

Aus dem Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Wirkung verschiedener Makrolid-Antibiotika im Vergleich zu
Quinupristin/Dalfopristin auf Endothelzellen *in vitro***

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Millrose

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Stahlmann
2. Prof. Dr. med. A. C. Rodloff
3. Priv.-Doz. Dr. R. Ignatius

Datum der Promotion: 18.09.2009

Ad astra per aspera

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Allgemeine Einführung..... | 1 |
| 1.2 Erythromycin..... | 3 |
| 1.2.1 Allgemeines | 3 |
| 1.2.2 Struktur | 3 |
| 1.2.3 Wirkmechanismus und antibakterielles Spektrum | 4 |
| 1.2.4 Pharmakokinetik | 5 |
| 1.2.5 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Interaktionen..... | 6 |
| 1.3 Clarithromycin | 7 |
| 1.3.1 Allgemeines | 7 |
| 1.3.2 Struktur | 7 |
| 1.3.3 Wirkungsmechanismus und antibakterielles Spektrum..... | 8 |
| 1.3.4 Pharmakokinetik | 8 |
| 1.3.5 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Interaktionen..... | 9 |
| 1.4 Azithromycin | 9 |
| 1.4.1 Allgemeines | 9 |
| 1.4.2 Struktur | 9 |
| 1.4.3 Wirkmechanismus und antibakterielles Spektrum | 10 |
| 1.4.4 Pharmakokinetik | 11 |
| 1.4.5 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Interaktionen..... | 11 |
| 1.5 Quinupristin/Dalfopristin..... | 12 |
| 1.5.1 Allgemeines | 12 |
| 1.5.2 Struktur | 12 |
| 1.5.3 Wirkmechanismus und antibakterielles Spektrum | 13 |
| 1.5.4 Pharmakokinetik | 14 |
| 1.5.5 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Interaktionen | 15 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1.6 | Oberflächenmoleküle auf Endothelzellen | 15 |
| 1.7 | Zelllinien..... | 18 |
| 1.7.1 | EA.hy 926: hybridisierte Endothelzelllinie | 18 |
| 1.7.2 | HUVEC..... | 18 |
| 1.7.3 | BALB/C 3T3-Fibroblasten | 19 |
| 1.8 | Fragestellungen der vorliegenden Arbeit..... | 19 |
| 2. | MATERIAL UND METHODEN | 21 |
| 2.1 | Apparative Ausstattung..... | 21 |
| 2.2 | Chemikalien | 22 |
| 2.3 | Antibiotika | 24 |
