

Methodik

40 männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 280 bis 380 g wurden untersucht. Hierfür wurde am 01.03.2000 die Genehmigung gemäß § 9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheit und technische Sicherheit Berlin erteilt (Geschäftszeichen: 5.2/315 – G 0116/98).

Die Ratten stammen aus der Zucht des hauseigenen Tierstalls des Instituts für Physiologie der Freien Universität Berlin. Die Ratten wurden unter Standard-Bedingungen gehalten und hatten freien Zugang zu Rattentrockenfutter und Wasser.

Gruppeneinteilung

Die Ratten wurden randomisiert in vier Gruppen eingeteilt.

Die Ratten der Gruppe K dienten als Kontrollgruppe. Bei diesen Tieren wurde nach erfolgter Halsgefäß- und Cremasterpräparation keine Ischämie ausgelöst, das übrige Procedere aber beibehalten. Bei den Ratten der Gruppe K+C1INH wurde ebenso wie bei denen der Gruppe K keine Ischämie erzeugt. Allerdings wurde den Tieren das Medikament C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) 5min vor dem virtuellen Reperfusionbeginn appliziert. In der Gruppe I wurde nach erfolgter Cremasterpräparation die bilaterale warme Tourniquetischämie an den Rattenhinterläufen ausgelöst, jedoch kein C1-INH verabreicht. Im Gegensatz zu den Versuchen der Gruppe I wurde den Ratten der Gruppe I+C1INH nach 180min Ischämie und 5 min vor Reperfusionbeginn C1-INH intravenös injiziert.

Gruppenübersicht:

Gruppe K	Versuchsablauf <u>ohne</u> Ischämie und <u>ohne</u> C1-INH
Gruppe K+C1INH	Versuchsablauf <u>ohne</u> Ischämie und <u>mit</u> C1-INH
Gruppe I	Versuchsablauf <u>mit</u> Ischämie und <u>ohne</u> C1-INH
Gruppe I+C1INH	Versuchsablauf <u>mit</u> Ischämie und <u>mit</u> C1-INH

Versuchsprotokoll

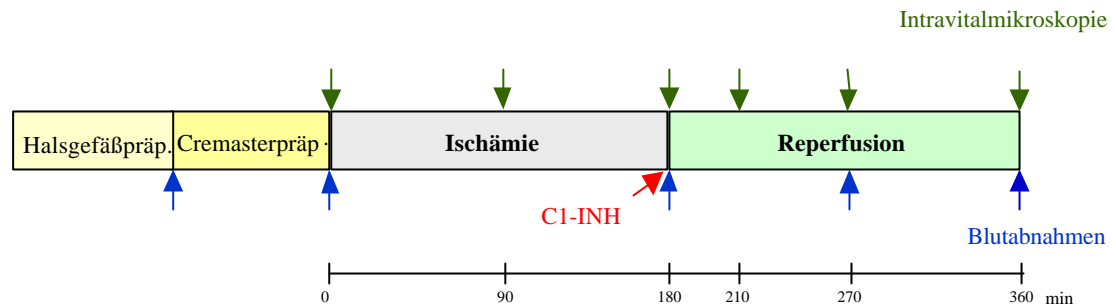


Abb.5 Versuchsablauf mit Zeitskala. Zeitpunkte der intravitalmikroskopischen Messungen (Pfeile oberhalb), der Blutabnahmen (Pfeile unterhalb) sowie der C1-INH Applikation.

Das Protokoll der Versuche einschließlich der Messzeitpunkte für die einzelnen Parameter ist schematisch in Abb. 5 dargestellt.

Die Versuche begannen mit der Narkotisierung der Ratten und nachfolgender Präparation der Halsgefäße und des M.cremaster sowie Intubation. Während des gesamten Versuches lag die Ratte auf einer thermostatisch-geregelten Heizmatte (Thermofoil Heater, HR5468 R6.1L30A, Minco), um eine Körpertemperatur im physiologischen Bereich (37,0 – 38,5°C) sicherzustellen.

Nach der Präparation des M.cremaster wurden beide Hinterläufe der Ratten einer 37°C warmen Tourniquetschämie ausgesetzt. Die Ischämiedauer betrug 3h. Nach drei Stunden wurden die Tourniquets wieder gelöst und die dreistündige Reperfusion somit eingeleitet. Bei der Hälfte der Tiere wurde 5min vor Reperfusionsbeginn 100U/kg KG C1-Esterase Inhibitor (Berinert[®] HS, Centeon, Marburg) intravenös verabreicht. Nach den drei Stunden Reperfusion wurde der Versuch beendet.

