Um die Fähigkeit der PMN, nach Inkubation mit PFC Sauerstoffradikale auf einen antigenen Stimulus hin zu bilden, zu untersuchen, wurden die PMN post incubationem mit Candida bzw. GBS-HD stimuliert. Die Versuchsreihe wurde analog zu 2.3.1 durchgeführt. Es wurden 100 µl PMN der Zellsuspension zu den Zeitpunkten t1, t30 , t60 aus den Ansätzen (PMN in RPMI; PMN + PF 5080; PMN + FO 6167) entnommen und in 2 ml Reaktionsgefäße, in denen 50 µl NBT- Reagenz und 10 µl Candida bzw. GBS-HD in den Konzentrationen  $3 \times 10^9$ /ml bzw.  $1 \times 10^{10}$ / ml vorgelegt waren, überführt. Der NBT-Reduktionstest lief im Anschluss unverändert ab.

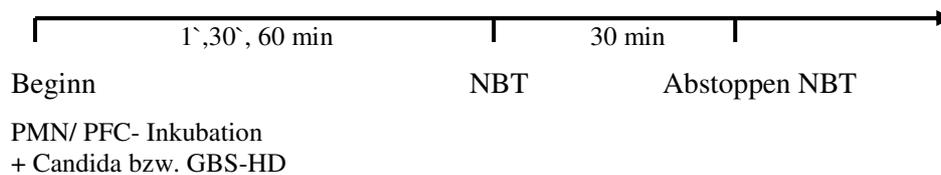
Um eine eventuell bestehende Konzentrationsabhängigkeit der PFC-Effekte aufzuzeigen, wurden die PMN ebenfalls in einer weiteren Versuchsreihe mit PFC in abnehmender Konzentration (1:2, 1:4, 1:10) inkubiert und im Anschluss mit 10 µl Candida bzw. GBS-HD stimuliert.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs: Präinkubation der PMN mit PFC und anschließende Stimulation

### 2.3.3 Inkubation der PMN mit PFC bei gleichzeitiger Stimulation

Nachdem zunächst untersucht wurde, ob eine Präinkubation der PMN mit PFC Auswirkungen auf die Sauerstoffradikalbildung bei anschließender Stimulation hat, so wurde in dieser Versuchsreihe untersucht, ob eine Inkubation von PMN mit PFC die Bildung von Sauerstoffradikalen bei gleichzeitiger Präsenz des antigenen Stimulus beeinflusst. Dazu wurde den drei Ansätzen (PMN in RPMI, PMN + PF 5080, PMN + FO 6167) gleich zu Versuchsbeginn Candida (10 µl Candida/ 100 µl PMN) in einer Konzentration von  $3 \times 10^9$  Zellen/ ml zugefügt. Die Abnahmen von 100 µl Zellsuspension aus den Ansätzen wurden zu den Zeitpunkten t1, t30 und t60 auf die in 2 ml Reagiergefäße vorgelegte 50 µl NBT- Reagenz überführt. Der NBT- Reduktionstest und die OD- Bestimmung wurden im Anschluss durchgeführt.

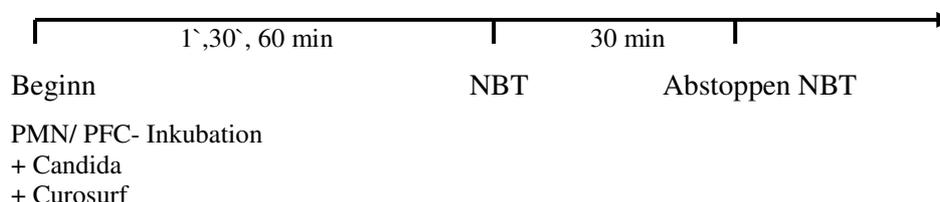


**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs: Präinkubation der PMN mit PFC bei gleichzeitiger Stimulation

### 2.3.4 Inkubation der PMN und PFC bei gleichzeitiger Stimulation und Surfactantzugabe

Da sich aus der Literatur Hinweise ergaben (Rüdiger et al. 2001, Herting et al. 1995), dass die Anwesenheit von Surfactant die Wirkung von PFC modifizieren könnte, wurde in einer weiteren Versuchsreihe neben der Zugabe von Candida (10 µl Candida/ 100 µl PMN) auch Curosurf (100 µl Curosurf/ 100 µl PMN) den Ansätzen dazugegeben. Das Beibehalten der Konzentrationsverhältnisse wurde beachtet. Curosurf wurde in einer Konzentration von 3 mg Phospholipid/ ml eingesetzt.

Die vier Ansätze bestanden aus einer Kontrolle (PMN in RPMI), einem Ansatz aus PMN und Curosurf, je einem Ansatz aus PMN und PF 5080 bzw. FO 6167 und einem Ansatz aus PMN, PF 5080 bzw. FO 6167 und Curosurf. PMN und das PFC lagen in gleichen Mengen vor (1:2). Jeder Ansatz enthielt 10 µl Candida/ 100 µl PMN in einer Konzentration von  $3 \times 10^8$ / ml. Auch hier wurde nach den Abnahmen der Aliquots zu den Zeitpunkten t1, t30, t60 der NBT- Reduktionstest mit anschließender OD- Messung durchgeführt.



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs: Präinkubation der PMN mit PFC bei gleichzeitiger Stimulation und Surfactantzugabe

### 2.3.5 Simultaninkubation von PMN, PFC, Candida und NBT

Um zu gewährleisten, dass es zu keiner Unterbrechung des PMN- PFC Kontaktes während Messung der Sauerstoffradikalbildung kommt, musste der Versuchsaufbau modifiziert werden. Ziel war es zu erreichen, dass der NBT- Reduktionstest, welcher in den vorherigen Versuchen immer in Abwesenheit von PFC abgelaufen war, in Anwesenheit von PFC abläuft. Die Proben wurden in 2 ml Reagiergefäßen angesetzt.



Zu den Abnahmezeitpunkten wurde den jeweiligen Ansätzen 200 µl Suspension (enthält PMN) aus dem Überstand entnommen und diese sofort im Anschluss mit 500 µl einer Aldehydmischung (1,5 % Glutaraldehyd + 1,5 % Formaldehyd in 0,1 M Na- Cacodylat) primärfixiert. Die weitere Aufarbeitung der Proben verlief analog Protokoll. Es umfasste, hier kurz zusammengefasst, eine Postfixierung mit Schwermetallsalzen (1 % Osmiumtetroxid in 0,1 M Na- Cacodylat), eine Blockkontrastierung (1,5 % Uranylacetat in Aqua bidest), eine schrittweise Entwässerung mittels Aceton und die anschließende Einbettung in Kunstharzen (Araldit) (Russel et al. 1992, Hunter et al. 1993).

Die Proben wurden qualitativ mit einem Transmissionselektronenmikroskop EM 10 A (Zeiss, Oberkochen) untersucht. Bei einer Beschleunigungsspannung von 40 kV wurden die auf Formvar- befilmten 1- Loch- Blenden aufgebrauchten Schnitte bei Vergrößerungen zwischen 3000 x und 12000 x ausgewertet. Dokumentiert wurden die Aufnahmen mit einer Planfilmkamera auf Kodak 4489 electron microscope film.

## 2.5 Statistische Methoden

Zur Ermittlung der optischen Dichte (OD) im NBT- Reduktionstest bzw. WST-1 Test zu den entsprechenden Abnahmezeitpunkten (t1, t30, t60) wurden alle Experimente dieser Arbeit in Doppelbestimmungen ausgeführt. Die durchschnittliche OD zweier Messungen eines jeden Leukozytenspenders wurde ermittelt, und aus diesem Datenkollektiv wurden im Folgenden Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der OD des jeweiligen Ansatzes errechnet. Die in die Berechnung der Werte einfließende Anzahl der Leukozytenspender (n) lag je nach Versuchsansatz zwischen fünf und neun.

Die graphische Darstellung und statistischen Analyse wurde unter Zuhilfenahme der GraphPad-Prism<sup>®</sup>-Software (GraphPad Prism Version 3.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) erstellt.

Die OD der jeweiligen Ansätze wurde gegen die Zeit (t1, t30, t60) graphisch größtenteils in Form von vertikalen Säulendiagrammen, vereinzelt auch in Gestalt von Regressionskurven und Tabellen dargestellt. Um statistische Unterschiede innerhalb einer Ansatzgruppe zu errechnen, wurde die Varianzanalyse („one-way ANOVA“) mit nachfolgendem „post- test“ nach Turkey bzw. Bonferroni angewandt. Ein p- Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Auswirkungen einer Inkubation mit Perfluorocarbonen auf die Sauerstoffradikalausschüttung von PMN

Um die Auswirkungen von PFC auf die Fähigkeit der PMN, Sauerstoffradikale zu bilden, zu untersuchen, wurden PMN mit PFC inkubiert.

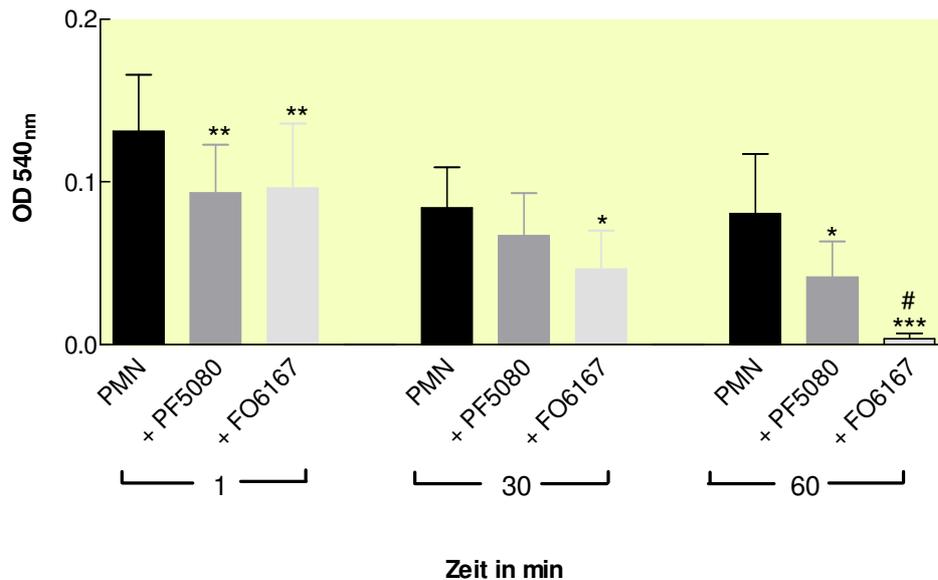
Dabei wurde nach Vorinkubation der PMN mit PFC die Auswirkung auf die basale Sauerstoffradikalausschüttung nicht antigenstimulierter PMN (3.1.1) und auf die anschließende Stimulierbarkeit der PMN durch Candida/ bzw. GBS-HD (3.1.2) untersucht. Zusätzlich wurde PFC in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, um eine eventuell vorhandene Abhängigkeit der PFC-Effekte von der eingesetzten PFC Konzentration aufzuzeigen.

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit die Sauerstoffradikalausschüttung der PMN bei gleichzeitiger Gegenwart von PFC und antigenem Stimulus beeinflusst wird (3.1.3), und inwieweit eine Surfactantmitinkubation die PFC- Wirkung modifiziert (3.1.4).

In der im Ablauf leicht modifizierten Versuchsreihe 3.1.5 wurde der NBT- Reduktionstest in Gegenwart von PFC gestartet und durchgeführt. Hierdurch sollte gewährleistet werden, dass es zu keiner Unterbrechung des PMN/ PFC Kontaktes während Messung der Sauerstoffradikalbildung kommt.

#### **3.1.1 Auswirkungen einer PFC- Präinkubation auf die Sauerstoffradikal- ausschüttung nicht stimulierter PMN**

Um die Auswirkungen einer Präinkubation der PMN mit PFC auf deren Sauerstoffradikalausschüttung im nicht antigenstimulierten Zustand zu untersuchen, wurden PMN und PFC miteinander inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte als Maß der Sauerstoffradikalausschüttung nach Durchführung des NBT-Reduktionstests photospektrometrisch gemessen.



**Abbildung 12:** NBT- Reduktion durch neutrophile Granulozyten nach Präinkubation mit PFC (PF 5080 bzw. FO 6167) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PMN). Messungen nach PFC-Inkubationsdauer von 1`, 30` und 60 Minuten. (Mittelwerte +/- (SD); n = 6 Versuche; \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 vs. PMN; # p <0,05 vs. + PF 5080)

Wie in Abb. 12 dargestellt, zeigt sich nach einer Inkubation von 1 min für beide PFC-Ansätze eine signifikant geringere OD als für den PFC freien Kontrollansatz (beide PFC: \*\* p<0,01 vs. PMN).

Die OD der mit PFC präinkubierten PMN nimmt im Zeitverlauf im Vergleich zur Kontrollgruppe weiterhin ab. Nach 60 min PFC- Inkubation ist die gemessene OD für beide PFC- Ansätze signifikant niedriger als die des Kontrollansatzes. Die OD der mit PF 5080 inkubierten PMN beträgt zum Zeitpunkt t60 ungefähr 50 % der Kontroll- OD (\* p<0,05 vs. PMN), die OD der mit FO 6167 inkubierten PMN geht gegen Null (\*\*\*) p<0,001 vs. PMN). Es ist zu beobachten, dass die OD ab dreißigminütiger Präinkubationszeit unter FO 6167 niedriger ist als unter PF 5080. Dieser Effekt wird mit längerer Inkubationszeit signifikant (t60: # p <0,05 vs. + PF 5080).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Präinkubation nicht antigenstimulierter PMN mit PFC im Vergleich zur PFC-freien Kontrolle zu einer Abnahme der basalen Sauerstoffradikalausüttung führt. Dieser Effekt ist abhängig von der Inkubationsdauer und Art des PFC.

## Abhängigkeit von der PFC- Konzentration

Um zu untersuchen, inwieweit der beobachtete PFC-Effekt auf die Sauerstoffradikal-freisetzung von der PFC- Konzentration abhängig ist, wurden in dieser Versuchsreihe die PMN mit unterschiedlichen PFC- Konzentrationen (1:2, 1:4, und 1:10) inkubiert. Die Ergebnisse sind für PF 5080 und für FO 6167 in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2:** NBT- Reduktion durch neutrophile Granulozyten nach Präinkubation mit verschiedenen PF 5080 und FO 6167 Konzentrationen im Vergleich zur PFC freien Kontrollgruppe (PMN). Messungen nach Inkubationsdauer von 1`, 30` und 60 Minuten (t1, t30, t60).

(Mittelwerte +/- (SD); n = 6 Versuche; \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 vs. PMN; # p<0,05, ## p<0,01 vs. PF 5080 1:10 bzw. FO 6167 1:10).

		OD t1	OD t30	OD t60
<b>P M N</b>	<b>Kontrolle</b>	0,17 (± 0,06)	0,14 (± 0,07)	0,10 (± 0,06)
	<b>+ PF 5080 (1:10)</b>	0,17 (± 0,05)	0,14 (± 0,07)	0,08 (± 0,01)
	<b>+ PF 5080 (1:4)</b>	0,16 (± 0,04) *	0,12 (± 0,06) #	0,05 (± 0,02) **
	<b>+ PF 5080 (1:2)</b>	0,15 (± 0,05) *** #	0,08 (± 0,04) ** ##	0,02 (± 0,02) *** #
<b>P M N</b>	<b>Kontrolle</b>	0,19 (± 0,05)	0,17 (± 0,07)	0,14 (± 0,07)
	<b>+ FO 6167 (1:10)</b>	0,13 (± 0,03) *	0,12 (± 0,04)	0,11 (± 0,05)
	<b>+ FO 6167 (1:4)</b>	0,09 (± 0,04) ***	0,09 (± 0,02) **	0,08 (± 0,04) * #
	<b>+ FO 6167 (1:2)</b>	0,11 (± 0,05) **	0,06 (± 0,02) *** #	0,03 (± 0,02) *** ##

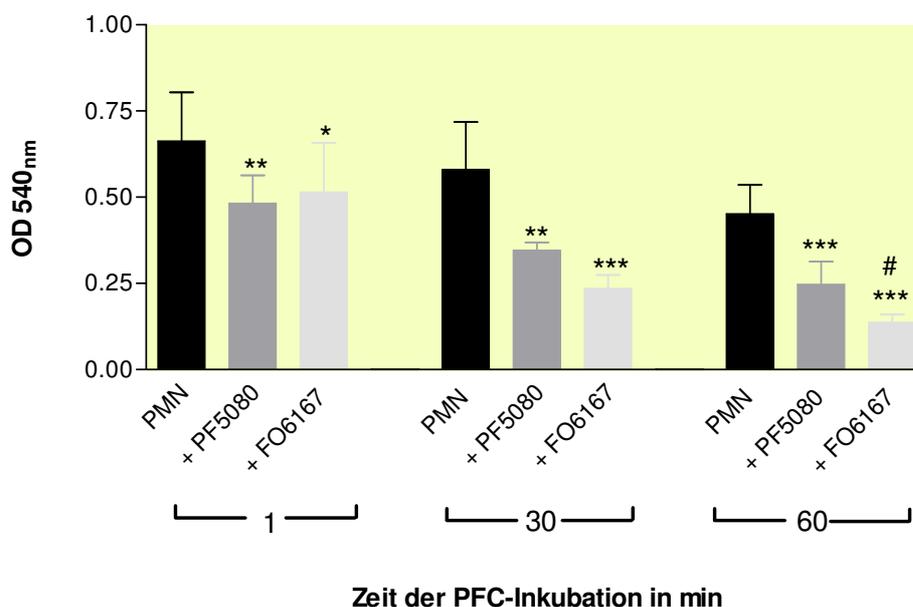
In der PF 5080 Gruppe ist zu erkennen, dass mit steigendem PFC- Anteil die OD sinkt. Zum Zeitpunkt t1 ist zu beobachten, dass PF 5080 in hoher Konzentration (1:2) zu einer Abnahme der OD im Vergleich zur Kontrolle führt (\*\*\*p<0,001 vs. PMN), dagegen aber in niedriger Konzentration (1:10) eingesetzt, die OD- Werte im Bereich der Kontrolle liegen. Nach 30 min (t30), bzw. 60 min (t60) PFC- Inkubation bleiben die Unterschiede in der OD zwischen den Ansätzen hoher (1:2) und mittlerer (1:4) PFC- Konzentrationen und der Kontrolle signifikant, wogegen bei PFC in niedriger Konzentration die OD nicht signifikant niedriger ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es nach PF 5080 Inkubation konzentrationsabhängig zu einer Reduktion der basalen Sauerstoffradikalaussschüttung kommt, und dass PF 5080 eingesetzt in einer Konzentration von 1:10 zu keinem signifikanten Abfall der OD mehr führt.

