

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und
Internistischer Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Auswirkung von Hyperglykämie und Osmolarität auf die
Zytokinproduktion und Phagozytose von mononukleären Zellen aus
peripherem Blut

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Natalie Maureen Otto
aus Rio de Janeiro, Brasilien

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. R. Schindler
 2. Prof. Dr. med. Dr. h. c. U. Heemann
 3. Prof. Dr. med. N. Marx

Datum der Promotion: 30.11.2012

Widmung

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Widmung	3
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	10
1 Einleitung	12
1.1 Definition und Epidemiologie der Sepsis	12
1.2 Hyperglykämie als Risikofaktor bei intensivpflichtigen und septischen Patienten ...	16
1.3 Zytokinfreisetzung unter hyperglykämischen Bedingungen	18
1.4 Hyperglykämie und Phagozytose	21
1.5 Hypothese.....	23
1.6 Ziele und Fragestellungen	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Chemikalien	25
2.1.2 Labormaterialien	26
2.1.3 Puffer	26
2.1.4 Enzyme, Kits und Sonstiges	28
2.2 Geräte	29
2.3 Methoden	30
2.3.1 Probanden	30
2.3.2 Zellpräparation	30
2.3.3 Separation von mononukleären Zellen (PBMC).....	30
2.3.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	31
2.3.5 Durchflusszytometrie	34
2.3.6 Phagozytose-Assay	35
2.3.7 Oxidativer Burst.....	37
2.3.8 Durchführung einer FACS-Analyse.....	38
2.3.9 Immunohistochemie – Nachweis von p38.....	39
2.4 Limulus-Lysat-Test (LAL-Test).....	40

2.5	Statistische Auswertung.....	40
3	Ergebnisse	42
3.1	Stimulationsstufen von mononukleären Zellen mit LPS	42
3.2	Hohe Glukosekonzentrationen steigern die Zytokinproduktion	43
3.3	Insulin führt zu keiner relevanten Änderung der Zytokinfreisetzung	45
3.4	Insulin führte zu einer Reduktion der anfänglich gesteigerten Zytokinfreisetzung nach Glukoseexposition	46
3.5	Stimulation der Zytokinproduktion durch D- und L-Glukose	47
3.6	Effekt von Mannitol auf die Zytokinfreisetzung.....	48
3.7	Hyperosmolare Bedingungen führen zu einer erhöhten Zytokinfreisetzung.....	50
3.8	Auswirkung von Glukose, Rapamycin und dem p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB 203580 auf die Zytokinproduktion.....	51
3.9	Charakterisierung der Auswirkung von Glukose und der p38-MAP-Kinase auf die Zytokinproduktion mittels Immunhistologie	54
3.10	Auswirkungen der Hyperglykämie und der Hyperosmolarität auf den oxidativen Burst und die Phagozytose.....	55
4	Diskussion	58
4.1	Erhöhte Glukosekonzentrationen steigern die Zytokinproduktion.....	58
4.2	Wirkt Insulin als antiinflammatorisches Hormon?.....	58
4.3	Bedeutung der Glukose und Osmolarität für die Zytokinproduktion.....	59
4.4	Der Zytokinproduktion zugrunde liegenden Regulationsmechanismen.....	62
4.5	Klinische Studien zur intensivierten Insulintherapie.....	66
4.6	Oxidativer Burst und Phagozytose – die nicht adaptive Immunabwehr der Granulozyten und Makrophagen	67
4.7	Kritikpunkte der Methodik.....	70
4.8	Mögliche Auswirkungen der glukoseassoziierten Zytokinmodulation bei anderen Krankheitsbildern	72

4.8.1 Die Rolle der Hyperglykämie bei Arteriosklerose und koronaren Gefäßerkrankungen	72
4.8.2 Einfluss der Hyperglykämie auf das akute Nierenversagen.....	74
5 Zusammenfassung	76
6 Literatur.....	78
7 Danksagung	89
8 Erklärung an Eides Statt.....	90
9 Lebenslauf.....	91

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Der Zusammenhang zwischen dem systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS), Sepsis und Infektion (aus Bone et al. 1992) ⁷	12
Abbildung 1.2: Ablauf der Lymphozytenstimulation (aus Wheeler u. Bernard 1999) ¹⁶	14
Abbildung 2.1: Separation mononukleärer Zellen nach Dichtegradientenzentrifugation.	30
Abbildung 2.2: 96-well-ELISA-Mikrotitrierplatte.....	32
Abbildung 2.3: Durchflusszytometrie, Argon-Laser (aus BD LSRII Benutzerhandbuch 2003).....	35
Abbildung 3.1: LPS-Stimulationsstufen.....	43
Abbildung 3.2: Glukose führte zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Zytokinproduktion.	44
Abbildung 3.3: Auswirkung von Insulin auf die Zytokinfreisetzung von IL-6 und IL-1 β .	45
Abbildung 3.4: Die Zugabe von Insulin zu Glukose führte zu einer Reduktion der Zytokinkonzentration.	46
Abbildung 3.5: IL-6- (A) und IL-1 β - (B) Produktion durch PBMC nach Zugabe von L- und D-Glukose.....	47
Abbildung 3.6: Induktion der IL-6- (A) und IL-1 β -Freisetzung (B) durch PBMC innerhalb von 24 Stunden.	49
Abbildung 3.7: IL-6- (A) und IL-1 β -Freisetzung (B) durch LPS-stimulierte PBMC nach Zugabe von Urea.....	50
Abbildung 3.8.1: IL-6- (A) und IL-1 β -Freisetzung (B) durch PBMC nach Inkubation mit Glukose, Rapamune und dem p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB 203580.	52
Abbildung 3.8.2: IL-1 β - (A) und IL-6-Freisetzung (B) durch PBMC nach Zugabe von Glukose und dem PKC β -Inhibitor.	53
Abbildung 3.9: Immunhistochemischer Nachweis der p38-MAP-Kinase bei verschiedenen Glukose- und LPS-Konzentrationen.	54
Abbildung 3.10: Oxidative Burst-Aktivität.	56

Abbildung 3.11: Phagozytotische Aktivitätsbestimmung bei verschiedenen osmotischen Stimuli 57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Die SIRS-Kriterien.....	13
Tabelle 1.2: Klinische Schweregrade der Sepsis	13
Tabelle 1.3: Übersicht der Zytokine: Immunregulation durch die Produktion von antiinflammatorischen und proinflammatorischen Zytokinen.	15
Tabelle 1.4: <i>In vivo</i> - und <i>In vitro</i> - Studienübersicht von Zelllinien und Tiermodellen unter hyperglykämischen Bedingungen.....	19
Tabelle 1.5: <i>In vivo</i> - und <i>In vitro</i> - Studienübersicht von Zelllinien und Tiermodellen unter hyperglykämischen, hyperosmolaren und normoglykämischen Bedingungen.....	20
Tabelle 2.1: Schema für das Auftragen des Standards.....	33
Tabelle 4.1: Studienübersicht der Intensivierten Insulintherapie (IIT) mit Auswirkung auf Morbidität und Mortalität.....	66

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
ANV	Akutes Nierenversagen
bp	Basenpaar(e)
C	Celsius
CAPD	Continuous ambulatory peritoneal dialysis
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
DHR	Dihydrorhodamin
DIGAMI	Diabetes mellitus Insulin-Glucose Infusion on Acute Myocardial Infarction
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPRR	Endocytic pattern recognition receptors
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein isothiocyanate
fMLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
FSC	Forward scatter
g	Fallbeschleunigung (= 9,80665 m/s ²)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HLA	Human leucocyte antigen
HG	Hyperglykämie
IIF	Immunfluoreszenz
IIT	Intensivierte Insulintherapie
IL-1	Interleukin-1
IL-10	Interleukin-10
IL-1β	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8

LAL	Limulus-Lysat
LPS	Lipopolysaccharide
MAP-Kinase	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MHC	Major histocompatibility complex
ml	Mililiter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
mTOR	Mammalian target of Rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nekrosefaktor-Kappa-B
p38-MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	potentia Hydrogenii
PKC- β	Proteinkinase-C beta
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PMN	Polymorphonukleär
PRR	Pattern recognition receptors
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RVD	Regulatory volume decrease
SEM	Standard error of the mean
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SSC	Sideward scatter
SPE	Solid phase extraction
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TRP	Transient receptor potential
vs.	Versus
VSMC	Vascular smooth muscle cells
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Definition und Epidemiologie der Sepsis

Von einer Sepsis sind allein in den USA pro Jahr annähernd 700.000 Personen betroffen; davon sterben 210.000 Menschen¹⁻³. Dies entspricht einer geschätzten Inzidenz von 1,5 bis 8 % im Jahr in den vergangenen Jahren trotz des medizinischen Fortschritts in Diagnostik und Therapie. In Deutschland liegt die Anzahl neu diagnostizierter schwerer Sepsisfälle bei 76–110 pro 100.000 Einwohner pro Jahr⁴. Sepsis verursacht 10 % aller Todesfälle im Jahr. Diese Rate überschreitet die der an akutem Myokardinfarkt Verstorbenen⁵. Septische Patienten haben eine erhöhte Gesamtliegedauer in Krankenhäusern mit einer mittleren Verweildauer auf Intensivstationen von zwei bis drei Wochen. Die durch Sepsis verursachten Kosten für das Gesundheitswesen sind erheblich; so lagen sie z. B. für das US-amerikanische Gesundheitssystem bei etwa 16,7 Milliarden USD pro Jahr^{2,5}.

Über mehrere Jahrzehnte hinweg verstand man die Sepsis als systemische Antwort auf eine Infektion. Sie wurde mit dem Vorhandensein von Bakterien im Blut (Bakteriämie) assoziiert und die Begriffe „Sepsis“ und „Septikämie“ wurden im klinischen Alltag synonym verwendet. Im Jahr 1989 publizierten Bone et al. eine einfache Definition der Sepsis, die auf spezifischen klinischen Symptomen und einem nachweislichen Infektfokus beruht (Abb. 1.1)⁶.

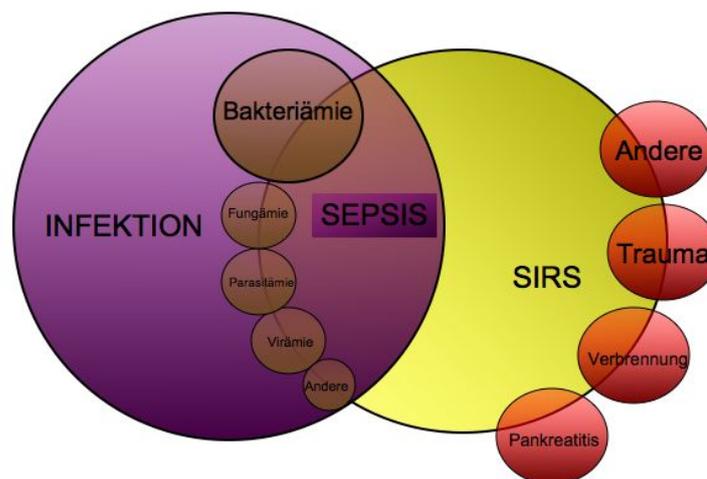


Abbildung 1.1: Der Zusammenhang zwischen dem systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS), Sepsis und Infektion (aus Bone et al. 1992)⁷

Die klinischen Symptome der Sepsis zeigen sich jedoch auch bei Patienten ohne Bakteriämie. Diese Diskrepanz wurde in der ersten Konsensuskonferenz der Society of Critical Care Medicine

und des American College of Chest Physicians (1992) im Begriff „SIRS“ berücksichtigt, der somit ohne den quantifizierbaren Nachweis von bakterieller Infektion auskommt⁷. Eine systemische inflammatorische Reaktion liegt vor, wenn zwei oder mehr der vier SIRS-Kriterien zutreffend sind. In den darauf folgenden Konferenzen wurde die Definition der Sepsis weiterentwickelt^{8,9}. Ihre Kriterien sind in den Tabellen 1.1 und 1.2 ersichtlich.

<i>Kriterium</i>	<i>Interpretation</i>
Körper(kern)temperatur	Fieber $\geq 38\text{ °C}$ oder Hypothermie $\leq 36\text{ °C}$
Tachykardie	Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$, bei Patienten unter Betablockertherapie auch $\leq 90/\text{min}$
Tachypnoe	Atemfrequenz ≥ 20 Atemzüge/min oder $\text{paCO}_2 \leq 33\text{ mmHg}$, maschinelle Beatmung erfüllt das Kriterium ebenfalls
Leukozytenzahl	Leukozytose $\geq 12\text{ Gpt/l}$ oder Leukopenie $\leq 4\text{ Gpt/l}$ oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differenzialblutbild

Tabelle 1.1: Die SIRS-Kriterien

Kriterien der systemischen inflammatorischen Antwortreaktion (systemisches inflammatorisches Response-Syndrom = SIRS). Eine systemische inflammatorische Reaktion liegt vor, wenn ≥ 2 der 4 SIRS-Kriterien zutreffend sind⁹.

Die SIRS-Kriterien als Ausdruck der Inflammation enthalten neben den rasch reagierenden klinischen Parametern, wie Tachypnoe und Tachykardie, die weniger schnell auftretenden klinischen Parameter Temperatur und den Laborparameter der Leukozytenanzahl.

<i>Schweregrad</i>	<i>Befunde</i>
Sepsis	≥ 2 von 4 SIRS-Kriterien + Infektion
Schwere Sepsis	Sepsis + ≥ 1 Organdysfunktion
Septischer Schock	schwere Sepsis + Katecholaminpflicht bei ausreichender Volumenzufuhr

Tabelle 1.2: Klinische Schweregrade der Sepsis

Die meisten deutschen Kliniken nutzen das C-reaktive Protein (CRP), das das Produkt der durch Zytokine stimulierten Hepatozyten ist, als Parameter für den Schweregrad der Entzündung¹⁰. Somit gehört es in die Gruppe der Akut-Phase-Proteine, die als Indikatoren der Ausprägung der

Inflammation sowie des Zellschadens gewertet werden können^{11, 12}. Die exakte Pathophysiologie von CRP im Entzündungsprozess bedarf noch weiterer Abklärung. Sie umfasst die Bindung an Liganden, wie Polysacchariden auf Bakterienoberflächen oder nekrotischem Gewebe, eine Aktivierung von Leukozyten und des Komplementsystems¹³.

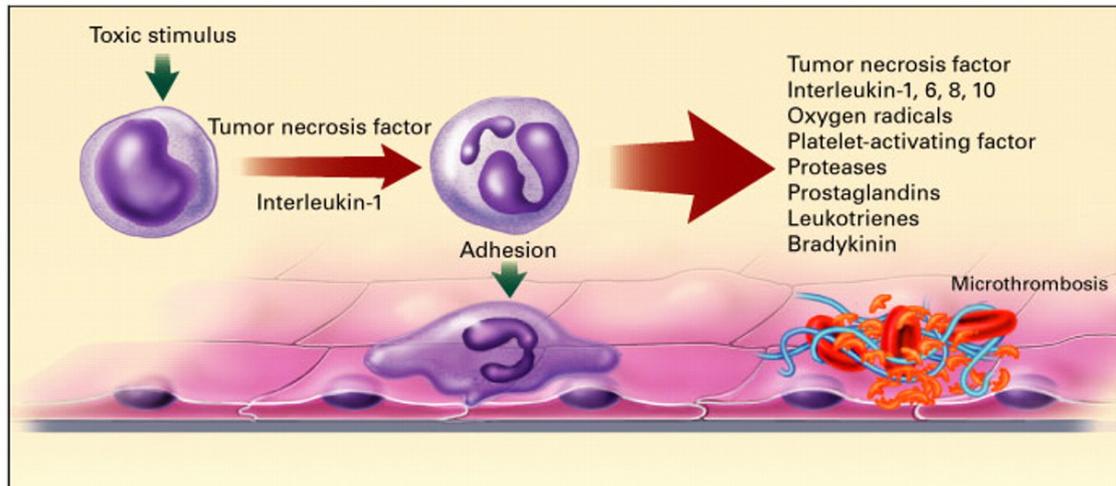


Abbildung 1.2: Ablauf der Lymphozytenstimulation

Ein initialer toxischer Stimulus (z. B. Endotoxin) induziert die Produktion proinflammatorischer Zytokine. Diese Zytokine ermöglichen die Adhäsion der Neutrophilen am Endothel, die Aktivierung der Blutplättchen sowie weiterer multipler sekundärer Inflamationsmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene, Proteasen etc.) (aus Wheeler u. Bernard 1999)¹⁴.

Bakterien werden in gramnegative oder grampositive Spezies unterschieden. Jede Art besitzt unterschiedliche Membranmoleküle, die zur Aktivierung des Immunsystems führen. Diese speziellen Strukturen, sogenannte PAMP (pathogen-associated molecular patterns)¹⁵, beinhalten eine große Vielfalt und fungieren u.a. als Aktivatoren des Immunsystems. Ihr potentester Vertreter ist das Lipopolysaccharidmolekül (LPS); es ist in allen gramnegativen Bakterien lokalisiert und dient als Stabilisator ihrer äußeren Zellmembran. Die Aktivierung des Abwehrsystems erfolgt nach Interaktion der PAMP mit den Toll-like-Rezeptoren (TLR)¹⁶. TLR sind transmembranöse Proteine auf der Zelloberfläche von Abwehrzellen. Aktuell sind mehr als 10 verschiedene Rezeptoren aus der Familie der TLR bekannt. TLR-4 und TLR-2 spielen eine bedeutende Rolle in der Sepsis: TLR-4 ist der Rezeptor für das Lipopolysaccharid (LPS) und TLR-2 bindet Lipoproteine, Lipopeptide und Peptidoglykane grampositiver Bakterien¹⁷. LPS bindet an das extrazelluläre LPS-binding Protein (LBP) und wird von CD14, das auf einem Zelloberflächenmolekül auf Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen exprimiert wird,

gebunden. Diese Bindung führt über mehrere Kaskaden zur Freisetzung von Transkriptionsfaktoren, die die Transkription von Genen der Immunantwort und somit u. a. die Produktion von Zytokinen regulieren¹⁸.

Im Rahmen der Inflammationsreaktion steht die Aktivierung und Regulation des Monozyten-/Makrophagensystems im Vordergrund, die über die Freisetzung von Zytokinen, wie IL-1, IL-6 und TNF- α , die proinflammatorische Antwort des Immunsystems auslösen (Abb. 1.2)¹⁹. Essenziell ist hierbei die Steuerung der Entzündungsreaktion durch gleichzeitige Produktion der antiinflammatorischen sowie proinflammatorischen Zytokine (Tab. 1.3).

antiinflammatorische Zytokine	IL-10, TGF- β , IL-1Ra, sTNFR-I/-II, IL-1RII
proinflammatorische Zytokine	TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, LIF

Tabelle 1.3: Übersicht der Zytokine: Immunregulation durch die Produktion von antiinflammatorischen und proinflammatorischen Zytokinen.

Das Zytokin Interleukin-1 β ist ein Bestandteil der Interleukin-1-Familie. Es wird primär von Monozyten synthetisiert. IL-1 β ist ein hochwirksames Zytokin: Wenige Nanogramm reichen aus, um Fieber, einen Anstieg der Zahl der neutrophilen Granulozyten, der Thrombozyten oder der Akute-Phase-Proteine zu induzieren²⁰. Des Weiteren führt es zur Interleukin-6-Freisetzung. IL-6 bewirkt eine vermehrte Synthese von Akute-Phase-Proteinen in den Hepatozyten. Pro- und antiinflammatorische Effekte dieses Zytokins werden evaluiert. Sezerniert wird IL-6 von Monozyten und Makrophagen, aber auch von Epithel- und Endothelzellen. IL-6 ist ein Schlüsselzytokin in der Sepsis.

Die Folgen des Erliegens der Regel- und Kompensationsmechanismen der inflammatorischen Reaktion sind Immunparalyse, Multiorganversagen und Tod. Dieser Vorgang hängt von einer Reihe von Faktoren ab, wie Ausmaß der Schädigung, genetische Prädisposition sowie Immunstatus. Die Immunparalyse wird definiert als „generelle Insuffizienz der zellvermittelten T-Lymphozyten-abhängigen Immunantwort“²¹. Sie ist erkennbar an einer Deaktivierung der Monozyten, die eine verminderte HLA-Expression aufweisen. HLA-DR dient als Aktivierungs- und Maturationsmarker professioneller antigenpräsentierender Zellen. Ein Abfall der HLA-DR-Expression unterhalb 80 % des Normbereichs kennzeichnet eine Immunparalyse. Die Arbeitsgruppe um Volk et al. definiert bereits eine Unterschreitung von 30 % unterhalb des Normbereichs als ausreichend²². Die Makrophagen befinden sich an der Schaltstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität. Somit kommt diesen Zellen eine entscheidende Rolle

zu, da im Zusammenhang der Immunparalyse über eine reduzierte HLA-DR-Expression keine Aktivierung des adaptiven Immunsystems erfolgen kann²²⁻²⁵.

1.2 Hyperglykämie als Risikofaktor bei intensivpflichtigen und septischen Patienten

Bereits 1878 beschrieb Claude Bernard erstmalig in seinem Werk „Leçons sur les phénomènes de la vie communes aux animaux et aux végétaux“ das Vorkommen von Hyperglykämien während eines klinischen Schocks, in diesem Fall während des hämorrhagischen Schocks (Volume 1, J. B. Baillière et Fils. Paris, France, 564 pp.). Die Hyperglykämie ist ein sehr häufig gesehenes Phänomen bei intensivtherapiepflichtigen Patienten und wird mittlerweile u. a. einer Freisetzung von Stresshormonen, einer peripheren Insulinresistenz und einigen Medikamentenwirkungen und -Nebenwirkungen zugeschrieben. Sie ist ein unabhängiger Risikofaktor und sogar ein Prädiktor der Morbidität und Mortalität in dieser Patientenpopulation²⁶⁻³⁰.

Im Vergleich zu bekannten diabetischen und normoglykämischen Patienten führt das akute Auftreten von Hyperglykämien im Krankenhaus zu einem schlechteren klinischen Verlauf und einer erhöhten Mortalität²⁸. Bei Patienten mit schwerster Hirnschädigung besteht unter hyperglykämischen Bedingungen ein Zusammenhang zwischen einem längeren Krankenhausaufenthalt, einem schlechteren neurologischen Ergebnis, einem erhöhten intrakraniellen Druck und einer insgesamt reduzierten Überlebensrate³¹⁻³³.

In einer prospektiven, randomisierten Studie mit insgesamt 1.548 erwachsenen Patienten einer chirurgischen Intensivstation zeigten van den Berghe et al. (2001)²⁹, dass die intensivte Insulintherapie (IIT) mit Zielblutzuckerwerten zwischen 80 und 110 mg/dl im Vergleich zur konventionellen Insulintherapie mit Zielblutzuckerwerten zwischen 180 und 200 mg/dl die Mortalität während des Aufenthalts auf der Intensivstation von 8 % auf 4,6 % sowie bei einer Verweildauer von mehr als fünf Tagen auf der Intensivstation von 20,2 % auf 10,6 % senkte. Die größte Reduktion der Mortalität erzielte die Kohorte der Patienten mit Multiorganversagen und nachgewiesenem septischem Fokus. Zusammenfassend zeigte die Studie von van den Berghe et al.²⁵ in der untersuchten Patientenpopulation, dass

- die intensivte Insulintherapie Blutinfektionen (mit Nachweis positiver Blutkulturen) um 46 %,

- das Vorkommen von akutem Nierenversagen mit konsekutivem Nierenersatzverfahren um 41 %,
- die Notwendigkeit von Bluttransfusionen um 50 %,
- die Critically-Illness-Polyneuropathie um 44 % und somit
- die Krankenhausmortalität um 34 %

senken konnte.

In einer weiteren Studie derselben Arbeitsgruppe³⁴ (2006) mit insgesamt 1.200 Patienten erhielten 605 Patienten die konventionelle Insulintherapie und 595 Patienten die intensivierete Insulintherapie. Hier konnte die Mortalität der Patienten mittels der IIT nicht signifikant verringert werden (40 % in der konventionellen Therapie vs. 37,3 % in der IIT, $p = 0,33$). Jedoch verminderte sich die Morbidität der Patienten, u. a. durch Prävention des akuten Nierenversagens, Verkürzung der Langzeitbeatmung und schnellere Entlassung von der Intensivstation.

Diese Effekte konnten durch eine weitere Studie dieser Arbeitsgruppe mit Patienten einer internistischen Intensivstation über die intensivierete Insulintherapie mit Zielblutzuckerwerten von 80–110 mg/dl vs. konventionelle Insulintherapie mit Zielblutzuckerwerten von 180–200 mg/dl reproduziert werden³⁴.

Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Risikokonstellation der Krankenhausmortalität führten Hansen et al. (2003)³⁵ durch. Hansen et al. quantifizierten die Ausprägung der Inflammation durch die Messung von CRP im Serum von intensivtherapiepflichtigen Patienten. Ihre Studie weist eine deutliche Reduktion des CRP-Serumspiegels unter der IIT im Vergleich zur konventionellen Insulintherapie nach; dabei wird das verbesserte Patientenüberleben einer Reduktion der Bildung von Akut-Phase-Proteinen unter der IIT zugeschrieben.

Zusammenfassend zeigt sich somit bei intensivtherapiepflichtigen Patienten durch die intensivierete Insulintherapie (IIT) eine Verbesserung des klinischen Verlaufs und der Überlebenszeit. Die genauen Pathomechanismen der schädigenden Auswirkungen von erhöhten Blutzuckerwerten im Vergleich zu den positiven Effekten der intensivierten Insulintherapie sind noch nicht hinreichend geklärt. Eine mögliche Erklärung beruht jedoch auf Alterationen der Inflammation und der Immunantwort³⁶, z. B. durch Induktion oder Suppression von pro- oder antiinflammatorischen Zytokinen, Produktion von Akut-Phase-Proteinen, Freisetzung sekundärer Immunmediatoren oder Veränderungen der Neutrophilenfunktion.

1.3 Zytokinfreisetzung unter hyperglykämischen Bedingungen

Die bereits erwähnte Studie von van den Berghe et al. (2001)²⁹ mit 1.548 beatmungspflichtigen Patienten von chirurgischen Intensivstationen weist eine signifikante Senkung der Mortalität und Morbidität unter intensivierter Insulintherapie (IIT) nach. Hierbei wurden jedoch keine Messungen von Entzündungsmediatoren, z. B. des CRP, durchgeführt.