Insgesamt wurde den Ratten zu fünf Zeitpunkten arterielles Blut abgenommen. Alle Blutabnahmen (jeweils 650µl) erfolgten in heparinisierte Reaktionsgefäße und dienten der Probengewinnung für die Analysen der Adhäsionsmoleküle CD11b und CD62L mittels FACS sowie von Interleukin 6 mittels ELISA. Nach jeder Blutabnahme wurden den Ratten 500µl Volumen in Form von physiologischer Kochsalzlösung (Kochsalzspüllösung 0,9%, Delta-Pharma, Boehringer Ingelheim) verabreicht, um die hämodynamische Belastung durch die Blutabnahmen zu minimieren. Im Falle eines Blutdruckabfalls unter einen mittleren arteriellen Blutdruck von 55mmHg wurde ein Bolus von 0,25 bis 0,5ml physiologische Kochsalzlösung intravenös zur Druckstabilisierung appliziert.

Die erste Blutabnahme erfolgte direkt nach der Halspräparation, die weiteren nach Präparation des M.cremaster, nach 180min Ischämie, nach 90min Reperfusion sowie letztmalig am Versuchsende nach 180min Reperfusion.

Bei der ersten und der letzten Blutabnahme wurden den Versuchstieren zusätzlich 50µl Blut für die Blutbildbestimmung entnommen.

Die Aufnahme intravitalmikroskopischer Bilder sowie Messungen der Blutströmungsgeschwindigkeiten und der Gefäßdurchmesser erfolgten zu 6 verschiedenen Zeitpunkten. Die erste Aufnahme erfolgte nach der Präparation des M.cremaster, die weiteren nach 90min Ischämie, nach 180min Ischämie, nach 30min Reperfusion, nach 90min Reperfusion sowie letztmalig am Versuchsende nach 180min Reperfusion (Abb.5).

Anästhesie

Die Ratten wurden durch intraperitoneale Gabe von 0,15g/100g Körpergewicht (KG) Urethan (Urethan 99% (N), Urethan[®], Sigma-Aldrich, Germany) sowie durch intramuskuläre Injektion von 5mg/100g KG Ketamin (Ketamin-hydrochlorid 100 mg/ml, Ketavet[®], Pharmacia & Upjohn) 20 min nach Urethangabe anästhesiert. Weitere Dosen Urethan (jeweils 0,2ml) wurden bei Bedarf während des Experiments zur Aufrechterhaltung der Narkose intraperitoneal verabreicht. Nach Versuchsende wurde die Ratte durch intra-arterielle Injektion von 0,1mg/100g KG Pentobarbital (Pentobarbital-Natrium, KG Narcoren[®], Rhone Merieux GmbH, Laupheim, Germany) eingeschläfert.

Präparation der Halsgefäße und Intubation

Nach eingetretener Narkose wurde der Rattenhals für die Katheterisierung der Arteria carotis communis und V. jugularis externa sowie zur trans-trachealen Intubation präpariert.

Im Anschluß an eine sorgfältige Rasur des vorderen Halsbereiches wurde ein medianer Halsschnitt mit einem Thermokauter (Galvanokauter, 4cm C-Metallschlinge 232v, Meyer + Kersting, Karlsruhe) durchgeführt. Daraufhin wurde die freigelegte Luftröhre tracheotomiert. Hierzu wurde mit einer chirurgischen

Schere ein kleiner transversaler interkartilaginärer Schnitt an der ventralen Trachea vorgenommen und durch das entstandene Lumen ein Polyethylen-Mikroschlauch (non sterile, ID: 1,57mm, OD: 2,08mm, Portex, England) eingeführt und in die Trachea vorgeschoben. Durch diese Kunststoff-Trachealkanüle atmete die Ratte während der Versuche spontan. Im Falle einer Verlegung der Atemwege durch Schleim oder anderes Sekret konnte durch den Trachealzugang ein Kunststoffschlauch endotracheal eingeführt und durch Absaugen freie Atemwege während der Experimente gewährleistet werden.

Anschließend wurde die rechte Vena jugularis externa stumpf freipräpariert und ein Polyethylen-Mikroschlauch (ID: 0,5mm, OD: 1,0mm, Portex, England) eingeführt. Dieser zentralvenöse Zugang wurde für die Dauerinfusion von physiologischer Kochsalzlösung (Kochsalzspüllösung 0,9%, Delta-Pharma, Boehringer Ingelheim) durch einen Perfusor (Perfusor segura FT, B.Braun) mit einer Infusionsrate von 1,5ml/h als auch für die Applikation von Medikamenten (C1-Esterase-Inhibitor) sowie Fluoreszenzfarbstoffen (Rhodamin 6G) verwendet.