| 2.4 | Zelllinien..... | 26 |
| 2.5 | TNF-α (Tumornekrosefaktor-alpha)..... | 27 |
| 2.6 | Zellkultivierung | 27 |
| 2.6.1 | Ansatz und Supplementierung des Kulturmediums für EA.hy 926 Endothelzellen | 27 |
| 2.6.2 | Ansatz und Supplementierung des Kulturmediums für HUVEC | 28 |
| 2.6.3 | Ansatz und Supplementierung des Kulturmediums für 3T3-Fibroblasten | 28 |
| 2.6.4 | Kultivierung der EA.hy 926 Endothelzellen | 28 |
| 2.6.5 | Kultivierung der HUVECs | 29 |
| 2.6.6 | Kultivierung der 3T3-Fibroblasten | 29 |
| 2.7 | Subkultivierung („Passagieren“) der Zellen..... | 29 |
| 2.7.1 | Prinzip der Subkultivierung..... | 30 |
| 2.7.2 | Durchführung der Subkultivierung..... | 30 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.8 | Kryokonservierung der Zelllinien | 31 |
| 2.8.1 | Durchführung der Kryokonservierung | 31 |
| 2.8.2 | Auftauen der kryokonservierten Zellen | 31 |
| 2.9 | Bestimmung der Zellzahl..... | 32 |
| 2.9.1 | Prinzip der Zellzahlbestimmung..... | 32 |
| 2.9.2 | Durchführung der Zellzahlbestimmung..... | 32 |
| 2.10 | Sterile Versuchsbedingungen | 33 |
| 2.11 | Durchflusszytometrie | 33 |
| 2.11.1 | Antikörpermarkierung der Endothelzellen | 34 |
| 2.11.2 | Prinzip der durchflusszytometrischen Messung | 34 |
| 2.11.3 | Vorbereitung der Proben für die Antigenexpressionsbestimmung..... | 36 |
| 2.11.4 | Durchführung der Messung | 37 |
| 2.11.5 | Auswertung mit Winlist..... | 37 |
| 2.11.6 | Statistische Auswertung..... | 39 |
| 2.12 | Zytotoxizitäts-Analyse | 40 |
| 2.12.1 | Prinzip des MTT-Zytotoxizitätstest..... | 40 |
| 2.12.2 | MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromid)..... | 40 |
| 2.12.3 | Herstellung der Lösungen..... | 41 |
| 2.12.4 | Versuchsdurchführung..... | 41 |
| 2.12.5 | Prinzip der Datenauswertung..... | 44 |
| 2.13 | Immunhistochemie | 45 |
| 2.13.1 | Prinzip der Immunhistochemie..... | 45 |
| 2.13.2 | Beschichten der Deckgläschen mit L-Lysin | 45 |
| 2.13.3 | Herstellung von TBS | 45 |
| 2.13.4 | Versuchsdurchführung..... | 46 |