Ohne Marker für die Entzündungsaktivität zu bestimmen, ging die Arbeitsgruppe um Wasmuth et al.³⁰ von einem Zusammenhang zwischen der Zytokinfreisetzung und der Glukose-Serumkonzentration der Patienten aus. Ihre Untersuchung ergab bei 75 intensivtherapiepflichtigen Patienten, dass hyperglykämische Bedingungen zu einer Erhöhung der Zytokinkonzentration von IL-6 führten. Ähnliches zeigte sich im Serum gesunder Probanden. Hyperglykämische Bedingungen erhöhten den Plasmaspiegel von Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)^{37, 38}. Die Zugabe von Insulin, um normoglykämische Blutzuckereinstellungen einzuhalten, beeinflusste die Zytokinfreisetzung nicht.

Weitere experimentelle *in vivo*- und *in vitro*-Studien untersuchten den Einfluss von Glukose, Insulin und anderen hyperosmolaren Substanzen auf die Zytokinproduktion durch das Monozyten-/Makrophagensystem. Der Einfluss der Hyperglykämie (HG) auf die Zytokinfreisetzung ist aus der Studienübersicht in Tabelle 1.4 und der Einfluss der hyperosmolaren Bedingungen aus der Studienübersicht in Tabelle 1.5 ersichtlich.

Modell	Studie	Studienmodell	Parameter	Ergebnis
<i>In vitro</i>	Igarashi et al. ³⁹	Rat SMC-Zelllinie	p38	HG führt zur Erhöhung von p38
	Shanmugam et al. ⁴⁰	THP-1-Zelllinie	TNF- α , IL-1b, p38, NF- κ B	HG erhöht die Zytokinkonzentration
	Devaraj et al. ⁴¹	THP-1-Zelllinie	IL-6, p38	HG, nicht aber Mannitol erhöht die Zytokinkonzentration und induziert p38
	Morohoshi et al. ⁴²	humane PBMC	IL-6, TNF	HG erhöht die IL-6-Konzentration
	Dasu et al. ⁴³	THP-1-Zelllinie	IL-1, p38, NADPH-Oxidase, NF- κ B, ERK 1/2	HG erhöht die Zytokinkonzentration
	Wen et al. ⁴⁴	Maus-Makrophagen	IL-1, -6, -12, TNF- α , p38	HG, nicht aber Mannitol erhöht die Zytokinkonzentration und p38-Expression
	Ling et al. ⁴⁵	Rattenmodell	IL-1 β , TNF- α	HG erhöht die Zytokinkonzentration
	Vanhorebeek et al. ⁴⁶	Hasenmodell	–	HG führt zu mitochondrialem Schaden
<i>In vivo</i>	Krogh-Madsen et al. ³⁷	humane Zellen	IL-6, TNF- α	HG erhöht die Zytokinkonzentration
	Esposito et al. ³⁸	humane Zellen	IL-6, TNF- α	HG erhöht die Zytokinkonzentration

Tabelle 1.4: *In vivo*- und *in vitro*- Studienübersicht von Zelllinien und Tiermodellen unter hyperglykämischen Bedingungen

Studie	Studiensetup	Parameter	Ergebnis
Shapiro u. Dinarello ⁴⁷	humane PBMC	IL-1, IL-8	NaCl-Lösungen erhöht die Zytokinkonzentration
Németh et al. ⁴⁸	humane intestinale Epithelzellen	IL-8, NF-κB	hypertone NaCl- und Mannitol-Lösungen führen zu einer Erhöhung von IL-8, NF-κB
Zhang et al. ⁴⁹	gastrische Epithelzellen von Mäusen	IL-1β	hypertone NaCl-Lösung führt zu einer Erhöhung von IL-1β

Tabelle 1.5: *In vivo*- und *in vitro*- Studienübersicht von Zelllinien und Tiermodellen unter hyperglykämischen, hyperosmolaren und normoglykämischen Bedingungen

In THP-1-Zellen (humane monozytische leukämische Zelllinie) führte die Steigerung der Glukosekonzentration im Zellkulturmedium zu einer Erhöhung der Zytokinexpression von TNF- α und zur Produktion von NF- κ B *in vitro*⁴⁰. In einem ähnlichen THP-1-Zellmodell ergab die Zugabe von Glukose, jedoch nicht von Mannitol, eine Erhöhung der Zytokinexpression von IL-6. Dasu et al.⁴³ wiesen in ihrer Studie mit THP-1-Zellen nach, dass die Zugabe von Glukose in erhöhten Konzentrationen (15 mmol/l und 25 mmol/l) eine dosisabhängige Induktion von IL-1 erreicht. Diese Studie vertiefte die möglichen zugrunde liegenden Regulationsmechanismen für die Expression der Proteinkinase-C, der MAP-Kinasen p38, ERK 1/2, NF- κ B und NADPH-Oxidase⁴⁴.

Tiermodelle bestätigten die bereits festgestellten begünstigenden Effekte der Glukoseeinstellungen, indem die strikte Glukosekontrolle und -einstellung die angeborene Immunfunktion verbesserte und damit Morbidität und Mortalität senkte. Eine engmaschige Glukosekontrolle und -einstellung mittels Insulin im Hasenmodell zeigte eine Verbesserung der angeborenen Immunfunktion, insbesondere eine Erhöhung der phagozytotischen Aktivität und somit die Verhinderung einer möglichen Exazerbation der Inflammation⁵⁰. Nach der Endoxin-Injektion bei Schweinen führte die Behandlung mit Insulin zu einer Reduktion des Zytokingehalts von TNF- α in diversen Organen (z. B. Myokard) und somit zu einer antiinflammatorischen Wirkung^{50, 51}. Bei Mäusen resultierte unter hyperglykämischen Bedingungen eine Erhöhung der mRNA-Expression der Zytokine IL-1, -6, -12 und TNF- α . Dabei führte die Nutzung von Mannitol zu keiner Steigerung der Zytokinsynthese⁴⁴. Bei Ratten verursachten hyperglykämische Bedingungen eine erhöhte Produktion von TNF- α und IL-1 β ⁴⁵.

Die Applikation von Verbrennungswunden bei Hasen simulierte ein Krankheitsbild intensivpflichtiger Patienten. Die Hyperglykämie verursachte in diesem Versuchsmodell erhöhte Plasmakreatininspiegel und morphologische Veränderungen an der Niere. Die Kontrollgruppe hingegen zeigte unter normoglykämischen Bedingungen eine geringere Ausprägung der Schädigung als Hasen unter hyperglykämischen Bedingungen. Eine erhöhte Insulinkonzentration schien hierbei jedoch nicht protektiv zu sein⁴⁶.

In weiteren experimentellen Untersuchungen führten nicht nur Bedingungen unter erhöhten Glukosekonzentrationen zu einem nachweislichen Anstieg der Zytokinproduktion, sondern auch die Zugabe von hypertonen Medien bzw. die Steigerung der Osmolarität (*per se*)^{47, 52}. Shapiro und Dinarello zeigten eine Verstärkung der Synthese von IL-1 und IL-8 durch humane PBMC unter hyperosmolaren Bedingungen mit einer maximalen Osmolarität von 375 mOsmol, erzielt durch die Zugabe unterschiedlich molarer NaCl-Lösungen⁴⁷. Eine weitere Studie wies durch die Beimischung von hypertoner NaCl-, Mannitol- und Saccharoselösung zu humanen intestinalen Epithelzellen eine Erhöhung der IL-8-Konzentration sowie des Transkriptionsfaktors NF- κ B nach⁴⁸. In einem Tiermodell mit gastrischen Epithelzellen von Mäusen wurde eine Erhöhung der IL-1 β -Konzentration nach Zugabe einer hypertonen NaCl-Lösung bestätigt⁴⁹. Diese Versuche belegen, dass nicht nur eine Steigerung der Glukosekonzentration, sondern auch hyperosmolare Substanzen über eine Veränderung der Osmolarität zu einer Alteration der Zytokinproduktion und somit einer Beeinträchtigung der Immunfunktion führen können.

1.4 Hyperglykämie und Phagozytose

Im Vordergrund der Infektabwehr steht jedoch nicht nur die durch Zytokine vermittelte Entzündungsreaktion. Neutrophile Granulozyten sind kleine, 12 μ m große Mikroorganismen, deren Funktion folgende Schritte beinhaltet: Adhäsion am Endothel, Chemotaxis, Phagozytose und Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species = ROS). Die Phagozytose löst eine Zunahme der ROS-Produktion aus. Dies wird auch als oxidativen Burst bezeichnet. Dieser ist gekennzeichnet durch einen erhöhten Sauerstoffkonsum, Glykogenolyse und Glukoseoxidation über den oxidativen Pentosephosphatweg. Hieraus erfolgt die Gewinnung von NADPH für die Produktion von ROS. Essenziell ist eine Aktivierung der phagozytären NADPH-Oxidase, bestehend aus den membranständigen Untereinheiten gp91^{PHOX} und p22^{PHOX} sowie den zytosolischen Untereinheiten p67^{PHOX}, p47^{PHOX}, p40^{PHOX} und Rac1 bzw. Rac2^{53, 54}. Stimuliert wird sie u. a. durch LPS, Lipoproteine oder Zytokine.

Ein Schlüsselenzym des Pentosephosphatwegs ist die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase⁵⁵. Diese ist beteiligt an der Produktion von NADPH. Hohe Konzentrationen an Glukose inhibieren die Funktion der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) mit folglich Reduktion der intrazellulären Konzentration an NADPH^{56, 57}. Hieraus resultiert eine weitere schädliche Auswirkung der hyperglykämischen Stoffwechsellage, da u.a. humane Zellen auf ein adäquates Angebot an NADPH als primären intrazellulären Reduktor des antioxidativen Systems angewiesen sind. Eine Reduktion der G6PD hat somit eine Abnahme von NADPH, eine Erniedrigung der Redoxreaktion mit gleichzeitiger Erhöhung des oxidativen Stresses und vermehrten Zelluntergang zur Folge⁵⁸.

Eine Korrektur des hyperglykämischen Milieus führt zu einer Steigerung der Neutrophilenfunktion und somit zu einer Verbesserung der Phagozytose⁵⁹.

Feijorová et al. untersuchten den respiratorischen Burst und die Phagozytose an gesunden Probanden unter den Auswirkungen der Hyperglykämie und Hyperinsulinämie⁶⁰. Hierbei ließen sich keine Veränderungen der Immunabwehr nachweisen. Im Gegensatz hierzu stehen die Studien von Nielson und Hindson⁶¹, Cendoroglo et al.⁶² und Liberek et al.⁶³, die Veränderungen der phagozytotischen Aktivität sowie des respiratorischen Bursts nach Glukoseexposition nachweisen konnten. Nielson und Hindson bewiesen bei erhöhten extrazellulären Glukosekonzentrationen (L- sowie D-Glukose) eine Abnahme der Superoxid-(O₂⁻)-Freisetzung und somit eine Abnahme der Phagozytose⁶¹. Als mögliche Ursache für diese Beobachtungen konnte die Arbeitsgruppe um Perner et al. anhand frisch isolierten humanen Neutrophilen eine Reduktion der Superoxid-(O₂⁻)-Produktion durch hohe Konzentrationen an extrazellulärer Glukose (5, 10 oder 25 mmol) und durch die Inhibition der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase nachweisen. Eine Inkubation der Neutrophilen mit einem extrazellulären Zusatz aus Mannitol zeigte in dieser Untersuchung keine Auswirkung auf die Reduktion der Superoxid-(O₂⁻)-Produktion⁶⁴. Zhang et al. untersuchten Patienten mit Typ-II-Diabetes mellitus und wiesen hierbei eine Hemmung der G6PD durch die hohen Glukosekonzentrationen mit konsekutiven Zelluntergang sowie eine Erhöhung der ROS-Produktion nach⁶⁵. Besonders bedeutsam war hierbei eine Steigerung der ROS-Freisetzung unter erhöhten extrazellulären Blutzuckerwerten⁶⁵.

In den Arbeiten von Walrand et al. zeigten sich hierzu unterschiedliche Ergebnisse. Bei humanen Probanden ergab die Insulingabe zur Erhaltung der Normoglykämie eine Aktivitätssteigerung der humanen polymorphonukleären Zellen^{67, 68}.

Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Auswirkung einer Veränderung der ROS-Produktion im Sinne des oxidativen Bursts sowie eine Änderung der Phagozytose hervorgerufen durch hyperglykämische Bedingungen ließen im klinischen Alltag eine zentrale Bedeutung in der Pathologie des Diabetes mellitus, des arteriellen Hochdrucks, der Arteriosklerose sowie der chronischen Niereninsuffizienz erkennen⁶⁹.

1.5 Hypothese

Hyperglykämie führt über eine Alteration der Immunantwort zur Erhöhung der Morbidität und Mortalität aufgrund einer gesteigerten Prädisposition für Infektionen.

1.6 Ziele und Fragestellungen

Die genauen molekularen Mechanismen der Hyperglykämie, Hyperosmolarität und der Therapie mit Insulin sind noch nicht vollständig geklärt. Multipel interagierende Systeme erschweren häufig die Untersuchung von Pathomechanismen *in vivo*. Insbesondere die protektiven Effekte der Insulintherapie könnten aufgrund der Wirkung des Insulins sowohl als endokriner Effekt oder als direkte Folge der Insulinwirkung im Rahmen der Glukosemetabolisierung oder aber auch der damit verbundenen Senkung der Osmolarität auftreten. Die bereits erwähnten schädlichen Auswirkungen von erhöhten Blutzuckerwerten sind nicht hinreichend geklärt, beruhen jedoch überwiegend auf Veränderungen der Inflammation und Immunantwort, z. B. durch Induktion oder Suppression von pro- oder antiinflammatorischen Zytokinen, Produktion von Akut-Phase-Proteinen, Freisetzung sekundärer Immunmediatoren und Veränderungen der Neutrophilenfunktion sowie der Phagozytoseaktivität.

Zum weiteren Verständnis dieser Mechanismen soll die Auswirkung von Glukose und Insulin sowie die Veränderung der Osmolarität durch Mannitol und Harnstoff (Urea) auf die Zytokinproduktion sowie Phagozytose *in vitro* mit folgenden Fragestellungen untersucht werden:

1. Führt eine Erhöhung der Glukosekonzentration zu einem dosisabhängigen Anstieg der Zytokinproduktion und welche Pathomechanismen liegen der Zytokinproduktion von IL-1 β und IL-6 *in vitro* zugrunde?
2. Hat Insulin antiinflammatorische Wirkungen durch Modifikation der Zytokinproduktion von IL-1 β und IL-6 *in vitro* und übt es somit einen protektiven Effekt auf die Reaktion der Inflammations aus?

3. Wirken hyperosmolare Substanzen wie Mannitol und Harnstoff auch wie Glukose und welche Auswirkungen haben sie auf die Zytokinproduktion von IL-1 β und IL-6 *in vitro*?
4. Welche Auswirkungen haben erhöhte Glukose- und Mannitolkonzentrationen auf den oxidativen Burst und die Phagozytose humaner Granulozyten *in vitro*?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad pro analysi verwendet.

Acetonitril	(J.T. Baker B.V., Deventer, Holland)
Ammoniumacetat	(SIGMA [®] , Steinheim, Deutschland)
Casein	(C-7078, SIGMA [®] , St. Louis, MO, USA)
CSPD [®]	(Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland/Warenzeichen der Firma Tropix Inc., Bedford, MA, USA)
E. Coli 055B5-LPS	(SIGMA [®] , Steinheim, Deutschland)
EDTA	(SIGMA [®] , Steinheim, Deutschland)
Ethanol 96 %	(Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland)
Ficoll Typ 400	(SIGMA [®] , Steinheim, Deutschland)
Isotone NaCl 0,9 %	(B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
L-Glutamin	(Biochrom AG seromed [®] , Berlin, Deutschland)
LiCl	(SIGMA [®] , Steinheim, Deutschland)
Methanol	(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
MgCl ₂	(Gibco, Life Technologies, Paisley, Schottland)
Penicillin	(Biochrom AG seromed [®] , Berlin, Deutschland)
Polyoxyethylenesorbitan (Tween 20)	(SIGMA [®] , St. Louis, MO, USA)
RPMI-Medium 1640 (1x)	(PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich-SB 203580 in Solution (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Schwefelsäure	(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Sodium-Diatrizoat	(SIGMA [®] , Steinheim, Deutschland)
Streptavidin-Peroxidase-Komplex	(Amersham, Braunschweig, Deutschland)
Streptavidin-biotin loaded	
Horseradish-Peroxidase Komplex	
Streptomycin	(Biochrom AG seromed [®] , Berlin, Deutschland)

ultrafiltriertes Milipore-Wasser [®]	(hergestellt durch Benutzung von Polyfluxfiltern, um zytokininduzierte Substanzen zu entfernen)
Phagoburst [®]	(Orpegen Pharma, Heidelberg, Deutschland)
Oxidativer Burst [®]	(Orpegen Pharma, Heidelberg, Deutschland)
Glucosteril [®] 50 %	(Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland)
D-(+)-Glukose	(SIGMA [®] , Steinheim, Deutschland)
L-Glukose	(SIGMA [®] , Steinheim, Deutschland)
Insuman Rapid 40 I.E./ml	(Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland)
Heparin-Rotexmedica	(Rotexmedica GmbH, Trittau, Deutschland)
Mannitol	(SIGMA [®] , Steinheim, Deutschland)
Urea, 98 %	(SIGMA [®] , Steinheim, Deutschland)

2.1.2 Labormaterialien

ELISA-Platten	(Nunc-Immuno Module, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark)
Falcon [®] -Röhrchen (50 ml)	(Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA)
Falcon [®] -Röhrchen (14 ml)	(Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA)
Falcon [®] -Röhrchen (6 ml)	(Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA)
Gewebekulturfilter 0,45 µm, 250 ml	(Nalge Company, New York, NY, USA)
PARAFILM [®] „M“ Laboratory Film	(American CAN COMPANY, Greenwich, CT, USA)
Polyfluxfilter PF14S	(Gambro, Hechingen, Deutschland)
Polyfluxfilter F60S	(Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland)
Sep-Pak [®] Vac RC (500 mg) C18-Cartridges	(Waters Corporation, Milford, MA, USA)
Sep-Pak [®] Light C18-Cartridges	(Waters Corporation, Milford, MA, USA)
24-well-Platten	(Nunc, Roskilde, Dänemark)
12-well-Platten	(Nunc, Roskilde, Dänemark)

2.1.3 Puffer

Blotting Buffer (20 x SSC):

175,3 g/l Natriumchlorid (58,44 g/mol)	(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
--	--------------------------------------

88,2 g/l Natriumcitrat (SIGMA[®], Steinheim, Deutschland)
10 N NaOH zur pH Einstellung von 7,0

Coatingpuffer:

5,52 g/l Natriumkarbonat (105,99 g/mol) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
5,03 g/l Natriumhydrogenkarbonat (84,01 g/mol) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Detektionspuffer:

78,5 g/l Tris-HCl (157,6 g/mol) (SIGMA[®], Steinheim, Deutschland)
29 g/l Natriumchlorid (58,44 g/mol) (SIGMA[®], Steinheim, Deutschland)
4 N Kaliumhydroxid zur pH-Einstellung von 9,5

Gallati-Puffer:

42 g/l Zitronensäure-Monohydrat (210,14 g/mol) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
4 N Kaliumhydroxid (zur pH-Einstellung von 3,95) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Wasserstoffperoxid 30%(34µl/100 mlGallati-Lsg.) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Loading Buffer (Ansatz für 50 ml):

28,7 ml Glycerol 87 % (SIGMA[®], Steinheim, Deutschland)
0,25 g Bromphenolblau (SIGMA[®], Steinheim, Deutschland)
16,3 ml Aqua bidest.

PBS-Puffer:

2,1 g/l Kaliumhydrogenphosphat (174,18 g/mol) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
90 g/l Natriumchlorid (58,44 g/mol) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
7,26 g/l Natriumhydrogenphosphat (142 g/mol) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

PBS-Tween:

100µl Tween 20 auf 1Liter PBS-Puffer

TMB-Lösung:

240 mg Tetramethylbenzidin (Fuke, Buchs, Deutschland)
5 ml Dimethylsulfoxid (SIGMA[®], Steinheim, Deutschland)
5 ml Ethanol (100 %) (Herbeta, Arzneimittel, Berlin, Deutschland)

10 x Blocking Stock Solution:

100 g/l Blocking Stock (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

1.000 ml 1x Waschpuffer

10 x PCR-Buffer:

200 mM Tris-HCl (pH 8,4) (Gibco, Life Technologies, Paisley, Schottland)

500 mM KCl

10 x TBE:

108 g/l Tris-Base (SIGMA[®], Steinheim, Deutschland)

55 g/l Boric Acid (SIGMA[®], Steinheim, Deutschland)

9 g/l EDTA (SIGMA[®], Steinheim, Deutschland)

1 x Waschpuffer:

8,7 g/l Natriumchlorid (58,44 g/mol) (SIGMA[®], Steinheim, Deutschland)

11,6 g/l Maleinsäure (116,1 g/mol) (SIGMA[®], Steinheim, Deutschland)

4 N Kaliumhydroxid zur pH-Einstellung auf 7,5

2.1.4 Enzyme, Kits und Sonstiges

Antikörper IL-1 β für den ELISA:

1. Antikörper IL-1 β

(Endogen, Woburn, MA, USA)

(Anti-human IL-1 β Monoclonal, M-421B)

2. Antikörper IL-1 β

(Biotin-Labeld Anti-human IL-1 β Monoclonal, M-420 B-B)

Antikörper IL-6 für den ELISA:

1. Antikörper IL-6

(R&D, Minneapolis, MN, USA)

(Recombinant human IL-6, Monoclonal, rh IL-6)

2. Antikörper IL-6

(anti-r IL-6, detection antibody, BAF 206)

Interleukin Standards:

IL-1 β

(Human Recombinant IL-1 β , CLBm Amsterdam, Holland)

IL-6 (Recombinant Human, R&D, Minneapolis, USA)

Monoclonal Anti-human/mouse/Rat p38a Antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

Affinity-Purified Rabbit Anti-phospho-p38-MAPK (T180/Y182) Antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

2.2 Geräte

Elutionsgerät (VAC ELUTE SPS24, VARIAN[®] sample preparation products, Harbor City, CA)

Speed Vac (HETOVAC VR-1, Heto Lab, Equipment)

Kühlfalle (Centrivac, Recker Victor, Deutschland)

Pumpe (Recker Victor, Deutschland)

UV-Kamera (Biometra, biomed. Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland)

Fotoentwickler (Protec45-compact, Protec, Protec Gerätebau GmbH, Deutschland)

ELISA-Photometer (MR 5000, Dynatech, Denkendorf, Deutschland)

FACScan[™] (FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany)

Leica-DMRB-Mikroskop (Leica, Bensheim, Deutschland)

2.3 Methoden

2.3.1 Probanden

In diese Versuchsreihen wurden 4–12 gesunde Probanden (überwiegend Kommilitonen, Labor- und Krankenhauspersonal) einbezogen. Das Alter lag zwischen 24 und 46 Jahren. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren bei keinem der Spender gesundheitliche Bedenken, Autoimmun-, Infektions- oder sonstige Erkrankungen bekannt.

2.3.2 Zellpräparation

Zur Gewinnung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) für ELISA und für die Immunhistologie sowie von Vollblut für die FACSScan-Analyse wurde eine 20-ml-Spritze mit 25.000 IE Heparin benetzt und nach sorgfältiger Desinfektion Blut aseptisch aus der Vena cubitalis gewonnen. Die Weiterverarbeitung und Kultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen.

2.3.3 Separation von mononukleären Zellen (PBMC)

Die Separation von mononukleären Zellen aus Vollblut erfolgte über einen Dichtegradienten durch Zentrifugation. Als Dichtegradient diente das Trennmedium Ficoll.

Das den Probanden abgenommene Blut wurde zu je 10 ml in zwei sterile 50-ml-Falcon®-Röhrchen (Abb. 2.1) gefüllt und anschließend durch Zugabe von 35 ml steriler 0,9 %-Kochsalzlösung verdünnt, durchmischt und mit 12,5 ml Ficoll-Trennmedium unterschichtet.

Anschließend erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 25 °C und 1.400 U/min (rpm).

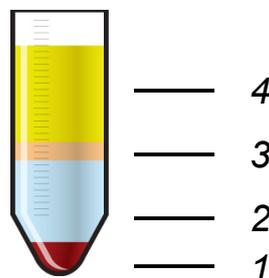


Abbildung 2.1: Separation mononukleärer Zellen nach Dichtegradientenzentrifugation.

Nach der Zentrifugation zeichneten sich vier Schichten in dem Falcon[®]-Röhrchen ab (Abb. 2.1):

1. ein Sediment aus Erythrozyten und Granulozyten,
2. eine 2 cm breite Ficollschicht,
3. ein Zellring aus Lymphozyten und Monozyten und
4. eine 4 cm breite Schicht aus Plasma und Thrombozyten.

Der mononukleäre Zellring (60–70 % Lymphozyten, 30–40 % Monozyten) wurde mittels einer Pipette vorsichtig entnommen und in ein weiteres, mit 30 ml serumfreiem RPMI-Medium gefülltes, steriles 50-ml-Falcon[®]-Röhrchen überführt. Daraufhin erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 25 °C und 2.000 U/min (rpm). Nach Verwerfen des Überstands wurde das Sediment aus PBMC mit 6 ml serumfreiem RPMI-Medium unter Zugabe von 100 U/ml Penicillin, 2 mmol/L L-Glutamin und 100 µg/ml Streptomycin resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl erfolgte die Entnahme von 50 µl der Zellsuspension. Dieses Aliquot wurde in 1%iger Essigsäure zur Darstellung der Zellkerne durch Auflösen der Zellstruktur resuspendiert. Die Zählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Daraufhin wurden die mononukleären Zellen im Medium für die PBMC-Kultur aufgenommen und auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Die separierten Zellen wurden mit den jeweiligen Proben im Verhältnis 1:1 (jeweils 500 µl) auf 12-Well-Platten aufgetragen und für drei Stunden in einem CO₂-Inkubator unter befeuchteter Atmosphäre, die 5 % CO₂ enthielt, bei 37 °C präinkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels 0,5 bzw. 1 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert und für weitere 24 Stunden unter identischen Bedingungen inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Lysieren der Zellen bei -80 °C im Gefrierschrank beendet. Die Zytokinfreisetzung konnte nun mittels ELISA quantifiziert werden.