Aus der Tabelle 2 wird auch für eine Inkubation der PMN mit FO 6167 eine Abhängigkeit der Effekte auf die Sauerstoffradikalausschüttung von der eingesetzten FO 6167 Konzentration deutlich. Eine PMN/ FO 6167 Ratio von 1:10 führt nach 30 min bzw. 60 min Inkubationszeit zu keiner signifikanten Reduktion der OD. Ein signifikanter Unterschied zu FO 6167 in hoher Konzentration (1:2) besteht dagegen zu t30 und t60.

### 3.1.2 Auswirkungen einer PFC- Präinkubation auf die nachfolgende Stimulierbarkeit der PMN

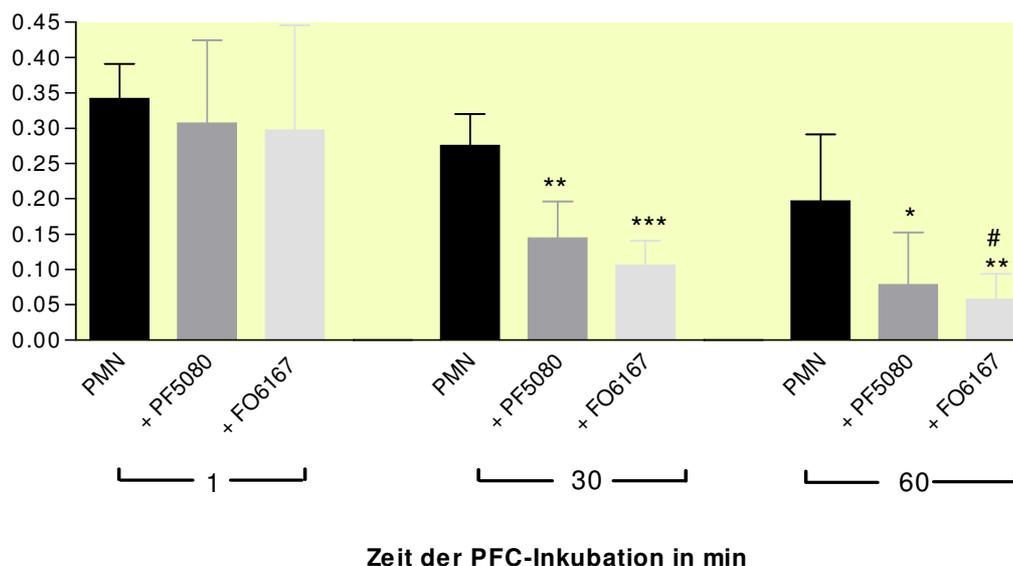
Um die Auswirkungen einer Inkubation mit PFC auf die Sauerstoffradikalausschüttung der PMN auf einen antigenen Stimulus hin zu untersuchen, wurden die PMN für 1`, 30` und 60 min mit PFC präinkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit erfolgte die Stimulation der PMN (in Abwesenheit von PFC) mit hitzeinaktivierten Candida bzw. GBS- HD. Abb.13 zeigt die gemessene OD als Maß für die Ausschüttung von Sauerstoffradikalen nach Stimulation mit Candida.



**Abbildung 13:** NBT- Reduktion durch neutrophile Granulozyten. Die PMN wurden nach Präinkubation mit PFC mittels Candida ( $3 \times 10^9$  /ml) stimuliert. Kontrolle ist ein PFC freier Ansatz (PMN). Messungen erfolgten nach 1`, 30`, 60 Minuten PFC-Inkubationsdauer. (Mittelwerte +/- (SD); n = 6 Versuche; \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 vs. PMN; # p<0,001 vs. PF 5080)

Zum Zeitpunkt t1, d.h. nach einer Präinkubation mit PFC von einer Minute, lässt sich eine im Vergleich zur PFC freien Kontrollgruppe signifikant geringere OD der mit PF 5080 und FO 6167 präinkubierten PMN beobachten. Diese OD- Differenz zur Kontrolle nimmt mit der Dauer der PFC- Präinkubation zu. Nach 60 min Inkubation mit PF 5080 lassen sich die PMN durch Candida- Zugabe im Vergleich zur Kontrolle nur um ca. 50 % stimulieren ( $p < 0,001$  vs. PMN). Die mit FO 6167 inkubierten PMN erreichen nach Candida- Stimulation einen OD- Wert, der ungefähr einem Drittel der Kontrolle entspricht ( $p < 0,001$  vs. PMN).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Ausschüttung von Sauerstoffradikalen der mit PFC präinkubierter PMN auf eine nachfolgende Candida Exposition hin, im Vergleich zu nicht PFC präinkubierten PMN, signifikant niedriger ist. Dieser Effekt wird mit zunehmender Inkubationszeit größer und ist für das FO 6167 stärker ausgeprägt.



**Abbildung 14:** NBT- Reduktion durch neutrophile Granulozyten. Die PMN wurden nach Präinkubation mit PFC mittels GBS-HD stimuliert. Kontrolle ist ein PFC freier Ansatz (PMN). Messungen erfolgten nach 1`, 30`, 60 Minuten PFC-Inkubationsdauer.

(Mittelwerte +/- (SD); n = 5 Versuche; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. PMN; #  $p < 0,05$  vs. PF 5080)

Abb. 14 zeigt die Auswirkungen auf die Ausschüttung von Sauerstoffradikalen der mit PFC präinkubierten PMN nach GBS-HD Stimulation im Vergleich zu nicht PFC präinkubierten PMN. Auch hier zeigt sich nach GBS-HD Stimulation ein Abfall der OD bei den mit PFC präinkubierten PMN im Vergleich zu der nicht PFC präinkubierten Kontrollgruppe. Signifikant ist die OD- Differenz zwischen Kontrollgruppe und PFC- Gruppe erst nach 30 min Inkubation mit PFC (PF 5080:  $p < 0,01$  vs. PMN; FO 6167:  $p < 0,001$  vs. PMN). Nach 60 Minuten beträgt die OD der mit PF 5080 präinkubierten PMN ungefähr 40 %, und die OD der mit FO 6167 präinkubierten PMN ungefähr 30 % der OD der Kontrollgruppe.

Es lässt sich festhalten, dass eine Präinkubation der PMN mit PFC ihre Fähigkeit zur Sauerstoffradikalausüttung nach einer Stimulation durch GBS-HD herabsetzt. Dieser Effekt nimmt mit der Inkubationsdauer zu und ist für das FO 6167 stärker ausgeprägt als für PF 5080.

### Abhängigkeit von der PFC- Konzentration

Um zu untersuchen, inwieweit die beobachtete Wirkung der PFC- Präinkubation auf die Stimulierbarkeit der PMN durch Candida von der eingesetzten PFC- Konzentration abhängt, wurden die PMN in einer anschließenden Versuchsreihe mit unterschiedlichen PFC- Konzentrationen (1:2, 1:4, und 1:10) für 1` und 60` inkubiert und anschließend mittels Candida stimuliert.

**Tabelle 3:** NBT- Reduktion durch neutrophile Granulozyten. Die PMN wurden mit PF 5080 bzw. FO 6167 in verschiedenen Konzentrationen präinkubiert und anschließend mit Candida ( $3 \times 10^9$ /ml) stimuliert. Kontrolle ist ein PFC freier Ansatz (PMN). Messungen erfolgten nach 1`, und 60 min PFC- Inkubationsdauer.

(Mittelwerte +/- (SD); n = 5 Versuche; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. PMN; ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  all vs. PF 5080 1:2 bzw. FO 6167 1:2)

		OD t1	OD t60
P M N	Kontrolle	0,31 (0,02)	0,26 (0,02)
	+ PF 5080 (1:10)	0,29 (0,07)	0,21 (0,03) * ###
	+ PF 5080 (1:4)	0,26 (0,07)	0,18 (0,01) *** ###
	+ PF 5080 (1:2)	0,25 (0,04) *	0,08 (0,01) ***
P M N	Kontrolle	0,49 (0,19)	0,37 (0,15)
	+ FO 6167 (1:10)	0,44 (0,12)	0,24 (0,05) ##
	+ FO 6167 (1:4)	0,38 (0,11) *	0,15 (0,04) **
	+ FO 6167 (1:2)	0,35 (0,14) **	0,05 (0,01) ***

In Tabelle 3 zeigt sich, dass eine Präinkubation mit PF 5080 in hoher Konzentration (1:2) bereits nach 1 Minute im Vergleich zur PFC- freien Kontrolle zu einer signifikanten OD- Abnahme nach Candida Stimulation führt ( $p < 0,05$ ). Eine sechzigminütige Präinkubation mit PF 5080 in hoher Konzentration (1:2) resultiert in einer stärkeren Abnahme der OD als PF 5080 in mittlerer (1:4) und niedrigerer Konzentration (1:10). Die Unterschiede sind zu t60 mit  $p < 0,001$  vs. PF 5080 (1:2) signifikant.

Analog zeigt Tabelle 3 auch für FO 6167 eine Abhängigkeit der Stimulierbarkeit der PMN durch nachfolgende Candida- Zugabe von der eingesetzten FO 6167 Konzentration. Die Fähigkeit zur Ausschüttung von Sauerstoffradikalen nach Stimulation ist umso stärker reduziert, je höher die eingesetzte FO 6167 Konzentration ist.

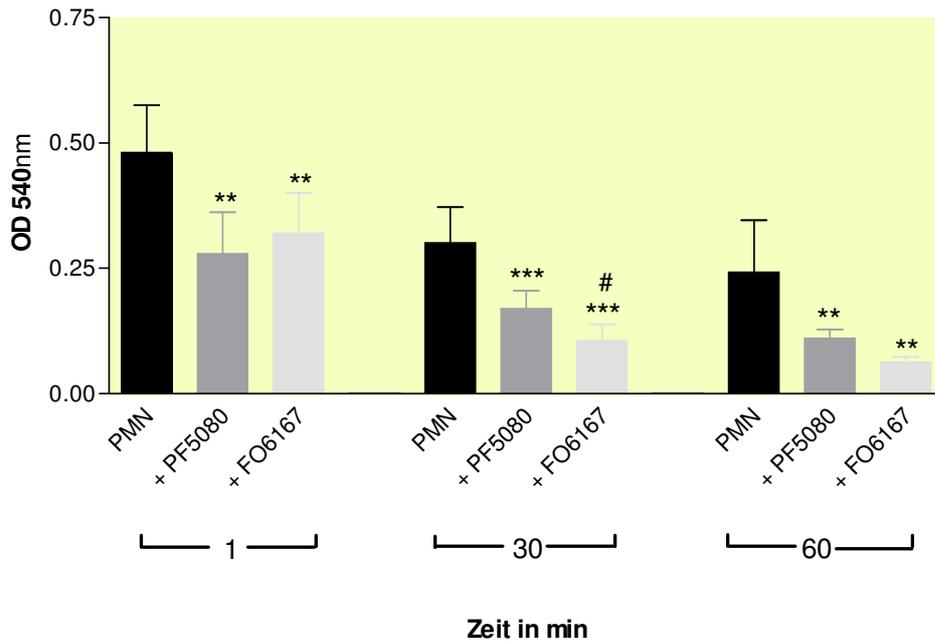
Der Unterschied in der OD zwischen den einzelnen Versuchsreihen (Abb. 13 zu Tab. 3) ist durch das variable Ausmaß der Sauerstoffradikalausschüttung der jeweiligen Spender-PMN nach antigener Stimulation zu erklären.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Auswirkungen einer PF 5080 bzw. einer FO 6167 Präinkubation der PMN auf die nachfolgende Candida induzierte Sauerstoffradikalausschüttung von der eingesetzten PFC- Konzentration abhängig ist, und der Effekt mit der Inkubationsdauer zunimmt.

### **3.1.3 Auswirkungen einer gleichzeitigen PFC- Inkubation und Stimulation auf die Sauerstoffradikalausschüttung der PMN**

Nachdem ein Effekt einer PFC- Präinkubation auf die nachfolgende Stimulierbarkeit der PMN aufgezeigt wurde, war anschließend die Frage zu beantworten, ob eine gleichzeitige Inkubation von PMN, PFC und antigenem Stimulus (Candida) einen ähnlichen Effekt zeigt.

Im Gegensatz zum vorigen Versuchablauf, in welchem die Stimulation der PMN nach der Inkubation mit PFC erfolgte, wurden die neutrophilen Granulozyten jetzt in Gegenwart von PFC mit Candida stimuliert.



**Abbildung 15:** NBT- Reduktion durch neutrophile Granulozyten nach simultaner PFC- Inkubation und Stimulation (*Candida*  $3 \times 10^9$  / $\mu$ l). Die Messungen erfolgten nach 1', 30' und 60 Minuten. Als Kontrollansatz fungiert ein PFC- freier Ansatz (PMN). (Mittelwerte  $\pm$ -(SD); n = 5 Versuche; \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 vs. PMN; # p<0,05 vs. PF 5080).

Wie aus Abb. 15 deutlich wird, zeigt sich nach einminütiger Inkubation (t1) im Vergleich zur Kontrolle, die kein PFC im Ansatz enthält, eine signifikante Abnahme der OD bei den PFC- Ansätzen. Die OD des PF 5080 Ansatzes beträgt nur ca. 60 % der Kontroll- OD (p<0,01 vs. PMN), die des FO 6167- Ansatzes etwa 70 % des Kontroll- OD Wertes (p<0,01 vs. PMN).

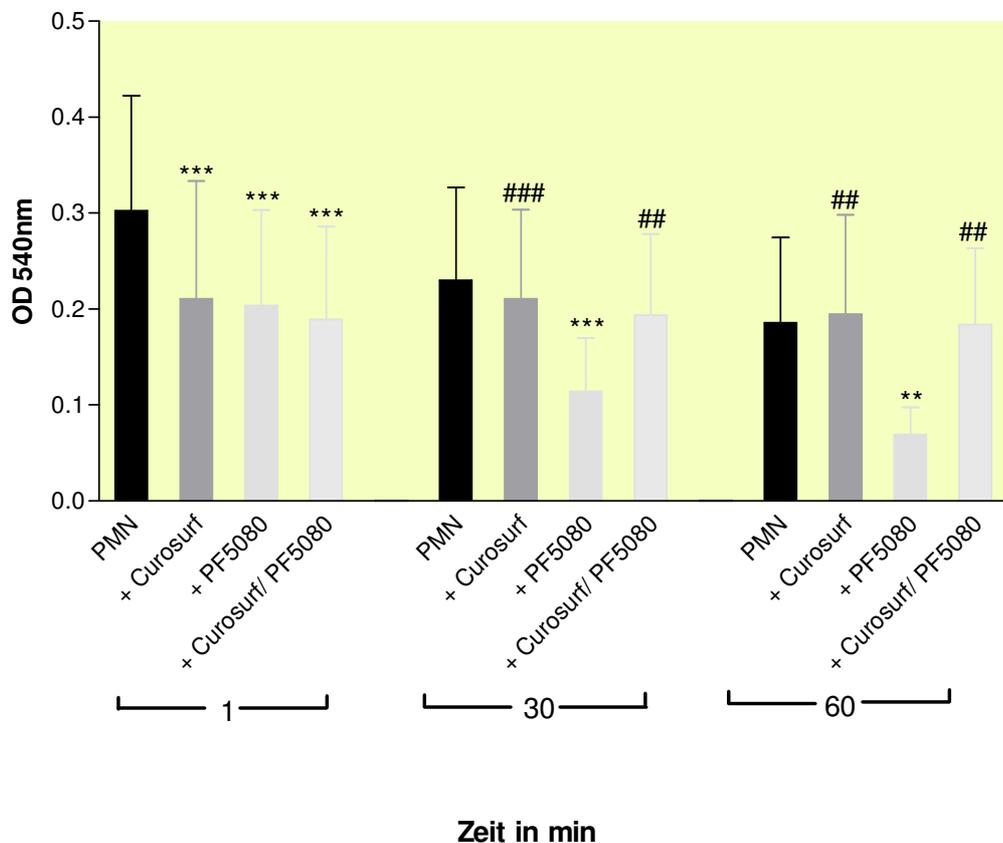
Zu t1 ist die OD unter PF 5080 Inkubation niedriger als unter FO 6167 Inkubation, was sich jedoch nach 30' und 60 Minuten umkehrt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in Gegenwart von PFC die *Candida* induzierte Sauerstoffradikalausschüttung signifikant geringer ist. Dieser Effekt ist schon nach kurzer Inkubationsdauer (t1) signifikant.