| | |
|---|------------|
| 3. ERGEBNISSE | 47 |
| 3.1 Immunhistochemie des vWF in den HUVEC | 47 |
| 3.1.1 Nachweis von vWF in HUVEC..... | 47 |
| 3.2 pH-Wertbestimmung der Antibiotikallösungen..... | 49 |
| 3.3 Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von Erythromycin, Clarithromycin und Azithromycin auf 3T3-Fibroblasten und EA.hy 926 Endothelzellen | 49 |
| 3.3.1 Adaption des MTT-Protokolls auf EA.hy 926 Endothelzellen | 50 |
| 3.3.2 Bestimmung der Zytotoxizität der Infusionslösungen..... | 52 |
| 3.3.3 Zusammenfassung – MTT-Zytotoxizitätstest mit Infusionslösungen | 57 |
| 3.3.4 Bestimmung der Zytotoxizität der Reinsubstanzen..... | 57 |
| 3.3.5 Zusammenfassung – MTT-Zytotoxizitätstest mit Reinsubstanzen | 63 |
| 3.4 Untersuchung der proinflammatorischen Oberflächenantigene durch die Durchflusszytometrie | 63 |
| 3.4.1 Anpassung des Modells an die klinische Infusionsapplikation | 64 |
| 3.4.2 Optimierung der Durchflusszytometrie | 69 |
| 3.4.3 Wirkung von Quinupristin/Dalfopristin auf proinflammatorische Oberflächenantigene | 73 |
| 3.4.4 Wirkung von Erythromycin auf proinflammatorische Oberflächenantigene | 75 |
| 3.4.5 Wirkung von Clarithromycin auf proinflammatorische Oberflächenantigene | 79 |
| 3.4.6 Wirkung von Azithromycin auf proinflammatorische Oberflächenantigene | 83 |
| 3.4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der Makrolid-Antibiotika | 86 |
| 4. DISKUSSION | 87 |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG | 103 |
| 6. LITERATURVERZEICHNIS | 106 |
| 7. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN..... | 117 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----------------------|--|----|
| <u>Abbildung 1:</u> | Strukturformel von Erythromycin..... | 4 |
| <u>Abbildung 2:</u> | Strukturformel von Clarithromycin..... | 7 |
| <u>Abbildung 3:</u> | Strukturformel von Azithromycin..... | 10 |
| <u>Abbildung 4:</u> | Strukturformel von Quinupristin..... | 13 |
| <u>Abbildung 5:</u> | Strukturformel von Dalfopristin..... | 13 |
| <u>Abbildung 6:</u> | Rekrutierung der Leukozyten aus dem Blutstrom in das entzündete Gewebe... | 16 |
| <u>Abbildung 7:</u> | Darstellung der intrinsischen Eigenschaften der einzelnen Zellen nach FSC und SSC und Darstellung der Fluoreszenz einer Kontrolle | 38 |
| <u>Abbildung 8:</u> | Erstellung des Gates R1 zur Markierung von 1% der Zellen, die eine Autofluoreszenz aufweisen | 38 |
| <u>Abbildung 9:</u> | CD 54 markierte Gruppe mit Gate R1 | 39 |
| <u>Abbildung 10:</u> | Pipettierschema für die Antibiotikabeschickung der 96-Well-Platte im MTT-Zytotoxizitätstest | 43 |
| <u>Abbildung 11:</u> | Immunhistochemische Färbung des vWF mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen vWF und dem sekundären Antikörper Cy-3 | 48 |
| <u>Abbildung 12:</u> | Immunhistochemische Färbung des Zellkerns mit dem DAPI-Farbstoff in HUVECs..... | 48 |
| <u>Abbildung 13:</u> | Schema einer 96-Well-Platte mit unterschiedlichen Einsaatdichten an EA.hy 926 Endothelzellen..... | 51 |
| <u>Abbildung 14:</u> | Optische Dichte der verschieden eingesäten Anfangszellzahlen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle | 52 |
| <u>Abbildung 15:</u> | Zytotoxizität von Azithromycin im MTT-Zytotoxizitätstest | 53 |
| <u>Abbildung 16:</u> | Zytotoxizität von Clarithromycin im MTT-Zytotoxizitätstest..... | 54 |
| <u>Abbildung 17:</u> | Zytotoxizität von Erythromycin im MTT-Zytotoxizitätstest | 56 |
| <u>Abbildung 18:</u> | Zytotoxizität von Methanol im MTT-Zytotoxizitätstest..... | 59 |
| <u>Abbildung 19:</u> | Zytotoxizität von Azithromycin als Reinsubstanz im MTT-Zytotoxizitätstest . | 60 |
| <u>Abbildung 20:</u> | Zytotoxizität von Erythromycin als Reinsubstanz im MTT-Zytotoxizitätstest . | 62 |
| <u>Abbildung 21:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach verschiedenen langen Inkubationszeiten | 65 |