Als letztes wurde die linke Arteria carotis communis stumpf freipräpariert und vorsichtig vom N.vagus sowie peri-arteriell vorhandenen sympathischen Nervengeflechten separiert (zur Vermeidung kardialer Zwischenfälle bei Fixierung des arteriellen Zugangs am distalen Gefäßende). Auch in die Arterie wurde ein Polyethylenschlauch (ID: 0,58mm, OD: 0,96mm, Portex, England) eingeführt, der an einen Drucksensor (SensoNor 840, SensoNor a.s., Norwegen) angeschlossen wurde und zur Messung des arteriellen Blutdrucks sowie der Herzfrequenz diente. Über diesen Zugang erfolgten auch die arteriellen Blutabnahmen.

Nach der Halsgefäßpräparation wurde das Versuchstier auf einer speziell konstruierten Vorrichtung aus Plexiglas gelagert.

Präparation des M.cremaster

Die Präparation des Musculus cremaster ermöglichte, die Mikrozirkulation dieses Areals mit Hilfe eines Intravitalmikroskops zu untersuchen.

In Anlehnung an die von Baez 1973 beschriebene und von Hill modifizierte Methode [63,64] wurde zunächst das anteriore Skrotum vorsichtig rasiert und anschließend mit dem Thermocauter (Galvanokauter C-Metallschlinge 232v, Meyer + Kersting,

Karlsruhe) die Spitze des Hodensackes abgetrennt. Nach dem Einführen einer geraden Pinzette, die das skrotale Gewebe von dem darunter liegenden Hoden abhob, wurde das Skrotum mit einem paramedianen longitudinalen Schnitt mit dem Kauter eröffnet.

Ab diesem Zeitpunkt bis zum Ende des Versuches wurde das Präparat mit einer 37°C warmen Tyrode-Lösung mit einer ungefähren Tröpfchengeschwindigkeit von zwei Tropfen/sec kontinuierlich superfundiert. Die nach Duling (1976) modifizierte Superfusionslösung, zusammengesetzt aus NaCl 131,9mM, KCl 4,7mM, CaCl₂ x 2,0mM, MgCl₂ 1,2mM, NaHCO₃ 18,0mM, wurde mit einem Gasgemisch aus 95% N₂ und 5% CO₂ äquilibriert, um einen pH-Wert von 7,35 bis 7,40 zu erreichen.

Der dorsale Anteil des den Hoden umschließenden M.cremaster wurde mit feinen Pinzetten (Fine Science Tools, Heidelberg, Germany) von glänzendem Binde- und Fasziengewebe vorsichtig befreit, bis dieser unter dem Operationsmikroskop (OPMI 1, Carl Zeiss, Oberkochen/Württ.) matt schimmerte. Daraufhin wurde ein 5/0-USP-Faden (Polyester, steril weiss unbeschichtet, Traumatil Catgut GmbH) durch die Hodenspitze mit einer chirurgischen Wundnadel (G 312/16, Acu-firm, Germany) gezogen, anschließend gespannt und der Cremastermuskel proximal der Nahtstelle am kaudalen Hodenende mit Hilfe des Kauters geringfügig eröffnet. Durch diese Öffnung wurde eine gerade Pinzette eingeführt, nach kranial vorgeschoben und der Musculus cremaster vom darunter liegenden Hoden- und Nebenhodengewebe abgehoben. Nachfolgend wurde der ventrale Cremasteranteil von seinem distalen Ende bis zur Basis mit dem Kauter aufgeschnitten.

Der nun fertig präparierte Muskel wurde durch sieben Randnähte (5/0-USP-Faden (Polyester, steril weiß unbeschichtet, Traumatil Catgut GmbH) über das Deckglas der Plexiglas-vorrichtung gespannt und war nun bereit für entsprechende intravitalmikroskopische Untersuchungen.

Intravitalmikroskopie

Für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurde ein Mikroskop-Aufbau (Leitz Wetzlar, Germany) mit einem 25 x 0,6 SW Immersionsobjektiv (Leitz Wetzlar, Germany) und einer CCD-Restlichtkamera (CCD CV-M 50 SIM-Restlicht) benutzt, die an einen Monitor (Sony PVM-122CE) als auch einen Videorecorder (Blaupunkt S-VHS RTV-950, Germany) zur Aufnahme intravitalmikroskopischer

Bilder angeschlossen waren. Letzteres ermöglichte die off-line Auswertung der Bildaufnahmen zur Durchmesserbestimmung als auch zur Auswertung der mit der Restlichtkamera aufgenommenen Fluoreszenzaufnahmen. Als Immersionsflüssigkeit wurde die Superfusionslösung verwendet. In Abb. 6 wird dieser Aufbau schematisch dargestellt.