### 3.1.4 Auswirkungen einer Curosurfinkubation bei gleichzeitiger PFC-Inkubation und antigener Stimulation auf die Sauerstoffradikal-ausschüttung der PMN

Um zu untersuchen, ob die PFC-Wirkung auch in Gegenwart von Surfactant reproduzierbar ist, wurden die PMN mit PFC und Surfactant inkubiert und gleichzeitig mit Candida stimuliert.

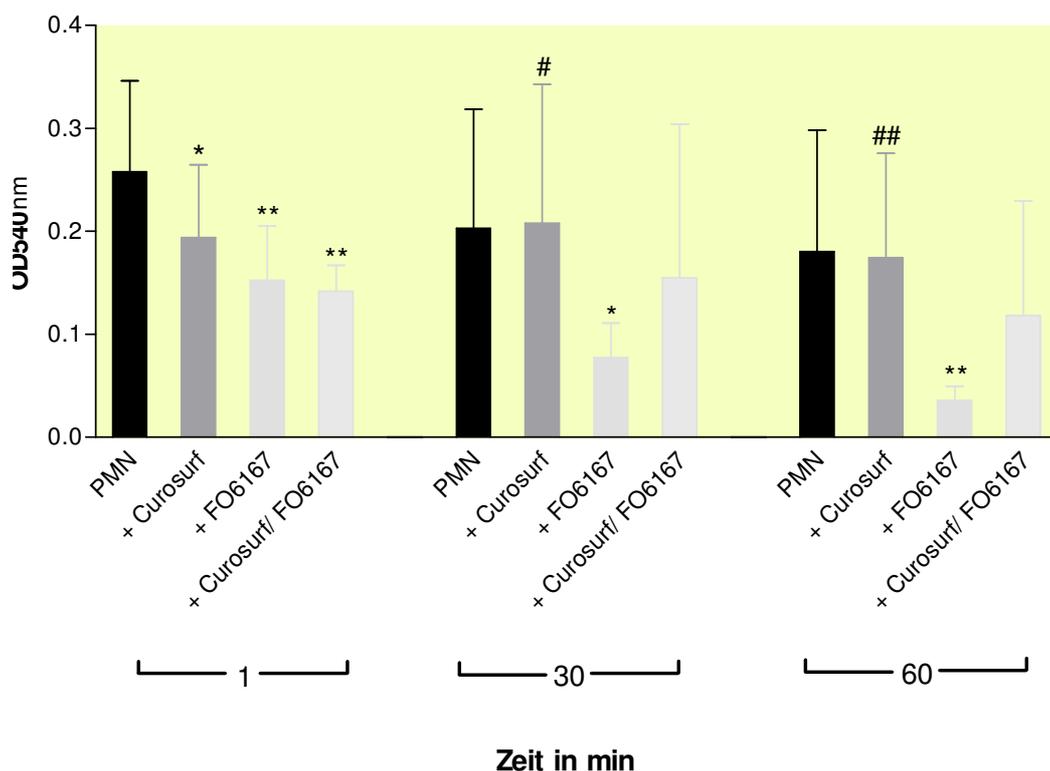
Der Kontrollansatz enthält kein PFC. Die Abnahmen und der anschließende NBT-Reduktionstest finden nach einer Inkubationszeit von 1`, 30` und 60 Minuten statt.



**Abbildung 16:** NBT- Reduktion durch neutrophile Granulozyten. Es wurden PF 5080 und Candida ( $3 \times 10^8 / \mu\text{l}$ ) in Gegenwart von Curosurf (3 mg PL/ ml) mit PMN inkubiert. Die Messungen erfolgten nach 1`, 30` und 60 Minuten. (Mittelwerte +/- (SD); n = 5 Versuche; \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 vs. PMN; ## p<0,01, ### p<0,001 vs. PF 5080).

Aus Abb. 16 geht hervor, dass unter alleiniger Curosurf- Inkubation die OD im Vergleich zur Kontrollgruppe nach einminütiger Inkubation reduziert ist (\*\*\*)  $p < 0,001$  vs. PMN). Ab dreißigminütiger Inkubationszeit besteht dieser Unterschied in der OD zur Kontrolle nicht mehr. Der Effekt des PF 5080 auf die OD bei simultaner Candida Stimulation ist aus den Versuchen unter 3.1.3 bereits bekannt. Wird dem Ansatz Curosurf hinzugefügt, so wird der OD reduzierende Effekt des PF 5080 geringer. Die OD nach 30` und 60 Minuten Inkubation unterscheidet sich nicht von der OD der reinen PMN/ Curosurf Kontrolle und ist signifikant größer als die des nur PF 5080 enthaltenen Ansatzes (##  $p < 0,01$  vs. PF 5080).

Es lässt sich also folgern, dass Curosurf die PF 5080 Wirkung auf die Sauerstoffradikalbildung weitestgehend aufhebt.



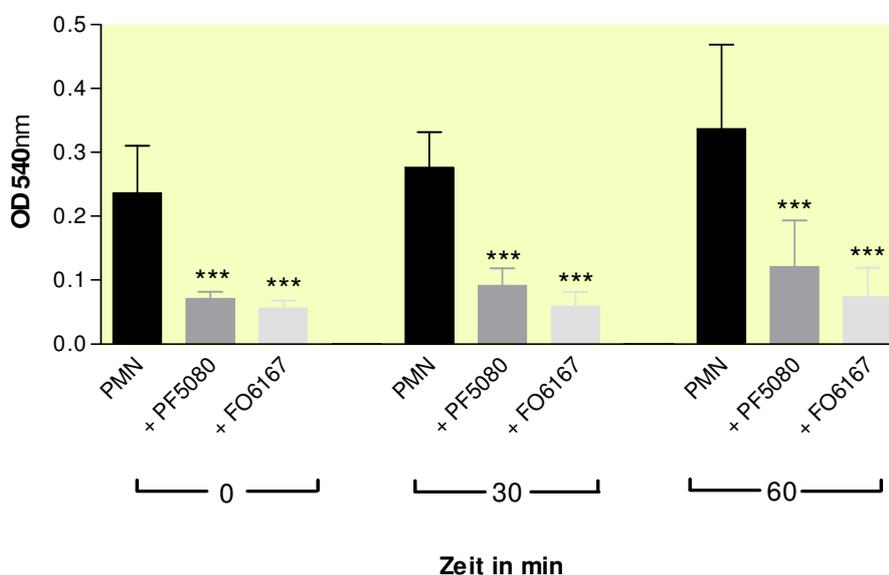
**Abbildung 17:** NBT- Reduktion durch neutrophile Granulozyten. Es wurden FO 6167 und Candida ( $3 \times 10^8 / \mu\text{l}$ ) in Gegenwart von Curosurf (3 mg/ ml) mit PMN inkubiert. Die Messungen erfolgten nach 1`, 30`, und 60 Minuten. (Mittelwerte +/- (SD); n = 5 Versuche; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  vs. PMN; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  vs. FO 6167).

Wie Abb. 17 zeigt, führt die Curosurfinkubation auch zu einer Reduktion der FO 6167 Auswirkungen auf die OD. Vergleicht man den FO 6167/ Curosurf- Ansatz mit dem reinen FO 6167- Ansatz und mit der Curosurf- Kontrolle zu den Zeitpunkten nach 30` und 60 Minuten, so kann man jedoch nur von einer partiellen Reduktion der FO 6167- Effekte sprechen.

Festzuhalten bleibt, dass eine Curosurfmitinkubation zu einer weitestgehend vollständigen Reduktion der PF 5080 Wirkung und zu einer partiellen Reduktion der FO 6167 Auswirkungen auf die Sauerstoffradikalbildung Candida stimulierter PMN führt.

### 3.1.5 Auswirkungen einer Simultaninkubation von PMN, PFC und NBT auf die Ausschüttung von Sauerstoffradikalen bei gleichzeitiger Candida-Stimulation der PMN

In einem vorherigen Versuchsansatz (3.1.2) wurden die PMN während des dreißigminütigen NBT- Reduktionstests mittels Candida stimuliert, ohne dass PFC anwesend gewesen war. Um zu untersuchen, wie sich eine permanente PFC- Präsenz während der PMN- Stimulation mittels Candida auf die Bildung von Sauerstoffradikalen auswirkt, wurde in einer Versuchsreihe mit modifiziertem Versuchsaufbau der NBT- Reduktionstest in Gegenwart von PFC durchgeführt.



**Abbildung 18:** NBT- Reduktion durch neutrophile Granulozyten. PMN wurden simultan mit PFC, Candida ( $3 \times 10^8$  / $\mu$ l) und NBT- Reagenz inkubiert. Der Kontrollansatz (PMN) enthielt kein PFC.

(Mittelwerte +/- (SD); n = 9 Versuche; \*\*\* p<0,001 vs. PMN).

Nach 30 min Inkubation (Zeitpunkt 0), dies entspricht der Dauer des NBT-Reduktionstests der bisher durchgeführten Versuchsreihen, ist es in den PFC- Ansätzen zu einer signifikanten Reduktion des OD- Wertes auf ungefähr 30 % (beide PFC:  $p < 0,001$  vs. PMN) im Vergleich zur PFC- freien Kontrolle gekommen. Nach 60 min Inkubation (Zeitpunkt 30) bleibt der Unterschied zwischen der Kontroll- OD und der OD der PFC- Ansätze weiterhin signifikant ( $p < 0,001$  vs. PMN). Von Zeitpunkt 0 zu Zeitpunkt 60 ist es für alle drei Ansätze zu einem Anstieg der OD gekommen. Dies ist in einer Akkumulation der gebildeten Sauerstoffradikale im Rahmen des zu diesen Messpunkten bereits 60 min bzw. 90 min ablaufenden NBT- Reduktionstests begründet. Auch hier ist unter FO 6167 Inkubation die OD niedriger als unter PF 5080 Inkubation.

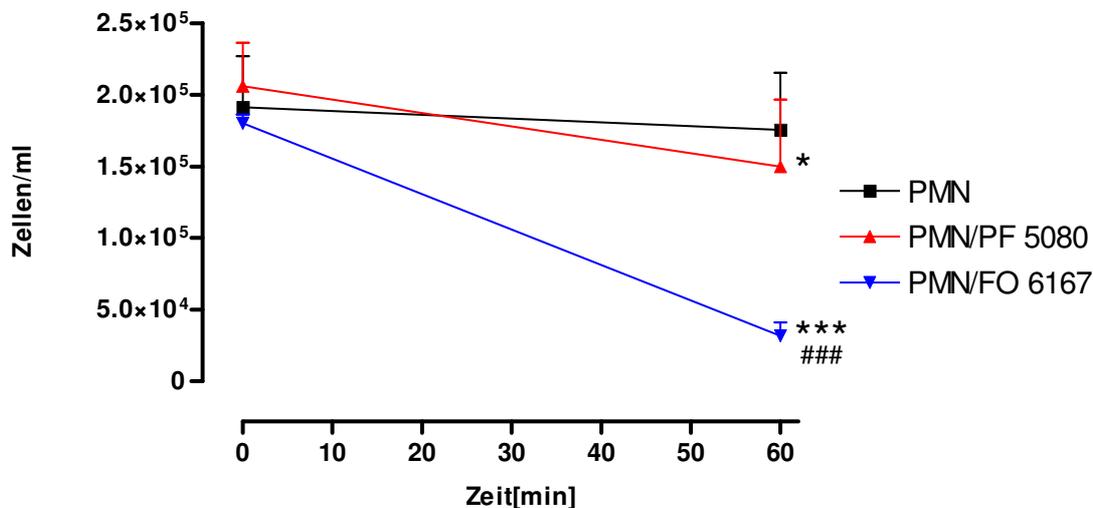
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die permanente Präsenz von PFC während der PMN-Stimulation durch Candida zu einer stark verringerten Ausschüttung von Sauerstoffradikalen führt. Bei permanenter PFC- Präsenz scheint diese Auswirkung auf die Radikalausschüttung ausgeprägter zu sein als bei nur partieller PFC- Gegenwart, wie es in den Präinkubationsversuchen der Fall war.

### 3.2 Auswirkungen einer Inkubation mit PFC auf die Viabilität der PMN

Aus den unter 3.1 beschriebenen Ergebnissen geht hervor, dass eine Inkubation der neutrophilen Granulozyten mit PFC zu einer Reduktion der Sauerstoffradikalausschüttung führt. Zur besseren Interpretation dieser Ergebnisse wurden die Auswirkungen einer Inkubation mit PFC auf die Viabilität und Zellzahl der PMN untersucht. Zum einen wurden Zellzahl und Viabilität der PMN nach PFC- Inkubation mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Auch wurde parallel eine automatisierte Zellzählung mit dem „Cell Counter“ durchgeführt. Zum anderen wurde der WST- 1 Test nach PFC- Inkubation durchgeführt.

#### 3.2.1 Zellzählung und Viabilitätsbestimmung mittels Trypanblau und Cell Counter

Abb. 19 zeigt graphisch die Ergebnisse der Zellzählung mittels Trypanblaufärbung für den Kontrollansatz (PMN) und für die mit PFC inkubierten PMN sofort nach Versuchsbeginn (t1) und nach 60 min (t60) Inkubationszeit. Es wurden nur vitale Zellen in die Zählung eingeschlossen..



**Abbildung 19:**

Graphische Darstellung der Auswirkungen einer PFC- Inkubation auf die Anzahl der vitalen neutrophilen Granulozyten. Die Zählung nach Trypanblauanfärbung erfolgte nach 1` und 60 min Inkubationszeit. Der Kontrollansatz (PMN) wurde nicht mit PFC inkubiert.

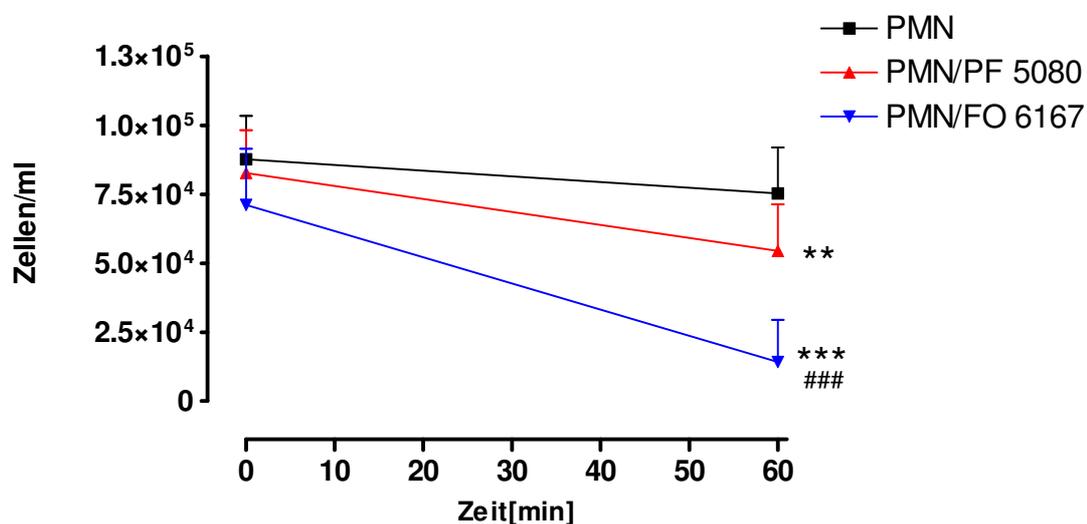
(Mittelwert +/- (SD); n = 8 Versuche; \* p<0,05, \*\*\* p<0,001 vs. t1; ### p<0,001 vs. PMN t60, PMN/ PF5080 t60)

Die Darstellung zeigt, dass eine Inkubation neutrophiler Granulozyten mit PFC Auswirkungen auf deren Zellzahl hat. Eine Kurzinkubation (t1) mit PFC hat im Vergleich zur PFC-freien Kontrolle noch keine Abnahme der Anzahl vitaler Zellen zur Folge. Nach 60 min PFC- Inkubation zeigt sich für die FO 6167 Gruppe eine starke Abnahme in der Anzahl vitaler Zellen. Eine Inkubation mit PF 5080 dagegen führt nur zu einer sehr

geringen Abnahme der Anzahl vitaler PMN. Die geringe Reduktion der Zellzahl der Kontrolle lässt sich durch die natürliche Absterbrate erklären.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nach 60 min eine FO 6167 Inkubation zu einem Absterben eines größeren Teils der PMN, eine PF 5080 Inkubation dagegen nur zu einer minimalen Reduktion der Viabilität führt.