| | | |
|----------------------|--|----|
| <u>Abbildung 22:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach verschieden langen Inkubationszeiten | 66 |
| <u>Abbildung 23:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach verschieden langen expositionsfreien Zeiten | 68 |
| <u>Abbildung 24:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für VCAM-1 nach verschieden langen PBS-Expositionszeiten..... | 70 |
| <u>Abbildung 25:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach Inkubation mit 10 mg/l TNF- α | 72 |
| <u>Abbildung 26:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 mit verschiedenen Konzentrationen für Quinupristin/Dalfopristin | 74 |
| <u>Abbildung 27:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 mit verschiedenen Konzentrationen für Erythromycin..... | 77 |
| <u>Abbildung 28:</u> | Prozentanteil der positiv markierten HUVECs für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 mit 800 mg/l Erythromycin..... | 78 |
| <u>Abbildung 29:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 mit verschiedenen Konzentrationen für Clarithromycin | 81 |
| <u>Abbildung 30:</u> | Prozentanteil der positiv markierten HUVECs für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 mit 200 mg/l Clarithromycin..... | 82 |
| <u>Abbildung 31:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 mit verschiedenen Konzentrationen für Azithromycin..... | 84 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|--------------------|---|----|
| <u>Tabelle 1:</u> | Monoklonale Antikörper | 34 |
| <u>Tabelle 2:</u> | Messwerte der optischen Dichte der mit Azithromycin inkubierten Zelllinien | 53 |
| <u>Tabelle 3:</u> | Kenngößen des zytotoxischen Potenzials von Azithromycin <i>in vitro</i> | 54 |
| <u>Tabelle 4:</u> | Messwerte der optischen Dichte der mit Clarithromycin inkubierten Zelllinien .. | 55 |
| <u>Tabelle 5:</u> | Kenngößen des zytotoxischen Potenzials von Clarithromycin <i>in vitro</i> | 55 |
| <u>Tabelle 6:</u> | Messwerte der optischen Dichte der mit Erythromycin inkubierten Zelllinien | 56 |
| <u>Tabelle 7:</u> | Kenngößen des zytotoxischen Potenzials von Erythromycin <i>in vitro</i> | 57 |
| <u>Tabelle 8:</u> | Messwerte der optischen Dichte der mit Methanol inkubierten Fibroblasten..... | 59 |
| <u>Tabelle 9:</u> | Kenngößen des zytotoxischen Potenzials von Methanol <i>in vitro</i> | 60 |
| <u>Tabelle 10:</u> | Messwerte der optischen Dichte der mit Azithromycin als Reinsubstanz inkubierten Fibroblasten | 61 |
| <u>Tabelle 11:</u> | Kenngößen des zytotoxischen Potenzials von Azithromycin als Reinsubstanz <i>in vitro</i> | 61 |
| <u>Tabelle 12:</u> | Messwerte der optischen Dichte der mit Erythromycin als Reinsubstanz inkubierten Fibroblasten | 62 |
| <u>Tabelle 13:</u> | Kenngößen des zytotoxischen Potenzials von Erythromycin als Reinsubstanz <i>in vitro</i> | 63 |
| <u>Tabelle 14:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach unterschiedlich langer Inkubationszeit..... | 65 |
| <u>Tabelle 15:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach unterschiedlich langer Inkubationszeit..... | 67 |
| <u>Tabelle 16:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach unterschiedlich langer expositions- freier Zeit | 68 |
| <u>Tabelle 17:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach verschieden langen PBS-Expositionszeiten | 71 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| <u>Tabelle 18:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach Inkubation mit 10 mg/l TNF- α | 72 |
| <u>Tabelle 19:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 mit verschiedenen Konzentrationen für Quinupristin/Dalfopristin..... | 75 |
| <u>Tabelle 20:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 mit verschiedenen Konzentrationen für Erythromycin | 77 |
| <u>Tabelle 21:</u> | Prozentanteil der positiv markierten HUVECs für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 mit 800 mg/l Erythromycin | 79 |
| <u>Tabelle 22:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 mit verschiedenen Konzentrationen für Clarithromycin..... | 81 |
| <u>Tabelle 23:</u> | Prozentanteil der positiv markierten HUVECs für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 mit 200 mg/l Clarithromycin..... | 83 |
| <u>Tabelle 24:</u> | Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 mit verschiedenen Konzentrationen für Azithromycin | 85 |
| <u>Tabelle 25:</u> | Prozentanteil der positiv markierten HUVEC Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 mit 400 mg/l Azithromycin | 85 |