Fünf Minuten vor jeder intravitalmikroskopischen Untersuchung wurden 0,15ml Rhodamin 6G (0.2g/l; Sigma, Germany) im Bolus intravenös verabreicht [60]. Durch Einschaltung geeigneter Erreger- und Sperrfilterkombinationen in den Strahlengang zwischen Xenonlampe und Präparat wurden die spezifisch mit Rhodamin angefärbten Leukozyten aufgrund der Absorptions- und Emmissionsmaxima von Rhodamin bei einer Wellenlänge von 524nm gut sichtbar. Somit wurde es möglich, die Interaktionen der Leukozyten mit dem Endothel in der Mikrozirkulation, insbesondere in den postkapillären Venolen, zu untersuchen.

Nach der Rhodamin-Gabe wurden zunächst die durch Transillumination gewonnenen am Monitor verfolgbaren Bilder einer Arteriole sowie einer postkapillären Venole auf Videoband aufgenommen, um eine spätere off-line Analyse der Gefäßdurchmesser zu ermöglichen. Dann erfolgte die on-line Messung der Blutströmungsgeschwindigkeiten. Abschließend wurden mittels Restlichtkamera Bilder einer postkapillären Venole einschließlich der darin sichtbaren Leukozyten über mindestens eine Minute lang ebenfalls auf Videoband zur Quantifizierung der rollenden, adhärenen und extravasierten Leukozyten aufgenommen.

Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte an einem PC-gestützten Videobildanalysiersystem. Die auf den Videobändern gespeicherten Bilder wurden an einen Echt-Zeit-Videodigitalisierer (Echtzeit-Digital-Bild Prozessor Karte, FG 100 AT, Imaging Technology Inc., USA) weitergeleitet, der an einen IBM-kompatiblen PC (PAC OMP) angeschlossen ist und über einen Monitor (Videomonitor, Sony) die digitalisierten Bilder sichtbar machte.

Dieses anhand von Referenzbildern von definierten Längenmaßen geeichte System ermöglichte die manuelle Bestimmung von Gefäßdurchmessern sowie die Quantifizierung der Restlichtkameraaufnahmen. Bei letzteren wurde für die Analyse rollender und adhärenter Leukozyten jeweils ein Gefäßabschnitt von 100µm Länge betrachtet. Ein Leukozyt wurde als „rollend“ gewertet, wenn er sich langsamer als die Blutströmung bewegend innerhalb dieser Gefäßstrecke von 100µm deutlich sichtbar aufleuchtete, also in den Fokus der Kamera kam. Als adhären wurden jene

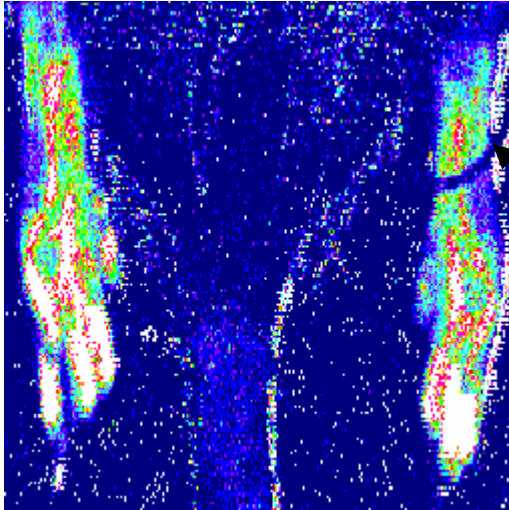
Sichtkontrolle am Bildschirm auf das zu vermessende Gefäß entlang seiner Gefäßachse ausgerichtet wurden, hatten einen definierten Abstand von $5,5\mu\text{m}$. Die Photodiodensignale wurden amplifiziert, digitalisiert und mit einer Frequenz von 10kHz in einen PC eingespeist. Die Aufnahmen dauerten jeweils fünf Sekunden. Offline wurde dann mittels Kreuzkorrelation die Verzögerung der Intensitätsmuster von einer Diode zur anderen bestimmt und aus dieser Zeit und dem Diodenabstand von $5,5\mu\text{m}$ die mittlere Strömungsgeschwindigkeit errechnet. In vorangegangenen unabhängigen Kalibrationsexperimenten mit rotierenden Scheibensystemen wurde gezeigt, dass diese Methode zur Bestimmung der Blutströmungsgeschwindigkeit verlässliche Ergebnisse bis zu Geschwindigkeiten von 50mm/s gewährleistet.