Abb. 20 zeigt graphisch die Ergebnisse der automatischen Zellzählung im Cell Counter. Die Zählung wurde nach 1` und 60 min Inkubation mit PFC durchgeführt.



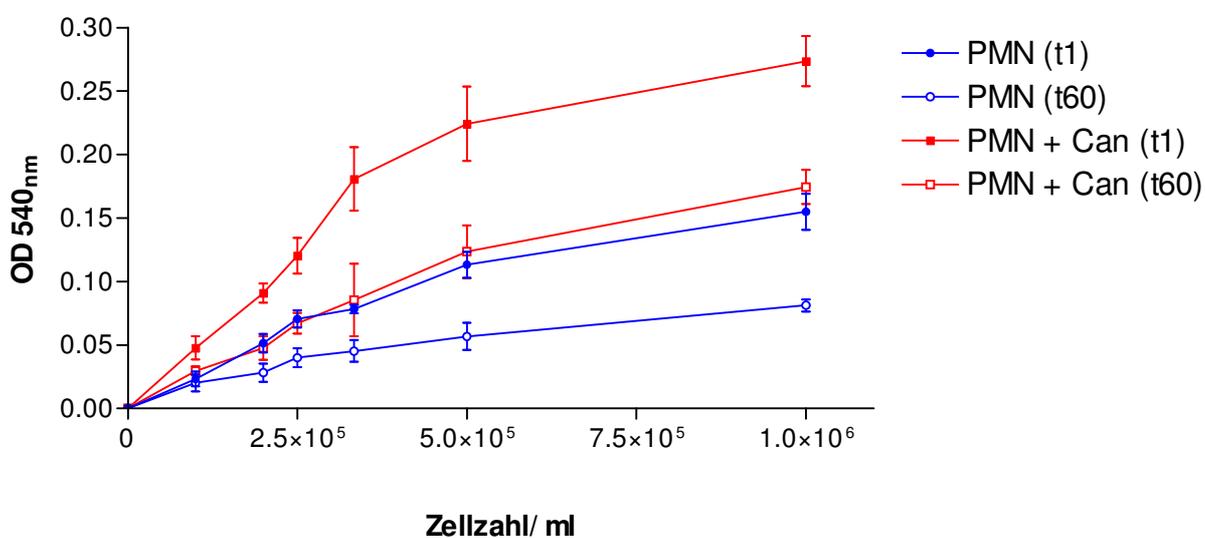
**Abbildung 20:** Zellzählung nach PFC- Inkubation im Cell Counter nach 1` und 60 min Inkubationszeit. Der Kontrollansatz (PMN) wurde nicht mit PFC inkubiert.

(Mittelwert +/- (SD); n = 8 Versuche; \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 vs. t1; ### p<0,001 vs. PMN t60, PMN/ PF5080 t60)

Die Ergebnisse der automatischen Zellzählung bestätigen die Beobachtungen der Trypanblaufärbung und der anschließenden Zellzählung unter dem Lichtmikroskop. Eine Kurzinkubation (t1) mit PFC führt zu keiner Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle. Nach 60 min Inkubationszeit nimmt die PMN- Anzahl im FO 6167- Ansatz stark ab. Eine Inkubation mit PF 5080 hat nur eine geringe Abnahme der PMN- Anzahl im Ansatz zur Folge.

### 3.2.2 Einfluss der Zellzahl auf das Ausmaß der optische Dichte im NBT-Reduktionstest

Um abzuschätzen, welchen Einfluss die Zellzahl auf die Ergebnisse hat, wurde die OD in Abhängigkeit von der Zellzahl untersucht. Es wurde der NBT- Reduktionstest sowohl an unstimulierten als auch an mittels Candida (Konzentration:  $3 \times 10^8 / \mu\text{l}$ ) stimulierten PMN in unterschiedlicher Konzentration durchgeführt.



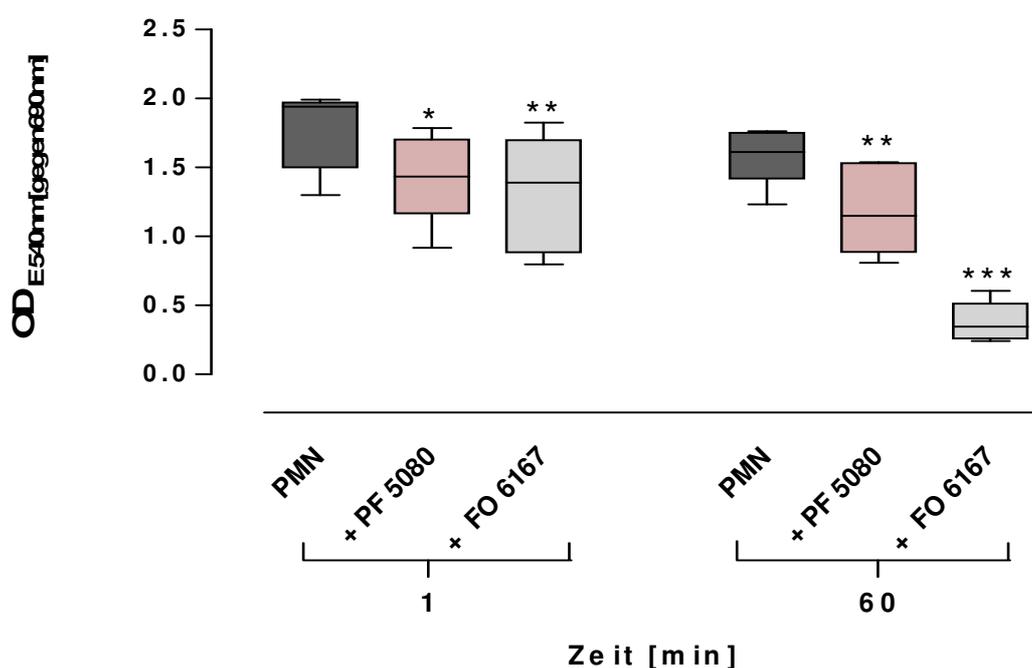
**Abbildung 21:** Graphische Darstellung der Korrelation zwischen der optischen Dichte als Maß für die Sauerstoffradikalausüttung und der eingesetzten PMN- Konzentration im NBT- Reduktionstest. Messungen erfolgten nach 1` (t1) und nach 60 Minuten (t60) an nicht stimulierten und Candida stimulierten (Can) PMN .

(Mittelwerte +/- (SD), n = 3 Versuche)

Aus Abb. 21 wird deutlich, dass eine Abhängigkeit zwischen der Zellzahl und der OD, welche ein Maß für die Sauerstoffradikalausüttung ist, besteht. Diese besteht sowohl für nicht stimulierte PMN als auch für antigen stimulierte PMN.

### 3.2.3 WST-1 Test

Vitale, metabolisch aktive PMN wandeln das gelbe WST-1 Reagenz zu wasserlöslichem, rotem Formazan um. Durch photometrische Messung der optischen Dichte lassen sich Rückschlüsse auf die Aktivität des mitochondrial lokalisierten Succinat- Tetrazolium Reductase System, welches das WST-1 Reagenz umwandelt, und so indirekt auch auf die Viabilität der neutrophilen Granulozyten, ziehen.



**Abbildung 22:** WST-1 Test neutrophiler Granulozyten nach Inkubation mit PFC.

Messung der OD nach 1` und 60 min Inkubationszeit.

(dargestellt: Median, 25% und 75% Quartile, minimaler und maximaler

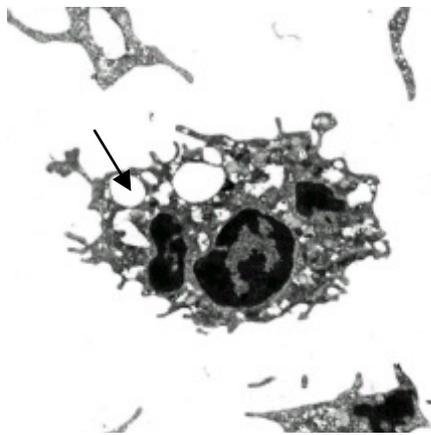
Wert; n = 7 Versuche; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 vs. PMN)

Vergleicht man die gemessene OD der PFC- Ansätze mit der Kontroll- OD nach einminütiger Inkubation, so lässt sich beobachten, dass sie für beide PFC- Ansätze signifikant unterhalb der Kontroll- OD liegt. Die Abnahme ist stärker ausgeprägt für das FO 6167. Nach 60 min Inkubation nimmt die OD aller drei Ansätze ab. Der OD- Abfall ist unter PF 5080 Inkubation geringer ausgeprägt als unter FO 6167 Inkubation im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Inkubation mit PFC die metabolische Gesamtaktivität der PMN reduziert. Dieser Effekt wird schon nach einer Kurzinkubation deutlich und nimmt im Inkubationsverlauf weiter zu (60 min). Für das FO 6167 ist dieser Effekt stärker ausgeprägt.

### 3.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung von PMN nach PFC-Inkubation

Um zu untersuchen, inwieweit eine Inkubation mit PFC zu Veränderungen in der Morphologie der PMN führt, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen nach der jeweiligen Inkubationszeit durchgeführt. Generell lässt sich beobachten, dass es nach Inkubation mit PFC zu einer vermehrten Vakuolisierung der PMN bei sonst weitestgehend unauffälliger Morphologie der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (PFC-frei) kommt. Die folgende Abbildung zeigt einen repräsentativen neutrophilen Granulozyten nach PF 5080 Inkubation.



#### **Abbildung EM 1:**

Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung eines neutrophilen Granulozyten nach dreißigminütiger PF 5080 Inkubation (t30).

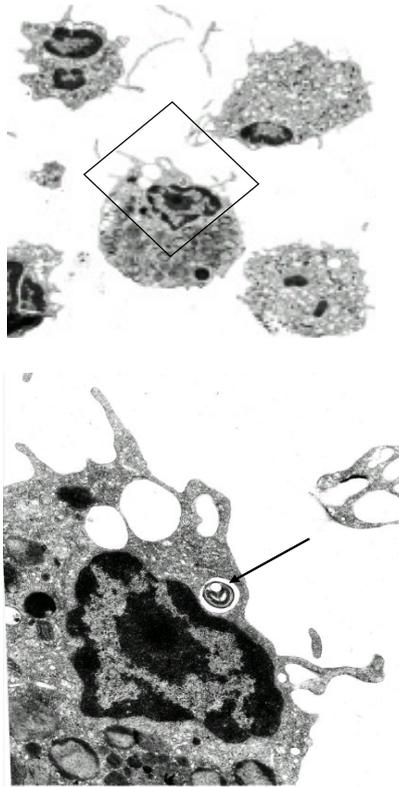
(→) Zytoplasmaeinschluss bzw. Vakuole

Negativ #: 023486

Vergrößerung: 3000 x

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich PMN elektronenmikroskopisch nach einer gleichzeitigen PFC und Surfactant Inkubation darstellen. Die Untersuchungen wurden für beide PFC jeweils in Gegenwart und Abwesenheit von Candida als antigenen Stimulus durchgeführt.

Abbildung EM 2 zeigt PMN nach dreißigminütiger PF 5080 und Surfactant Inkubation. Aus unseren Aufnahmen geht hervor, dass Surfactant in Gegenwart von PFC (hier für PF 5080 dargestellt) in PMN aufgenommen wird. Die bereits bei reiner PFC-Inkubation beobachtete Zunahme der Vakuolisierung war auch hier zu beobachten.

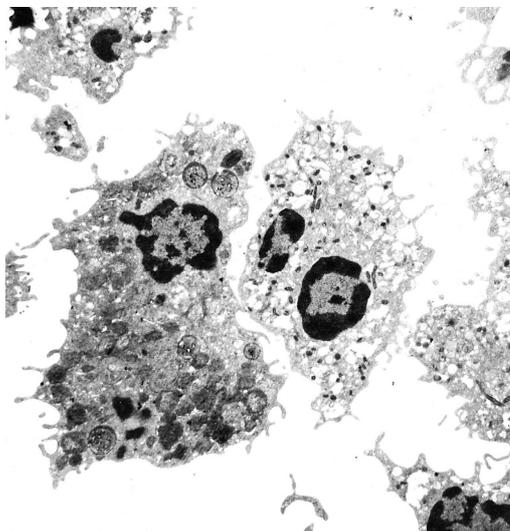


**Abbildung EM 2:**

Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung neutrophiler Granulozyten nach 30 min (t30) PF 5080 und Curosurf Inkubation (oben). Das untere Bild zeigt eine Ausschnittsvergrößerung (□) eines neutrophilen Granulozyten, welcher Surfactant-Partikel (→) aufgenommen hat (unten).

Negativ #: 023484 (oben), 023485 (unten)  
Vergrößerung: 3000 x (oben), 12000 x (unten)

Abbildung EM 3 dagegen zeigt PMN nach dreißigminütiger Inkubation mit FO 6167 und Surfactant. Auffällig ist auch hier die ausgeprägte Vakuolisierung der PMN.

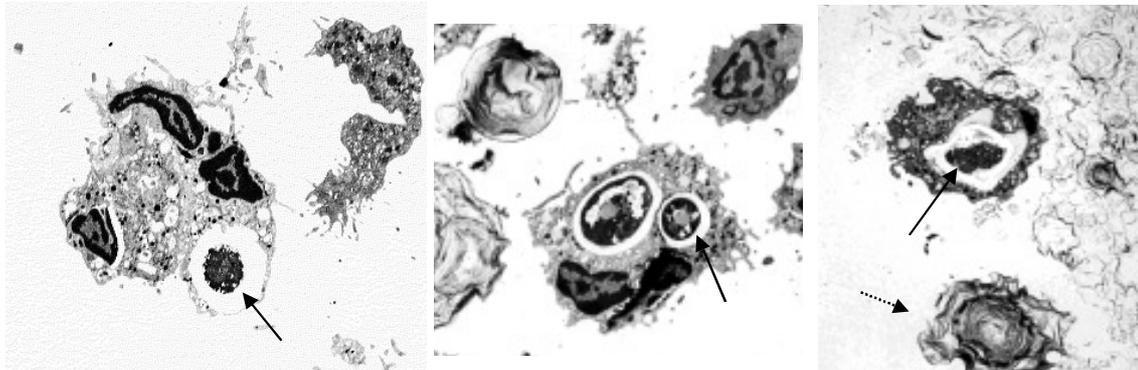


**Abbildung EM 3:**

PMN nach 30 min (t30) Inkubation mit FO 6167 und Curosurf.

Negativ #: 023489  
Vergrößerung: 3000 x

Abbildung EM 4 zeigt exemplarisch PMN nach 60 min Inkubation mit PFC (Kontrolle: PFC frei) und Curosurf bei gleichzeitiger antigener Stimulation mittels Candida. Unsere Beobachtungen zeigen, dass Candida- Partikel sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in den PFC- Gruppen phagozytiert werden.



**Abbildung EM 4:** Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung mittels Candida stimulierter PMN nach 60 min Inkubation mit Curosurf und PF 5080 (Mitte), bzw. FO 6167 (rechts). Die Kontrolle (links) enthält kein PFC im Ansatz.

( —> ) phagozytierter Candida- Partikel, (.....> ) Curosurf („lamellar body“)

Negativ # (von links): 023492, 023487, 023490

Vergrößerung: 3000 x

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine PFC- Inkubation zu einer Zunahme der Vakuolisierung des Zytoplasmas der PMN führt. Diese ausgeprägte Vakuolisierung des Zellplasmas nach PFC-Inkubation der PMN war auch in Anwesenheit von Surfactant zu beobachten. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Candida in Anwesenheit von PFC und Surfactant phagozytiert wird.