2.3.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Als ELISA definiert man ein immunologisches Nachweisverfahren (Assay) zur quantitativen Proteinbestimmung, das auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Die Eigenschaft spezifischer Antikörper wird dabei genutzt, um eine Bindung an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) zu erzielen. Der Antikörper oder das Antigen sind durch ein Enzym gekennzeichnet. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion fungiert als Nachweis für das Antigen.

Ein für das gesuchte Protein spezifischer Antikörper wurde zuerst an eine Mikrotitrierplatte gebunden, die zu untersuchende Probe auf die Platte gegeben und inkubiert. Ein zweiter,

spezifisch gegen das Protein gerichteter, biotinylierter Antikörper wurde dazugegeben. Die Detektion erfolgte mittels entsprechender Farbreaktion durch Extinktionsmessung in einem Spektralphotometer zur Bestimmung der Menge des gesuchten Proteins.

Die Auswertung erfolgte anhand einer Standardkurve (x-Achse: natürlicher Logarithmus der Konzentration; y-Achse: Extinktion = OD = optische Dichte = Absorption), die durch eine Verdünnungsreihe des gesuchten Proteinstandards ermittelt wurde.

2.3.4.1 Durchführung des Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Der erste Schritt dieses Assays bestand in der Beschichtung einer 96-well-ELISA-Mikrotitrierplatte (Abb. 2.2) mit einem monoklonalen 1. Antikörper.

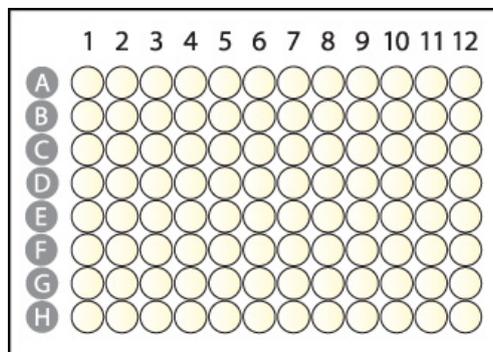


Abbildung 2.2: 96-well-ELISA-Mikrotitrierplatte.

Im konkreten Fall wurde der IL-1 β -Antikörper (R&D, Minneapolis, MN, USA) in einer Verdünnung in Coatingpuffer (s. u.) von 1:200 (50 μ l pro Napf) und der IL-6-Antikörper (R&D, Minneapolis, MN, USA) in der Verdünnung von 1:500 (100 μ l pro Napf) aufgetragen. Die beschichtete Platte wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und am nächsten Tag weiterverarbeitet (Tab. 2.1). Ein zweiter biotinylierter Antikörper wurde auf die Platte gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehreren Waschsritten wurde in jeden Napf 50 μ l Streptavidin-Peroxidase-Komplex gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Erneute Waschsritte folgten. Durch Hinzugabe von 150 μ l aus einem Gemisch aus Gallati-Puffer und TMB-Lösungen erfolgte die Farbreaktion. Eine Abstopfung der Reaktion gelang durch Addition von 50 μ l Schwefelsäure (4N) pro Napf. Die Extinktionsmessung im Photometer ergab die Bestimmung der Zytokine IL-1 β und IL-6.

A1 + A2	1. Standard 100 µl 50 µl davon ↓
B1 + B2	2. Standard + 50 µl PBS-Tween 50 µl davon ↓
C1 + C2	3. Standard + 50 µl PBS-Tween 50 µl davon ↓
D1 + D2	4. Standard + 50 µl PBS-Tween 50 µl davon ↓
E1 + E2	5. Standard + 50 µl PBS-Tween 50 µl davon ↓
F1 + F2	6. Standard + 50 µl PBS-Tween 50 µl davon ↓
G1 + G2	7. Standard + 50 µl PBS-Tween 50 µl davon ↓
H1 + H2	8. Standard + 50 µl PBS-Tween 50 µl davon verwerfen

Tabelle 2.1: Schema für das Auftragen des Standards

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Proben (s. o.) mittels ELISA für die Quantifizierung der Zytokine IL-1 β und IL-6 nach der Stimulation mit LPS durchgeführt:

1. Proben bestehend aus einem Gemisch von 500 ml PBMC und 500 ml Glukose in unterschiedlichen Konzentrationen (250, 500, 1.000 mg/dl)
2. Proben bestehend aus einem Gemisch von 500 ml PBMC und 500 ml Insulin in unterschiedlichen Konzentrationen (10, 100, 1.000 IE)
3. Proben bestehend aus einem Gemisch von 500 ml PBMC und 500 ml einer Kombinationslösung von Glukose und Insulin (1.000 mg/dl Glukose + 10 IE Insulin sowie 1.000 mg/dl Glukose + 100 IE Insulin)
4. Proben bestehend aus einem Gemisch von 500 ml PBMC und 500 ml D-Glukose (1.000 mg/dl) oder L-Glukose (1.000 mg/dl)

5. Proben bestehend aus einem Gemisch von 500 ml PBMC und 500 ml Mannitol (1.000 mg/dl)
6. Proben bestehend aus einem Gemisch von 500 ml PBMC und 500 ml Harnstoff (136, 327, 654 mg/dl)
7. Proben bestehend aus einem Gemisch von 500 ml PBMC und 500 ml Glukose (1.000 mg/dl) mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin
8. Proben bestehend aus einem Gemisch von 500 ml PBMC und 500 ml Glukose (1.000 mg/dl) mit dem p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB 203580
9. Proben bestehend aus einem Gemisch von 500 ml PBMC und 500 ml Glukose (1.000 mg/dl) mit dem Proteinkinase-C-beta-Inhibitor

Als Kontrollgruppe wurde in jeder Versuchsreihe eine Probe mit 500 ml PBMC und dem äquimolaren Anteil an RPMI-Medium ohne Zusatz sowie mit und ohne LPS-Stimulation untersucht.

2.3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (fluorescence activated cell sorting) genannt, dient der Analyse und Quantifizierung physikalischer und molekularer Eigenschaften, wenn fluoreszenzmarkierte Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einen gebündelten Laserstrahl passieren (Longobardi Givan, Flow Cytometry, 2001). Die Fluoreszenzmarkierung einer Zelle erfolgt über Fluorochrom-gekoppelte Antikörper, die an bestimmte Antigene der Zelle binden. Dabei beruht das Prinzip der Untersuchung auf der Emission von optischen Signalen seitens des verwendeten Fluorochroms.

In unseren Untersuchungen diente ein monochromatischer kohärenter Argon-Laser als Laserquelle. Aufgrund der Intensitätsminderung des Laserstrahls, ähnlich der Gauß'schen Normalverteilung (Verteilungskurvenprinzip) mit Abnahme der Intensität an den Rändern des Lichtstrahls, ist eine Fokussierung der Zellen in der Mitte des Laserstrahls für eine maximale Extinktion der Fluorochrome essenziell. Dies wird anhand einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung der Zellen erreicht.

Durch den monochromatischen Laserstrahl erfolgt eine Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes. Dieser wird hierdurch auf ein höheres Energieniveau gehoben. Unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) gelangt der Fluoreszenzfarbstoff auf sein Ursprungsniveau. Durchflusszytometer besitzen unterschiedliche Fluoreszenzkanäle (Fl-Channels), die das emittierte Signal mittels Detektoren, sogenannten Photomultipliern (PMT photomultiplier tubes),

messen und in elektrische Signale umwandeln. Das elektrische Signal ist proportional zum emittierten Lichtsignal. Durch eine lineare oder logarithmische Umwandlung wird dieses Signal graphisch dargestellt. Die emittierte Photonenzahl, die durch einen Photomultiplier registriert wird, verhält sich proportional zur Menge gebundener Antikörper pro Zelle und erlaubt somit z. B. eine Aussage über Expression von Oberflächenmolekülen.

Durch Lichtbeugung und -streuung erfolgt die Gewinnung zusätzlicher Informationen über die Zelle wie Zellgröße und Granularität: Das nach vorne gestreute Licht, auch Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter) genannt, ist ein Maß für die Beugung des Lichtes im flachen Winkel, bei 3–10° und bedingt durch das Volumen der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = sideways scatter), verstreut in einem 90°-Winkel vom Laserstrahl, ergibt eine Aussage über die Granularität der Zelle. Die Dosis des vorwärts gestreuten Lichtes entspricht der Größe der Zellen, das seitwärts gestreute Licht ihrer Komplexität. So verteilen Granulozyten, die eine „raue“ Oberfläche und in ihrem Inneren viele Vesikel haben, mehr Licht als die „glatten“ T-Zellen.

Bestimmte Zellarten haben eine typische FSC sowie SSC Konfiguration. Die Untersuchung der physikalischen und molekularen Eigenschaften der einzelnen Zellen erfolgt aus den einzelnen Streuungsdaten mittels FSC, SSC sowie der Emission.

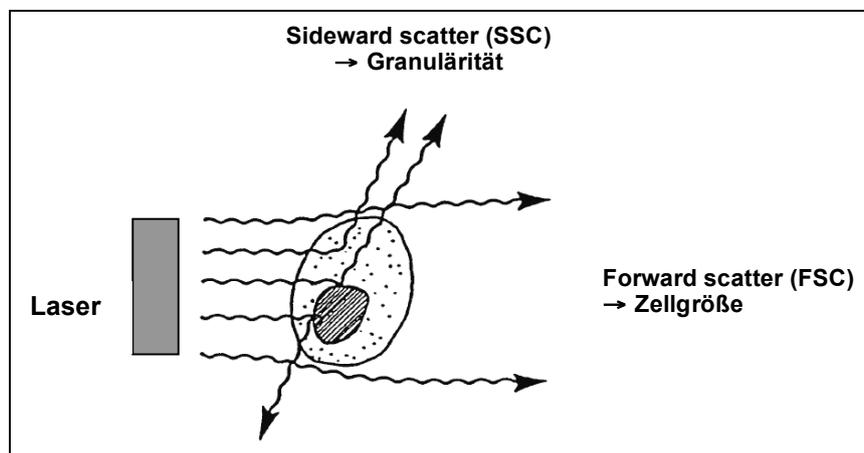


Abbildung 2.3: Durchflusszytometrie, Argon-Laser (aus BD LSRII Benutzerhandbuch 2003).

2.3.6 Phagozytose-Assay

Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen haben phagozytotische Eigenschaften. Die Phagozytose (aus dem Griechischen, *phagein* = essen) ist einer der bedeutsamsten Abwehrmechanismen des Körpers gegen mykotische und bakterielle Infektionen. Der Phagozytoseprozess wird in mehrere Abschnitte eingeteilt:

- Chemotaxis,
- Anlagerung von Partikeln an die Zelloberfläche der Phagozyten,
- Aufnahmephase (Phagozytose) und
- intrazelluläre Vernichtung durch sauerstoff(un)abhängige Reaktionen.

In Rahmen dieser Arbeit wurde eine quantitative Bestimmung der Leukozytenphagozytose (Aufnahme von Bakterien) durch die Durchflusszytometrie mittels des PHAGOTESTS® (ORPEGEN Pharma, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Des Weiteren konnte der prozentuale Anteil der Phagozyten, die Bakterien aufgenommen haben, bestimmt und deren Aktivität aufgrund der Anzahl der aufgenommenen Bakterien pro Zelle gemessen werden. Hierfür wurde heparinisiertes Vollblut mit FITC-markierten E.-coli-Bakterien bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von eiskalter „Quench“-Lösung wurde die Phagozytose unterbrochen. Zur Entfernung von Erythrozyten wurde die Probe in mehreren Waschschritten mit dafür vorgesehenen Waschlösungen gereinigt. Kurz vor der durchflusszytometrischen Messung erfolgte die Färbung der DNA mittels DNA-Färbelösung, die zusätzliche Aggregationsartefakte von Bakterien oder Zellen ausschließt. Ein Kontrollansatz verweilte während des gesamten Versuchsaufbaus bis kurz vor der durchflusszytometrischen Messung auf Eis.

Die FITC-markierten E.-coli-Bakterien wurden mit Antikörpern und Komplement opsoniert. Die Zellen des phagozytären Systems (Monozyten, neutrophile Granulozyten) besitzen Rezeptoren für eine Komplementkomponente (C 3b) und für den konstanten Teil des Immunglobulin-Moleküls (Fc) des Antikörpers, die eine Anheftung der Bakterien an die Zelle vermitteln. Durch Verwendung von opsonierten und nicht opsonierten Bakterien können gleichzeitig die Opsonierungsfähigkeit und Phagozytoserate bestimmt werden. So lässt sich ermitteln, ob ein Opsonierungs- oder Aufnahmedefekt Ursache für die verminderte Phagozytoseleistung ist. Kritische Faktoren waren in dieser Versuchsreihe der Grad der Opsonierung, die Temperatur, die Inkubationszeit und das Verhältnis von Bakterien zu Leukozyten.

2.3.6.1 Phagozytoseansatz im Detail

1. *Aliquotieren:* Heparinisiertes Vollblut wurde auf 5-ml-Probenröhrchen aliquotiert, bestehend aus 100 µl pro Ansatz. Die Blutproben wurden vor Zugabe der Bakterien 10 Minuten im Eiswasserbad inkubiert um eine Abkühlung auf 0 °C zu erzielen.
2. *Aktivierung:* Pro Ansatz erfolgte die Zugabe von 20 µl der vorgekühlten und gemischten FITC-markierten E.-coli-Bakterien zur Vollblutprobe.

3. *Inkubation*: Die Röhren mit Kontrollansätzen verweilten bis zu ihrer Messung auf Eis. Die Röhren mit den Testansätzen wurden 10 Minuten bei 37,0 °C im Wasserbad inkubiert.
4. *Abstoppen bzw. „Quenchen“*: Zum Ende der Inkubationszeit wurden alle Proben (gleichzeitig im Reagenzgestell) aus dem Wasserbad genommen und auf Eis gestellt. Zu jedem Ansatz wurden 100 µl eiskalte „Quench“-Lösung gegeben. Alle Proben wurden anschließend gut vermischt.
5. *Waschen*: Pro Probenansatz wurden danach 3 ml Waschlösung hinzugefügt und vermischt. Die Röhren wurden 5 Minuten bei 250 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand dekantiert. Im Anschluss erfolgte ein erneuter Waschschrift mit Zugabe von 3 ml Waschlösung zur Zellsuspension und die Zentrifugation über 5 Minuten bei 250 x g und 4 °C.
6. *Lyse und Fixierung*: Die Vollblutproben wurden bei Raumtemperatur durch Zugabe von je 2 ml Lysing-Lösung (bereits vorgewärmt auf Raumtemperatur) lysiert, fixiert, für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 Minuten, 250 x g, 4 °C). Der Überstand wurde erneut dekantiert.
7. *Waschen*: Proben wurden noch einmal mit je 3 ml Waschlösung gewaschen (5 Minuten, 250 x g, 4 °C).
8. *DNA-Färbung*: Nach Zugabe von je 200 µl DNA-Färbelösung erfolgte nach kurzem Mischen der Suspension eine 10-minütige Inkubation auf Eis in einem lichtgeschützten Wasserbad. Die Zellsuspension wurde innerhalb von 60 Minuten gemessen.

2.3.7 Oxidativer Burst

In Granulozyten wurde die Bildung von ROS durch nicht markierte opsonisierte E.-coli-Bakterien als partikulärer Stimulus, der Proteinkinase-C-Liganden Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) als „high stimulus“, das chemotaktische Peptid N-formyl-MetLeuPhe (fMLP) als physiologischer „low stimulus“ und Dihydrorhodamin (DHR) 123 als fluorogenes Substrat hervorgerufen.

Heparinisiertes Vollblut wurde mit den unterschiedlichen Stimuli bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle fungierte eine Probe ohne Stimulus. Granulozyten und Monozyten produzieren nach der Stimulation reaktive Sauerstoffmetabolite (Superoxid-Anionen, Wasserstoffperoxid). Die Bildung der reaktiven Sauerstoffradikale wurde durch Addition und Oxidation von DHR 123 beobachtet. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität korreliert mit der NADPH-Oxidase-Aktivität. Die Lysing-Lösung beendete die Reaktion und entfernte überschüssige Erythrozyten. Die Zugabe von Waschlösung und die anschließende DNA-Färbung diente dem Ausschluss von

Bakterien- oder Zellaggregationsartefakten. Anschließend erfolgte die Messung des Prozentsatzes oxidierender Zellen (Monozyten und Granulozyten) entsprechend der Umwandlungsfähigkeit von DHR 123 in die hydroxylierte Form R 123 mittels Durchflusszytometrie. Die Dehydroxy- und Hydroxy-Formen, des Rhodamin-Derivats als Zeichen der ROS-Bildung, emittieren unterschiedliche Emissionsspektren und können im FACS unterscheiden werden.

2.3.7.1 Messung des oxidativen Bursts im Einzelnen

1. *Aliquotieren*: Heparinisiertes Vollblut wurde in 5-ml-Probenröhrchen aliquotiert; 100 µl pro Ansatz. Proben wurden vor Zugabe der Stimulanzen ca. 10 Minuten im Eiswasserbad inkubiert, um auf 0 °C abzukühlen.
2. *Aktivierung*: Pro Ansatz wurden 20 µl der vorgekühlten und vermischten Bakterien zur Vollblutprobe hinzugefügt (Röhrchen #1). Als Negativkontrolle fungierte ein weiteres Röhrchen, in das statt der Bakterien 20 µl Waschlösung beigemischt wurde (Röhrchen #2). Die Zugabe von 20 µl fMLP-Arbeitslösung zur Vollblutprobe erfolgte in einem 3. Röhrchen („low control“, Röhrchen #3). In einem 4. Röhrchen wurden 20 µl PMA-Arbeitslösung zur Vollblutprobe hinzugefügt („high control“, Röhrchen #4). Alle Proben wurden für 10 Minuten bei 37 °C im lichtgeschützten Wasserbad inkubiert.
3. *Oxidation*: Nach der Inkubation wurden pro Probe 20 µl der Oxidationssubstratlösung beigemischt. Eine Messung der Proben erfolgte innerhalb von 60 Minuten.

2.3.8 Durchführung einer FACS-Analyse

Eine Analyse der Zellen erfolgt im Durchflusszytometer bei blaugrüner Lichtanregung.

In unserer Versuchsreihe wurden folgende Untersuchungen zur quantitativen Bestimmung der oxidativen Burst-Aktivität durchgeführt:

1. Vollblut wurde mittels 500 mg/dl Glukose und 500 mg/dl Mannitol inkubiert und mit PMA als „high stimulus“ stimuliert. Hierzu wurde die entsprechende Leukozytenpopulation (Monozyten bzw. Granulozyten) im Streulichtdiagramm (lin FSC gegen lin SSC) eingegrenzt und mit deren Grünfluoreszenz im FL-1-Histogramm analysiert.
2. Vollblut wurde mittels 500 mg/dl Glukose und 500 mg/dl Mannitol inkubiert und mit fMLP als „low stimulus“ stimuliert. Hierzu wurde die entsprechende Leukozytenpopulation (Monozyten bzw. Granulozyten) im Streulichtdiagramm (lin FSC gegen lin SSC) eingegrenzt und mit deren Grünfluoreszenz im FL-1-Histogramm analysiert.

3. Vollblut wurde mittels 500 mg/dl Glukose und 500 mg/dl Mannitol inkubiert und mit E. coli stimuliert. Hierzu wurde die entsprechende Leukozytenpopulation (Monozyten bzw. Granulozyten) im Streulichtdiagramm (lin FSC gegen lin SSC) eingegrenzt und mit deren Grünfluoreszenz im FL-1-Histogramm analysiert.

2.3.9 Immunohistochemie – Nachweis von p38

Die Immunhistochemie ermöglicht die Erkennung und Quantifizierung von Proteinen im Rahmen der Antigen-Antikörper-Reaktion durch die spezifische Affinität von Antikörpern zu Antigenen bzw. Epitopen. Der Antikörper ist an ein Detektionssystem gebunden, das den Nachweis des Antikörpers in der Probe ermöglicht. Als Primärantikörper wird der Antikörper bezeichnet, der gegen das zu untersuchende Epitop gerichtet ist, sich durch eine hohe Affinität und Spezifität auszeichnet und zu keiner Kreuzreaktionen führt.

In der direkten Immunhistochemie wird das zu untersuchende Antigen an einen spezifischen Antikörper gebunden, der mit einem Enzym oder Fluorophor, wie Rhodamin oder Fluorescein, konjugiert ist. Der konjugierte Antikörper bindet an das Antigen. Alle nicht gebundenen Antikörper werden in anschließenden Waschschrift abgewaschen. Durch Zusatz eines Substrats generiert das Enzym dort einen Farbstoff, wo die immunhistochemische Reaktion stattgefunden hat und die gesamte Reaktion wird sichtbar.

Die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) unterscheidet sich von der direkten Immunfluoreszenz, indem neben der Zugabe eines spezifischen Antikörpers (Primärantikörper) auf die zu untersuchenden Zellen im ersten Schritt, in einem weiteren Schritt ein zweiter Antikörper aufgetragen wird. Dieser Antikörper richtet sich gegen den ersten Antikörper und wird als Sekundärantikörper bezeichnet. Dieser ist mit einem Enzym verbunden, das zu einer Farbentstehung im Rahmen der Enzym-Substrat-Reaktion führt.

2.3.9.1 Durchführung der Immunohistochemie

Zur Gewinnung der einzelnen Proben wurden PBMC aus Vollblut isoliert. Präinkubiert wurden die Proben mit und ohne Glukose für drei Stunden bei 37 °C, anschließend mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen (0, 0,5 und 50 ng/ml) stimuliert und für weitere 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde ein Aliquot der Zellsuspension anhand einer Zytospin-Zentrifuge auf einen Objektträger übertragen und mit Formaldehyd fixiert.

Die Objektträger wurden mit 3-Aminopropyltriethoxysilane beschichtet. Zur Detektion der p38-MAP-Kinase wurden konjugierte Antikörper benutzt. Die Antigenerkennung wurde in einer erhitzten Dako-Lösung in einer Druckkammer durchgeführt. Nach der Färbung wurden die Objektträger mit 1,5 % Glutaraldehyd und 1 % OsO₄ behandelt. Alle Inkubationen wurden in einer humidifizierten Kammer durchgeführt. Zwischen den Inkubationen wurden 2–4 Waschschrte mit folgenden Lösungen durchgeführt: 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0,1 % Tween-20 bei einem pH von 7,6.

2.3.9.2 Signalanalyse

Die immunhistochemischen Signale wurden mit einem Leica-DMRB-Mikroskop (Leica, Bensheim, Deutschland) durch einen Differenzialinterferenzkontrast dargestellt. Die Bilder wurden anhand des Visitron-Systems (Visitron, Puchheim, Deutschland) digital aufgenommen und verarbeitet.

2.4 Limulus-Lysat-Test (LAL-Test)

Der Endoxingehalt (LPS) wurde mittels LAL-Tests festgestellt (QCL 1000, BioWhittaker, Walkersville, MD). Die Sensitivität lag zwischen 0,01 und 0,02 U/ml; der Testbereich lag zwischen 0,02 und 1 U/ml. Die Messung der Proben erfolgte in zwei Verdünnungsansätzen, bis ihre Konzentrationen im linearen Teil der Standardkurve lagen. Eine Verdünnung der Proben und Standards gelang mit destilliertem Wasser.

2.5 Statistische Auswertung

Die Werte wurden mittels des Shapiro-Wilks- sowie des D'Agostino- und Pearson-omnibus-Tests auf Normalverteilung untersucht.

Im Falle der Normalverteilung wurden die Signifikanzen der Gruppen durch einen „repeated-measure-one-way“ ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Tests getestet. Die Daten wurden jeweils als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (mean \pm SEM = standard error of the mean) angegeben und in Säulendiagrammen oder Kurvendiagramm dargestellt.

Falls keine Normalverteilung in den Gruppen auftrat, wurden die Daten anhand eines nonparametrischen „repeated-measure-one-way“ ANOVA mit Dunn's Post-hoc-Test untersucht.

Die Daten, die keiner Normalverteilung unterlagen wurden mittels eines Box-Whisker-Plots Diagram dargestellt unter Verwendung des Median und der Interquartilrange (25. – 75. Perzentile). Ein p-Wert von 0,05 oder weniger wurde als signifikant betrachtet. Eine Analyse und Darstellung der Daten erfolgte mithilfe des Computerprogramms Prism 5 (Graphpad Software Inc.).

3 Ergebnisse

Die Auswirkungen der Hyperglykämie, Hyperosmolarität und der Therapie mit Insulin auf die Inflammationsreaktion und deren Folgen sind unzureichend geklärt. Die protektiven Effekte der Insulintherapie sind aufgrund der Wirkung des Insulins als endokriner Effekt oder als Folge der Insulinwirkung im Rahmen der Glukosemetabolisierung oder aber auch der damit verbundenen Senkung der Osmolarität zu erklären. Zum weiteren Verständnis dieser Mechanismen sollte die Auswirkung von Glukose, Insulin sowie die Veränderung der Osmolarität durch Mannitol und Harnstoff auf die Zytokinproduktion von PBMC (peripheral blood mononuclear cells) sowie der Phagozytose und des oxidativen Burstes *in vitro* untersucht werden:

Führt eine Erhöhung der Glukosekonzentration zu einem dosisabhängigen Anstieg der Zytokinproduktion und welche Pathomechanismen liegen der Zytokinproduktion von IL-1 β und IL-6 *in vitro* zugrunde?

Wirken hyperosmolare Substanzen wie Mannitol und Harnstoff wie Glukose und welche Auswirkungen haben sie auf die Zytokinproduktion von IL-1 β und IL-6 *in vitro*? Welche Auswirkungen haben erhöhte Glukose- und Mannitolkonzentrationen auf den oxidativen Burst und die Phagozytose humaner Granulozyten *in vitro*?

3.1 Stimulationsstufen von mononukleären Zellen mit LPS

In Vorversuchen erfolgte die Ermittlung der benötigten LPS-Konzentration zur Erlangung einer submaximalen Stimulation der Zytokinproduktion durch PBMC. Hieraus resultierte eine Dosis-Wirkungskurve mit den zu nutzenden LPS-Konzentrationen von 0,5 bis 1 ng/ml in den weiteren Folgeversuchen (Abb. 3.1).