Tourniquetischämie

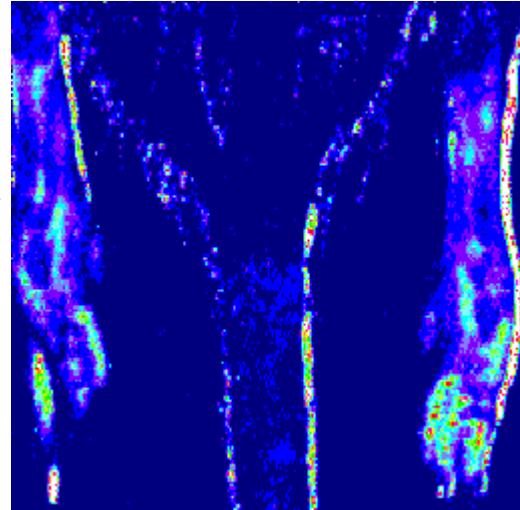
Die selbst hergestellten Tourniquets bestanden aus einem Bindfaden und einem herkömmlichen Plastikhohlzylinder, durch den der Bindfaden doppelt hindurch gezogen wurde, so dass am distalen Ende eine Schlaufe entstand. Diese wurde um die proximalen Hinterlaufenden gelegt (Abb.6). Anschließend wurde die Schlaufe mit Hilfe einer chirurgischen Klemme, die den Plastikhohlzylinder gegen das Schlaufenende drückte, zusammengezogen und eine komplette Ischämie beider Hinterläufe erzeugt. Den Ischämienachweis, dessen Bilddaten in Abb. 7 dargestellt sind, führten wir mit einer LaserScan Kamera durch, mit deren Hilfe gezeigt werden konnte, dass mit dieser Tourniquetmethode die Durchblutung in dem abgeklemmten Hinterlauf vollständig zum Erliegen kommt.

Um für die durch die Ischämie bedingten Schädigungen kontrollierte Bedingungen zu schaffen sowie eine hohe Relevanz für anwendbare klinische Situationen zu erreichen, wurde die Temperatur der ischämischen Areale durch kontrollierte Wärmezufuhr bei 37°C gehalten. Dies wurde durch in der hauseigenen Werkstatt hergestellte und über die Hinterläufe der Versuchstiere gelegte halbröhrenförmige Glashohlkörper, deren Inneres mit 37°C warmen Wasser durchflossen wurde, realisiert. Der Innenraum der Glashohlkörper war Teil eines geschlossenen Flüssigkeitskreislaufes eines Thermostats (Umwälz/Bad-Thermostat, Haake D8-L), der auch der Erwärmung der Superfusionslösung diente.

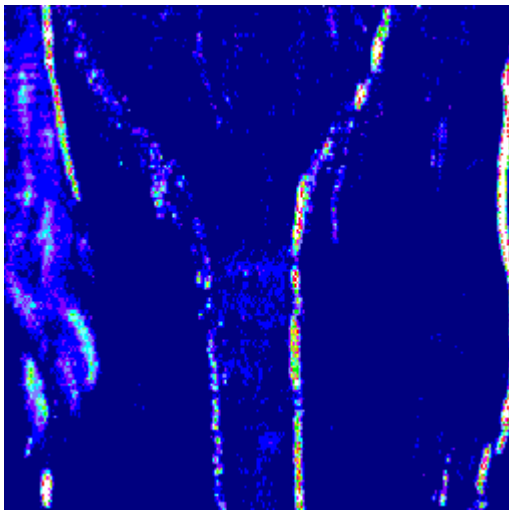
Vor Untersuchung:



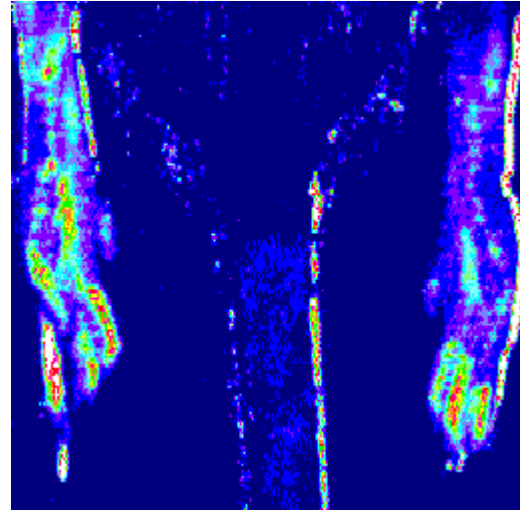
Nach 1min Reperfusion:



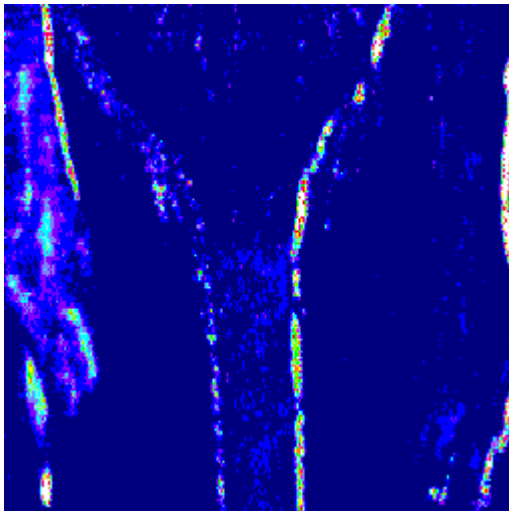
10min Ischämie des rechten Hinterlaufes



Nach 10min Reperfusion



30 min Ischämie des rechten Hinterlaufes



Exitus (nach Tod der Ratte)

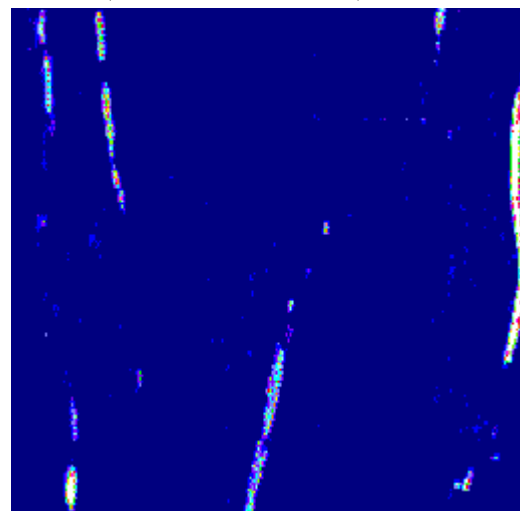


Abb.7 Nachweis der Ischämie. Die Bilder der LaserScanKamera zeigen die Durchblutung in der unteren Extremität der Ratte vor der Untersuchung sowie das Sistieren der Durchblutung nach 10 bzw. 30min Ischämie des rechten Hinterlaufes. Nach Beendigung der Ischämie zeigt sich eine deutliche Reperfusion der Extremität. Als Artefaktkontrolle diente die Aufnahme nach Tod des Versuchstieres.

Durchflußzytometrie mittels FACS (Fluorescence activated cell sorter)

Bei jeder Blutabnahme wurden jeweils ca. 650µl arterielles Blut entnommen. Dieses wurde innerhalb weniger Minuten nach Abnahme weiterverarbeitet. Für die Bestimmung der Adhäsionsmoleküle CD11b (Mac1) sowie CD62L (L-Selektin) am FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) wurden in 4 Reaktionsgefäße (PP/1,5ml, Plastikbrand®) jeweils 30µl Vollblut pipettiert. Diese Blutproben wurden dann mit 7,5µl einer 1:10 verdünnten Lösung des entsprechenden Antikörpers inkubiert. Eine Probe wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen CD11b (FITC-conjugated mouse IgA, ? anti-rat CD11b monoclonal antibody, PharMingen) versetzt, während eine weitere mit einem unspezifischen Antikörper gleicher Art und Herkunft (FITC-conjugated mouse IgA, ? monoclonal immunoglobulin isotype standard, PharMingen) inkubiert wurde (negativ Kontrolle), um das Ausmaß der unspezifischen Bindung messen zu können. Die Probe für die Bestimmung der CD62L Moleküle wurde entsprechend mit einem spezifischen Antikörper gegen CD62L (FITC-Hamster anti-rat CD62L monoclonal antibody, PharMingen) versetzt. Für die erforderliche Negativ-Kontrolle wurde wiederum ein unspezifischer Antikörper gleichen Isotyps und gleicher Herkunft (FITC-conjugated Hamster IgG, group 2, ? monoclonal immunoglobulin isotype standard, PharMingen) verwendet. Die Blutproben wurden 30min mit dem Antikörper bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert.

Anschließend wurde zu jeder Probe 1000µl 1:10 verdünnte Lysing solution (FACS™ Lysing Solution, 10fach konzentriert, Becton Dickinson) zur Lyse der Erythrozyten gegeben.