## 4 Diskussion

Die akute Lungenschädigung und das ARDS sind schwierig zu behandelnde klinische Syndrome, die sowohl auf pädiatrischen als auch auf Erwachsenenintensivstationen anzutreffen sind. 1967 erstmals von Ashbaugh und Mitarbeitern beschrieben, wurde die Mortalitätsrate des ARDS mit 58 % angegeben (Ashbaugh et al. 1967). Wenig hat sich seitdem verändert. Die Mortalitätsrate des ARDS liegt noch immer zwischen 40 % - 60 % (Zilberberg et al. 1998). Zu den Haupttodesursachen werden Sepsis und Multiorganversagen gezählt (Doyle et al. 1995).

Dass neutrophile Granulozyten in der komplexen Pathogenese der akuten Lungenschädigung bzw. des ARDS eine bedeutende Rolle spielen, wurde von verschiedenen Studiengruppen aufgezeigt (z.B. Heflin et al. 1981). PMN dominieren bei Lungengeschädigten in der Lungenödemflüssigkeit wie Untersuchungen der Bronchoalveolären Lavage zeigten (Pittet et al. 1997). Sie sezernieren Proteasen (Moraes et al. 2003), proinflammatorische Zytokine (Abraham 2003) und Sauerstoffradikale (Holman et al. 1988) ins Lungengewebe und können so im Rahmen einer massiven, überschüssigen Entzündungsreaktion maßgeblich an der Ausbildung einer akuten Lungenschädigung beteiligt sein (Moraes et al. 2003).

Versuchsreihen an Lungenschädigungsmodellen zeigen, dass Perfluorocarbone, eingesetzt in der partiellen Flüssigkeitsbeatmung, Oxygenierung und Compliance (Tütüncü et al. 1993) verbessern. Auch reduzieren sie Ödembildung (Colton et al. 1998), histologische Lungenschädigung und Sequestration von Entzündungszellen ins Lungenparenchym (Rotta et al. 1998). In *in vitro* Versuchen wurden die beobachteten antiinflammatorischen Eigenschaften der Perfluorocarbone vertiefend untersucht. So reduziert PFC die Phagozytoseleistung (Fernandez et al. 2001), die Aktivierbarkeit (Rossman et al. 1996) und Sauerstoffradikalausschüttung (Lowe et al. 1998) neutrophiler Granulozyten.

Wegen der besonderen Bedeutung toxischer Sauerstoffmetabolite für die Entstehung des ARDS (Holman et al. 1988) wurden in der vorliegenden Arbeit die Wirkungen der Perfluorocarbone auf Sauerstoffradikalausschüttung und Viabilität neutrophiler Granulozyten untersucht.

### *PFC reduzieren den respiratory burst neutrophiler Granulozyten*

Verschiedene Arbeitsgruppen haben in in vitro Versuchen die Auswirkungen von Perfluorocarbonen auf die Sauerstoffradikalausschüttung neutrophiler Granulozyten untersucht. Werden PMN mit PFC (Oxypherol und Fluosol-DA) inkubiert und anschließend mittels Phorbolmyristatazetat stimuliert, so führt dies zu einer signifikanten Reduktion der Sauerstoffradikalausschüttung im Vergleich zur Kontrollgruppe (in Pufferlösung) (Virmani et al. 1984). Auch eine Inkubation von Vollblut mit einer PFC-Emulsion (18,5 % Perfluorodecalin und 1,5 % Perfluorodimorpholinpropan) für 10 min reduziert den anschließend mittels Phorbolmyristatazetat induzierten „respiratory burst“ neutrophiler Granulozyten im Vergleich zur PFC freien Kontrollgruppe. Die Sauerstoffradikalausschüttung wurde in diesem Fall mittels Chemolumineszenz-Verfahren quantifiziert (Lowe et al. 1998). Rossman und Mitarbeiter inkubierten neutrophile Granulozyten für bis zu zwei Stunden mit Perflubron. Sie untersuchten die intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion der PFC-inkubierten PMN nach Antigenstimulation (Phorbolmyristatazetat) mittels Durchfluß-Zytometrie. Es zeigte sich, dass es schon nach kurzer Inkubation (2 min) zu einer Reduktion der intrazellulären Sauerstoffradikalproduktion um über 70 % im Vergleich zur PFC-freien Kontrollgruppe kommt. Eine längere Perflubron- Exposition führt dabei ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Sauerstoffradikalproduktion intrazellulär (im Mittel um 60 % gegenüber der Kontrollgruppe) (Rossman et al. 1996). Lässt man in einem Extrakorporalen Kreislaufmodell (ECC) Vollblut gemeinsam mit einer Perflubron- Emulsion als Zusatz und, zur Kontrolle, Vollblut alleine für maximal 2 h zirkulieren und untersucht zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Sauerstoffradikalausschüttung der PMN, so zeigt sich in der PFC- Therapiegruppe eine zu allen Messzeitpunkten signifikant niedrigere Sauerstoffradikalausschüttung. Werden die PMN beider Gruppen nach der zweistündigen Zirkulation in der ECC mittels FMLP (N-Formyl-methionyl-leucylphenylalanine) stimuliert, so ist die Sauerstoffradikalausschüttung in der PFC- Therapiegruppe in ihrem Ausmaß geringer als die der PFC freien Kontrollgruppe (McDonagh et al. 2001).

Diese, in der Literatur beschriebene Reduktion des „respiratory burst“ neutrophiler Granulozyten durch Perfluorocarbone stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Für die in dieser Arbeit verwendeten Perfluorocarbone PF 5080 und FO 6167 konnte eine reduzierende Wirkung auf die Sauerstoffradikalausschüttung nachgewiesen werden.

Eine Präinkubation neutrophiler Granulozyten mit PFC reduziert sowohl die basale Sauerstoffradikalausschüttung nicht stimulierter PMN (3.1.1), als auch die antigen

induzierte Sauerstoffradikalausschüttung (3.1.2). Durch Verwendung unterschiedlicher PFC Konzentrationen konnte gezeigt werden, dass die Auswirkungen auf den „respiratory burst“ von der eingesetzten PFC- Menge abhängig sind. Auch ist zu beobachten, dass die Reduktion des „respiratory burst“ von der Inkubationsdauer abhängt. Mit zunehmender Dauer der PFC- Präinkubation nimmt das Ausmaß der „respiratory burst“- Reduktion zu. Dennoch ist schon nach kurzem PFC- Kontakt (1 min) ein signifikanter Effekt auf die Sauerstoffradikalausschüttung zu beobachten. Antiinflammatorische Wirkungen von Perfluorocarbonen nach nur kurzzeitigem Kontakt mit PMN wurden bereits in der Literatur beschrieben (Rossman et al. 1996, McDonagh et al. 2001). Festzuhalten bleibt, dass die Ergebnisse dieser Arbeit, übereinstimmend mit der präsentierten Literatur, für PFC eine antiinflammatorische Wirkung in Form einer „respiratory burst“- Reduktion neutrophiler Granulozyten aufweisen. Das Ausmaß der antiinflammatorischen Wirkung ist abhängig von der Inkubationsdauer und der eingesetzten PFC- Menge.

#### *Untersuchung von unspezifischen Effekten der Perfluorocarbone*

Im Rahmen der Untersuchungen bezüglich der antiinflammatorischen Eigenschaften der PFC wurden auch ihre Auswirkungen auf die Viabilität der mit ihnen in Kontakt kommenden Zellen untersucht. Aus der Literatur lässt sich schließen, dass die Auswirkungen auf die Viabilität vom eingesetzten PFC- Typ abhängig sind. Für Perflubron, welches bereits erfolgreich in klinischen Studien in der PLV eingesetzt wurde, ergaben sich in in vitro Versuchen keine Hinweise auf eventuelle Zytotoxizität gegenüber PMN und Alveolarmakrophagen. Als Untersuchungsmethode wurde die Trypanblaufärbung der Zellen nach Perflubron- Inkubation gewählt (Rossmann et al. 1996, Smith et al. 1995).

PF 5080 hat sich in Untersuchungen an GBS als nicht toxisch erwiesen (Rüdiger et al. 2001). Auch die mitochondriale Viabilität von Typ II Pneumozyten wurde durch PF 5080 nicht negativ beeinflusst, und in Tierversuchen wurde es, ohne toxische Eigenschaften zu zeigen, erfolgreich eingesetzt (Rüdiger et al. 2003).

FO 6167, Perfluorooctylbromide in nicht medizinischem Reinheitsgrad, dagegen hat sich in Untersuchungen gegenüber GBS als toxisch gezeigt (Rüdiger et al. 2001). Studien über die Auswirkungen auf die Viabilität von neutrophilen Granulozyten lagen für das PF 5080 und das FO 6167 bislang nicht vor.

Um interpretieren zu können, ob die Reduktion des „respiratory burst“ auf einer toxisch bedingten Abnahme der PMN- Anzahl oder auf einer antiinflammatorischen Wirkung der

PFC beruht, wurden zusätzlich Viabilitätsbestimmungen und Zellzählungen nach erfolgter PFC- Inkubation (PF 5080 bzw. FO 6167) durchgeführt (3.2.1 und 3.2.2). Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass eine sechzigminütige Inkubation der PMN mit PF 5080 nur zu einer geringen, nicht signifikanten Abnahme der Zellzahl und Viabilität im Vergleich zur PFC-freien Kontrollgruppe führt. Dagegen ist die PMN- Zellzahl nach sechzigminütiger FO 6167- Inkubation stark reduziert. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass es unter PF 5080 im Gegensatz zu FO 6167 zu einer nicht toxisch bedingten Reduktion des „respiratory burst“ kommt. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch die durchgeführten Verdünnungsreihen der PMN- Konzentration (3.2.2). Sie verdeutlichen die Korrelation zwischen der optischen Dichte als Maß für die Sauerstoffradikalauslösung und der Anzahl vitaler PMN.

Eine weitere Möglichkeit, den Zusammenhang zwischen Viabilität der PMN und ihrer metabolischen Aktivität aufzuzeigen, ist der WST-1 Test. Anhand dieses Testes lassen sich Rückschlüsse auf die Aktivität der mitochondrial lokalisierten Succinat-Tetrazolium Reductase ziehen. In der Literatur ließen sich keine Untersuchungen bezüglich der Auswirkungen einer PFC- Inkubation auf die Aktivität dieses Enzyms bei neutrophilen Granulozyten finden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine sechzigminütige PFC Inkubation der PMN in einer signifikanten Abnahme der Enzymaktivität resultiert (3.2.3). Die parallel durchgeführten Viabilitäts- und Zellzahlbestimmungen legen ebenfalls nahe, dass die reduzierende Wirkung des FO 6167 auf die Enzymaktivität in einem toxisch bedingten Absterben der PMN begründet liegt, wogegen die Auswirkungen einer PF 5080- Inkubation nicht anhand eventueller toxischer Eigenschaften erklärt werden kann.

Eine weitere denkbare Möglichkeit, die Reduktion der Sauerstoffradikalauslösung zu erklären, wäre die Fähigkeit der Perfluorocarbone, Sauerstoffradikale abzufangen, und sie dadurch in unseren Untersuchungen dem NBT- Reduktionstest nicht mehr zugänglich zu machen.

Unter PLV wird, im Vergleich zur konventionell beatmeten Kontrollgruppe im Lungenschädigungsmodell nach E. coli Endotoxingabe, die durch freie Radikale ausgelöste Schädigung an Proteinen und Lipiden im Lungengewebe signifikant reduziert. Um auszuschließen, dass dieser Effekt einem technischen Fehler zuzusprechen ist, wurden weitere in vitro Versuche durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass PFC nicht die im Rahmen des Entzündungsprozesses gebildeten freien Sauerstoffradikale ab-

fängt, sondern dass der Effekt viel mehr auf zellulärer Ebene anzusiedeln ist (Rotta et al. 2000).

Neben den Ergebnissen der eigenen PFC-Präinkubationsversuche konnten weitere Versuche eine durch PFC ausgelöste Reduktion des Formazan- Farbstoffes ausschließen (Ergebnisse nicht dargestellt), so dass nicht von einer Beeinflussung der Ergebnisse durch PFC als Radikalfänger auszugehen ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Auswirkungen einer FO 6167-Inkubation auf den „respiratory burst“ neutrophiler Granulozyten durch dessen Zytotoxizität zu begründen ist. PF 5080 scheint dagegen eine direkte, wenn auch vermutlich unspezifische Wirkung auf den „respiratory burst“ der PMN zu haben.

Wie Perfluorocarbone auf die neutrophilen Granulozyten wirken ist nicht genau bekannt.

#### *Untersuchung der „Barrierefunktion“*

Zu einer der möglichen Wirkungsweisen der Perfluorocarbone gehört die von Varani postulierte „Barrierefunktion“. Hierbei wird davon ausgegangen, dass PFC im Sinne einer rein mechanischen Barriere agieren, indem sie sich aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften zellulären Oberflächenstrukturen anlagern und so Zell zu Zell bzw. Zell zu Protein (extrazellulär) Interaktionen verhindern.

So ist die Adhäsion humaner neutrophiler Granulozyten an kultivierte Lungenepithelzellen und deren anschließende Lyse nur dann in ihrem Ausmaß reduziert, solange sich die Zielzellen in Kontakt mit den PFC befinden. Eine alleinige Präinkubation der PMN bzw. der Lungenepithelzellen mit PFC führt dagegen zu keiner Abnahme der Zelladhäsion und Lyse im Vergleich zu einer PFC-freien Kontrolle (Varani et al. 1996).

Zur Untersuchung der „Barrierefunktion“ wurden in dieser Arbeit PMN und PFC gemeinsam mit Candida, zur antigenen Stimulation, zeitgleich miteinander inkubiert. Das simultane Vorhandensein von PFC, PMN und Antigen simuliert, stark vereinfacht, die Gegebenheiten in der Lunge während der Flüssigkeitsbeatmung. Die Ergebnisse zeigen einen deutlich reduzierten „respiratory burst“ in den PFC- Gruppen im Vergleich zur PFC freien Kontrolle (3.1.3). Auch ist eine Zunahme der Wirkung auf die Sauerstoffradikalausschüttung mit der Inkubationsdauer zu beobachten.

Um zu gewährleisten, dass die Messung der Sauerstoffradikalausschüttung bei simultaner PMN- Stimulation in ständiger PFC- Gegenwart durchgeführt wird, und dadurch eine eventuelle Barrierefunktion der PFC stärker ins Gewicht fällt, wurde der Versuchsaufbau

von 3.1.3 modifiziert (3.1.5). Hier lässt sich beobachten, dass nach 30 Minuten Inkubationszeit der PMN mit PFC bei gleichzeitiger antigener Stimulation die Sauerstoffradikalausschüttung im Vergleich zur Kontrolle signifikant (\*\*\*)  $p < 0,001$  vs. PMN) reduziert ist.

Die Ergebnisse beider Versuchsreihen wären anhand der „Barrierefunktion“ der PFC zu erklären. Durch die Gegenwart von PFC während der antigenen Stimulation der PMN könnte eine Kontaktaufnahme zwischen den PMN und dem antigenen Stimulus im Sinne einer mechanischen Barriere erschwert bzw. verhindert werden, welches wiederum zu einem reduzierten „respiratory burst“ führen würde.

Allerdings lässt es sich aufgrund dieser Ergebnisse nicht ausschließen, dass PFC nicht auch eine direkte antiinflammatorische Wirkung auf die PMN haben.

#### *Untersuchung einer direkten PFC- Wirkung*

In den Ergebnissen neuerer Studien finden sich vermehrt Hinweise darauf, dass Perfluorocarbone direkt auf die mit ihnen in Kontakt stehenden Zellen wirken und intrazelluläre, eventuell energieabhängige Prozesse beeinflussen.

In vitro Untersuchungen, welche die Abhängigkeit der PFC- Effekte von ihrer Lipidlöslichkeit an Thrombozyten und Erythrozyten erforschten, kamen zu folgendem Ergebnis: Eine PFC- Inkubation der Zellen führte zu einer Reduktion der Thrombozytenaggregation nach Kollagenstimulus und zu einer verringerten Hämolysebereitschaft der Erythrozyten. Die Intensität der Effekte korrelierte dabei direkt mit der Lipidlöslichkeit der Perfluorocarbone. Der gesamt gemessene, intrazelluläre PFC-Gehalt war in der Zellmembran der Erythrozyten bzw. in den Lecithin- Liposomen der Thrombozyten lokalisiert. Es wurde die Hypothese aufgestellt, PFC würde in die Lipidkomponente von Membranen eingebaut und habe dort eine generell protektive, membranstabilisierende Wirkung auf eine Vielzahl von membranvermittelten Zellantworten auf Stress oder Aktivierung (Obraztsov et al. 2000).