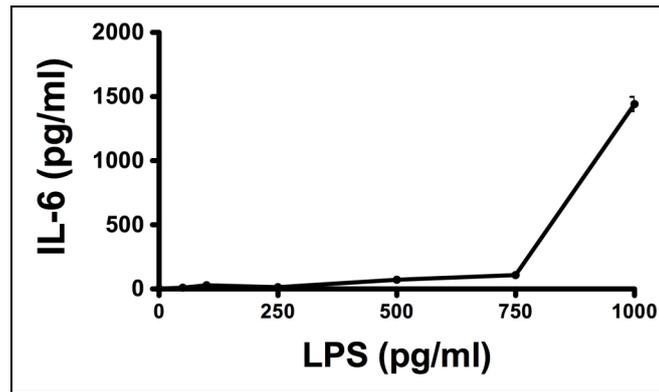


Abbildung 3.1: LPS-Stimulationsstufen.

Steigende Konzentrationen von LPS und Messung der IL-6 Zytokinproduktion (n=2).

3.2 Hohe Glukosekonzentrationen steigern die Zytokinproduktion

In der ersten Versuchsreihe zur Analyse der Zytokinfreisetzung nach Glukosezugabe zeigte sich nach der Kultivierung von PBMC in RPMI (Roswell Park Memorial Institute)-Medium durch die Addition von Glukose eine Induktion der IL-1 β - sowie IL-6-Zytokinfreisetzung in einem konzentrationsabhängigen Verhältnis, verglichen zu PBMC kultiviert im Zellkulturüberstand in einem nicht supplementierten (isoosmolaren) Medium.

Aus den Abbildungen 3.2 A und 3.2 B ist ersichtlich, dass die Produktion der Zytokine IL-1 β und IL-6 signifikant unter Erhöhung der Glukosekonzentration nach LPS-Stimulation stieg (* = $p < 0,05$). Bei den Proben mit den geringsten Glukosekonzentrationen von 250 mg/dl Glukose und einer Osmolarität von 295 mOsmol/l kam es bereits zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration verglichen mit dem Kontrollmedium ohne Zusatz (Abb. 3.2A, * = $p < 0,05$).

Im Versuch zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung: Mit zunehmender Glukosekonzentration war eine ausgeprägtere Stimulation der Zytokinproduktion nachweisbar. Eine statistisch signifikante Erhöhung der Zytokinfreisetzung von IL-1 β konnte erst ab der höchsten Glukosekonzentration von 1.000 mg/dl entsprechend einer Osmolarität von 337 mOsmol/l erzielt werden (Abb. 3.2 B, * = $p < 0,05$).

Verglichen mit den Proben, die mit LPS stimuliert wurden, konnte **ohne** die zusätzliche Gabe von LPS trotz steigender Konzentration von Glukose (250, 500, 1.000 mg/dl) keine signifikante Erhöhung der IL-1 β - sowie IL-6-Zytokinfreisetzung nachgewiesen werden. Für IL-1 β zeigten sich bei dem isoosmolaren Medium ohne Addition von LPS und Glukose Zytokinwerte von

7,7 pg/ml \pm 14,4 pg/ml. Bei Zugabe von 250 mg/dl Glukose, weiterhin ohne LPS-Stimulation, lag der Wert bei 7,3 pg/ml \pm 12,3 pg/ml, bei 500 mg/dl Glukose ohne LPS bei 5,9 pg/ml \pm 9,8 pg/ml und bei Ergänzung von 1.000 mg/dl Glukose ohne Zusatz von LPS bei 19,4 pg/dl \pm 37,5 pg/ml.

Ähnliche Konzentrationen ergaben die Messungen der Zytokinfreisetzung von IL-6 ohne die Supplementierung von LPS. Im isoosmolaren Medium ohne Zugabe von Glukose und LPS betrug die Zytokinkonzentration 23,4 pg/ml \pm 18,45 pg/ml, bei der Addition von 250 mg/dl Glukose ohne LPS betrug die Konzentration 30,0 pg/ml \pm 21,2 pg/ml, bei der Beimischung von 500 mg/dl Glukose betrug die Zytokinkonzentration 53,1 pg/ml \pm 57,3 pg/ml und bei Zusatz von 1.000 mg/dl Glukose ohne LPS betrug die IL-6-Konzentration 53,2 pg/ml \pm 99,9 pg/ml.

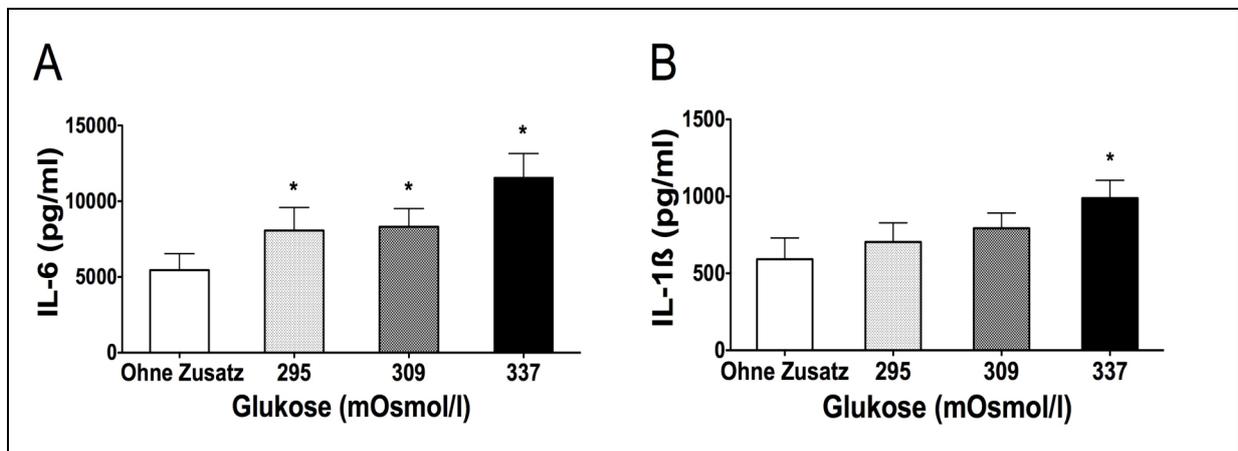


Abbildung 3.2: Glukose führte zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Zytokinproduktion.

Nach LPS-Stimulation mit 0,5 ng/ml erfolgte die Quantifizierung der Zytokinproduktion von IL-6 (A) und IL-1β (B). Eine initiale Präinkubation von drei Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ der PBMC ohne Zusatz (= Kontrollprobe) mit 250, 500, 1.000 mg/dl Glukose entsprechend einer Osmolarität von 295, 309 und 337 mOsmol/l (A + B) im Verhältnis 1:1 mit anschließender LPS-Stimulation und konsekutiver Fortführung der Inkubation für weitere 24 Stunden ermöglichte die Bestimmung der Zytokinfreisetzung mittels ELISA im Anschluss (n = 11, Mittelwert \pm SEM, * = p < 0,05 vs. ohne Zusatz).

3.3 Insulin führt zu keiner relevanten Änderung der Zytokinfreisetzung

Besitzt Insulin oder die durch Zugabe von Insulin indirekt erreichte Normoglykämie antiinflammatorische Wirkungen durch Modifikation der Zytokinproduktion von IL-6 und IL-1 β und ergibt sich somit ein protektiver Effekt auf die Entzündungsreaktion? Zur Klärung dieser Fragestellung erfolgte zuerst eine Inkubation der PBMC mit steigenden Insulinkonzentrationen und konsekutiver LPS-Stimulation.

Der Effekt von Insulin auf die Zytokinproduktion von IL-6 wurde durch die Inkubation mit verschiedenen Insulinkonzentrationen untersucht. Hier zeigte sich, dass es durch die Zugabe von Insulin, trotz Erhöhung der Konzentration, zu keiner signifikanten Veränderung der IL-6-Zytokinfreisetzung kam (Abb. 3.3 A, $p =$ nicht signifikant (n.s.)). Bei der Analyse der Auswirkungen von Insulin auf die Zytokinproduktion von IL-1 β erbrachte lediglich die höchste Insulinkonzentration von 1.000 IU einen signifikanten Anstieg der IL-1 β -Freisetzung (Abb. 3.3 B, * = $p < 0,05$ vs. ohne Zusatz).

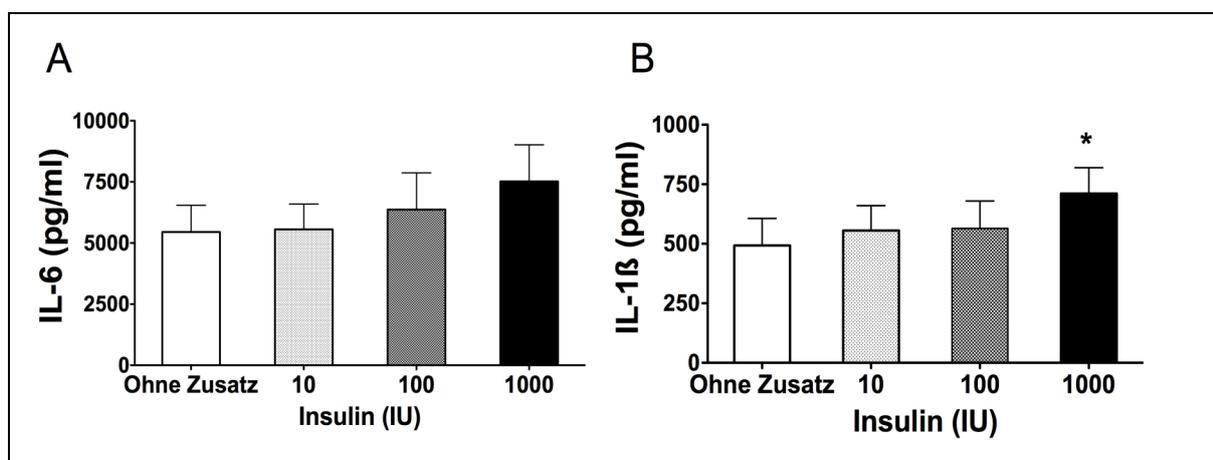


Abbildung 3.3: Auswirkung von Insulin auf die Zytokinfreisetzung von IL-6 und IL-1 β .

Nach LPS-Stimulation mit 0,5 ng/ml erfolgte die Quantifizierung der Zytokinproduktion von IL-6 (A) und IL-1 β (B). Eine initiale Präinkubation von drei Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ der PBMC ohne Zusatz (= Kontrollprobe) mit 10, 100, 1.000 IU Insulin (A + B) im Verhältnis 1:1 mit anschließender LPS-Stimulation und konsekutiver Fortführung der Inkubation für weitere 24 Stunden ermöglichte die Bestimmung der Zytokinfreisetzung mittels ELISA (n = 11, Mittelwert \pm SEM, * = $p < 0,05$ vs. ohne Zusatz).

3.4 Insulin führte zu einer Reduktion der anfänglich gesteigerten Zytokinfreisetzung nach Glukoseexposition

Eine Untersuchung der Reversibilität der anfänglich erhöhten Zytokinproduktion nach Glukoseexposition durch Addition von Insulin führte zur Durchführung einer Inkubation der PBMC mit einem Medium bestehend aus einer Kombination von Glukose und Insulin (Abb. 3.4).

1. Auch hier zeigte sich der bereits in der oben dargestellten Versuchsreihe statistisch signifikante Effekt der Steigerung der IL-1 β - und IL-6-Zytokinfreisetzung durch die Zugabe von Glukose (Abb. 3.4 A und 3.4 B, * = $p < 0,05$ vs. ohne Zusatz).
2. Die Addition von Insulin zu einer hoch hyperglykämischen Lösung ergab eine partielle Erniedrigung der initial erhöhten Zytokinkonzentration. Statistisch signifikant zeigte sich dieses Ergebnis nur bei der höchsten Glukosekonzentration (1.000 mg/dl = 337 mOsmol/l) in Kombination mit Insulin (100 IU) für die Messung der IL-1 β -Zytokinfreisetzung (Abb. 3.4 B, $\delta = p < 0,05$ vs. 1.000 mg/dl oder 337 mOsmol/l Glukose).

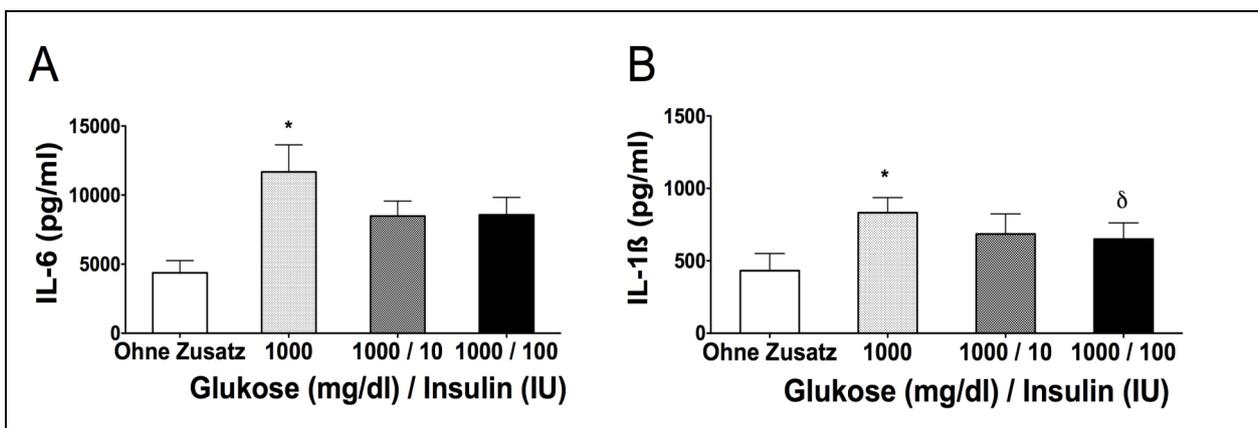


Abbildung 3.4: Die Zugabe von Insulin zu Glukose führte zu einer Reduktion der Zytokinkonzentration.

Produktion von IL-6 (A) und IL-1 β (B) durch PBMC nach LPS-Stimulation. PBMC wurden ohne Zusatz mit Glukose (1.000 mg/dl entsprechend 337 mOsmol/l) und einer Kombination aus Glukose und Insulin (1.000 mg/dl entsprechend 337 mOsmol/l Glukose sowie 10 IU Insulin oder 100 IU Insulin) im Verhältnis 1:1 für drei Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ präinkubiert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden unter denselben Bedingungen erbrachte das ELISA-Verfahren im Anschluss die Quantifizierung der Zytokinkonzentration (n = 9, Mittelwert \pm SEM, * = $p < 0,05$ vs. ohne Zusatz, $\delta = p < 0,05$ vs. 1.000 mg/dl oder 337 mOsmol/l Glukose).

3.5 Stimulation der Zytokinproduktion durch D- und L-Glukose

Zur weiteren Differenzierung der Auswirkung von Glukose (Hyperglykämie) auf die Zytokinfreisetzung erfolgte eine Inkubation von PBMC im RPMI-Medium und einem Zusatz von D-Glukose mit einer Konzentration von 1.000 mg/dl entsprechend einer Osmolarität von 337 mOsmol/l. Das Enantiomer der D-Glukose, die L-Glukose, wurde mit einer Konzentration von 1.000 mg/dl (= 337 mOsmol/l) zu den Proben hinzugefügt.

Unter Addition beider Glukosevarianten stieg die Zytokinfreisetzung. Lediglich durch die Zugabe von D-Glukose zeigte sich eine statistisch signifikante Induktion der IL-6-Zytokinausschüttung (Abb. 3.5 A, * = $p < 0,05$ vs. ohne Zusatz). Für das Zytokin IL-1 β konnte durch beide Enantiomere eine Erhöhung der Zytokinkonzentration nachgewiesen werden (Abb. 3.5 B). Diese war jedoch statistisch nicht signifikant. Zwischen den beiden Enantiomeren bestand in Bezug auf die Zytokinproduktion kein Unterschied, weder für IL-1 β noch für IL-6.

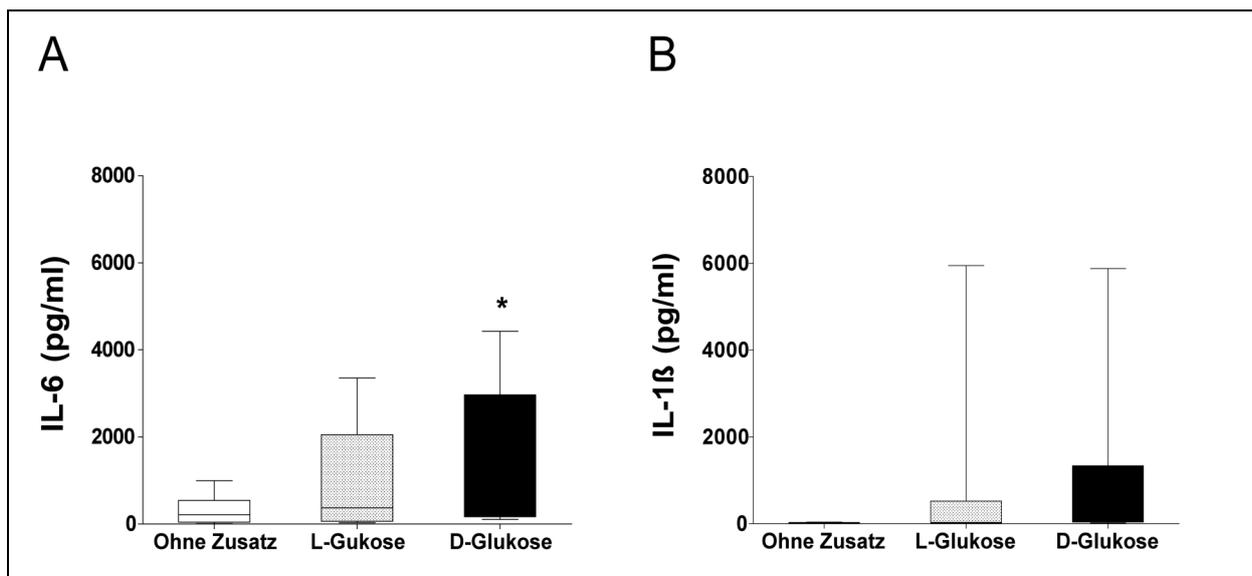


Abbildung 3.5: IL-6- (A) und IL-1 β - (B) Produktion durch PBMC nach Zugabe von L- und D-Glukose.

PBMC wurden mit L-Glukose in einer Konzentration von 1.000 mg/dl entsprechend einer Osmolarität von 337 mOsmol/l und D-Glukose gemäß einer Konzentration von 1.000 mg/dl und einer Osmolarität von ebenfalls 337 mOsmol/l für drei Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ präinkubiert, danach mit 0,5 ng/ml LPS stimuliert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden unter denselben Bedingungen erbrachte das ELISA-Verfahren im Anschluss die Quantifizierung der Zytokinkonzentration (n = 10, Median (25. - 75. Perzentile), * = $p < 0,05$ vs. ohne Zusatz).

3.6 Effekt von Mannitol auf die Zytokinfreisetzung

Um die Auswirkung eines anderen osmotisch wirksamen Stoffes aus der Gruppe der Kohlenhydrate zu nutzen, erfolgte die Inkubation der PBMC erneut mit einem Medium aus RPMI und einem Zusatz aus dem Diastereomer der Glukose: Mannitol. Proben wurden mit Mannitol und Glukose entsprechend einer Osmolarität von 337 mOsmol/l in einem RPMI-Medium versetzt.

Die Quantifizierung der Zytokinkonzentration von IL-1 β und IL-6 vollzog sich nach einer Inkubationszeit von 3, 6, 9, 12 und 24 Stunden, wie in Abbildung 3.6 dargestellt. Bereits nach 6 Stunden Inkubationszeit konnte ein deutlicher, nach 9 Stunden ein statistisch signifikanter Anstieg der Zytokinfreisetzung von IL-1 β und IL-6 nachgewiesen werden. Nach 12-stündiger Inkubationszeit konnte keine weitere statistisch signifikante Erhöhung der Produktion im Vergleich zu den Vorwerten erreicht werden (= Plateauphase).

Die Zugabe von Glukose mit einer konsekutiven Erhöhung der Gesamtosmolarität auf 337 mOsmol/l führte zu einem signifikanten und anhaltenden Anstieg der Zytokinkonzentration verglichen mit den Proben ohne Zusatz (Abb. 3.6 A und B; * = $p < 0,05$ vs. ohne Zusatz). Die Addition von Mannitol mit derselben Gesamtosmolarität von 337 mOsmol/l führte auch zu einer Erhöhung der Zytokinproduktion. Diese war jedoch deutlich geringer als bei den Proben mit dem Zusatz aus Glukose und statistisch nicht signifikant (Abb. 3.6 A und B; $p = n. s.$). Dies konnte sowohl für IL-6 als auch für IL-1 β nachgewiesen werden.

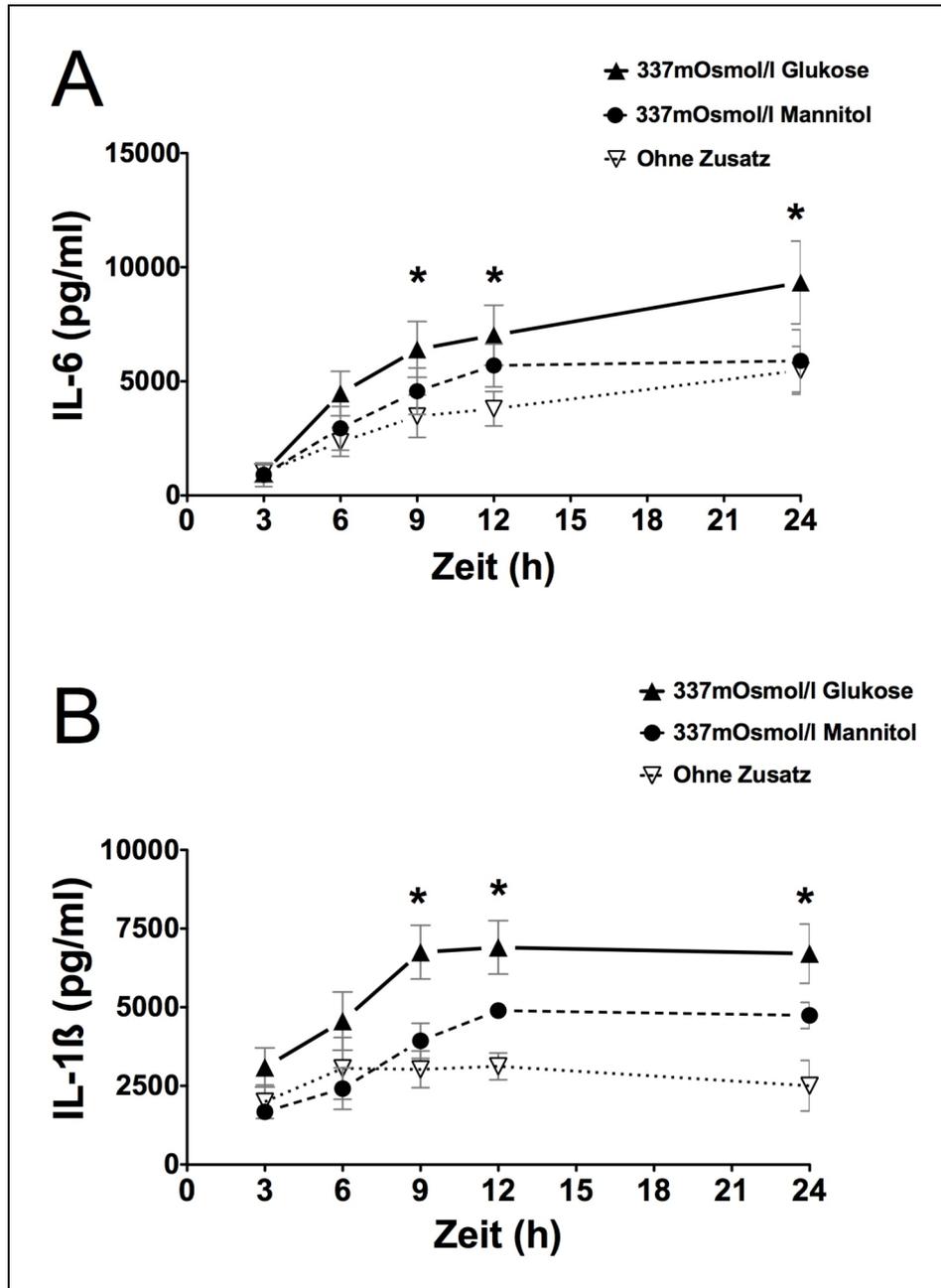


Abbildung 3.6: Induktion der IL-6- (A) und IL-1β-Freisetzung (B) durch PBMC innerhalb von 24 Stunden.

PBMC wurden mit Glukose und Mannitol entsprechend einer Osmolarität von 337 mOsmol/l im Verhältnis 1:1 für drei Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ präinkubiert, daraufhin mit 0,5 ng/ml LPS stimuliert. Die Proben wurden unter denselben Bedingungen für weitere 24 Stunden inkubiert. Innerhalb dieses Zeitraums wurden in einem Abstand von 3, 6, 9, 12 und 24 Stunden jeweils die Zytokinkonzentration von IL-6 und IL-1β via ELISA bestimmt (n = 4–5, Mittelwert ± SEM, * = p < 0,05 Glukose vs. ohne Zusatz).

3.7 Hyperosmolare Bedingungen führen zu einer erhöhten Zytokinfreisetzung

Um eine Aussage bezüglich der Auswirkung von hyperosmolaren Bedingungen auf die Zytokinproduktion zu erhalten und eine Substanz zu wählen, die einen direkten Einfluss auf die Osmolarität im physiologischen Milieu ausübt, aber die Tonizität des Milieus nicht beeinflusst, wurden PBMC mit Harnstoff, einer frei durch die Zellmembran diffundierenden Substanz, inkubiert (Abb. 3.7). Auch in dieser Versuchsreihe wurde eine Induktion der Zytokinfreisetzung durch die Addition von Harnstoff in das RPMI-Medium nach LPS-Stimulation erzielt.

Für die Produktion der Zytokine IL-1 β und IL-6 zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Konzentrationserhöhung von Harnstoff und der Zytokinfreisetzung. Dieser war statistisch signifikant sowohl für IL-6 (Abb. 3.7 A) als auch für IL-1 β (Abb. 3.7 B) bei der höchsten Harnstoffkonzentration von 654 mg/dl gemäß 2.000 mg/dl Glukose und einer Osmolarität von 392 mOsmol/l im Vergleich zu den niedrigeren Harnstoffkonzentrationen (163, 327 mg/dl) entsprechend einer Osmolarität von 309 und 337 mOsmol/l ($\delta = p < 0,05$ vs. ohne Zusatz). Vorzufinden war ein weiterer statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Zytokinproduktion zwischen der höchsten Harnstoffkonzentration von 392 mOsmol/l und der Probe mit der geringsten Harnstoffkonzentration von 163 mg/dl, entsprechend einer umgerechneten Glukosekonzentration von 500 mg/dl und einer Osmolarität von 309 mOsmol/l (Abb. 3.7 A, B; * = $p < 0,05$ vs. 392 mOsmol/l). Für das Zytokin IL-6 zeigte sich dies auch für die Probe mit der mittleren Harnstoffkonzentration im Medium von 327mg/dl und einer Osmolarität von 337 mOsmol/l (Abb. 3.7 A, * = $p < 0,05$ vs. 392 mOsmol/l).