Nach 10min Einwirkzeit wurden die Proben bei 310 x g zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf). Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Die sich am Gefäßboden befindenden Leukozyten wurden dann durch Zugabe von 1000µl PBS-Puffer Lösung (PBS-Dulbecco w/o Ca²⁺, Mg²⁺, Biochrome KG, Berlin) resuspendiert und nachfolgend „gewaschen“. Hierbei wurden die Proben erneut bei 310 x g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden den nun fertigen Proben 500µl CellFix Lösung (CelFix™ 50ml, Cat.No.340181, Becton Dickinson) zugegeben, um einen Konjugationsverlust der Antikörperbindung bzw. der Isothiocyanat-Bindung (FITC) vom Antikörper zu vermeiden. Die Proben wurden in

für FACS-Messungen geeignete Rundbodenröhrchen (5ml Polystyrol Rundbodenröhrchen, Falcon[®], Becton Dickinson) umgefüllt.

Noch am Versuchstag wurden alle Proben an einem FACScan[™]-Gerät (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) analysiert. In jeder Probe wurden 10.000 Zellen gemessen. Die Auswertung der Proben fand am selben Gerät mit dem Programm Cell-Quest[™] (MacApp 3.1.3., Becton Dickinson) statt. Die Zellen der Probelösungen wurden in einem Dotplot dargestellt, in welchem die Zellen entsprechend ihrer Größe und Granularität eingeordnet wurden. Hierzu wertete das Gerät die Daten der Streuung von ausgesendetem Laserlicht aus, wobei die Vorwärtsstreuung (Größe) und Seitwärtsstreuung (Granularität) gemessen wurde. Somit konnten die einzelnen Zellpopulationen differenziert werden. Abschließend wurde die Population der polymorphkernigen Granulozyten (PMN) in dem dot-plot ausgewählt (gating) und die Fluoreszenzaktivität dieser Zellen gemessen, welche proportional der Anzahl der zu messenden, mit fluoreszierenden Antikörpern besetzten Oberflächenmoleküle (CD62L, CD11b) war. Ein Beispiel für einen solchen Dotplot mit gating von CD62-positiven PMN und deren ermittelter Fluoreszenzaktivität ist in Abb. 8 dargestellt.

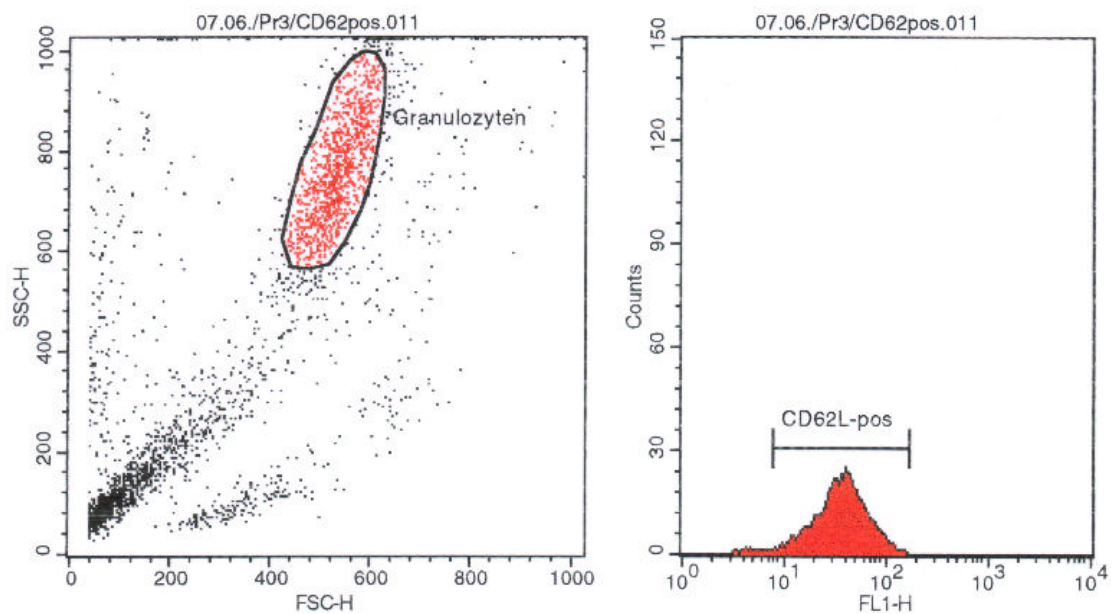


Abb.8 Messergebnisse der FACS-Analyse mit Antikörpern gegen L-Selektin. Links ist ein Dotplot mit Markierung der polymorphkernigen Granulozyten und rechts die entsprechende Messung der Fluoreszenzaktivität dargestellt.