Dass ein direkter Kontakt mit PFC nicht notwendig ist, um Entzündungsreaktionen abzuschwächen, zeigen auch andere Studien. So kann die Reduktion der pulmonalen Schädigung unter PLV unter anderem auf einer direkten Beeinflussung der Makrophagenaktivität beruhen, welche z.B. durch eine „frustrane Phagozytose“ von PFC und der dadurch bedingten Störung der Membraneigenschaften erklärt werden (Steinhorn et al. 1999). Aktivierte Endothelzellen (EC), welche neben PMN und AM maßgeblich an der Pathogenese des ARDS beteiligt sind (Simon et al. 1992), wurden PFC exponiert.

Allerdings wurde ein direkter Kontakt mit PFC durch eine Membran (3  $\mu\text{m}$ ) verhindert, wodurch eine möglichst genaue Rekonstruktion der in vivo Verhältnisse während der PLV geschaffen werden sollte. Es zeigte sich, dass eine PFC-Exposition zu einer verringerten Adhäsion neutrophiler Granulozyten an die exponierten EC im Vergleich zu den nicht exponierten EC führt. Weiterhin fand sich eine geringere Expression der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selectin in der Gruppe der PFC-exponierten EC. Auch hier wird spekuliert, dass PFC in die EC diffundiert, sich in das „bilayer lipid membrane system“ integriert, so die Adhäsion der PMN reduziert und auf diese Weise antiinflammatorisch wirkt (Woods et al. 2000).

Für neutrophile Granulozyten konnte nachgewiesen werden, dass die nach PFC-Inkubation beobachtete Reduzierung der Phagozytose und Chemotaxis in der Abnahme eines intrazellulären Signalweges, einer Tyrosinphosphorylation, begründet ist, was zu einer Abschwächung der Entzündungsreaktion führen könnte (Fernandez et al. 2001).

Um eine direkte antiinflammatorische Wirkung von Perfluorocarbonen auf neutrophile Granulozyten zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit PFC und PMN miteinander präinkubiert. Die basale und die antigen-induzierte Sauerstoffradikalausschüttung wurden im Anschluss an die Präinkubation (unter Rotation) in Abwesenheit von PFC, welche sich aufgrund ihrer Hydrophobie nicht mit der wässrigen Phase (PMN in RPMI-Medium) vermischen, gemessen (3.1.1 und 3.1.2). Die Ergebnisse zeigen eine Reduktion des „respiratory burst“ nach PFC-Präinkubation. Dieser ist gegenüber der PFC-freien Kontrollgruppe schon nach kurzzeitigem PFC-Kontakt (1 min) signifikant. Hieraus wird deutlich, dass die Anwesenheit von PFC nicht Voraussetzung für eine PFC-vermittelte Wirkung auf den „respiratory burst“ neutrophiler Granulozyten ist. PFC haben eine direkte Wirkung auf PMN. Aufgrund dieser Ergebnisse lassen sich jedoch keine Rückschlüsse auf den genauen Wirkmechanismus der PFC ziehen. Dennoch ist eine Aufnahme der PFC in die Zellmembran (Obraztsov et al. 2000, Woods et al. 2000) bzw. in das Zytoplasma mittels Phagozytose (Virmani et al. 1984, Wolfson et al. 1992), und eine hierdurch verursachte Beeinflussung intrazellulärer Prozesse, sehr wahrscheinlich. Eigene elektronenmikroskopische Beobachtungen zeigen eine Zunahme der Vakuolisierung von PMN nach PFC-Inkubation, wahrscheinlich verursacht durch die Phagozytose von PFC.

### *Aufhebung der PFC- Wirkung durch Surfactant*

Da Perfluorocarbone im Rahmen der PLV bzw. TLV mit Surfactant zwangsläufig in Kontakt kommen, ist es von Interesse zu untersuchen, inwieweit diese beiden Substanzen miteinander interagieren und sich in ihren Wirkungen, speziell auf neutrophile Granulozyten, beeinflussen.

Werden PMN mit Curosurf inkubiert und anschließend mittels GBS antigen stimuliert, so ist der „respiratory burst“ im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe signifikant reduziert (Herting et al. 1995). Bestätigt werden konnte dieses Ergebnis auch nach antigener Stimulation der PMN durch die GBS-HD Variante (Scholtes et al. 2002). Weiterhin konnte eine verminderte Elastase- Freisetzung aus Surfactant inkubierten PMN nachgewiesen werden (Tegtmeyer et al. 1996), und es zeigte sich, dass PMN in ihrer Phagozytosefähigkeit eingeschränkt sind, sobald sie hohen Konzentrationen von Surfactant ausgesetzt sind (Speer et al. 1990).

Weitere Daten über eventuelle PFC- Surfactant Interaktionen liegen bis dato nicht vor. Beobachtet werden konnte, wie sich während der PLV in den distalen Alveolarbezirken kleine, Surfactant umhüllte PFC- Vesikel bilden (Bachofen et al. 1994). Die Arbeitsgruppe um Rüdiger beschrieb erstmals die Herstellung einer PFC- Surfactant Emulsion. Durch starke Durchmischung von Curosurf und PFC konnten sie eine „PFC-in-Surfactant“ Emulsion herstellen. In Viabilitätsversuchen mit GBS nach PFC- Inkubation konnten sie aufzeigen, dass FO 6167 einen toxischen Effekt auf GBS hat. Eine Inkubation von GBS mit einer „FO 6167-in-Surfactant“ Emulsion zeigte dagegen keinen toxischen Effekt mehr auf die GBS. Lediglich Curosurf, nicht als PFC- Surfactant Emulsion eingesetzt, hatte keinen reduzierenden Effekt auf die Toxizität des FO 6167 (Rüdiger et al. 2001).

In dieser Arbeit konnten wir aufzeigen, dass Perfluorocarbone den „respiratory burst“ neutrophiler Granulozyten reduzieren. Um zu untersuchen, inwieweit dieses Ergebnis durch Surfactant beeinflusst wird, wurden die PMN mit PFC (für PF 5080 und FO 6167 je einen separaten Versuch) und zusätzlich Curosurf inkubiert. Zur antigenen Stimulation der PMN wurde den Ansätzen Candida zugefügt (3.1.4).

Wie schon in der Literatur beschrieben, konnte ein reduzierender Effekt auf die Sauerstoffradikalausschüttung nach alleiniger Curosurfinkubation der PMN von uns bestätigt werden (Herting et al. 1995). Allerdings besteht ab dreißigminütiger Inkubationszeit (t30) kein Unterschied mehr in der Sauerstoffradikalausschüttung zur Curosurf- freien Kontrolle. Daten über die Auswirkungen einer länger andauernden

Curosurf/ PMN Inkubation auf die Sauerstoffradikalausschüttung liegen unserer Ansicht nach nicht vor. Weiterhin konnte folgendes beobachtet werden. Eine Curosurfinkubation hebt die von uns beschriebene Reduktion des „respiratory burst“ unter alleiniger PFC-Inkubation der PMN auf. Nach dreißigminütiger Inkubationsdauer besteht kein Unterschied mehr in der quantitativen Sauerstoffradikalausschüttung zwischen dem PFC/Curosurf Ansatz und dem PFC freien Kontrollansatz. Diese Beobachtung wurde sowohl für das PF 5080 als auch, allerdings in leicht geringerer Ausprägung, für das toxische FO 6167 gemacht.

Es kommen verschiedene Erklärungsmodelle in Betracht, welche die Aufhebung der PFC-Wirkung auf den „respiratory burst“ der PMN durch Surfactant erläutern könnten.

Zum einen könnte man vermuten, dass Curosurf sich mit seinen lipophilen Bestandteilen (Phospholipiden) an die Oberfläche der PMN anlagert und diese wie einen Saum umschließt. Dadurch wäre es denkbar, dass ein PMN/ PFC- Kontakt größtenteils verhindert würde und PFC nicht antiinflammatorisch (im Sinne einer Reduzierung der Sauerstoffradikalausschüttung) wirken können, da sie nicht mit den PMN in Kontakt treten. Auch könnte durch eine Interaktion von Curosurf mit der Zelloberfläche, die Phagozytose des PFC behindert und so eine mögliche intrazelluläre Wechselwirkung von PFC mit dem Zellmetabolismus verhindert werden. Für Makrophagen konnte eine Aufnahme von PFC mittels Phagozytose bereits nachgewiesen werden (Wolfson et al. 1992).

Speer und Mitarbeiter konnten eine eingeschränkte Phagozytosefunktion neutrophiler Granulozyten nachweisen, wenn sie hohen Curosurf- Konzentrationen ausgesetzt waren. Sie spekulieren, dass die Phospholipide die für die Phagozytose essentiellen Rezeptoren bedecken könnten (Speer et al. 1990). Eigene elektronenmikroskopische Untersuchungen der PMN nach Inkubation mit PFC, Curosurf (Konzentration 3 mg PL/ ml) und Candida zur antigenen Stimulation illustrieren, dass eine Phagozytose von Candida trotzdem möglich ist. Auch wird die Aufnahme von PFC, vermutlich mittels Phagozytose, durch PMN nicht verhindert (3.1.4, Abb. EM 2-4).

Ein anderer Gedanke wäre, dass Curosurf und PFC während der Inkubation eine Emulsion bilden, wobei Curosurf sich um das PFC legt. Dies würde ebenfalls eine Protektion der PMN gegenüber der PFC Wirkung erklären, da es auf diese Weise zu einer Verhinderung einer Kontaktaufnahme zwischen PMN und PFC käme. Für diese These sprechen auch die bereits erwähnte Bildung Surfactant umhüllter PFC- Vesikel unter PLV- Therapie (Bachofen et al. 1994) und die Viabilitätsversuche mit GBS nach

Inkubation mit einer „PFC-in-Surfactant“ Emulsion der Arbeitsgruppe Rüdiger (Rüdiger et al. 2001).

In den Versuchen dieser Arbeit wurde Curosurf nicht als „PFC-in-Surfactant“ Emulsion eingesetzt. Dennoch erscheint es möglich, dass sich während der Inkubation, die unter ständiger Rotation abläuft, jene von Bachofen beschriebenen Surfactant umhüllte PFC-Vesikel bilden. In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass erst nach dreißigminütiger Inkubationsrotation die Curosurf Wirkung auftritt.

Es lässt sich festhalten, dass Curosurf die PFC vermittelte Reduktion des „respiratory burst“ nahezu aufhebt. Dies legt nahe, dass PFC mit PMN in Kontakt kommen müssen, um ihre antiinflammatorische Aktivität zu exhibieren. Dieser Kontakt könnte durch Curosurf verhindert werden. Obwohl Curosurf den PFC- Effekt auf die Sauerstoffradikal-ausschüttung inhibiert, verhindert es nicht die Phagozytose von PFC.

#### *Einfluss der PFC auf PMN*

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der „respiratory burst“ neutrophiler Granulozyten nach einer Präinkubation mit Perfluorocarbonen reduziert ist. Es ist davon auszugehen, dass PFC direkt antiinflammatorisch auf die PMN wirken. Damit stimmen diese Daten mit den Ergebnissen anderer Studiengruppen, die ebenfalls eine antiinflammatorische Wirkung von PFC auf den „respiratory burst“ neutrophiler Granulozyten nachweisen konnten, überein (Virmani et al. 1984, Lowe et al. 1998). Dass PFC direkt, durch Diffusion in die „bilayer lipid membrane“ (Obraztsov et al. 2000, Fernandez et al. 2001) oder mittels phagozytärer Aufnahme (Wolfson et al. 1992, Rossman et al. 1996), aufgrund Beeinflussung intrazellulärer Prozesse antiinflammatorisch auf die mit ihnen in Kontakt stehenden Zellen einwirken, ist sehr wahrscheinlich. Da PFC relativ langsam in die Zellmembran diffundieren (maximale Perflubron- Konzentration in Erythrozytenmembran erst nach 7 h erreicht (Obraztsov et al. 2000)), sich in unseren Versuchen eine PFC- Wirkung auf den „respiratory burst“ aber schon nach kurzer Präinkubation der PMN zeigt (1 min), ist eine Aufnahme der PFC auch mittels Phagozytose zu diskutieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass kurzzeitiger Kontakt mit PFC (2,5 min) zu einer phagozytären Aufnahme von PFC führt, und in einer Abnahme des intrazellulären Gehaltes an freiem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exponierter PMN resultiert (Rossman et al. 1996). Auch eigene elektronenmikroskopische Betrachtungen legen dies nahe. Dass die extrazelluläre Gegenwart von PFC essentiell für die antiinflammatorische

Wirkung ist (Barrierefunktion, Varani et al. 1996), konnte in unseren Versuchen nicht bestätigt werden. Untersuchungen der „Barrierefunktion“ der PFC in dieser Arbeit ergaben jedoch Hinweise darauf, dass PFC, neben einer direkten Beeinflussung der PMN (Präinkubationsversuche), auch zusätzlich im Sinne einer physikalischen Barriere die Kontaktaufnahme zwischen PMN und Antigen verhindern. Deutlich wird dies an der stärker ausgeprägten Reduktion des „respiratory burst“ in PFC- Gegenwart (3.1.5) als nach alleiniger PFC- Präinkubation (3.1.2).

Bezüglich einer Beeinflussung der PFC- Wirkung durch Surfactant wurde von uns aufgezeigt, dass Curosurf die abschwächende, ggf. protektive Wirkung von PFC auf den „respiratory burst“ aufhebt.

### *Klinische Relevanz*

Die präsentierten Daten und Ergebnisse sind von klinischem Interesse. Sie zeigen den abschwächenden Effekt von Perfluorocarbonen auf den „respiratory burst“ neutrophiler Granulozyten in vitro auf. PMN, Makrophagen und Alveolarepithelzellen sind bedeutsam für die Abwehr von Mikroorganismen und eingebunden in das komplexe Zusammenspiel eines intakten Immunsystems. Sie spielen aber auch eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des akuten Lungenschadens und besonders des ARDS. PFC, eingesetzt in der Flüssigkeitsbeatmung, gehören prinzipiell zu den alternativen Strategien in der Behandlung des akuten Lungenschadens und des ARDS. Daher ist es von Bedeutung zu wissen, wie sich PFC auf die mit ihnen in Kontakt kommenden Zellen auswirken. Eine Attenuierung der Entzündungsreaktion neutrophiler Granulozyten, z.B. im Sinne eines reduzierten „respiratory burst“ bei ungestörter Viabilität der Zellen, könnte sich als pulmoprotektiv erweisen und die Progredienz bzw. gar die Entstehung eines ARDS verhindern. Studien an Ratten, die mit Streptococcus pneumoniae infiziert wurden, zeigten, dass PLV gemeinsam mit Penicillin als Therapiestrategie erfolgreicher war als alleinige Penicillingabe. Eine erhöhte Letalität der PLV- Gruppe im Vergleich zur konventionell beatmeten Kontrolle bestand nicht (Dickson et al. 1998). Hieraus könnten sich neue Therapieansätze fulminanter, schwerbehandelbarer Pneumonien ergeben. Interessant in diesem Zusammenhang waren auch die Ergebnisse der Gruppe um Rüdiger. Sie konnten in einer in vivo Studie an GBS infizierten Kaninchenfeteten zeigen, dass es im Gegensatz zu der konventionell beatmeten Kontrollgruppe in der PLV- Gruppe, trotz der antiinflammatorischen Eigenschaften der PLV (Anzahl neutrophiler Granulozyten im Lungengewebe in der Studie reduziert), zu keiner intrapulmonalen Proliferation der GBS

kommt (Rüdiger et al. 2003). Zu einem anderen Ergebnis kam eine Studie, welche die Mortalität nach künstlich ausgelöster Peritonitis bei zeitgleicher intravenöser PFC Instillation an Mäusen untersuchte. Die Mortalität lag, bei reduzierter PMN- Anzahl in der Peritoneallavage, signifikant höher in der PFC- Gruppe (Lane et al. 1986). Inwieweit eine PFC induzierte reduzierte Sauerstoffradikalausschüttung die Fähigkeit des Körpers zur Abwehr pathogener Mikroorganismen vermindert, ist noch nicht ausreichend untersucht worden und bedarf weiterer Klärung.

Von klinischer Bedeutung in diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung, dass Curosurf diesen protektiven Effekt der PFC auf die PMN reduziert und es erscheint wichtig, die Wechselwirkungen von PFC und Surfactant noch eingehender zu untersuchen.

Trotz der Tatsache, dass sich Perfluorocarbone, eingesetzt in der partiellen Flüssigkeitsbeatmung, nicht gegenüber konventionellen Beatmungsstrategien in klinischen Studien durchgesetzt haben (Zielkriterien: beatmungsfreie Tage und Mortalität in den ersten 28 Tagen), sind Perfluorocarbone, insbesondere aufgrund ihrer physikalischen und antiinflammatorischen Eigenschaften, weiterhin Gegenstand derzeitiger Forschung.