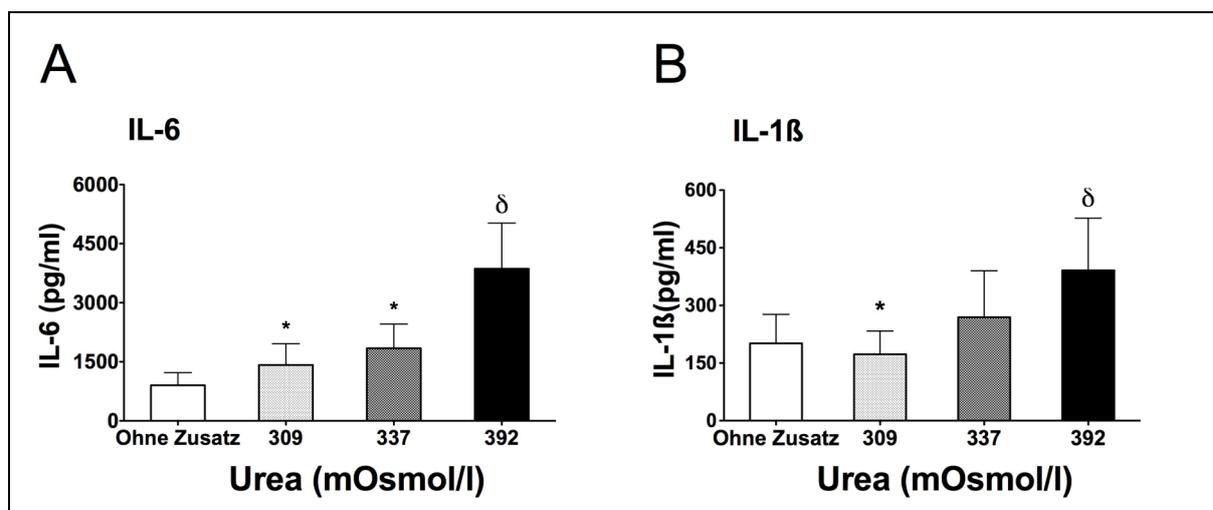


Abbildung 3.7: IL-6- (A) und IL-1 β -Freisetzung (B) durch LPS-stimulierte PBMC nach Zugabe von Urea.

PBMC wurden mit Urea (163, 327, 654 mg/dl) in der Konzentration 1:1 für drei Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ präinkubiert, daraufhin mit 0,5 ng/ml LPS stimuliert und weitere 24 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Die jeweiligen Urea-Konzentrationen entsprachen: 163 mg/dl Urea = 500 mg/dl Glukose = 309 mOsmol/l; 327 mg/dl Urea = 1.000 mg/dl Glukose = 337 mOsmol/l; 654 mg/dl Urea = 2.000 mg/dl Glukose = 392 mOsmol/l (n = 10, Mittelwert ± SEM, * = p < 0,05 vs. ohne Zusatz, δ = p < 0,05 vs. 309 mg/dl und 337 mg/dl Urea).

3.8 Auswirkung von Glukose, Rapamycin und dem p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB 203580 auf die Zytokinproduktion

Wie aus den bereits durchgeführten Versuchen ersichtlich, fördern hyperglykämische sowie hyperosmolare Bedingungen die Zytokinfreisetzung in einem konzentrationsabhängigen Verhältnis. Um grundlegende Mechanismen der durch diese Bedingungen hervorgerufenen Regulationen der Zytokinproduktion zu untersuchen, erfolgte eine selektive Blockierung möglicher auf unterschiedlichen Ebenen interagierender Kinasen und weiterer Regulationsmechanismen. Insbesondere scheinen die in der nächsten Versuchsreihe untersuchten Kinasen, wie die PKC-β-, die p38-MAP-Kinasen und der Regulationsmechanismus über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3)/Akt-Signalkaskade mittels Selektierung von mTOR (= mammalian target of Rapamycin), von Bedeutung zu sein.

Es erfolgte daher

- die Blockierung des mTOR-Pathways durch den mTOR-Inhibitor Rapamycin (Abb. 3.8.1),
- die weitere Blockierung der durch die p38-MAP-Kinase übermittelten Kaskade durch den p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB 203580 (Abb. 3.8.1 und Abb. 3.8.2) und
- die Inhibition der Proteinkinase-C-beta durch den spezifischen Inhibitor (Abb. 3.8.2).

Die freigesetzten Zytokine IL-1β und IL-6 zeigten nach der Inkubation mit Glukose (1.000 mg/dl), entsprechend einer Osmolarität von 337 mOsmol/l und nachfolgender LPS-Stimulation, eine signifikante Erhöhung der Zytokinproduktion (Abb. 3.8.1 A, B; * = p < 0,05 vs. ohne Zusatz). Auch in den mit derselben Konzentration von Glukose versetzten Proben, jedoch mit der Beimischung des mTOR-Inhibitors Rapamune, war ein signifikanter Anstieg der Zytokinkonzentration im Vergleich zu den Proben ohne Zusatz zu messen (Abb. 3.8.1 A, B; * = p < 0,05 vs. ohne Zusatz). Durch die weitere Addition von Rapamune zu den Glukosemedien sank die Zytokinfreisetzung im Vergleich zu den Proben, die nur mit Glukose inkubiert wurden,

allerdings nicht signifikant ($p > 0,05$ oder $p =$ nicht signifikant Glukose vs. Glukose/Rapamune). Nach der Inkubation mit dem p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB 203580 zeigte sich trotz Zugabe von Glukose zu den Proben in einem äquimolaren Verhältnis eine deutlich signifikante Abnahme der Zytokinfreisetzung im Vergleich zu den Proben mit dem Zusatz aus Glukose ($\delta = p < 0,05$ vs. Glukose und Glukose/Rapamune). Dies traf für das Zytokin IL-6 (Abb. 3.8.1 A) und für das Zytokin IL-1 β gleichermaßen zu (Abb. 3.8.1 B).

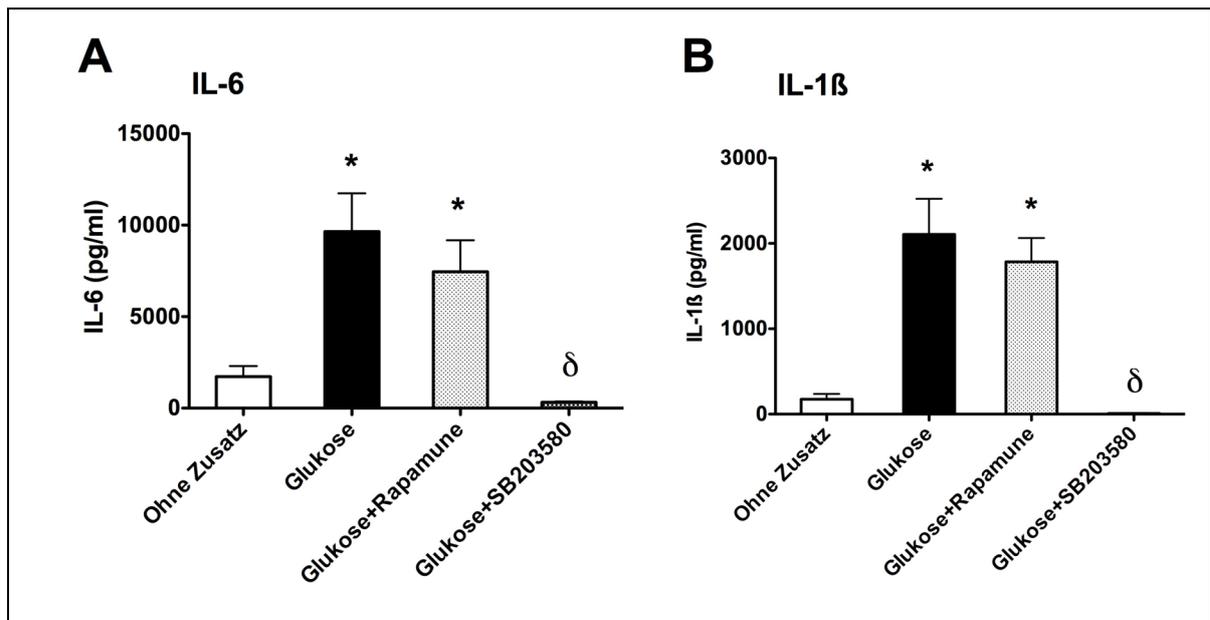


Abbildung 3.8.1: IL-6- (A) und IL-1 β -Freisetzung (B) durch PBMC nach Inkubation mit Glukose, Rapamune und dem p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB 203580.

PBMC wurden ohne Zusatz, mit Glukose (1.000 mg/dl) entsprechend einer Osmolarität von 337 mOsmol/l, einer Kombination aus Glukose (1.000 mg/dl) und Rapamune sowie der Kombination aus Glukose (1.000 mg/dl) und dem p38-MAPK-Inhibitor SB 203580 in der Konzentration 1:1 für drei Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ präinkubiert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden unter denselben Bedingungen erbrachte im Anschluss das ELISA-Verfahren die Bestimmung der Zytokinkonzentration ($n = 9$, Mittelwert \pm SEM, * = $p < 0,05$ vs. ohne Zusatz, $\delta = p < 0,05$ vs. Glukose).

Durch die Addition von Glukose kam es erneut zu einem Anstieg der Zytokinkonzentration von IL-1 β und IL-6 (Abb. 3.8.2 A, B). Die Zugabe des Proteinkinase-C-beta-Inhibitors mit Glukose führte zu einem weiteren Anstieg der Zytokinausschüttung im Vergleich zu den Proben, die nur mit dem Zusatz aus Glukose inkubiert wurden. Wie schon in den Abbildungen 3.8.1 A und 3.8.1 B beschrieben, kam es auch in dieser Versuchsreihe zu einer signifikanten Reduktion der

Zytokinproduktion von IL-1 β und IL-6 durch die Beimischung von SB 203580 zu den Proben mit und ohne Glukose.

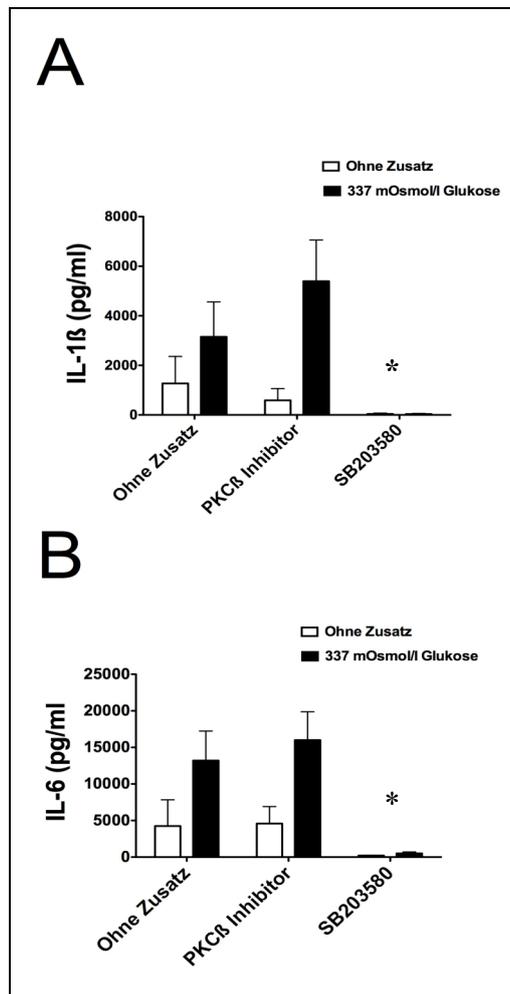


Abbildung 3.8.2: IL-1 β - (A) und IL-6-Freisetzung (B) durch PBMC nach Zugabe von Glukose und dem PKC β -Inhibitor.

PBMC wurden ohne Zusatz, mit Glukose (1.000 mg/dl) entsprechend einer Osmolarität von 337 mOsmol/l, einer Kombination aus Glukose (1.000 mg/dl) und dem Proteinkinase-C-beta-Inhibitor sowie der Kombination aus Glukose (1.000 mg/dl) und dem p38-MAPK-Inhibitor SB 203580 in der Konzentration 1:1 für drei Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ präinkubiert und im Anschluss mit 0,5 ng/ml LPS stimuliert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden unter denselben Bedingungen erbrachte im Anschluss das ELISA-Verfahren die Quantifizierung der Zytokinkonzentration (n = 4, Mittelwert \pm SEM, * = p < 0,05 vs. ohne Zusatz, PKC β -Inhibitor).

3.9 Charakterisierung der Auswirkung von Glukose und der p38-MAP-Kinase auf die Zytokinproduktion mittels Immunhistologie

Zur Bestätigung der Expression und der Beteiligung der MAP-Kinase p38 gelang dieser Nachweis in der anschließenden Versuchsreihe durch eine immunhistologische Färbung. PBMC wurden zum Einen mit RPMI ohne Zusatz (isoosmolares Medium) und zum Anderen mit RPMI und einer Addition von 1.000 mg/dl Glukose entsprechend einer Osmolarität von 337 mOsmol/l versetzt (Abb. 3.9). Eine Stimulation erfolgte durch steigende Konzentration von LPS (ohne Zusatz, 0,5 ng/ml, 50 ng/ml). Es schloss sich eine immunhistologische Färbung der p38-MAP-Kinase mittels des p38-MAP-Kinase-Antikörpers an.

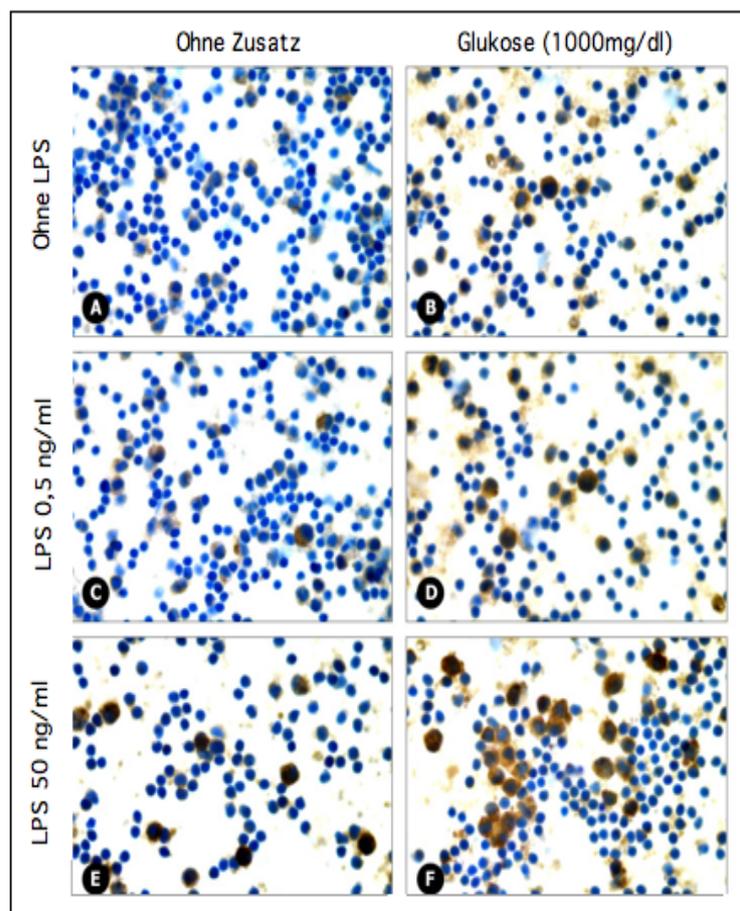


Abbildung 3.9: Immunhistochemischer Nachweis der p38-MAP-Kinase bei verschiedenen Glukose- und LPS-Konzentrationen.

PBMC wurden drei Stunden mit und ohne Zusatz von Glukose (1.000 mg/dl) entsprechend einer Osmolarität von 337 mOsmol/l bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Es folgte im Anschluss eine Stimulation mit 0,5 und 50 ng/ml LPS, zudem

eine weitere Inkubation für 24 Stunden. Proben ohne den Zusatz von LPS dienten sowohl mit als auch ohne Addition von Glukose als Kontrollen. Die im Anschluss durchgeführte Färbung der p38-MAP-Kinase erfolgte durch den p38-Antikörper (n = 2).

Ohne Beimischung von LPS und ohne Zugabe von Glukose und somit bestehend aus einer Zusammensetzung eines isoosmolaren RPMI-Mediums ließ sich kaum eine Anfärbung der p38-MAP-Kinase nachweisen (Abb. 3.9 A). Der Zusatz von 1.000 mg/dl Glukose entsprechend einer Osmolarität von 337 mOsmol/l, weiterhin ohne LPS-Stimulation, erbrachte eine geringe Intensitätssteigerung der p38-MAP-Kinase-Färbung (Abb. 3.9 B). Die Ausprägung der Färbung nahm bei zunehmender LPS-Konzentration deutlich zu (Abb. 3.9 D, F). Eine alleinige Zunahme der Nachweisintensität von p38-MAP-Kinase durch eine Steigerung der LPS-Konzentration konnte ohne Addition von Glukose im Vergleich zu den mit Glukose und LPS versetzten Proben nicht erzielt werden (Abb. 3.9 A, C, E).

3.10 Auswirkungen der Hyperglykämie und der Hyperosmolarität auf den oxidativen Burst und die Phagozytose

Eine Untersuchung der Effekte auf die Phagozytose und den oxidativen Burst nach Addition von Glukose und Mannitol (zur Erzeugung eines weiteren hyperosmolaren Kulturmediums) ergab einen Einblick in ein weiteres Teilgebiet der unspezifischen, angeborenen Immunantwort. Hierfür wurde Vollblut im RPMI-Medium entweder ohne Zusatz oder mit Beimischung von Glukose (500 mg/dl) entsprechend einer Osmolarität von 309 mOsmol/l als auch mit Zugabe von Mannitol (500 mg/dl oder 309 mOsmol/l) inkubiert.

Unter den hyperglykämischen Bedingungen war die oxidative Burst-Aktivität der Granulozyten in den Proben mit PMA als starker („high“) Stimulus (Abb. 3.10 A) und in den Proben mit E. coli als schwacher („low“) Stimulus (Abb. 3.10 B) signifikant reduziert (* = $p < 0,05$). Als Negativkontrolle (Null-Probe) dienten Vollblutproben, die nur in RPMI-Medium ohne Zusatz analysiert wurden. Die mit Mannitol versetzten Medien derselben Osmolarität wie die mit Glukose inkubierten Proben zeigten eine Abnahme der oxidativen Burst-Aktivität. Die Aktivitätsreduktion unter Mannitol war geringer ausgeprägt als unter Zugabe von Glukose. Eine statistisch signifikante Veränderung der oxidativen Burst-Aktivität durch Inkubation mit Mannitol konnte nur für die Proben nachgewiesen werden, die mit PMA als starkem Stimulus versetzt wurden (Abb. 3.10 A, * = $p < 0,05$ vs. ohne Zusatz).

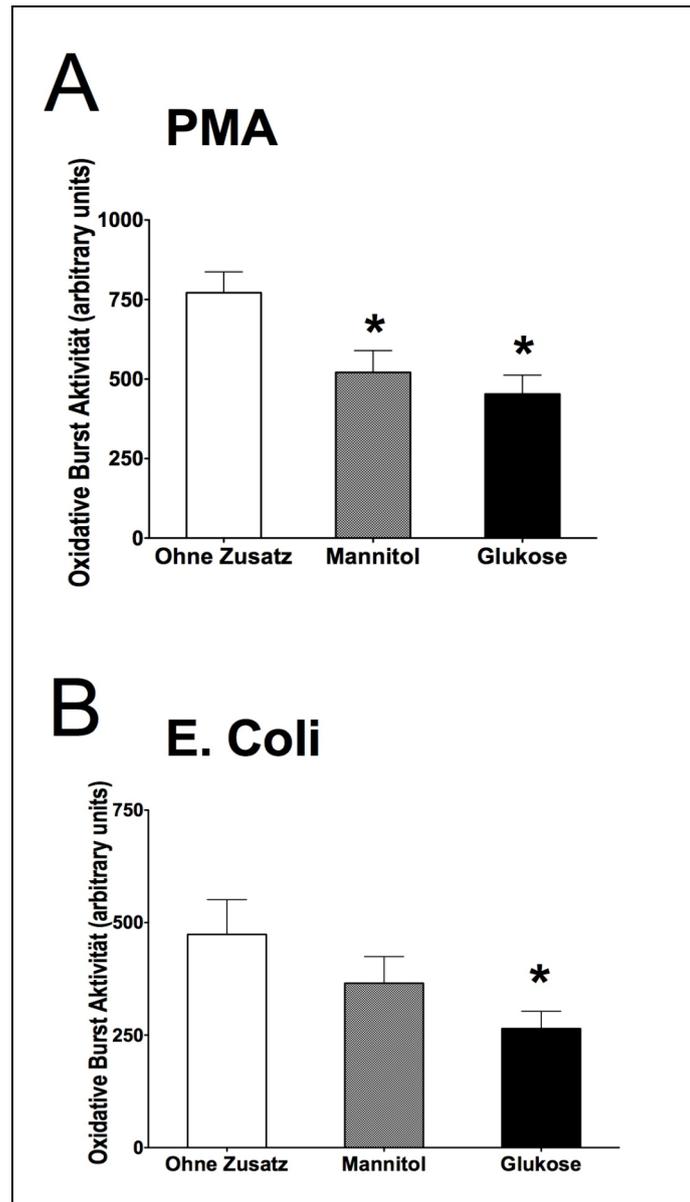


Abbildung 3.10: Oxidative Burst-Aktivität.

Vollblut wurde ohne Zusatz, mit Mannitol (500 mg/dl) und Glukose (500 mg/dl) entsprechend einer Osmolarität von 309 mOsmol/l für drei Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert und im Anschluss entweder mit PMA (A) als „high“-Stimulus oder E. coli (B) als „low“-Stimulus aktiviert (n = 10, * = p < 0,05 vs. ohne Zusatz).

Die Zugabe eines hyperglykämischen Mediums entsprechend einer Osmolarität von 309 mOsmol/l zu den Vollblutproben erbrachte auch in dieser Versuchsreihe eine signifikante Aktivitätsabnahme der Phagozytose (Abb. 3.11, * = p < 0,05) verglichen mit den Vollblutproben ohne Zusatz. Eine Erhöhung der Osmolarität auf 309 mOsmol/l durch Mannitol führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der phagozytotischen Aktivität (Abb.3.11, * = p < 0,05).

Hyperglykämische Bedingungen scheinen hier, wie auch bei der Versuchsreihe zur Quantifizierung der oxidativen Burst-Aktivität, einen deutlich ausgeprägteren Effekt auf die Herabsetzung der Phagozytose zu haben als hyperosmolare Veränderungen isoliert betrachtet. Dies ist jedoch statistisch nicht signifikant zu belegen.

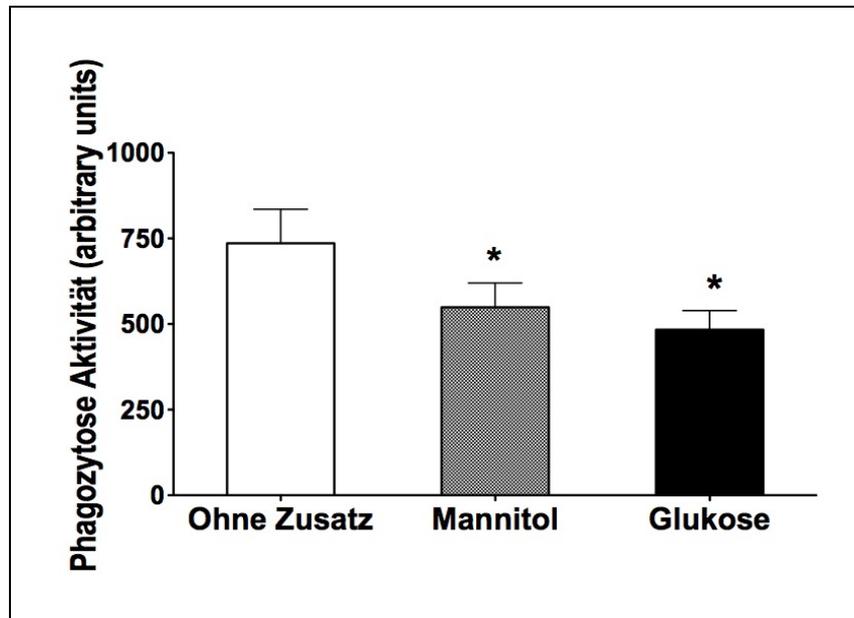


Abbildung 3.11: Phagozytotische Aktivitätsbestimmung bei verschiedenen osmotischen Stimuli.

Vollblutproben wurden ohne Zusatz, mit Mannitol (500 mg/dl) und Glukose (500 mg/dl) entsprechend einer Osmolarität von 309 mOsmol/l für drei Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert (n = 10, * = p < 0,05 vs. ohne Zusatz).

4 Diskussion

Die Hyperglykämie ist ein sehr häufig gesehenes Phänomen bei intensivpflichtigen Patienten und ein Prädiktor für Morbidität und Mortalität in dieser Patientenpopulation²⁶⁻³⁰. Ziel unserer Untersuchungen war es, die Modulation der Immunantwort in einem Sepsismodell unter hyperglykämischen und hyperosmolaren Bedingungen zu analysieren, um die Ursachen der Morbiditäts- und Mortalitätssteigerung bei septischen und intensivpflichtigen Patienten zu eruieren.