ELISA

Für die Bestimmung der Interleukin 6 (IL-6) Konzentrationen wurde der für die FACS-Analyse nicht verwandte Teil der Blutabnahme genutzt. Dieser wurde wenige Minuten nach Abnahme 5min bei 10.000U/min zentrifugiert. Das hierbei gewonnene Blutplasma wurde mit einer Pasteur-Pipette abgetrennt und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Die Plasmaproben wurden umgehend kühlgestellt und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

Zur Messung der Interleukin 6 Konzentrationen in den Plasmaproben wurde ein ELISA-Kit für Ratten-Interleukin 6 (Cytoscreen™ ELISA Kit Rat Interleukin 6, BioSource International, USA) verwendet.

Dieser „Sandwich“ Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA) Kit bestand aus zwei Mikrotiterplatten mit jeweils 96 Probenöffnungen („sample wells“), in denen der spezifische Antikörper für Ratten-IL-6 immobilisiert vorhanden war. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt, so dass pro Plasmaprobe zwei Plattenöffnungen verwendet wurden. Die zu messenden Plasmaproben (jeweils 100µl) als auch die Standardlösungen mit bekannten IL-6 Konzentrationen wurden in die einzelnen Probenöffnungen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2h bei 37°C hatte das Antigen IL-6 fest an den stationären IL-6 Antikörper gebunden. Im Anschluß an einen Waschvorgang, welcher nicht-antikörpergebundenes IL-6 auswusch, wurden 100µl einer Lösung mit Biotin-markierten Antikörpern gegen IL-6 (anti-IL-6) hinzugegeben, welche in einer zweiten Inkubationszeit von 1h bei Raumtemperatur an das im ersten Vorgang immobilisierte IL-6 banden. Ein zweiter Waschvorgang beseitigte überschüssige, nicht gebundene Antikörper. Daraufhin wurden 100µl einer Lösung mit Streptavidin-Peroxidase-Enzym in die Proben gegeben, welches an die Biotinmarkierten Antikörper band. Auf diese Weise entstand ein sogenanntes „Sandwich“ aus vier Teilen. Ungebundene Enzyme wurden nach einer dritten Inkubationszeit von 30min bei Raumtemperatur ausgewaschen und nachfolgend 100µl einer chromogenen Substratlösung hinzugegeben. Das Streptavidin-Peroxidase-Enzym, welches in den Probenöffnungen an den „Antikörpersandwich“ fest gebunden war, setzte das zugegebene Substrat um, wobei diese enzymatische Reaktion von einem Farbumschlag begleitet war. Nach 30minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 100µl einer Stop-Reagenz beendet. Die Proben

wurden im Anschluß an einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Spectra Thermo & Rainbow Thermo Reader, Tecan Spectra, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) analysiert. Die Intensität des entstandenen Farbproduktes war proportional der Konzentration von Interleukin 6 in den Plasmaproben. Die Interleukin 6 Konzentrationen wurden von einem Computer durch Ablesen der Extinktionen (Farbintensitäten) auf der Standardkurve der Extinktionen der Standardlösungen, deren IL-6 Konzentrationen bekannt waren, errechnet.

Blutbild

Von den Proben der ersten und der letzten Blutabnahme wurden ca. 50µl Blut in ein heparinisiertes Eppendorfgefäß gegeben und für die Erstellung des Blutbildes einschließlich Messung von Hämoglobinkonzentration (Hb) und Hämatokrit an einem Coulter Analysator (Coulter[®] AC-T diff[™] Analysator, Coulter Corporation, Florida, USA) genutzt. Die Messung erfolgte mit arteriellem Vollblut. Eine spezielle Vorbereitung der Blutproben war nicht erforderlich.

Auswertung

Für die Auswertung der gewonnenen Daten wurden die Datenverarbeitungs- und Graphikprogramme SPSS 9.0 für Windows (SPSS Inc.), SigmaPlot2000 für Windows 6.0 (SPSS Inc.) sowie Microsoft[®] Excel 97 SR-1 verwendet.

Für die statistischen Analysen wurden der Wilcoxon-Test (Vergleiche innerhalb einer Versuchsgruppe) sowie Mann-Whitney U-Test (Vergleiche zwischen den Versuchsgruppen) benutzt. Werte mit einem Signifikanzniveau $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

Alle Daten sind (wenn nicht anders bezeichnet) als Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers aufgeführt.