Interessante Ergebnisse sind auch von einem zukünftigen klinischen Einsatz der TLV zu erwarten (Brown et al. 2006). Weiterhin wurden erstmals in verschiedenen Tierversuchen PFC als Aerosole zur Behandlung des akuten Lungenschadens eingesetzt und erste Erfolg versprechende Resultate konnten erzielt werden (Bleyl et al. 1999; Kandler et al. 2001). Ein weiteres spannendes Feld für PFC ist ihr Einsatz als Trägersubstanz für Medikamente. Aufgrund ihrer physikalisch- chemischen Eigenschaften sind sie gut geeignet, an sie gebundene Medikamente in der geschädigten Lunge zu verteilen. Bereits durchgeführt wurden Studien über die Applikation von Antibiotika (Zelinka et al. 1997), Anästhetika (Kimless-Garber et al.1997), vasoaktiven Substanzen (Wolfson et al. 1996), sowie Adenovirus-vermittelter Gentransfer (Lisby et al. 1997) mittels PFC. So z.B. zeigten Cox und Mitarbeiter, dass es zu einer gleichmäßigeren und höheren Verteilung einer Gentamycin- Suspension im Lungengewebe kommt, wenn man die Suspension während der PLV intratracheal appliziert als bei intravenöser Gabe (Cox et al. 2001).

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit untersuchen die immunmodulatorischen Eigenschaften von Perfluorocarbonen. Gerade Lungenerkrankungen infektiöser Ursache könnten in Zukunft ein mögliches Anwendungsgebiet für den Einsatz der Flüssigkeitsbeatmung mittels Perfluorocarbonen darstellen.

## 6 Zusammenfassung

Mit einer Mortalitätsrate von 40–60 % gehört das ARDS zu einer der am schwierigsten behandelbaren respiratorischen Erkrankungen. Neben Alveolarmakrophagen und Gefäßendothelzellen werden neutrophile Granulozyten zu den wichtigsten Bausteinen in der Pathogenese des akuten Lungenschadens gezählt.

Perfluorocarbone, eingesetzt in der Flüssigkeitsbeatmung, haben sich als alternative Behandlungsmethode des ARDS gezeigt. Neben Verbesserung der Oxygenierung und Compliance konnten ihnen antiinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden. Im Besonderen die antiinflammatorischen Eigenschaften der Perfluorocarbone und ihre Interaktion mit anderen Entzündungszellen sind von großem klinischem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von Perfluorocarbonen auf den „respiratory burst“ und die Viabilität neutrophiler Granulozyten untersucht.

Hierzu wurden neutrophile Granulozyten aus dem Blut adulter Spender isoliert und mit zwei verschiedenen Perfluorocarbonen (FO 6167 und PF 5080) inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde die optische Dichte als Maß für die Sauerstoffradikalausschüttung mittels NBT- Reduktionstest bestimmt. In einer Versuchsreihe wurden die Auswirkungen einer Präinkubation mit PFC auf den „respiratory burst“ nicht stimulierter PMN und auf nachfolgend antigen- stimulierte PMN (Candida bzw. GBS-HD) untersucht. Durch Einsatz verschiedener PFC- Konzentrationen wurden die Effekte auf ihre Konzentrationsabhängigkeit hin untersucht. In einer zweiten Versuchsreihe wurden dann die Auswirkungen einer permanenten PFC-Anwesenheit während einer Antigenstimulation auf den „respiratory burst“ der neutrophilen Granulozyten untersucht. Um zu untersuchen, wie Surfactant die beobachteten Auswirkungen beeinflusst, wurde den Ansätzen Curosurf hinzugegeben.

Zusätzlich wurden Viabilitätsbestimmungen und elektronenmikroskopische Untersuchungen nach PFC- Inkubation der PMN durchgeführt.

Es konnte aufgezeigt werden, dass Perfluorocarbone den „respiratory burst“ neutrophiler Granulozyten dosisabhängig reduzieren. Nach Präinkubation der PMN mit PFC wurde sowohl die basale Sauerstoffradikalausschüttung, als auch die Radikalausschüttung als Antwort auf eine anschließende Antigenstimulation der PMN deutlich gegenüber der PFC freien Kontrolle reduziert. Messungen der Viabilität der PMN konnten zeigen, dass FO 6167 toxische Eigenschaften hat, und der Effekt auf den „respiratory burst“

größtenteils in einer Abnahme der PMN Zahl begründet liegt. PF 5080 dagegen zeigte sich als nicht toxisch, und es ist anzunehmen, dass PF 5080 direkt antiinflammatorisch auf die PMN wirkt.

Versuche, in denen PFC auch während der Antigenstimulation anwesend waren – ähnlich den Verhältnissen während der Flüssigkeitsbeatmung-, zeigten, dass PFC wahrscheinlich zusätzlich auch im Sinne einer mechanischen Barriere wirken und sich der reduzierende Effekt auf den „respiratory burst“ dadurch noch verstärkt. Weiterhin wurde dokumentiert, dass eine Cuorsurfmittinkubation den Effekt der Perfluorocarbone auf den „respiratory burst“ der neutrophilen Granulozyten aufhebt.

Aufgrund unserer Ergebnisse gehen wir davon aus, dass Perfluorocarbone direkt antiinflammatorisch im Sinne einer Reduktion des „respiratory burst“ auf neutrophile Granulozyten wirken.

## 7 Literaturverzeichnis

Abraham E (2003): Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med* 31, 195- 9

Ahuja A, Oh N, Chao W, Spragg RG, Smith RM (1996): Inhibition of the human neutrophil respiratory burst by native and synthetic surfactant. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14, 496- 503

Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE (1967): Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2, 319- 33

Babior BM (1978): Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N Engl J Med* 298, 659- 68

Bachofen H, Schürch S, Possmayer F (1994): Disturbance of alveolar lining layer: Effects on alveolar microstructure. *J Appl Physiol* 76, 1983- 92

Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG (1971): The development of neutrophilic polymorpho-nuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med* 134, 907- 34

Baldrige CW, Gerard RW (1933): The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol* 103, 235- 47

Bartlett RH, Croce M, Hirschl R, et al. (1997): A phase II randomized, controlled trial of partial liquid ventilation (PLV) in adult patients with acute hypoxemic respiratory failure (AHRF). *Crit Care Med* 25, A 35

Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R (1994): The American- European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149, 818- 24

Bleyl JU, Ragaller M, Tschö U, Regner M, Hübler M, Kanzow M, Vincent O, Albrecht M (2002): Changes in pulmonary function and oxygenation during application of perfluoro-carbon vapor in healthy and oleic acid- injured animals. *Crit Care Med* 30, 1340- 47

Bleyl JU, Ragaller M, Tschö U, Regner M, Kanzow M, Hübler M, Rasche S, Albrecht M (1999): Vaporized perfluorocarbon improves oxygenation and pulmonary function in an ovine model of acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 91, 461- 9

Bøyum A (1968): Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 97, 7

Brown JK, Haft JW, Bartlett RH, Hirschl RB (2006): Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: extracorporeal life support and liquid ventilation for severe acute respiratory distress syndrome in adults. *Semin Respir Crit Care Med* 27, 416- 25

Carden D, Xiao F, Moak C, Willis BH, Robinson-Jackson S, Alexander S (1998): Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol* 275, H385- H392

Clark LC Jr, Gollan F (1966): Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science* 152, 1755- 66

Clark LC Jr, Kaplan S, Becattini F, Benzing G 3<sup>rd</sup> (1970): Perfusion of whole animals with perfluorinated liquid emulsions using the Clark bubble-defoam heart-lung machine. *Fed Proc* 29, 1764- 70

Clark RA (1999): Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis* 179, 309- 17

Colton DM, Till GO, Johnson KJ, Dean SB, Bartlett RH, Hirschl RB (1998): Neutrophil accumulation is reduced during partial liquid ventilation. *Crit Care Med* 26, 1716- 24

Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG (1991): Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 3, 207- 12

Cox CA, Cullen AB, Wolfson MR, Shaffer TH (2001): Intratracheal administration of perfluorochemical- gentamycin suspension: a comparison to intravenous administration in normal and injured lungs. *Pediatr Pulmonol* 32, 142- 51

Croce MA, Fabian TC, Patton JH Jr, Melton SM, Moore M, Trentham LL (1998): Partial Liquid Ventilation decreases the inflammatory response in the alveolar environment of trauma patients. *J Trauma* 45, 273- 82

Dahlgren C, Karlsson A (1999): Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Meth* 232, 3- 14

Dani C, Costantino ML, Martelli E, Corno C, Fiore GB, Buonocore G, Longini M, Di Filippo A, Tozzini S, Rubaltelli FF (2003): Perfluorocarbons attenuate oxidative lung damage. *Pediatr Pumonol* 36, 322- 29

De Leo FR, Quinn MT (1996): Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukocyte Biol* 60, 677- 91

Devereaux A, Amundson D (1999) : Antibacterial effect of perflubron : Time for bugs to sink or swim. *Crit Care Med* 27, 2741- 7

Dickson EW, Heard SO, Chu B, Fraire A, Brueggemann AB, Doern GV (1998): Partial Liquid Ventilation with perfluorocarbon in the treatment of rats with lethal pneumococcal pneumonia. *Anesthesiology* 88, 218- 23

Doctor A, Ibla JC, Grenier BM, Zurakowski D, Feretti ML, Thompson JE, Lillehei CW, Arnold JH (1998): Pulmonary blood flow distribution during partial liquid ventilation. *J Appl Physiol* 84, 1540- 50

Donnelly SC, MacGregor I, Zamani A, Gordon MW, Robertson CE, Steedman DJ, Little K, Haslett C (1995): Plasma elastase levels and the development of the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 151, 1428- 33

Doyle RL, Szaflarski N, Modin GW, Wiener- Kronish JP, Matthay MA (1995): Identification of patients with acute lung injury: Predictors of mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 152, 1818- 24

Fernandez R, Sarma V, Younkin E, Hirschl RB, Ward PA, Younger JG (2001): Exposure to perflubron is associated with decreased Syk phosphorylation in human neutrophils. *J Appl Physiol* 91, 1941- 47

Finck CM, Hodell MG, Marx WH, Paskanik AM, McGraw DJ, Lutz CJ, Gatto LA, Picone AL, Nieman GF (1998): Endotoxin- stimulated alveolar macrophage recruitment of neutrophils and modulation with exogenous surfactant. *Crit Care Med* 26, 1414-18

Fuhrmann BP, Paczan PR, DeFrancis M (1991): Perfluorocarbon-associated gas exchange. *Crit Care Med* 19, 712- 22

Gallin JI, Snyderman R: Inflammation. Basic principles and clinical correlates. 2 nd edn; Raven Press, New York 1999, 220- 22

Gauger PG, Pranikoff T, Schreiner RJ, Moler FW, Hirschl RB (1996): Initial experience with partial liquid ventilation in pediatric patients with the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 24, 16- 22

Geyer RP (1983): PFC as blood substitute- an overview. *Prog Clin Biol Res* 122, 157- 68

Gollan F, McDermott J, Johnson AE, Namon R (1970): Compliance and diffusion during respiration with fluorocarbon fluid. *Fed Proc* 29, 1725- 30

Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC (1998): Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92, 3007- 17

Heard SO, Puyana JC (2000): The anti-inflammatory effects of perfluorocarbons: let`s get physical. *Crit Care Med* 8, 1241- 42

Heflin AC, Brigham KL (1981): Prevention by granulocyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia. *J Clin Invest* 68, 1253- 60

Herting E, Jarstrand C, Rasool O, Curstedt T, Håkansson S, Robertson B (1995): Effect of surfactant on nitroblue tetrazolium reduction of polymorphonuclear leucocytes stimulated with type Ia group B streptococci. *Acta Paediatr* 84, 922- 6

Herting E, Speer CP: Mehrfachbehandlung des schweren Atemnotsyndroms Frühgeborener mit einem natürlichen porcinen Surfactant (Curosurf)- Ergebnisse einer randomisierten multizentrischen Studie. *Med. Diss. Göttingen*, 1991

Hierholzer C, Harbrecht B, Menezes J (1998): Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J Exp Med* 187, 917-28

Hirschl RB, Croce M, Gore D, Wiedemann H, Davis K, Zwischenberger J, Bartlett RH (2002): Prospective, randomized, controlled pilot study of partial liquid ventilation in adult acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 781- 7

Hirschl RB, Philip WF, Glick PL, Greenspan J, Smith K, Thompson A, Wilson J, Adzick NS (2003): A prospective, randomized pilot trial of perfluorocarbon-induced lung growth in newborns with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 38, 283- 9

Hirschl RB, Pranikoff T, Gauger P, Schreiner RJ, Dechert R, Bartlett RH (1995): Liquid ventilation in adults, children, and full-term neonates. *Lancet* 346, 1201- 02

Hirschl RB, Tooley R, Parent AC, Johnson K, Bartlett RH (1995): Improvement of gas exchange, pulmonary function, and lung injury with partial liquid ventilation. A study model in a setting of severe respiratory failure. *Chest* 108, 500- 08

Holman RG, Maier RV (1988): Superoxide production by neutrophils in a model of adult respiratory distress syndrome. *Arch Surg* 123, 1491- 95

Holmes B, Page AR, Good RA (1967): Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J Clin Invest* 46, 1422-32

Jiang L, Wang Q, Liu Y, Du M, Shen X, Guo X, Wu S (2006): Total liquid ventilation reduces lung injury in piglets after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 82, 124- 30

Junqueira LC, Carneiro J: *Histologie*. 4. Auflage, 193- 97; Springer Verlag, Berlin 2005

Kacmarek RM, Wiedemann HP, Lavin PT, Wedel MK, Tütüncü AS, Slutsky AS (2006): Partial liquid ventilation in adult patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 882- 9

Kayser FH, Bienz KA, Eckert JE, Zinkernagel RM: *Medizinische Mikrobiologie*. 9. Auflage, 21- 22; Georg Thieme Verlag Stuttgart 1998

Kaisers U, Kelly KP, Busch T (2003): Liquid Ventilation. *Br J Anaesth* 91, 143- 51

Kandler MA, von der Hardt K, Schoof E, Dötsch J, Rascher W (2001): Persistent improvement of gas exchange and lung mechanics by aerosolized perfluorocarbon. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 31- 5

Kawano T, Mori S, Cybulsky M, Burger R, Ballin A, Cutz E, Bryan AC (1987): Effect of granulocyte depletion on a ventilated surfactant-depleted lung. *J Appl Physiol* 62, 27- 33

Kazerooni EA, Pranikoff T, Cascade PN, Hirschl RB (1996): Partial liquid ventilation with perflubron during extracorporeal life support in adults: radiographic appearance. *Radiology* 198, 137- 42

Kelly KP, Stenson BJ, Drummond GB (2000): Randomised comparison of partial liquid ventilation, nebulised perfluorocarbon, porcine surfactant, artificial surfactant and combined treatments on oxygenation, lung mechanics, and survival in rabbits after saline lung lavage. *Intensive Care Med* 26, 1523- 30

Kettemann M: Untersuchungen über die Beeinflussung von sessilen Lebermakrophagen sowie Hepatozyten durch Perfluorcarbone. Med. Diss. Würzburg, 1998

Kimless-Garber DB, Wolfson MR, Carlsson C, Shaffer TH (1997): Halothane administration during liquid ventilation. *Respir Med* 91, 255- 62

Klebanoff SJ (1968): Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J Bacteriol* 95, 2131- 8

Kylstra JA, Tissing MO, van der Maen A (1962): Of mice as fish. *Trans Am Soc Artif Intern Organ* 8, 378- 83

Lane TA, Lamkin GE (1986): Increased infection mortality and decreased neutrophil migration due to a component of an artificial blood substitute. *Blood* 68, 351- 54

Leach CL, Greenspan JS, Rubenstein SD, Shaffer TH, Wolfson MR, Jackson JC, DeLemos R, Fuhrman BP (1996): Partial liquid ventilation with perflubron in premature infants with severe respiratory distress syndrome: The LiquiVent Study Group. *New Engl J Med* 335, 761- 67

Leach CL, Holm B, Morin FC<sup>3rd</sup>, Fuhrmann BP, Papo MC, Steinhorn D, Hernan LJ (1995): Partial liquid ventilation in premature lambs with respiratory distress syndrome: efficacy and compatibility with exogenous surfactant. *J Pediatr* 126, 412- 20

Lisby DA, Ballard PL, Fox WW, Wolfson MR, Shaffer TH, Gonzales LW (1997): Enhanced distribution of adenovirus-mediated gene transfer to lung parenchyma by perfluorochemical liquid. *Hum Gene Ther* 8, 919- 28

Lowe KC, Davey MR, Power JB (1998): Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture. *Trends Biotechnol* 16, 272- 77

Lowe KC, Edwards CM, Röhlke W, Reuter P, Geister U, Meinert H (1997): Perfluorochemical effects on neutrophil chemiluminescence. *Adv Exp Med Biol* 428, 495-9

Luce JM (1998): Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 26, 369- 76

Luecke T, Meinhardt JP, Herrmann P, Klemm S, Weiss A, Weisser G, Hirschl RB, Quintel M (2003): End-expiratory lung volumes and density distribution patterns during partial liquid ventilation in healthy and oleic acid-injured sheep: A computed tomography study. *Crit Care Med* 31, 2190- 97