4.1 Erhöhte Glukosekonzentrationen steigern die Zytokinproduktion

In den in dieser Dissertation durchgeführten Versuchsreihen zeigte sich nach Zugabe von LPS zu humanen PBMC von gesunden Probanden unter steigenden hyperglykämischen Bedingungen ein proportionaler Anstieg der Zytokinfreisetzung von IL-1 β sowie IL-6. Diese beobachtete Steigerung der Zytokinproduktion bestätigte die Arbeit von Esposito et al.³⁸, die unter experimentellen hyperglykämischen Bedingungen bei gesunden Probanden sowie bei diabetischen Patienten eine Erhöhung der Zytokinkonzentration nachwies. Weiterhin ergab sich in dieser Studie, dass die diabetischen Patienten einen signifikant höheren Zytokinspiegel unter normoglykämischer Stoffwechsellage hatten als Patienten ohne Diabetes³⁸. Nach Endotoxinstimulation führte die Zugabe von Glukose zu den Proben gesunder Probanden zu einer Erhöhung der IL-6-Freisetzung³⁷. Dies bestätigte sich auch bei intensivtherapiepflichtigen Patienten durch den Nachweis eines Anstieges der IL-6-Konzentration unter hyperglykämischen Konditionen³⁰. Ähnliche Daten ergaben sich in einer weiteren Studie, in der es auch zu einer Erhöhung der IL-6- und TNF- α -Freisetzung nach Exposition mit LPS unter erhöhten Glukosekonzentrationen kam⁷⁰. In Tiermodellen konnten diese Ergebnisse ebenfalls nachgewiesen werden^{51, 50, 44}.

4.2 Wirkt Insulin als antiinflammatorisches Hormon?

Die Insulintherapie, intensiviert (Zielblutzuckerwerte: 80–110 mg/dl) oder mit konservativer Dosierung (Zielblutzuckerwerte: 180–200 mg/dl), ist eine einfache und kostengünstige Intervention, die das klinische Ergebnis von intensivpflichtigen^{29, 34}, kardiologischen⁷¹⁻⁷⁴, neurologischen^{32, 33}, diabetischen und dialysepflichtigen⁷⁵⁻⁷⁷ Patienten verbessert⁷⁸. Sie kann unter einfachen und unkomplizierten Bedingungen im klinischen Alltag nach entsprechender

Einführung, Übung und Überwachung eingesetzt werden⁷⁹. Insulin scheint teilweise die metabolischen Entgleisungen bei kritisch kranken Patienten revidieren zu können. Nach Endotoxin-Injektion bei Schweinen erzielte die Gabe von Insulin eine Abnahme der initial erhöhten Zytokinproduktion nach Glukoseexposition. Die Autoren formulierten hieraus die Hypothese, Insulin als antiinflammatorisches Hormon zu betrachten⁵¹. Im Hasenmodell zeigte sich nach Addition von Insulin zur Erhaltung der Normoglykämie (3,3–6,1 mmol/l oder 59,5–109,9 mg/dl) das Eintreten einer Inflammationsreduktion bereits innerhalb von drei Tagen nach Applikation von Verbrennungswunden verglichen mit Hasen, die weiterhin einen erhöhten Blutzuckerspiegel (13,8–16,6 mmol/l oder 249–299,1 mg/dl) hatten. Diese waren gekennzeichnet durch eine deutlich prolongierte Krankheitsdauer sowie einen schlechteren klinischen Verlauf unter hyperglykämischen Bedingungen⁵⁰.

In unserer Versuchsreihe zeigte die Inkubation von humanen PBMC nach LPS-Stimulation mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen (10, 100, 1.000 IE) keinen signifikanten Einfluss auf die Zytokinsynthese von IL-1 β und IL-6. Lediglich unter der höchsten Konzentration von 1.000 IE Insulin kam es zu einer Erhöhung der IL-1 β -Zytokinproduktion.

Unsere Daten weisen somit keinen direkten Effekt der isolierten Gabe von Insulin auf die LPS-stimulierte Zytokinausschüttung nach. Eine Kombination aus der Beimischung von unterschiedlichen Konzentrationen von Glukose und Insulin zu den humanen PBMC erbrachte einen initialen Anstieg der Zytokinfreisetzung unter alleiniger Zugabe von Glukose. Durch die Addition von Insulin konnte dieser Anstieg partiell revidiert werden. Dies ist jedoch als zusätzliches Argument dafür zu werten, dass Insulin einen knapp signifikanten Effekt auf die Zytokinantwort ausübt. Weiterhin bleibt jedoch zu klären, ob es bei den beschriebenen klinischen Studien durch die Gabe von Insulin zur Erzielung der Normoglykämie und hierdurch zu einer Abnahme der Osmolarität kam und dies zu den beschriebenen klinischen Verbesserungen der Patientenpopulation führte. Unser etabliertes Zellkulturmodell konnte diese Fragestellung nicht hinreichend beantworten, da die vielschichtigen physiologischen Interaktionsmechanismen in diesem Versuchsaufbau nicht ausreichend widerspiegelt werden konnten.

4.3 Bedeutung der Glukose und Osmolarität für die Zytokinproduktion

Zusammenfassend erbrachten unsere Daten den Nachweis einer signifikanten Erhöhung der Zytokinfreisetzung durch Zugabe von Glukose. Studien berichteten jedoch zusätzlich über eine

Steigerung der Zytokinproduktion durch Veränderung des osmotischen Milieus, bezogen auf diese Versuchsreihe also durch eine Steigerung der Osmolarität durch das Hinzufügen von Glukose. Zur genaueren Differenzierung, ob die von uns beschriebenen Veränderungen der Zytokinfreisetzung durch die alleinige Beimischung von Glukose bzw. die konsekutive Veränderung der Osmolarität erzielt wurden, erfolgte die Inkubation der humanen PBMC mit unterschiedlichen osmotisch wirksamen Substanzen.

Eine Studie von Taubert et al. untersuchte die endotheliale NO-vermittelte Vasodilatation an Koronargefäßen von Schweinen nach Addition von D-Glukose sowie dessen Enantiomer, der L-Glukose. Die Ergänzung von D-Glukose zu den Proben erbrachte die Messung eines konzentrationsabhängigen Anstiegs der NO-Freisetzung. Nur die Proben versetzt mit D-Glukose zeigten einen Zusammenhang mit einem verstärkten Kalziuminflux über die Plasmamembran in die Zelle und konsekutiv die Aktivierung der NO-Synthese (eNOS). Der Zusatz von L-Glukose erzielte in dieser Versuchsreihe keine Veränderungen auf die NO-Formation⁸⁰. Unsere Versuchsreihe untersuchte entsprechend dieser Anordnung die Zytokinkonzentration nach Beimischung von L- und D-Glukose. Unsere Daten führten zu einem Anstieg der Zytokinproduktion von IL-1 β und IL-6 sowohl durch Addition von D-Glukose als auch durch Zugabe von L-Glukose. Statistisch signifikant war dies nur für die Addition von D-Glukose bei dem Nachweis von IL-6. Insgesamt zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Enantiomeren in Bezug auf die Zytokinfreisetzung. Dies könnte auf einen Mechanismus der Zytokininduktion hinweisen, der nicht unbedingt auf die isolierte Zugabe der biologisch frei verfügbaren D-Glukose angewiesen ist.

Zhang et al.⁴⁹ stellten in ihrer Studie durch Beimischung von hypertoner NaCl-Lösung und Mannitol ein hyperosmolares Milieu mit einer Osmolarität zwischen 300 und 350 mOsmol/l her. Dieses Medium wurde in einem weiteren Schritt mit gastrischen Epithelzellen inkubiert. Unter den erzeugten hyperosmolaren Bedingungen kam es zu einer Zunahme der mRNA-Expression von IL-1 β durch gastrische Epithelzellen. Die Zugabe von hyperosmolarer NaCl-Lösung mit einer Endosmolarität von 375 mOsmol/l zu PBMC zeigte auch in anderen Studien eine Erhöhung der Zytokinkonzentration, in diesem Falle von IL-8^{47, 81}. Diese Ergebnisse konnten in der Studie von Németh et al.⁴⁸ bestätigt werden. Unter Zufuhr von hypertoner NaCl-Lösung sowie von Mannitol kam es hierbei zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der IL-8-Freisetzung von humanen intestinalen Epithelzellen. Die Arbeitsgruppe postulierte Hinweise für zugrunde liegende Mechanismen im Sinne einer Aktivierung der p38- und p42/44-MAP-Kinasen

unter hyperosmolaren Bedingungen. Ein Tierversuch konnte eine Erhöhung der Zytokinfreisetzung durch Zugabe von Mannitol zu den Proben nicht bestätigen⁴⁴.

Unsere Untersuchungen zeigten ähnliche Ergebnisse wie die von Németh und Zhang et al. In unserer Versuchsreihe erfolgte die Inkubation frisch isolierter humaner PBMC mit der Beimischung von Mannitol und einer Zielosmolarität von 337 mOsmol/l. Anschließend erfolgte die Stimulation mit LPS. Die Messung der Zytokine IL-6 und IL-1 β zeigte auch hier einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Zytokinproduktion nach Exposition mit Mannitol. Im Vergleich dazu ergab der Zusatz von Glukose mit derselben Endosmolarität von 337 mOsmol/l auch eine Erhöhung der Zytokinkonzentration von IL-6 und IL-1 β . Jedoch war dieser durch Glukose induzierte Effekt deutlich ausgeprägter als der Anstieg, der durch die Gabe von Mannitol erzielt wurde.

Dies weist zum einen auf einen durch die Veränderung des osmotischen Milieus erreichten Einfluss hin, zum anderen auf eine darüber hinausgehende additive Auswirkung der Glukosezugabe auf die Zytokinfreisetzung.

Hatanaka et al.⁸² zeigten gegenteilige Ergebnisse. Frisch isolierte humane mononukleäre Zellen gesunder Probanden wurden mit hypertoner NaCl-Lösung inkubiert. Im Anschluss wurde die Zytokinkonzentration von IL-8, TNF- α und dem IL-1-Rezeptor-Antagonisten der Neutrophilen sowie IL-8 und IL-1 β von Monozyten nach der LPS-Stimulation gemessen. Die gemessenen Zytokinkonzentrationen waren nach Beimischung der hypertonen NaCl-Lösung gesunken. Als Ursache hierfür sahen die Autoren Elektrolytveränderungen induziert durch den Zusatz der hypertonen NaCl-Lösung, die im Rahmen der Entzündungsreaktion Auswirkungen auf die Leukozytenfunktion hatten.

Zur weiteren Differenzierung der Auswirkung der Osmolarität auf die Zytokinfreisetzung wurde in einer zusätzlichen Versuchsreihe frisch isolierte PBMC mit Urea inkubiert. Hierbei wurde die Dosierung entsprechend der Osmolarität vorgegeben:

- 163 mg/dl Urea gemäß einer Konzentration von 500 mg/dl Glukose und einer Osmolarität von 309 mOsmol/l;
- 327 mg/dl Urea entsprechend einer Konzentration von 1.000 mg/dl Glukose und einer Osmolarität von 337 mOsmol/l;
- 654 mg/dl Urea entsprechend einer Konzentration von 2000 mg/dl Glukose und einer Osmolarität von 392 mOsmol/l.

Die Zugabe von Harnstoff in einem konzentrationsabhängigen Verhältnis ergab eine Steigerung der Zytokinproduktion.

Harnstoff diffundiert frei durch die Zellmembran, ist also nicht an Transportmechanismen gebunden, führt weiterhin zu einer Änderung der Tonizität im Kulturmedium und umgeht somit eine Veränderung der Zelloberfläche (Zellschwellung) im Vergleich zum hypersmolaren Milieu erzielt durch die Gabe von Mannitol oder Glukose. Harnstoff führte ebenfalls zu einer Erhöhung der Zytokinfreisetzung.

Zusammenfassend zeigen die Versuchsdaten dieser Arbeit, dass die Veränderung des osmotischen Milieus und der Tonizität einen Einfluss auf die Induktion sowie die konzentrationsabhängige Produktion der Zytokine IL-6 und IL-1 β nach LPS-Stimulation ausübt. Die Erhöhung der Osmolarität ist hierbei der entscheidende Mechanismus.

4.4 Der Zytokinproduktion zugrunde liegenden Regulationsmechanismen

Mögliche der Erhöhung der Zytokininduktion durch Hyperglykämie und Hyperosmolarität zugrunde liegende Pathomechanismen wurden bereits in der Studie von Németh et al.⁴⁸ nach Exposition von humanen intestinalen Epithelzellen mit hypertoner NaCl-Lösung sowie von Mannitol nach einer konzentrationsabhängigen Steigerung der IL-8-Freisetzung untersucht. Postuliert wurde hierbei, dass es durch die Syntheseleistung von proinflammatorischen Zytokinen zu einer Aktivierung von MAP-Kinasen, insbesondere der p38- und p42/44-MAP-Kinasen, unter hyperosmolaren Bedingungen kommt^{48, 52}.

Mitogen-activated-Proteinkinasen (MAP-Kinasen) sind kleine Proteine mit einer mittleren Molekülmasse um 36.000–44.000 Dalton, die andere Proteine an spezifischen Threonin- bzw. Serin-Resten phosphorylieren und somit mehrstufige Signaltransduktionswege regulieren^{83, 84}. Unter anderem erfolgt über diese Transduktionswege eine Regulation der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und des programmierten Zelltods.

Die Aktivierung der Makrophagen und Monozyten scheint durch LPS über CD14 und TLR mittels dem MAP-Kinase-System vermittelt zu sein⁸⁵. Hervorzuheben ist hier die p38-MAP-Kinase, die im Nukleolus sowie im Zytoplasma aktivierter Zellen vorkommt. Eine Aktivierung der Zelle kommt durch die duale Phosphorylierung an Threonin Thr-180 und Tyrosin Tyr-182 zustande und wird u. a. durch hyperosmolaren Stress getriggert, mit dem Resultat einer Aktivierung der p38-MAP-Kinase, gefolgt von Zytokinen wie IL-1 β , TNF α und NF- κ b⁸⁶. Unter

hyperosmolaren Bedingungen kommt es zu einer Phosphorylierung von Proteinen, u. a. der p38 - MAP-Kinasen^{43, 87,31}.

In einer der ersten Studien, die den Signalkaskadenweg der p38-MAP-Kinase und der Proteinkinase C untersuchte, zeigten Shanmugam et al. nach der Exposition mit erhöhten Glukosekonzentrationen zu Endothelzellen und Monozyten, dass es zu einer Steigerung der TNF- α -Konzentration kam und diese über die p38-MAP-Kinase und die Proteinkinase C vermittelt wurde⁴⁰. Devaraj et al. wiesen die Proteinkinase-C-vermittelte Zytokinproduktion der PBMC nach⁴¹. Dasu et al.⁴³ zeigten wie Shanmugam et al. eine Induktion der Zytokinfreisetzung von IL-1 nach Exposition mit steigender Glukosekonzentration, eine Aktivierung der Proteinkinase C-alpha durch Phosphorylierung von p38 sowie eine Stimulation von NF- κ b durch Phosphorylierung von ERK 1/2. Dies führte insgesamt zu einer Zunahme der IL-1- β -mRNA-Expression. Weitere beobachtete Mechanismen waren die durch NADPH-Oxidase vermittelte p-47-phox-Aktivierung von NF- κ b und die resultierende Verstärkung der IL-1 β -Sekretion⁴³. Igarashi et al.³⁹ zeigten unter diabetischen Bedingungen in VSMC (vascular smooth muscle cells) der Rattenaorta eine gesteigerte MAP-Kinase-Aktivierung, hauptsächlich der ERK und p38-MAP-Kinase³⁹. Im Rahmen einer Studie von CAPD-Patienten (continuous ambulatory peritoneal dialysis) konnte weiterhin in von diesen Patienten kultivierten humanen HPMC (peritonealen Mesothelialzellen), die konstant einer erhöhten Glukosekonzentration aufgrund des Peritonealdialysates ausgesetzt sind, eine Aktivierung des p38-MAP-Kinase-Signalwegs nachgewiesen werden⁸⁸.

In einem Tierversuch konnten Sherry et al. die LPS-induzierte TNF- α -Produktion peritonealer Makrophagen durch Blockierung der p38-MAP-Kinase bei diabetischen Mäusen inhibieren⁸⁹. Durch Applikation eines p38-Inhibitors wurde in humanen Lungenmakrophagen und Monozyten die Expression von TNF- α und teilweise von IL-8 unterdrückt⁹⁰. Hervorzuheben ist weiterhin die unterschiedliche Auswirkung auf Aktivierung, Inhibition und Expression der einzelnen Zytokine sowie MAP-Kinasen, abhängig vom Zelltypus. So wurden z. B. zwischen Makrophagen oder Monozyten Unterschiede in der Aktivierung der MAP-Kinasen und der resultierenden Zytokinexpression gemessen⁹¹.

Lee et al.⁹² zeigten, dass die Substanz SB203580 (MAPK-Inhibitor) spezifisch an p38-MAPK bindet und diese inaktiviert. Yamakawa et al. bestätigten diese Ergebnisse, indem sie die durch LPS getriggerte Phosphorylierung von p42/44-MAPK und p38-MAPK nachwiesen und belegten, dass die Zugabe von SB 203580 zu VSMC von Ratten (vascular smooth muscle cells) die Induktion von TNF- α hemmt⁹³.

Die Addition von Glukose und dem p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB 203580 zu PBMC erbrachte in den vorliegenden Experimenten eine deutliche Abnahme der Zytokinproduktion im Vergleich zu den nur mit Glukose inkubierten Proben. Dies konnte sowohl für IL-1 β als auch für IL-6 nachgewiesen werden. Die Zugabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin zu den Zellen versetzt mit Glukose zeigte im Vergleich zu den nur mit Glukose inkubierten Proben ebenfalls eine Verminderung der Zytokinfreisetzung. Dieser Abfall war jedoch nicht so ausgeprägt wie nach Blockade von p38. Immunhistochemisch zeigten wir in unserer Arbeit eine Intensitätssteigerung der p38-MAP-Kinasenexpression durch LPS-Stimulation und steigende Glukosekonzentration mit konsekutiver Erhöhung der Osmolarität. Dies belegt die zentrale Rolle der MAP-Kinase p38 in der Zytokinexpression und die aus ihrer Inhibition resultierende deutlich ausgeprägte Einschränkung der Zytokinsynthese. Nishikawa et al. wiesen weiterhin eine erhöhte Aktivität der Proteinkinase C unter hyperglykämischen Bedingungen nach⁹⁴. Weitere *in vivo*- sowie *in vitro*-Studien bestätigten die Aktivierung der Proteinkinase C unter diabetischen Bedingungen^{95, 96}. Eine weitere Studie von Williams et al. untersuchte mögliche pathogenetische Mechanismen glomerulärer hämodynamischer Veränderungen, die eine Rolle in der Entwicklung diabetischer Glomerulopathien spielen. Sie zeigten anhand von kultivierten glomerulären Mesangialzellen eine Erhöhung der Proteinkinase-C-Aktivität, die spezifisch durch die Zugabe von Glukose erzielt wurde. Eine Addition von L-Glukose und/oder Mannitol konnte dies in der beschriebenen Versuchsreihe nicht hervorrufen⁹⁷.

Der Zusatz eines Proteinkinase-C-beta-Inhibitors in unserer Versuchsreihe konnte keine Abnahme der Zytokinausscheidung in humanen PBMC nachweisen: Die Zytokinproduktion wurde nicht unterdrückt, sondern eher nach der Beimischung von Glukose verstärkt. Ohne die zusätzliche Zugabe von Glukose zeigten sich kaum Unterschiede zu den Proben, die mit oder ohne Zusatz des Proteinkinase-C-Inhibitors inkubiert wurden.

Nicht nur unter hyperglykämischen Bedingungen konnte eine Aktivierung der p38-MAP-Kinase nachgewiesen werden. In Studien, die durch die Ergänzung von Substanzen wie Mannitol oder NaCl-Lösungen Veränderungen der Osmolarität erzielten, wurde ebenfalls eine Aktivierung der MAP-Kinasen beobachtet. In kultivierten Säugetierzellen war ein Anstieg der p38-MAP-Kinase nach Veränderung des osmotischen Milieus nachweisbar⁸¹. Die Induktion von hyperosmotischem Stress zur Evaluierung der mRNA-Expression sowie zur Quantifizierung der Synthese von proinflammatorischen Zytokinen frisch isolierter humaner peripherer Blutmonozyten *in vitro* wurde von Shapiro und Dinarello⁵² untersucht. Hier zeigte sich unter isoosmolaren/euglykämischen Bedingungen kein Nachweis einer gesteigerten IL-8-

Genexpression. Ganz im Gegensatz hierzu kam es im hyperosmolaren Milieu (330–410 mOsmol/l), bedingt durch die Zugabe von NaCl-Lösungen zum Kulturmedium, zu einer Erhöhung der Genexpression für IL-1 α , IL-1 β und IL-8 der humanen PBMC. Zu berücksichtigen ist weiterhin, dass Standard-Zellkulturmedien verglichen mit humanem Plasma (280–295 mOsmol/l) eher hyperosmotisch (305 mOsmol/l) sind. Dieser Versuch demonstriert auch, dass eine Reduktion der Osmolarität in das normophysiologische Milieu mit einer 50%igen Abnahme der IL-8-Synthese einhergeht⁵². Veränderungen des osmotischen Milieus in hypoosmotischen Bereichen führen auch zu einer Änderung der MAP-Kinasen-Aktivität⁹⁸. Beobachtungen an renalen Epithelialzellen ergaben, dass durch eine Umstellung der Osmolarität in hypoosmolare Bereiche eine rasche, maximal sechs Minuten andauernde Zellschwellung folgt, die nach wenigen Minuten durch RVD (regulatory volume decrease) bereits reversibel ist, und dass es somit kurzzeitig zu einer Modulation der Membranoberflächenspannung kommt. Dies führt u. a. zu Änderungen von Zelloberflächenrezeptoren^{98, 99} sowie zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden, wie p38, EKR 1/2. Die Senkung der physiologischen Iso-Osmolarität von 225 mOsmol/l auf hypoosmolare Werte um 135 mOsmol/l führte in einer Studie von Taruno et al.¹⁰⁰ zu einer Erhöhung der Phosphorylierung und somit zum Anstieg der MAP-Kinase-Aktivität von ERK 1/2 und JNK/SAPK, aber nicht von p38¹⁰⁰. Sadoshima et al. zeigten, dass nicht die Hyperosmolarität allein, sondern auch eine Hypotonizität im Zellmedium zu einer Anregung von ERK und JNK, aber nicht zur Aktivierung der p38-MAP-Kinase in Kardiomyozyten führte¹⁰¹.

Chlorpromazin – ein Phenothiazid-Derivat – generiert ähnlich wie hypoosmolare Bedingungen eine Zellmembrandeformation durch Zellschwellung. Niisato et al. machten sich diesen Effekt in ihren Versuchen zunutze und zeigten, dass es wie bei der Senkung der physiologischen Osmolarität unter der Gabe von Chlorpromazin zu einer Aktivierung von MAP-Kinasen, auch der p38-MAP-Kinase, durch Zellschwellung und nicht unbedingt direkt durch eine Änderung der Osmolarität kam¹⁰².

In diesem Kontext wurden in unserem Versuchsaufbau frisch isolierte humane PBMC mit Harnstoff inkubiert. Durch die Beimischung von Harnstoff zu den PBMC kam es zu einer Steigerung der Osmolarität, jedoch zu kaum einer Veränderung der Tonizität. Hieraus resultierte eine signifikante dosisabhängige Zytokinproduktion. Zusammenfassend besteht hier also ein ausgeprägter Unterschied zwischen Hypotonizität und hyperosmolarem Stress, wobei es über beide Wege zu einer Aktivierung der Signalkaskaden durch direkte und indirekte Mechanismen, wie u. a. Zellschwellung, kommen kann.

4.5 Klinische Studien zur intensivierten Insulintherapie

Wie bereits erwähnt, belegte eine große prospektive randomisierte Studie bereits 2001 mit insgesamt 1.548 erwachsenen Patienten einer chirurgischen Intensivstation, dass eine intensivierete Insulintherapie (IIT) mit Zielblutzuckerwerten zwischen 80 und 110 mg/dl im Vergleich zu einer konventionellen Insulintherapie mit Zielblutzuckerwerten zwischen 180 und 200 mg/dl die Mortalität während des Intensivstationsaufenthalts von 8 % auf 4,6 % senkte und die Mortalität von 20,2 % auf 10,6 % bei einer Verweildauer länger als fünf Tage¹⁰³.

In der NICE-Sugar-Studie wurden zwischen 2004 und 2008 insgesamt 6.104 Patienten eingeschlossen und randomisiert: 3.054 erhielten eine engmaschige Blutzuckerkontrolle mit Blutzuckerzielwerten zwischen 81 und 108 mg/dl (4,5–6,0 mmol/l) und 3.050 eine konventionelle Blutzuckerkontrolle mit Blutzuckerzielwerten ≤ 180 mg/dl ($\leq 8,0$ mmol/l)¹⁰⁴. Zusammenfassend zeigte sich in dieser randomisierten multizentrischen Interventionsstudie, im Gegensatz zu den ursprünglichen Erstbeobachtungen der Arbeitsgruppe um van den Berghe et al.^{29, 78}, nicht nur ein fehlender Vorteil für die engmaschige Glukosekontrolle und Einstellung (häufig als intensivierete Insulintherapie bezeichnet), sondern sogar eine Erhöhung der Mortalität (siehe Tabelle 4.1).

Studie & Autor	Patientenanzahl	Ergebnis
Van den Berghe et al. (2001) ²⁹	1.548 Patienten	IIT verbessert Mortalität und Morbidität
Van den Berghe et al. (2006) ³⁴	1.200 Patienten	IIT verbessert Morbidität, Mortalität wird nicht signifikant verbessert
NICE Sugar (2009) ¹⁰⁴	6.104 Patienten	IIT erhöht Mortalität

Tabelle 4.1: Studienübersicht der Intensivierten Insulintherapie (IIT) mit Auswirkung auf Morbidität und Mortalität

Hierbei stellt sich die Frage, warum es bei dieser Patientenpopulation zu einer Erhöhung der Mortalität kam. Die Hauptrisiken und - Nebenwirkungen der Insulintherapie sind Hypoglykämien. Diese traten in der NICE-Sugar-Studie unter der IIT bei 206 von 3.016 Patienten (6,8 %) und unter konventioneller Blutzuckereinstellung bei 15 von 3.014 Patienten (0,5 %) auf. Schwerste Hypoglykämien wurden definiert als Blutzuckerwerte unter 40 mg/dl. Folgen hiervon sind Störungen des ZNS, hypoxische Hirnschädigungen, Schlaganfälle und Herzrhythmusstörungen. Symptome der Hypoglykämie können bei intensivtherapiepflichtigen

Patienten teilweise aufgrund der Begleiterkrankungen oder Behandlungen, wie Analgosedation oder maschinelle Beatmung, maskiert sein. In der Originalarbeit von van den Berghe et al. waren insgesamt 39 Patienten hypoglykämisch und nur zwei von ihnen (5,2 %) zeigten physiologisch korrespondierende Zeichen einer Hypoglykämie wie Schwitzen und Agitiertheit²⁹. Keiner der Patienten hatte neurologische Defizite. In der Folgestudie aus dem Jahr 2006 hatten 111 Patienten (18,7 %) unter der IIT je eine Episode von hypoglykämischen Beschwerden, jedoch ohne schädliche Folgen³⁴. Patienten mit akutem Nierenversagen und Dialysepflicht zeigten in dieser Gruppe einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung von Hypoglykämien. Am ehesten wurde hierfür der zu 30 % stattfindende Insulinmetabolismus über die Niere verantwortlich gemacht.