Mantell LL, Shaffer TH, Horowitz S, Foust R 3rd, Wolfson MR, Cox C, Khullar P, Zakeri Z, Lin L, Kazzaz JA, Palaia T, Scott W, Davis JM (2002): Distinct patterns of apoptosis in the lung during liquid ventilation compared with gas ventilation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, L31- L41

Martin TR, Nakamura M, Matute-Bello G (2003): The role of apoptosis in acute lung injury. *Crit Care Med* 31, 184- 88

Matsuda K, Sawada S, Bartlett RH, Hirschl RB (2003): Effect of ventilatory variables on gas exchange and hemodynamics during total liquid ventilation in a rat model. *Crit Care Med* 31, 2034- 40

McDonagh P, Cerney K, Hokama J, Lai G, Gonzales R, Davis- Gorman G, Copeland J (2001): Perflubron emulsion reduces inflammation during extracorporeal circulation. *J Surg Res* 99, 7- 16

Moraes TJ, Chow CW, Downey GP (2003): Proteases and lung injury. *Crit Care Med* 31, 189- 94

Möller OG: In- vitro- Untersuchungen zur Beeinflussung des Proliferationsverhaltens von B- Streptokokken durch Surfactant. *Med. Diss. Göttingen*, 1998

Moskowitz GD (1970): A mechanical ventilator for control of liquid breathing. *Fed Proc* 29, 1751- 52

Nakstad B, Wolfson MR, Shaffer TH, Kähler H, Lindemann R, Fugelseth D, Lyberg T (2001): Perfluorochemical liquids modulate cell- mediated inflammatory responses. *Crit Care Med* 29, 1731- 37

Nekvasil R, Zabrodsky V, Penkova Z et al. (1995): Partial Liquid Ventilation (Perfluorocarbon associated gas exchange- PAGE) in newborns. The first european clinical experience. *Dev Physiopath and Clin* 6, 5-15

Obraztsov VV, Neslund GG, Kornbrust ES, Flaim SF, Woods CM (2000): In vitro cellular effects of perfluorochemicals correlate with their lipid solubility. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278, 1018-1024

Ognibene FP, Martin SE, Parker MM, et al. (1986): Adult respiratory distress syndrome in patients with severe neutropenia. *N Engl J Med* 315, 547- 51

Parsey MV, Tuder R, Abraham E (1998): Neutrophils are major contributors to intraparenchymal lung IL-1 $\beta$  expression after hemorrhage and endotoxemia. *J Immunol* 160, 1007- 13

Pelosi P, Crotti S, Brazzi L, Gattinoni L (1996): Computed tomography in adult respiratory distress syndrome: what has it taught us? *Eur Respir J* 9, 1055- 62

Phelps DS (2001): Surfactant regulation of host defense function in the lung: a question of balance. *Pediatr Pathol Mol Med* 20, 269-92

Pittet JF, Mackersie RC, MartinTR, Matthay MA (1997): Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 1187- 205

Pugin J, Ricou B, Steinberg KP, Suter PM, Martin TR (1996): Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for Interleukin-1. *Am J Resp Crit Care Med* 153, 1850- 56

Ragaller M, Bleyl JU, Koch T, Albrecht DM (2000): Vom Isofluran zum Perfluorhexan?: Perfluorokarbonate- Therapiemöglichkeiten beim akuten Lungenversagen. *Anaesthesist* 49, 291- 301

Rauprich P, Walter G, Jarstrand C, Robertson B, Herting E (2004): Influence of modified natural and synthetic surfactant preparations on bacterial killing by polymorphonuclear leucocytes. *Immunobiology* 209, 609- 17

Ricard JD, Martin-Lefèvre L, Dreyfuss D, Saumon G (2000): Alveolar permeability and liquid absorption during partial liquid ventilation of rats with perflubron. *Am J Resp Crit Care Med* 161, 44-49

Riess JG (1992): Overview of progress in the fluorocarbon approach to in vivo oxygen delivery. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol* 20, 183- 202

Rimensberger PC, Fedorko L, Cutz E, Bohn DJ (1998): Attenuation of ventilator- induced acute lung injury in an animal model by inhibition of neutrophil adhesion by leumedins (NPC 15669). *Crit Care Med* 26, 548- 55

Robertson B, Curstedt T, Johansson J, Jörnvall H, Kobayashi T (1990): Structural and functional characterization of porcine surfactant isolated by liquid- gel chromatography. *Prog Respir Res* 25, 237- 46

Rossmann JE, Caty MG, Rich GA, Karamanoukian HL, Azizkhan RG (1996): Neutrophil activation and chemotaxis after in vitro treatment with perfluorocarbon. *J Pediatr Surg* 31, 1147-51

Rotta AT, Gunnarson B, Hernan LJ, Fuhrmann BP, Steinhorn DM (1999): Partial liquid ventilation influences pulmonary histopathology in an animal model of acute lung injury. *J Crit Care* 14, 84- 92

Rotta AT, Gunnarsson B, Hernan LJ, Fuhrman BP, Steinhorn DM (2000): Partial liquid ventilation with perflubron attenuates in vivo oxidative damage to proteins and lipids. *Crit Care Med* 28, 202- 08

Rotta AT, Steinhorn DM (1998): Partial liquid ventilation reduces pulmonary neutrophil accumulation in an experimental model of systemic endotoxemia and acute lung injury. Crit Care Med 26, 1707- 15

Rüdiger M, Köpke U, Prösch S, Rauprich P, Wauer RR, Herting E (2001): Effects of perfluorocarbons and perfluorocarbons/ surfactant emulsions on growth and viability of group B streptococci and Escherichia coli. Crit Care Med 29, 1786- 91

Rüdiger M, Some M, Jarstrand C, Calkovska A, Linderholm B, Robertson B, Herting E (2003): Influence of partial liquid ventilation on bacterial growth and alveolar expansion in newborn rabbits with group B- streptococcal pneumonia. Pediatr Res 54, 808- 13

Rüdiger M, Wauer RR, Proquitté H et al (1998): Perfluorocarbons increase the amount of surfactant in isolated type II cells. Pediatr Res 44, 435- 39

Rüdiger M, Wissel H, Ochs M, Burkhardt W, Proquitté H, Wauer RR, Stevens P, Rüstow B (2003): Perfluorocarbons are taken up by isolated type II pneumocytes and influence its lipid synthesis and secretion. Crit Care Med 31, 1190- 95

Scholtes U, Wiegand N, Zwirner J, Robertson B, Herting E (2002): Influence of porcine natural modified surfactant on chemotaxis and oxidative metabolism of polymorphonuclear leucocytes. Immunbiol 205, 290- 302

Schürch S, Bachofen H: Biophysical aspects in the design of a therapeutic surfactant; in: Surfactant therapy for lung disease; hrsg. V. Robertson B und Taeusch HW; Marcel Dekker; New York, Basel, Hong Kong 1995, 3- 32

Shaffer TH (2006): History of liquid ventilation. ASAIO 52, 485

Shaffer TH, Lowe CA, Bhutani VK, Douglas PR (1984): Liquid ventilation: effects on pulmonary function in distressed meconium- stained lambs. Pediatr Res 18, 47-52

Shaffer TH, Wolfson MR, Clark LC Jr (1992): Liquid Ventilation. Pediatr Pulmonol 14, 102-9

Shenkar R, Abraham E (1999): Mechanisms of lung neutrophil activation after hemorrhage or endotoxemia: roles of reactive oxygen intermediates, NF-kappa and cyclic AMP response element binding protein. J Immunol 163, 954- 62

Slater TF, Sawyer B, Straeuli U (1963): Studies on succinate- tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta* 8, 383- 93

Smart BE (1995): Physical and physicochemical properties: Chemistry of organic fluorine compounds II. ACS Monograph 187, 979- 1010

Smith TM, Steinhorn DM, Thusu K, Fuhrman BP, Dandona P (1995): A liquid perfluorochemical decreases the in vitro production of reactive oxygen species by alveolar macrophages. *Crit Care Med* 23, 1533- 39

Speer ChP, Götze B, Robertson B, Curstedt T (1990): Einfluß von natürlichem porcinen Surfactant (Curosurf) auf die Funktion neutrophiler Granulozyten. *Monatsschr Kinderheilkd* 138, 737-41

Steinhorn DM (2006): Biological effects of perfluocarbons. *ASAIO* 52, 488

Steinhorn DM, Leach CL, Fuhrman BP, Holm BA (1996): Partial liquid ventilation enhances surfactant phospholipid production. *Crit Care Med* 24, 1252- 56

Steinhorn DM, Papo MC, Rotta AT, Aljada A, Fuhrmann BP, Dandona P (1999): Liquid ventilation attenuates pulmonary oxidative damage. *Crit Care* 14, 20- 8

Tegtmeyer FK, Gortner L, Ludwig A, Brandt E (1996): In vitro modulation of induced neutrophil activation by different surfactant preparations. *Eur Respir J* 9, 752- 7

Thomassen MJ, Buhrow LT, Wiedemann HP (1997): Perflubron decreases inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Crit Care Med* 25, 2045- 47

Till GO, Johnson KT, Kunkel R, Ward PA (1982): Intravascular activation of complement and acute lung injury. Dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites. *J Clin Invest* 69, 1126- 35

Tütüncü AS, Faithfull NS, Lachmann B (1993): Intratracheal perfluorocarbon administration combined with mechanical ventilation in experimental respiratory distress syndrome: dose-dependent improvement of gas exchange. *Crit Care Med* 21, 962- 9

- Urban T, Jarstrand C, Tunevall G (1981): The influence of opsonization with specific antibody and complement on the nitroblue tetrazolium (NBT) reduction of neutrophil granulocytes. A methodological study and a clinical application. *J Clin Lab Immunol* 5, 175- 9
- Van Eeden SF, Klut ME, Leal MA, Alexander J, Zonis Z, Skippen P (2000): Partial Liquid Ventilation with perfluorocarbon in acute lung injury: light and transmission electron microscopy studies. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22, 441- 50
- Varani J, Hirschl RB, Dame M, Johnson K (1996): Perfluorocarbon protects lung epithelial cells from neutrophil-mediated injury in an in vitro model of liquid ventilation therapy. *Shock* 6, 339- 44
- Virmani R, Fink LM, Gunter K, English D (1984): Effect of perfluorochemical blood substitutes on human neutrophil function. *Transfusion* 24, 343- 47
- Von Neergaard K (1929): Neue Auffassungen bei einem Grundbegriff der Atemmechanik; Die Retraktionskraft der Lungen abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. *Z Gesamt Exp Med* 66, 373- 94
- Wagner MH, Sonntag J, Strauss E, Obladen M (1999): Complement and contact activation related to surfactant response in respiratory distress syndrome. *Pediatr Res* 45, 14-18
- Ware LB, Matthay MA (2000): The Acute Respiratory Distress Syndrome. *New Engl J Med* 342, 1334- 49
- Wauer RR: Surfactanttherapie. 2. Auflage, 21- 25; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1997
- Weiland JE, Davis WB, Holter JF, Mohammed JR, Dorinsky PM, Gadek JE (1986): Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome: clinical and pathophysiologic significance. *Am Rev Respir Dis* 133, 218- 25
- Wilcox DT, Glick PL, Karamanoukian HL, Holm BA (1997): Partial liquid ventilation and nitric oxide in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 32, 1211- 15

Williams EA, Welty SE, Geske RS, Hubble CL, Craig DM, Quick G, Meliones JN, Cheifetz IM (2001): Liquid lung ventilation reduces neutrophil sequestration in a neonatal swine model of cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med* 29, 789- 95

Winternitz MC, Smith GH (1920): Preliminary studies in intratracheal therapy. *Pathology of War Gas Poisoning*. Yale: Yale University Press 145- 60

Wolfson MR, Davidson A, Heckman JL, Donner RM, Miller TF, Shaffer TH (1998): Cardiopulmonary interaction during partial liquid ventilation in surfactant-treated preterm lambs. *Eur J Pediatr* 157, 138- 45

Wolfson MR, Greenspan JS, Deoras KS, Rubenstein SD, Shaffer TH (1992): Comparison of gas and liquid ventilation : clinical, physiological and histological correlates. *J Appl Physiol* 72, 1024- 31

Wolfson MR, Greenspan JS, Shaffer TH (1996): Pulmonary administration of vasoactive substances by perfluorochemical ventilation. *Pediatrics* 97, 449- 55

Woods CM, Neslund G, Kornbrust E, Flaim SF (2000): Perflubron attenuates neutrophil adhesion to activated endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278, 1008- 17

Younger JG, Taqi AS, Till GO, Hirschl RB (1997): Partial liquid ventilation protects lung during resuscitation from shock. *J Appl Physiol* 83, 1666-70

Zelinka MA, Wolfson MR, Calligaro I, Rubenstein SD, Greenspan JS, Shaffer TH (1996): A comparison of intratracheal and intravenous administration of gentamicin during liquid ventilation. *Eur J Pediatr* 156, 401- 4

Zilberberg MD, Epstein SK (1998): Acute lung injury in the medical ICU: comorbid conditions, age, etiology, and hospital outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 157, 1159- 64

## 8 Danksagung

Meine Dankbarkeit gilt in erster Linie und im Besonderen Herrn Prof. Dr. med. Egbert Herting für die Vergabe des Themas dieser Doktorarbeit und für die Unterstützung bei ihrer Durchführung.

Des Weiteren möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. med. Mario Rüdiger, Leiter des Bereichs Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden, für die wissenschaftliche Mitbetreuung und sein Fachwissen sowie bei Gabi Walter, Medizinisch-Technische Assistentin im Surfactant Labor von Prof. Dr. med. E. Herting, für ihre kompetente Anleitung und Beratung bei der Planung und Durchführung der Versuchsreihen bedanken. Auch danke ich Dagmar Engelhardt und PD Dr. rer. nat. Wilfried Kugler für ihre zahlreichen Ratschläge.

All die genannten Personen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit sowie zur Schaffung einer sehr angenehmen und produktiven Arbeitsatmosphäre beigetragen. Dafür danke ich.

Für die Möglichkeit zur Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen möchte ich der Abteilung für Histologie des Zentrums für Anatomie der Universität Göttingen sowie Prof. Dr. med. M. Ochs und Dr. med. Markus Schüttler danken.

Die Surfactant- Präparationen wurden uns freundlicherweise von der Nycomed Arzneimittel GmbH, Roskilde, Dänemark, zur Verfügung gestellt.

Die Versuchsreihen der Doktorarbeit wurden mit Mitteln der DFG (DFG He 2072/2-2) unterstützt.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern, Großeltern, Verwandten, meiner Freundin Beata und Freunden für ihre umfassende Unterstützung während meiner Studenten- und nun ersten Arbeitsjahre bedanken.

## 9 Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Name: Alexander Herz  
Geburtsdatum/-ort: 31.01.1975, Auetal  
Eltern: Karin und Jürgen Herz



### Ausbildung

---

#### **Gymnasium Bad Nenndorf**

Allgemeine Hochschulreife Juni 1995  
Student Exchange Year 1992/ 93: Ohio, USA

#### **Universidad de Granada, Spanien**

Centro de Lenguas Modernas 08/ 95 – 03/ 96

#### **Georg-August-Universität, Göttingen**

Medizinische Fakultät 04/ 96 – 10/ 2003  
Praktisches Jahr 10/ 02 – 09/ 03 (Peru, USA, Göttingen)  
Sprachlehrzentrum 04/ 99 – 04/ 02, Brasilianisches Portugiesisch

### Promotion

---

Beginn der Doktorarbeit in der Abteilung Pädiatrie I unter der Leitung von Prof. Dr. med.  
E. Herting an der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen im Juni 2002  
Beendigung des experimentellen Teils im Oktober 2004  
Auswertung/ Statistik 2005/06

### Berufliche Tätigkeit

---

#### **Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck**

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Assistenzarzt seit Oktober 2004  
Mitarbeiter der pneumologisch- allergologischen Ambulanz seit Januar 2006

## Kongressbeiträge, Poster, Veröffentlichungen

---

- 1) Herz A, Odendahl R, Ahrens P, Axt Fliedner R, Nowak G, Petersen D, Herting E. Interventioneller Verschluss der tumorversorgenden A. choroidea posterior bei einem atypischen Plexuspapillom eines FG der 35. SSW. Postervortrag auf der 33. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin.
  
- 2) Härtel C, Herz A, Vieth S, Lensing C, Schultz C. Renal complications associated with human parvovirus B19 infection in early childhood. *Klin Padiatr.* 2007 Mar-Apr; 219 (2):74-5
  
- 3) Köchling J, Freitag HJ, Bollinger T, Herz A, Sperner J. Lyme disease with lymphocytic meningitis, trigeminal palsy and silent thalamic lesion. *Eur J Paediatr Neurol.* 2008 Nov; 12 (6): 501-504