In einer Metaanalyse von Griesdale et al. wurden 26 Studien mit insgesamt 13.567 Patienten untersucht. In dieser Analyse zeigte sich ein erhöhtes Risiko für Hypoglykämien; weiterhin konnten die positiven Auswirkungen der IIT auf die Mortalität internistischer intensivpflichtiger Patienten nicht nachvollzogen werden¹⁰⁵. Arabi et al. beobachteten bei einer Patientenpopulation von 523 Patienten, dass durch die intensivierete Insulintherapie mit Zielblutzuckerwerten zwischen 80 und 110 mg/dl vs. konventionelle Intensivtherapie mit Zielblutzuckerwerten zwischen 180 und 200 mg/dl häufiger Hypoglykämien eintraten, und folgerten daraus, dass deshalb die IIT nicht zu empfehlen sei¹⁰⁶. Zusammenfassend sind die kontroversen Daten der NICE-Sugar-Studie am ehesten als Folge der durch die intensivierete Insulintherapie verursachten Hypoglykämien und deren schädlichen Auswirkungen zu erklären.

4.6 Oxidativer Burst und Phagozytose – die nicht adaptive Immunabwehr der Granulozyten und Makrophagen

Die Funktion der neutrophilen Granulozyten lässt sich im Ablauf der Infektionsabwehr in folgende Schritte einteilen: Adhäsion am Endothel, chemotaktische Migration, Phagozytose, Bereitstellung abbauender Enzyme sowie reaktiver Sauerstoff-Verbindungen (reactive oxygen species, ROS) und Abtöten von in den Körper eingedrungenen Erregern¹⁰⁷.

Der Prozess der Phagozytose beinhaltet folgende Schritte:

1. Erkennen und Anhaften der Phagozyten am jeweiligen Mikroorganismus,
2. Aufnahme in eine Vakuole (Phagozytose) sowie
3. Abtöten und Abbau der phagozytierten Substanz.

Die Adhäsion der Leukozyten an den Endothelzellen gelingt erst durch die Expression der Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche, die durch bakterielles Antigen, wie Lipopolysaccharide, oder durch Zytokine, wie IL-1 α , IL-1 β oder TNF- α , angeregt werden^{108, 109}. Das Erkennen der mikrobiellen molekularen Muster auf den Zelloberflächen der Erreger geschieht durch EPRR (endocytic pattern-recognition receptors), die für den gegebenen Zelltyp, z. B. Makrophagen, spezifisch sind, oder über Toll-like-Rezeptoren (TLR)¹¹⁰. Werden durch die EPRR bakterielle Antigenmuster erkannt, folgt die Endozytose und Aufnahme der Bakterien in die Lysosomen. Die resultierenden Proteinreste werden prozessiert und mittels MHC-Molekülen an der Oberfläche des Makrophagen an T-Zellen präsentiert. Die TLR lösen über einen anderen Mechanismus die Immunantwort auf die Erkennung der pathogenen Antigene aus. Die Aktivierung von TLR-4 durch Lipopolysaccharide stimuliert die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und weiteren kostimulatorischen Molekülen, die für die Immunantwort essenziell sind.

Wie in unseren Versuchen gezeigt, kommt es durch eine Erhöhung der Osmolarität sowie unter hyperglykämischen Bedingungen zu einer vermehrten Zytokinfreisetzung. Unter hyperglykämischen Konditionen sowie bei inadäquat eingestelltem Diabetes mellitus scheint es auch zu Veränderungen der phagozytotischen Aktivität zu kommen. Klinische Studien zeigen eine direkte Korrelation zwischen der diabetologischen Einstellung und der phagozytotischen Aktivität von polymorphonukleären (PMN) Zellen. Erhöhte Blutzuckerwerte von schlecht eingestellten Diabetikern gehen mit einer deutlich eingeschränkten phagozytotischen Aktivität einher¹¹¹. Diese Ergebnisse werden in diversen Tiermodellen bestätigt. In der bereits erwähnten Studie an einem Hasenmodell⁵⁰, die sich in einer iatrogenen diabetischen Stoffwechsellage befanden und eine 30%ige Körperoberflächenverbrennung aufwiesen, erfolgte eine Randomisierung in zwei Gruppen: in eine mit Insulinbehandlung zur Erhaltung der Euglykämie und eine ohne Insulintherapie mit hyperglykämischer Stoffwechsellage als Vergleichsgruppe. Nicht nur die Zytokinsynthese wurde hier untersucht, sondern auch Teile des angeborenen Immunsystems. In der normoglykämischen Gruppe verbesserte sich die phagozytotische Aktivität um 150 %. Der oxidative Burst verdoppelte sich. Nielson und Hindson⁶¹ konnten in ihren *in vitro* Untersuchungen eine Abnahme der PMN-Funktion gesunder Probanden bereits nach einer 30-minütigen Inkubation in einem Glukosemedium größer als 200 mg/dl (= 11 mmol/l und 56 mmol/l) nachweisen. Hierbei war die Wahl des Stimulus ohne Auswirkungen auf die phagozytotische Aktivität. Die Wahl des Mediums jedoch, unabhängig ob L- oder D-Glukose, spielte keine Rolle, da beide gleichwertige Ergebnisse erzielten. Nur die Zugabe von Mannitol zu den Proben konnte keine Veränderungen der phagozytotischen

Aktivität herbeiführen. Auch hier wurde, wie in der Studie von Marhoeffer¹¹¹, als mögliche Ursache eine Glykolisierung der Proteine aufgrund der hyperglykämischen Bedingungen gesehen. Liberek et al.⁶³ wiesen jedoch auch durch die Modifikation der Osmolarität mit anderen Substanzen als Glukose einen erheblichen Effekt auf Änderungen der phagozytotischen Aktivität nach.

Dementsprechend verdeutlichen weitere Studien^{49, 112, 113}, dass nicht nur die Hyperglykämie an sich, sondern auch die Veränderungen der Osmolarität einen Einfluss auf die PMN-Funktion ausüben.

Unsere Daten zeigten unter hyperglykämischen Bedingungen bei der Addition von 500 mg/dl Glukose entsprechend einer Osmolarität von 309 mOsmol/l eine statistisch signifikante Abnahme der phagozytotischen Aktivität. Dieser Effekt konnte ebenfalls durch Beimischung von 500 mg/dl Mannitol entsprechend derselben Osmolarität von 309 mOsmol/l erzielt werden. Hervorzuheben ist, dass es bei der Zugabe von Glukose einen deutlichen Trend zu einer stärkeren Depression der phagozytotischen Aktivität gab. Die Untersuchungen des oxidativen Bursts ergaben ähnliche Ergebnisse. Durch Zusatz von 500 mg/dl Glukose (= 309 mOsmol/l) konnte ein statistisch signifikanter Abfall des oxidativen Bursts nachgewiesen werden, sowohl unter dem primären Stimulus PMA als auch nach der Inkubation mit *E. coli*. Die Zugabe von 500 mg/dl Mannitol (309 mOsmol/l) ergab erneut eine Reduktion des oxidativen Bursts, wiederum geringer als bei der isolierten Beimischung von Glukose.

Zusammenfassend lässt sich aus unseren Daten schließen, dass analog zu unseren Beobachtungen der Zytokinproduktion die Einschränkung der Phagozytose sowie des oxidativen Bursts einerseits durch eine Erhöhung der Osmolarität bedingt wird, andererseits zu einem geringeren Anteil jedoch direkt durch die Glukoseaddition vermittelt ist. Diese Effekte scheinen zum größeren Teil durch Osmolaritätsveränderungen zustande zu kommen und zu einem geringen Teil aus glukosespezifischen Mechanismen zu resultieren.

Die Abnahme der phagozytotischen Aktivität sowie des oxidativen Bursts kann unterschiedliche Ursachen haben. Beispielsweise können die intrazelluläre Destruktion und die Phagozytose partiell zumindest durch die Formation von Sauerstoffverbindungen und Radikalen (reactive oxygen species = ROS) gekennzeichnet sein. Hyperglykämische Stoffwechsellagen wurden in mehreren Studien mit einer Veränderung der ROS-Formation in Verbindung gebracht¹¹⁴⁻¹¹⁶. Alexiewicz et al.¹¹⁷ zeigten eine Korrelation zwischen der intrazellulären Kalziumkonzentration mit der Ausprägung der Hyperglykämie und konsekutiven Folgen für die Phagozytoseaktivität. Für sie besteht ein glukoseinduzierter Kalziuminflux in die Zelle, der mit einer Erhöhung der

Proteinkinase C einhergeht und somit aufgrund des akuten intrazellulären Kalziumanstiegs zu einer Depletion von Adenosintriphosphat führt, der für die Konformationsänderung der Zelle während der Phagozytose nötig ist^{52, 118}. In der Literatur zeigen sich diskrepante Ergebnisse^{60, 67} bezüglich der Auswirkung von Glukose und Insulin auf die PMN-Funktion im Vergleich zu unseren Ergebnissen. Dies lässt sich u. a. den unterschiedlichen Untersuchungsmethoden zuschreiben, wie der Untersuchung der ROS-Formation und -Produktion.

Es bleibt weiterhin zu hinterfragen, ob die klinischen Studien und unsere *in vitro* Daten bezüglich der Auswirkungen der hyperglykämischen und hyperosmolaren Bedingungen auf den klinischen Verlauf der intensivierten Insulintherapie ausreichend Aufschluss geben. Walrand et al.⁶⁷ führten an acht gesunden Probanden einen *in vivo*-Versuch durch, bei dem durch Insulin- und Glukoseinfusionen über vier Stunden erhöhte Insulinkonzentrationen im Blut und euglykämische Bedingungen hervorgerufen wurden. Unter den Insulininfusionen zeigte sich eine Erhöhung der Phagozytoseaktivität und somit ein insgesamt günstigerer Effekt als die direkte Auswirkung der Insulingabe.

In einer weiteren Studie⁶⁰ mit zwölf gesunden Probanden, die sich einem vierstündigen hyperglykämischen oder hyperinsulinämischen, euglykämischen *in vivo* Infusionsversuch unterzogen, zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der PMN-Funktion. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte die relativ kurze Infusionszeit bzw. kurze Hyperglykämiedauer von vier Stunden sein, da diese nicht ausreichend für eine ausgeprägte Änderung der PMN-Funktion ist. In unseren Kinetikversuchen zeigte sich erst ein signifikanter Anstieg der Zytokinfreisetzung nach bereits dreistündiger Präinkubation sowie nachfolgender sechsstündiger Inkubation. Eine Plateauphase der Zytokinproduktion wurde nach zwölf Stunden erreicht. Eine Messung der Zytokinkonzentration erfolgte deswegen in unserem Versuchsaufbau erst nach 24 Stunden Inkubation.

4.7 Kritikpunkte der Methodik

Ein Kritikpunkt an der Durchführung dieser Untersuchungen ist u. a. der Gebrauch hoher Konzentrationen von Glukose zwischen 500 und 1.000 mg/dl für den Nachweis von Veränderungen in der Zytokinproduktion. Es handelt sich in unserer Versuchsreihe um *in vitro* Daten, wobei in diesem Kontext hohe Konzentrationen tolerabel sind, um einen erzielten Effekt eindeutig nachweisen zu können. Die initial unphysiologisch scheinenden hohen

Glukosekonzentrationen sind umgerechnet in die entsprechende Osmolarität durchaus nachvollziehbare Werte in unserem klinischen Alltag.

Aufgrund der Versuchsbedingungen, der erhöhten Osmolarität und Glukosekonzentrationen ließe sich eine Beeinflussung der Zellvitalität und entsprechenden Zytokinproduktion postulieren. Die Zytokinfreisetzung wäre somit als Folge eines toxischen Zelluntergangs zu werten. Zytokine werden nicht gespeichert, sondern durch die bereits beschriebenen Pathomechanismen nach vorausgegangenem Stimulus neu synthetisiert^{119-121,85}. Zytokin-freisetzende Zellen sind somit insofern als vitale Zellen einzuschätzen, als sie in der Lage sind, die energieintensiven Prozesse der Proteinbiosynthese aufrechtzuerhalten.

Des Weiteren zeigen sich in dieser Arbeit eine Variabilität der unterschiedlichen IL-1 β -und IL-6-Ausschüttungen unter den gleichen Versuchsbedingungen und -durchführungen. Mögliche Ursachen hierfür wären Unterschiede der einzelnen gesunden Spender in Bezug auf Gender, Hormone, tageszeitliche Abnahmeunterschiede sowie die im Laufe der Versuchsreihe genutzten LPS-Chargen.

Die unterschiedlichsten Zelllinien von Menschen und Tieren führten unter erhöhten Glukosekonzentrationen zu einer nachweislichen Erhöhung der Zytokinproduktion. Die Mehrzahl der Studien nutzte Zelllinien. Nur die Minderheit der Daten wurde an frisch isolierten humanen Immunzellen generiert. Unsere Daten wurden von frisch isolierten humanen PBMC gewonnen, die aufgrund der Vermeidung der künstlichen Kondition der Zellkultur und der Lagerung qualitativ überlegen sind und aufgrund ihrer Differenzierung geeignete Rückschlüsse auf die *in vivo* Situation erlauben.

Die immunhistochemische Untersuchung evaluierte nur die p38-Färbung zweier Probanden nach Glukoseexposition und LPS-Stimulation. Die Beteiligung der p38-MAP-Kinase in der Zytokinexpression wurde in den Versuchen durch die Zugabe des MAP-Kinase-Inhibitors SB 203580 gezeigt. Für eine ergänzende qualitative Aussage ist somit auch die Immunhistochemie von nur zwei Probanden tolerabel.

Ohne Zugabe des Lipopolysaccharids konnte die Zytokinfreisetzung nicht ausreichend quantifiziert werden. Es wurde ein zweiter Stimulus nach der Zugabe von Glukose oder den anderen hyperosmolaren Medien als Sensitizer benötigt. Schindler et al. zufolge setzen nicht stimulierte PBMC keine nachweislich messbaren Konzentrationen von IL-1 β frei. Nach LPS-Stimulation konnten signifikante Konzentrationen von IL- β nachgewiesen werden. Ähnliche Effekte konnten

durch Addition des Komplementfaktors rC5a erzielt werden, der als Sensitizer bzw. Induktor für die Zytokinfreisetzung von IL-1 fungierte¹²².

In unserem Versuchsaufbau erfolgte die Isolation frischer humaner PBMC von gesunden Normprobanden sowie eine konsekutive *in vitro* Stimulation mit Lipopolysaccharid und Kultivierung der Zellen. Auf die Untersuchung frisch isolierter PBMC septischer Patienten wurde aus folgendem Grund verzichtet: In von uns durchgeführten Vorversuchen an septischen Patienten der internistischen Intensivstation zeigten sich bereits in der Isolation der PBMC erhebliche Schwankungen an Zellmenge und -konzentrationen. Nach Stimulation mit LPS sowie Messung der Zytokinkonzentrationen ergaben sich äußerst diskrepante Befunde. Der Zeitpunkt bzw. die Dauer der septischen Episode konnte zum Zeitpunkt der Blutuntersuchung bei den meisten Patienten nicht genau festgestellt werden und somit ergaben sich auch hier bereits erste Abweichungen. Der Schweregrad sowie der Fokus des septischen Geschehens waren unterschiedlich. Einige Patienten befanden sich bereits in der Phase der möglichen Immunparalyse. Die Zytokinbestimmung war unter den *in vivo* Bedingungen vielen Störfaktoren ausgesetzt (Erreger, Dauer der Sepsis, Medikamentenwirkungen, -nebenwirkung etc.). Daher wäre eine Untersuchung der hyperglykämischen, hyperosmotischen Bedingungen schwierig zu interpretieren gewesen, dies gilt auch für die Erfassung der Auswirkungen von Insulin auf die Veränderungen der Inflammation und Immunantwort, wie die Induktion von pro- oder antiinflammatorischen Zytokinen, die Produktion von Akute-Phase-Proteinen, die Freisetzung sekundärer Immunmediatoren, die Veränderungen der Neutrophilenfunktion und Phagozytoseaktivität. Eine Untersuchung der septischen Patientenpopulation wäre anhand von hohen Einschlusszahlen ($n > 100$) mit einem sehr hohen Aufwand verbunden, jedoch prinzipiell möglich.

4.8 Mögliche Auswirkungen der glukoseassoziierten Zytokinmodulation bei anderen Krankheitsbildern

4.8.1 Die Rolle der Hyperglykämie bei Arteriosklerose und koronaren Gefäßerkrankungen

Die Veränderung der Osmolarität ist ein entscheidender Mechanismus und hat Konsequenzen weit über die Auswirkung der Glukose im Sepsismodel hinaus. Sie ist für alle Umstände von Bedeutung, in denen Hyperosmolarität herrscht, wie z. B. bei akutem Nierenversagen und somit

Notwendigkeit der Einleitung einer frühen Dialysebehandlung aus diesen Gründen, der Arteriosklerose, koronaren Gefäßerkrankung oder z. B. in der parenteralen Ernährung.

Die vorliegenden Daten führen im klinischen Alltag zu einem besseren Verständnis der Auswirkungen erhöhter Blutzuckerwerte auf assoziierte medizinische Komplikationen durch die Erkenntnisse der gesteigerten Zytokinfreisetzung und reduzierten phagozytotischen Aktivität unter hyperglykämischen Bedingungen.

Patienten mit Diabetes mellitus haben ein erhöhtes arteriosklerotisches und kardiovaskuläres Risiko im Vergleich zu Patienten ohne Diabetes mellitus¹²³⁻¹²⁷. Nach akuten Myokardinfarkten zeigte sich ein erhöhtes Risiko für die Sterblichkeit stationär behandelter Patienten mit und ohne Diabetes mellitus^{71, 73, 128, 129}. In einer Studie der Arbeitsgruppe um Malmberg et al. wurde eine Verbesserung des Langzeitüberlebens auf 3,5 Jahre durch eine Insulin-Glukose-Infusion mit subkutanen Insulin-Applikationen zur Einstellung des Blutzuckers bei diabetischen Patienten nach Myokardinfarkt nachgewiesen sowie eine hiermit verbundene Senkung der Mortalität um 11 % verzeichnet⁷². Malmberg et al. belegten in der DIAGMI-Studie (Diabetes mellitus Insulin-Glucose Infusion in Acute Myocardial Infarction), dass die Langzeitmortalität von Patienten durch intensivierete Insulintherapie mit Blutzuckerzielwerten kleiner als 200 mg/dl um 30 % in einem Zeitraum von 3,5 Jahren gesenkt werden konnte. Dies traf auch auf Patienten mit erhöhten Blutzuckerwerten und erhöhtem HbA1c zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme zu²⁷.

Nach herzchirurgischen Interventionen wiesen Patienten mit hyperglykämischen Blutzuckerwerten eine erhöhte Inzidenz an postoperativen Komplikationen nach¹³⁰. Lazar et al. untersuchten in einer prospektiven Studie die Auswirkungen einer engmaschigen Glukoseeinstellung. Sie konnten in der Patientengruppe mit der niedrigeren Blutzuckereinstellung von 138 ± 4 mg/dl vs. höhere Blutzuckereinstellung von 260 ± 6 mg/dl eine Abnahme der Häufigkeit von Vorhofflimmern, Ischämien und Wundinfektionen sowie eine Verbesserung der Überlebensrate um zwei Jahre nach kardiochirurgischer Intervention nachweisen¹³¹. In einer weiteren Studie zeigten sich nach akuten Myokardinfarkten und folgendem Nachweis von Stress-Hyperglykämien erhöhte Inflammationslevel durch verstärkte Expression von T-Zellen und zytotoxischen T-Zellen, die mit einem reduzierten Überleben der oben genannten Patientenpopulation assoziiert wurde⁷³. Hierbei ergab sich eine Assoziation zwischen akuten Myokardinfarkten, erhöhten Blutzuckerspiegeln und einer Erhöhung von C-reaktivem Protein (CRP) und dem IL-8-Spiegel im Serum⁷³.

In einem Rattenmodell wurde nach intravenöser Applikation von LPS und somit Induktion einer systemischen Entzündung die Herzfunktion untersucht¹³². Zu verzeichnen war eine ausgeprägte Verschlechterung der kardialen Funktion unter hyperglykämischen Blutzuckerwerten, die sich durch die Zugabe von Insulin deutlich besserte¹³². Kado et al. zeigten eine Assoziation zwischen hyperglykämischen Bedingungen bei Diabetikern mit erhöhten zirkulierenden Spiegeln von IL-6 und folglich einer Erhöhung von Fibrinogen, das ein bekannter Risikofaktor der Arteriosklerose ist¹³³.

4.8.2 Einfluss der Hyperglykämie auf das akute Nierenversagen

Unter klinischen Bedingungen spielt die Hyperglykämie insbesondere in Hinblick auf die Entwicklung eines akuten Nierenversagens bei Intensivpatienten sowie bei der chronischen Niereninsuffizienz eine bedeutende Rolle. Wie bereits in der Studie von Vanhorebeek et al. erwähnt, zeigte sich unter hyperglykämischen Bedingungen im Tiermodell eine Einschränkung der Nierenfunktion. Die Applikation von Verbrennungswunden bei Hasen simulierte in ihrer Studie ein Krankheitsbild intensivpflichtiger Patienten. Die Hyperglykämie verursachte in diesem Versuchsmodell erhöhte Plasmakreatininspiegel und morphologische Veränderungen an der Niere. Die Kontrollgruppe hingegen zeigte unter normoglykämischen Bedingungen eine geringere Ausprägung der Schädigung als Hasen unter hyperglykämischen Bedingungen⁴⁶.

Die Entwicklung eines akuten Nierenversagens bei intensivpflichtigen Patienten ist eine häufig gesehene Komplikation in der Intensivmedizin. Patienten mit akutem oder chronischem Nierenversagen haben erhöhte Morbiditäts- und Mortalitätsraten^{134, 135, 136-138}. Etwa 13 % der amerikanischen Bevölkerung leiden unter einer chronischen Niereninsuffizienz¹³⁹. In Deutschland beträgt die Anzahl der hämodialysepflichtigen Patienten 67.000, etwa 24.000 Patienten sind nierentransplantiert¹⁴⁰.

Akutes Nierenversagen aggraviert das Stadium der intensivpflichtigen Patienten und führt dadurch zu einer Erhöhung der Mortalität¹⁴¹⁻¹⁴³. In einer großen multinationalen Studie hatten 5,7 % der intensivpflichtigen Patienten ein akutes Nierenversagen (ANV). Verteilt über verschiedene Zentren betrifft dies zwischen 1,4–25,9 % der Patienten auf Intensivstationen^{141, 144}. Die Mortalität von Patienten mit akutem Nierenversagen, die ein Nierenersatzverfahren benötigen und an einer Sepsis leiden, liegt in den USA bei 70 %¹⁴⁵. Durch die RIFLE-Klassifikation (**R**isk of renal dysfunction, **I**njury to the kidney, **F**ailure of kidney function, **L**oss of kidney function and **E**nd-stage kidney disease) zur Stadieneinteilung des akuten

Nierenversagens¹⁴³ zeigte sich eine Korrelation zwischen Krankenhausmortalität, Dauer des Intensivstationsaufenthalts und des Gesamtkrankenhausaufenthalts¹⁴⁶.

Zwei Komponenten scheinen von essenzieller Bedeutung für die eingeschränkte glomeruläre Filtrationsrate bei akutem Nierenversagen zu sein:

- die vaskuläre Komponente im Rahmen der Vasokonstriktion und des endothelialen Schadens und
- die tubuläre Komponente, bestehend aus dem Tubuluszellschaden und der tubulären Obstruktion.

Insbesondere der proximale Tubulus scheint sehr empfindlich gegenüber dem mitochondrialen Schaden zu sein¹⁴⁷.

Die Gabe von Insulin zeigte in einigen Studien einen protektiven Effekt auf das vaskuläre Endothelium und auf (hepatische) Mitochondrien von intensivpflichtigen Patienten^{148, 149}. Die Hälfte aller Patienten mit Nierenversagen hat eine gestörte Glukosetoleranz¹⁵⁰. Krinsley et al. zeigten eine Reduktion des akuten Nierenversagens von 75 % unter IIT⁷⁶. Eine Analyse von zwei großen randomisierten Studien mit insgesamt 2.707 Patienten zeigte, dass die IIT mit dem Ziel der Normoglykämie die Nierenfunktion von intensivpflichtigen Patienten schützt. Die Inzidenz des akuten Nierenversagens wurde von 7,6 % auf 4,5 % sowie die Anwendung von Nierenersatzverfahren von 7,4 % auf 4 % gesenkt⁷⁷.

Eine intensivierete Insulintherapie ist nicht nur im klinischen Kontext von intensivpflichtigen Patienten relevant, sondern auch für Patienten mit akutem oder chronischem Nierenversagen⁷⁵.

5 Zusammenfassung

Eine Hyperglykämie ist bei unterschiedlichen Patientengruppen mit einer schlechteren Prognose verbunden. Erhöhte Glukosewerte korrelieren bei diabetischen, neurologischen, nephrologischen und kardiologischen Erkrankungen mit einer gesteigerten Morbidität und Mortalität. Auch bei schwer erkrankten, intensivpflichtigen Patienten ist eine Hyperglykämie ein unabhängiger Risikofaktor für Mortalität. Demgegenüber senkt eine intensivierete Insulintherapie (IIT) die Mortalität von Intensivpatienten.

Diese klinischen Beobachtungen führten im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung folgender Fragestellungen:

- Führen hyperglykämische Bedingungen *in vitro* zu einer Modulation des Immunsystems bzw. zu veränderten Zellfunktionen von PBMC mit möglicherweise gesteigerter Prädisposition für Infektionen?
- Führt die Zugabe von Glukose zum PBMC-Zellkulturmedium zu einer Alteration der Zytokinausschüttung von IL-1 β und IL-6?
- Übt Insulin durch direkte und sekundäre Mechanismen im Rahmen einer Erniedrigung des Glukosespiegels einen protektiven Effekt auf die Immunantwort aus?
- Welche Auswirkung hat die Veränderung der Osmolarität auf die Immunantwort?
- Beeinflusst die Addition weiterer hyperosmotischer Substanzen, wie Mannitol, Harnstoff oder das Enantiomer der Glukose, die L-Glukose, zum Zellmedium die Zytokinproduktion ?
- Welche Bedeutung hat der Zusatz aus Glukose und anderen hyperosmotisch wirksamen Substanzen, wie Mannitol, auf die Phagozytose und den oxidativen Burst?
- Welche Pathomechanismen liegen der Zytokinfreisetzung unter hyperglykämischen und hyperosmolaren Bedingungen zugrunde und welche Funktionen haben hierbei die MAP-Kinasen?

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass erhöhte Glukosekonzentrationen die LPS-stimulierte Zytokinproduktion von humanen PBMC dosisabhängig signifikant steigern. Die Zugabe des Enantiomers L-Glukose bewirkt eine Zunahme der Zytokinfreisetzung für IL-1 β und IL-6, allerdings weniger ausgeprägt als bei der physiologisch vorkommenden D-Glukose. Die Resultate dieser Arbeit belegen, dass die Aktivierung der p38-MAP-Kinase unter hyperglykämischen Bedingungen für die Steuerung der Zytokinfreisetzung verantwortlich ist. Insulin

allein führt lediglich zu einer signifikanten Steigerung der IL-1 β -, nicht jedoch der IL-6-Produktion, und dies ausschließlich bei höchster Insulinkonzentration. Die Kombination von Insulin mit Glukose im Zellmedium reduziert die Produktion beider Zytokine signifikant verglichen mit Glukose allein. Dieser Effekt weist einen protektiven Einfluss von Insulin auf die Entzündungsreaktion im Rahmen einer reduzierten proinflammatorischen Zytokinausschüttung durch Senkung der Hyperglykämie im Zellmilieu nach.

Weitere Versuche belegten, dass die Zugabe von Mannitol und Harnstoff zum Zellmedium ebenfalls eine Steigerung der Zytokinproduktion hervorruft. Es zeigte sich allerdings, dass bei gleicher Osmolarität im Zellmedium, abhängig von der jeweils hinzugefügten Substanz, die Zytokinfreisetzung unterschiedlich ausgeprägt war. Die Zytokinausschüttung erzielte unter Glukosezugabe im Vergleich zu den anderen Substanzen die höchste Wirkung. Gemeinsamer Mechanismus für die zytokinsteigernden Effekte scheint also die Steigerung der Osmolarität zu sein.

In Vollblutproben bewirkt die Addition von Glukose eine Suppression der Phagozytose und des oxidativen Bursts. Dieser Effekt war nicht spezifisch für Glukose, da die Zugabe von Mannitol ebenfalls zu einer Abnahme der Phagozytose und des oxidativen Bursts führt, wenn auch in geringerem Ausmaß als nach Glukosebeimischung. Demzufolge bewirken hyperglykämische Bedingungen eine weitere Einschränkung der Immunantwort.

Eine Übertragung dieser Laborergebnisse auf die klinische Situation von Intensivpatienten lässt folgende Hypothese zu: Hyperglykämie führt bei intensivpflichtigen Patienten zu einer Stimulation von IL-1 β und IL-6 sowie zu einer Erniedrigung der Phagozytose und des oxidativen Bursts. Dies könnte zu einer gesteigerten Prädisposition für Infektionen in dieser Patientenpopulation führen. Unter der IIT bzw. bei Aufrechterhaltung der Normoglykämie im Patientenblut kommt es zu einer Verbesserung bzw. Normalisierung der Immunantwort. Die Daten dieser Arbeit bieten eine Erklärung für die Assoziation zwischen IIT und Mortalität bei intensivpflichtigen Patienten.

6 Literatur

1. Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia--United States, 1979-1987. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1990;39:31-4.
2. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England Journal of Medicine* 2003;348:1546-54.
3. From the Centers for Disease Control. Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia--United States, 1979-1987. *Jama* 1990;263:937-8.
4. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007;33:606-18.
5. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine* 2001;29:1303-10.
6. Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Critical care medicine* 1989;17:389-93.
7. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101:1644-55.
8. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Critical care medicine* 2003;31:1250-6.
9. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Critical care medicine* 2004;32:858-68.
10. Brunkhorst FM, Engel C, Ragaller M, et al. Practice and perception--a nationwide survey of therapy habits in sepsis. *Critical care medicine* 2008;36:2719-25.
11. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340:448-54.
12. Mortensen RF. C-reactive protein, inflammation, and innate immunity. *Immunol Res* 2001;24:163-76.
13. Szalai AJ, Agrawal A, Greenhough TJ, Volanakis JE. C-reactive protein: structural biology and host defense function. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:265-70.

14. Wheeler AP, Bernard GR. Treating Patients with Severe Sepsis. *The New England Journal of Medicine* 1999;340:207-14.
15. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
16. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406:782-7.
17. Hume DA, Underhill DM, Sweet MJ, Ozinsky AO, Liew FY, Aderem A. Macrophages exposed continuously to lipopolysaccharide and other agonists that act via toll-like receptors exhibit a sustained and additive activation state. *BMC Immunol* 2001;2:11.
18. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008;42:145-51.
19. Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997;112:321S-9S.
20. Dinarello CA. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol* 1989;44:153-205.
21. Gustot T. Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory response. *Curr Opin Crit Care* 2011;17:153-9.
22. Volk HD, Reinke P, Krausch D, et al. Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med* 1996;22 Suppl 4:S474-81.
23. Lang JD, Matute-Bello G. Lymphocytes, apoptosis and sepsis: making the jump from mice to humans. *Crit Care* 2009;13:109.
24. Weber SU, Schewe JC, Lehmann LE, et al. Induction of Bim and Bid gene expression during accelerated apoptosis in severe sepsis. *Crit Care* 2008;12:R128.
25. Docke WD, Randow F, Syrbe U, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997;3:678-81.
26. Finney S, Zekveld C, Elia A, Evans T. Glucose control and mortality in the critically ill patients. *JAMA* 2003;290:2041-7.
27. Malmberg K, Norhammar A, Wedel H, Rydén L. Glycometabolic State at Admission: Important Risk Marker of Mortality in Conventionally Treated Patients With Diabetes Mellitus and Acute Mortality in Infarction: Long-Term Results From the Diabetes and Insulin-Glucose Infusion in Acute Myocardial Infarction (DIGAMI) Study. *Circulation* 1999;99:2626-32.
28. Umpierrez GE, Isaacs SD, Barzagan N, You X, Thaler LM, Kitabchi AE. Hyperglycemia: an independent marker of in-hospital mortality in patients with undiagnosed diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002;87:978-82.

29. Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, et al. Intensive Insulin Therapy in Critically Ill Patients. *The New England Journal of Medicine* 2001;345:1359-67.
30. Wasmuth H, Kunz D, Graf J, et al. Hyperglycemia at admission to the intensive care unit is associated with elevated serum concentrations of interleukin-6 and reduced ex vivo secretion of tumor necrosis factor-alpha. *Critical Care Med* 2004;32:1109-14.
31. Rovlias A, Kotsou S. The influence of hyperglycemia on neurological outcome in patients with severe head injury. *Neurosurgery* 2000;46:335-42; discussion 42-3.
32. Jeremitsky E, Omert LA, Dunham CM, Wilberger J, Rodriguez A. The impact of hyperglycemia on patients with severe brain injury. *J Trauma* 2005;58:47-50.
33. Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Pathak P, Gerstein HC. Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: a systematic overview. *Stroke* 2001;32:2426-32.
34. Van den Berghe G, Wilmer A, Hermans G, et al. Intensive Insulin Therpay in the Medical ICU. *The New England Journal of Medicine* 2006;354:449-61.
35. Hansen TK, Thiel S, Wouters PJ, Christiansen JS, Van den Berghe G. Intensive insulin therapy exerts antiinflammatory effects in critically ill patients and counteracts the adverse effect of low mannose-binding lectin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1082-8.
36. Turina M, Fry DE, Polk HC, Jr. Acute hyperglycemia and the innate immune system: Clinical, cellular, and molecular aspects. *Critical care medicine* 2005;33:1624-33.
37. Krogh-Madsen R, Moller K, Dela F, Kronborg G, Jauffred S, Pedersen BK. Effect of hyperglycemia and hyperinsulinemia on the response of IL-6, TNF-alpha and FFAs to low-dose endotoxemia in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E766-72.
38. Esposito K, Nappo F, Marfella R, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* 2002;106:2067-72.
39. Igarashi M, Hirata A, Yamaguchi H, et al. Characterization of Activation of MAP Kinase Superfamily in Vasculature from Diabetic Rats. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2007;14:235-44.
40. Shanmugam N, Reddy M, Guha M, Natarajan R. High Glucose-Induced Expression of Proinflammatory Cytokine and Chemokine Genes in Monocytic Cells. *Diabetes* 2003;52:1256-64.
41. Devaraj S, Venugopal SK, Singh U, Jialal I. Hyperglycemia Induces Monocytic Release of Interleukin-6 via Induction of Protein Kinase C-alpha and beta. *Diabetes* 2005;54:85-91.

42. Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F. Glucose-dependent interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes *in vitro*. *Diabetes* 1996;45:954-9.
43. Dasu M, Devaraj S, Jialal I. High glucose induces IL-1 β expression in human monocytes: mechanistic insights. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:E337-E46.
44. Wen Y, Gu J, Li S-L, Reddy MA, Natarajan R, Nadler JL. Elevated Glucose and Diabetes Promote Interleukin-12 Cytokine Gene Expression in Mouse Macrophages. *Endocrinology* 2006;147:2518-25.
45. Ling P-R, Smith RJ, Bistrain BR. Acute effects of hyperglycemia and hyperinsulinemia on hepatic oxidative stress and the systemic inflammatory response in rats. *Critical care medicine* 2007;35:555-60.
46. Vanhorebeek I, Gunst J, Ellger B, et al. Hyperglycemic kidney damage in an animal model of prolonged critical illness. *Kidney Int* 2009;76:512-20.
47. Shapiro L, Dinarello C. Osmotic regulation of cytokine synthesis *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:12230-4.
48. Németh ZH, Deitch EA, Szabó C, Hasko G. Hyperosmotic Stress Induces Nuclear Factor- κ B Activation and Interleukin-8 Production in Human Intestinal Epithelial Cells. *American Journal of Pathology* 2002;161:987-96.
49. Zhang S, Yanaka A, Tauchi M, et al. Hyperosmotic stress enhances interleukin-1 β expression in *Helicobacter pylori*-infected murine gastric epithelial cells *in vitro*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2006;21:759-66.
50. Weekers F, Giuletti A-P, Michalaki M, et al. Metabolic, Endocrine, and Immune Effects of Stress Hyperglycemia in a Rabbit Model of Prolonged Critical Illness. *Endocrinology* 2003;144:5329-38.
51. Brix-Christensen V, Andersen SK, Andersen R, et al. Acute Hyperinsulinemia Restrains Endotoxin-induced Systemic Inflammatory Response
An Experimental Study in a Porcine Model. *Anesthesiology* 2004;100:861-70.
52. Shapiro L, Dinarello CA. Hyperosmotic Stress as a Stimulant for Proinflammatory Cytokine Production. *Experimental Cell Reserach* 1997;231:354-62.
53. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002;397:342-4.
54. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999;93:1464-76.
55. Tian WN, Braunstein LD, Pang J, et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *J Biol Chem* 1998;273:10609-17.

56. Zhang Z, Apse K, Pang J, Stanton RC. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 2000;275:40042-7.
57. Xu Y, Osborne BW, Stanton RC. Diabetes causes inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase via activation of PKA, which contributes to oxidative stress in rat kidney cortex. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F1040-7.
58. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 2008;371:64-74.
59. Gallacher SJ, Thomson G, Fraser WD, Fisher BM, Gemmell CG, MacCuish AC. Neutrophil bactericidal function in diabetes mellitus: evidence for association with blood glucose control. *Diabet Med* 1995;12:916-20.
60. Fejfarová V, Jirkovská A, Lupínková J, et al. Effect of acute hyperglycemia and/or hyperinsulinemia on polymorphonuclear functions in healthy subjects. *Metabolism Clinical and Experimental* 2006;55:811-18.
61. Nielson CP, Hindson DA. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst by elevated glucose concentrations in vitro. *Diabetes* 1989;38:1031-5.
62. Cendoroglo M, Sundaram S, Jaber BL, Pereira BJ. Effect of glucose concentration, osmolality, and sterilization process of peritoneal dialysis fluids on cytokine production by peripheral blood mononuclear cells and polymorphonuclear cell functions in vitro. *Am J Kidney Dis* 1998;31:273-82.
63. Liberek T, Topley N, Jorres A, Coles GA, Gahl GM, Williams JD. Peritoneal dialysis fluid inhibition of phagocyte function: effects of osmolality and glucose concentration. *J Am Soc Nephrol* 1993;3:1508-15.
64. Perner A, Nielsen SE, Rask-Madsen J. High glucose impairs superoxide production from isolated blood neutrophils. *Intensive Care Med* 2003;29:642-5.
65. Zhang Z, Liew CW, Handy DE, et al. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and beta-cell apoptosis. *Faseb J* 2010;24:1497-505.
66. Ha H, Kim KH. Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes Res Clin Pract* 1999;45:147-51.
67. Walrand S, Guillet C, Boirie Y, Vasson M-P. In vivo evidences that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions. *Journal of Leukocyte Biology* 2004;76:1104-10.

68. Walrand S, Guillet C, Boirie Y, Vasson M-P. Insulin Differentially Regulates Monocyte and Polymorphonuclear Neutrophil Functions in Healthy Young and Elderly Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006;91:2738-48.
69. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 2008;31 Suppl 2:S170-80.
70. Wen-Kui Y, Wei-Qin L, Ning L, Jie-Shou L. Influence of acute hyperglycemia in human sepsis on inflammatory cytokine and counterregulatory hormone concentrations. *World J Gastroenterology* 2003;9:1824-7.
71. Malmberg K, Ryden L. Myocardial infarction in patients with diabetes mellitus. *Eur Heart J* 1988;9:259-64.
72. Malmberg K. Prospective randomised study of intensive insulin treatment on long term survival after acute myocardial infarction in patients with diabetes mellitus. *BMJ* 1997;314:1512-5.
73. Marfella R, Siniscalchi M, Esposito K, et al. Effects of Stress Hyperglycemia on Acute Myocardial Infarction. *Diabetes Care* 2003;26:3129-35.
74. Capes S, Hunt D, Malmberg K, Gerstein H. Stress hyperglycemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes: a systemic overview. *Lancet* 2000;355:773-8.
75. Ritchie-McLean S, Kirwan C, Levy JB. Is There a Role for Intensive Insulin Therapy in Patients With Kidney Disease? *American Journal of Kidney Diseases* 2007;50:371-8.
76. Krinsley JS. Effect of an intensive glucose management protocol on the mortality of critically ill adult patients. *Mayo Clin Proc* 2004;79:992-1000.
77. Schetz M, Vanhorebeek I, Wouters PJ, Wilmer A, Van den Berghe G. Tight blood glucose control is renoprotective in critically ill patients. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:571-8.
78. Van den Berghe G, Wouters PJ, Kesteloot K, Hilleman DE. Analysis of healthcare resource utilization with intensive insulin therapy in critically ill patients. *Critical care medicine* 2006;34:612-6.
79. Goldberg PA, Siegel MD, Sherwin RS, et al. Implementation of a safe and effective insulin infusion protocol in a medical intensive care unit. *Diabetes Care* 2004;27:461-7.
80. Taubert D, Rosenkranz A, Berkels R, Roesen R, Schömig E. Acute effects of glucose and insulin on vascular endothelium. *Diabetologia* 2004;47:2059-71.
81. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994;265:808-11.

82. Hatanaka E, Shimomi FM, Curi R, Campa A. Sodium chloride inhibits cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated human neutrophils and mononuclear cells. *Shock* 2007;27:32-5.
83. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007;26:3100-12.
84. Zhong J, Kyriakis JM. Dissection of a signaling pathway by which pathogen-associated molecular patterns recruit the JNK and p38 MAPKs and trigger cytokine release. *J Biol Chem* 2007;282:24246-54.
85. Rao KM. MAP kinase activation in macrophages. *J Leukoc Biol* 2001;69:3-10.
86. Sheikh-Hamad D, Gustin MC. MAP kinases and the adaptive response to hypertonicity: functional preservation from yeast to mammals. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F1102-10.
87. Galcheva-Gargova Z, Derijard B, Wu IH, Davis RJ. An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science* 1994;265:806-8.
88. Xu Z-G, Kim KS, Park HC, et al. High glucose activates the p38 MAPK pathway in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Kidney International* 2003;63:958-68.
89. Sherry CL, O'Connor JC, Kramer JM, Freund GG. Augmented Lipopolysaccharide-Induced TNF-alpha Production by Peritoneal Macrophages in Type 2 Diabetic Mice is Dependent on Elevated Glucose and Requires p38 MAPK. *The Journal of Immunology* 2007;178:663-70.
90. Smith S, Fenwick P, Nicholson A, et al. Inhibitory effect of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors on cytokine release from human macrophages. *British Journal of Pharmacology* 2006;149:393-404.
91. Barbour SE, Wong C, Rabah D, Kapur A, Carter AD. Mature macrophage cell lines exhibit variable responses to LPS. *Mol Immunol* 1998;35:977-87.
92. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994;372:739-46.
93. Yamakawa T, Eguchi S, Matumoto T, et al. Intracellular Signaling in Rat Cultured Vascular Smooth Muscle Cells: Roles of Nuclear Factor-kB and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase on Tumor Necrosis Factor-a Production. *Endocrinology* 1999;140:3562-72.
94. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787-90.
95. Craven PA, DeRubertis FR. Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats. Possible mediation by glucose. *J Clin Invest* 1989;83:1667-75.

96. Noh H, King GL. The role of protein kinase C activation in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2007;S49-53.
97. Williams B, Schrier RW. Glucose-induced protein kinase C activity regulates arachidonic acid release and eicosanoid production by cultured glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1993;92:2889-96.
98. Chiri S, Bogliolo S, Ehrenfeld J, Ciapa B. Activation of extracellular signal-regulated kinase ERK after hypo-osmotic stress in renal epithelial A6 cells. *Biochim Biophys Acta* 2004;1664:224-9.
99. Rosette C, Karin M. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 1996;274:1194-7.
100. Taruno A, Niisato N, Marunaka Y. Hypotonicity stimulates renal epithelial sodium transport by activating JNK via receptor tyrosine kinases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:128-38.
101. Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S. Tyrosine kinase activation is an immediate and essential step in hypotonic cell swelling-induced ERK activation and c-fos gene expression in cardiac myocytes. *Embo J* 1996;15:5535-46.
102. Niisato N, Post M, Van Driessche W, Marunaka Y. Cell swelling activates stress-activated protein kinases, p38 MAP kinase and JNK, in renal epithelial A6 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266:547-50.
103. Van den Berghe G, Mesotten D, Vanhorebeek I. Intensive insulin therapy in the intensive care unit. *Cmaj* 2009;180:799-800.
104. Finfer S, Chittock DR, Su SY, et al. Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. *N Engl J Med* 2009;360:1283-97.
105. Griesdale DE, de Souza RJ, van Dam RM, et al. Intensive insulin therapy and mortality among critically ill patients: a meta-analysis including NICE-SUGAR study data. *Cmaj* 2009;180:821-7.
106. Arabi YM, Dabbagh OC, Tamim HM, et al. Intensive versus conventional insulin therapy: a randomized controlled trial in medical and surgical critically ill patients. *Critical care medicine* 2008;36:3190-7.
107. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000;109:33-44.
108. Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *Faseb J* 1994;8:504-12.

109. Sellak H, Franzini E, Hakim J, Pasquier C. Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood* 1994;83:2669-77.
110. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003;102:2660-9.
111. Marhoffer W, Stein M, Maeser E, Federlin K. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care* 1992;15:256-60.
112. Cuschieri J, Gourlay D, Garcia I, Jelacic S, Maier RV. Hypertonic Preconditioning Inhibits Macrophage Responsiveness to Endotoxin. *The Journal of Immunology* 2002;168:1389-96.
113. Gual P, Marchand-Brustel YL, Tanti J. Positive and negative regulation of glucose uptake by hyperosmotic stress. *Diabetes Metab* 2003;29:566-75.
114. Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M, Matsuoka TA. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2010;2010:453892.
115. Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:343-53.
116. Yu T, Jhun BS, Yoon Y. High glucose stimulation increases reactive oxygen species production through the calcium and MAP kinase-mediated activation of mitochondrial fission. *Antioxid Redox Signal* 2010.
117. Alexiewicz JM, Kumar D, Smogorzewski M, Klin M, Massry SG. Polymorphonuclear leukocytes in non-insulin-dependent diabetes mellitus: abnormalities in metabolism and function. *Ann Intern Med* 1995;123:919-24.
118. Fiebich BL, Schleicher S, Butcher RD, Craig A, Lieb K. The Neuropeptide Substance P Activates p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Resulting in IL-6 Expression Independently from NF-kB. *The Journal of Immunology* 2000;165:5606-11.
119. Blackwell T, Christman J. Sepsis and cytokines: current status. *British Journal of Anaesthesia* 1996;77:110-7.
120. Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:253-65.
121. Dinarello C. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991;77:1627-52.
122. Schindler R, Gelfand JA, Dinarello CA. Recombinant C5a stimulates transcription rather than translation of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor: translational signal provided by lipopolysaccharide or IL-1 itself. *Blood* 1990;76:1631-8.
123. Mazzone T, Chait A, Plutzky J. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *Lancet* 2008;371:1800-9.

124. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *Bmj* 2000;321:405-12.
125. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998;352:837-53.
126. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993;329:977-86.
127. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20.
128. Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Gerstein HC. Stress hyperglycaemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes: a systematic overview. *Lancet* 2000;355:773-8.
129. Abbud ZA, Shindler DM, Wilson AC, Kostis JB. Effect of diabetes mellitus on short- and long-term mortality rates of patients with acute myocardial infarction: a statewide study. Myocardial Infarction Data Acquisition System Study Group. *Am Heart J* 1995;130:51-8.
130. Vanhorebeek I, Ingels C, Van den Berghe G. Intensive insulin therapy in high-risk cardiac surgery patients: evidence from the Leuven randomized study. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2006;18:309-16.
131. Lazar HL, Chipkin SR, Fitzgerald CA, Bao Y, Cabral H, Apstein CS. Tight glycemic control in diabetic coronary artery bypass graft patients improves perioperative outcomes and decreases recurrent ischemic events. *Circulation* 2004;109:1497-502.
132. Hagiwara S, Iwasaka H, Hasegawa A, Asai N, Noguchi T. Hyperglycemia contributes to cardiac dysfunction in a lipopolysaccharide-induced systemic inflammation model. *Critical care medicine* 2009;37:2223-7.
133. Kado S, Nagase T, Nagata N. Circulating levels of interleukin-6, its soluble receptor and interleukin-6/interleukin-6 receptor complexes in patients with type 2 diabetes mellitus. *Aceta Diabetol* 1999;36:67-72.
134. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet* 2005;365:417-30.
135. Wan L, Bellomo R, Di Giantomasso D, Ronco C. The pathogenesis of septic acute renal failure. *Curr Opin Crit Care* 2003;9:496-502.
136. Cerda J, Lameire N, Eggers P, et al. Epidemiology of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:881-6.

137. Uchino S. The epidemiology of acute renal failure in the world. *Curr Opin Crit Care* 2006;12:538-43.
138. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. The changing epidemiology of acute renal failure. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006;2:364-77.
139. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* 2007;298:2038-47.
140. Frei U. S-HH-J. Nierenersatztherapie in Deutschland; 2005.
141. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *Jama* 2005;294:813-8.
142. Oppert M, Engel C, Brunkhorst FM, et al. Acute renal failure in patients with severe sepsis and septic shock--a significant independent risk factor for mortality: results from the German Prevalence Study. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:904-9.
143. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 2004;8:R204-12.
144. Joannidis M, Metnitz PG. Epidemiology and natural history of acute renal failure in the ICU. *Crit Care Clin* 2005;21:239-49.
145. Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med* 2004;351:159-69.
146. Hoste EA, Clermont G, Kersten A, et al. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit Care* 2006;10:R73.
147. Hall AM, Unwin RJ. The not so 'mighty chondrion': emergence of renal diseases due to mitochondrial dysfunction. *Nephron Physiol* 2007;105:p1-10.
148. Langouche L, Vanhorebeek I, Vlasselaers D, et al. Intensive insulin therapy protects the endothelium of critically ill patients. *J Clin Invest* 2005;115:2277-86.
149. Vanhorebeek I, De Vos R, Mesotten D, Wouters PJ, De Wolf-Peeters C, Van den Berghe G. Protection of hepatocyte mitochondrial ultrastructure and function by strict blood glucose control with insulin in critically ill patients. *Lancet* 2005;365:53-9.
150. Mak RH, Mehls O. Insulin-like growth factor-I action on glucose transport in acute renal failure. *Am J Physiol* 1996;271:F440-5.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen Bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Ralf Schindler für die Bereitstellung dieser Arbeit. Danke für die Ruhe, Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und Geduld bei der Verwirklichung dieser Dissertation.

Besonderer Dank geht an Wolfgang Böhmerle, Christian Storm und Jan Hendrik Roosen für Ihre stetige Hilfsbereitschaft, gute Laune, Ermutigungen und Bereitschaft ohne Scheu jeglicher Mühen und Strapazen mir während der vergangenen Jahre zur Seite zu stehen.

Zudem möchte ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere bei Adelheid Wilde und Daniel Zickler für Ihre Hilfsbereitschaft während meiner Laborarbeit bedanken.

Ich danke meinen Eltern und meinen Geschwistern, Jill und Philip Otto, für Ihre Unterstützung und Zuneigung, die es mir ermöglicht haben mein Ziel zu erreichen.

8 Erklärung an Eides Statt

„Ich, Natalie Maureen Otto, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Auswirkung von Hyperglykämie und Osmolarität auf die Zytokinproduktion und Phagozytose von mononukleären Zellen aus peripherem Blut, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

9 Lebenslauf

“Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.”