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Im klinischen Alltag werden Lösungen von Medikamenten und andere Flüssigkeiten intravenös als Injektion oder als Infusion appliziert. Dies ist insbesondere indiziert bei einem schweren Krankheitsbild mit vitaler Bedrohung wie dem septischen Schock. Bei dieser Diagnose muss schnell ein wirksamer Spiegel des Medikaments im Blut erreicht werden (Ruokonen und Pettila, 2005, Micek et al., 2006, Shapiro et al., 2006). Auch Antibiotika müssen mitunter schnell intravenös verabreicht werden, um eine schnellere Beseitigung der Infektion bzw. eine Senkung der Mortalität zu erreichen (Houck et al., 2004). Für die stationäre Behandlung einer „community-acquired“ Pneumonie (CAP) empfehlen die Therapieleitlinien die intravenöse Behandlung mit einem Drittgenerations-Cephalosporin und einem Makrolid (Niederman et al., 2001, Chiu et al., 2002, Höffken et al., 2005). Weiterhin gibt es Medikamente, die nur parenteral verabreicht werden können, weil sie aus dem Magen-Darmtrakt nicht resorbiert bzw. dort inaktiviert werden würden.

Die intravenöse Infusion beinhaltet als mögliche Komplikation eine Inflammation der Gefäßwand – die Infusionsphlebitis (Monreal et al., 1999). Die vollständige Manifestation dieser Entzündung ist die Thrombophlebitis der superfizialen Vene. Die Symptome der Thrombophlebitis sind Schmerzen an der Infusionsstelle und dem Venenverlauf. Weiterhin ist ein geröteter, überwärmter und palpabler Strang zu beobachten, der mit einer ödematösen Schwellung des umliegenden Gewebes einhergehen kann (Hershey et al., 1984, Micek et al., 2006). Zur frühzeitigen Diagnosestellung gibt es verschiedene Skalen, die entwickelt wurden, um eine Einteilung des Schweregrades der Phlebitis zu ermöglichen. Zu diesen Skalen gehören unter anderem die „Maddox Skala“ und die „Baxter Skala“ (Maddox et al., 1977). Mit diesen Skalen als Hilfsmittel bei der täglichen Kontrolle des venösen Zugangs kann eine beginnende Thrombophlebitis frühzeitig erkannt und vermieden werden (Stonehouse und Butcher, 1996).

Das histologische Bild der infusionsbedingten Thrombophlebitis zeigt eine vermehrte Adhäsion von Leukozyten an das Endothel der Vene. Im weiteren Verlauf infiltrieren die Leukozyten die Venenwand und migrieren durch sie hindurch. In schweren Fällen sind auch die tiefen Schichten der Venenwand mitbetroffen (Woodhouse, 1980, Subrahmanyam, 1989).

Die Komplikation der Thrombophlebitis nach dem Legen eines peripheren Venenzugangs zur Infusion von Flüssigkeiten oder Medikamenten wird mit einer Inzidenz von 8% bis 35% angegeben (Myrianthefs et al., 2005). 1990 wurden „Guidelines of the Intravenous Nurse Society“ herausgegeben, nach denen die akzeptable Inzidenz der Thrombophlebitis unter 5% liegen sollte (Campbell, 1998a). Diese Schwelle wird jedoch in nahezu allen publizierten Studien überschritten (Tagalakakis et al., 2002). Die Thrombophlebitis kann zu weiteren Komplikationen führen, die es nötig machen, den peripheren Zugang neu zu legen, zusätzliche Medikamente zu applizieren und sogar den Krankenhausaufenthalt zu verlängern (Campbell, 1998b).

Es gibt viele verschiedene Faktoren, die das Risiko einer Thrombophlebitis, verursacht durch einen peripheren venösen Zugang, erhöhen (Tagalakakis et al., 2002).

Mögliche chemische Risikofaktoren für die Thrombophlebitis sind, neben den in der Infusionslösung befindlichen medikamentösen Substanzen, außerdem die Osmolarität (Kuwahara et al., 1998) und der pH-Wert der Lösung (Kuwahara et al., 1999). Patientenbezogene Risikofaktoren sind periphere Venen von „schlechter Qualität“, d. h. sehr dünne und schlecht zu erreichende Venen, weibliches Geschlecht (Maki und Ringer, 1991), Lebensalter (Lanbeck et al., 2002) und häufige Manipulation am Venenkatheter (Dibble et al., 1991). Weiterhin gibt es Hinweise, dass ein erhöhter Hämoglobinspiegel das Risiko für eine Thrombophlebitis erhöht, weil die Verdünnung der infundierten Lösung nicht im ausreichenden Maße gegeben ist (Monreal et al., 1999). Eine bakterielle Besiedlung der Katheterspitze erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Infusionsphlebitis (Collin et al., 1975). Bei den physikalischen Risikofaktoren ist das Hauptproblem die häufig zu lange Liegezeit des venösen Zugangs (Bregenzer et al., 1998, Cornely et al., 2002, Grune et al., 2004). Weitere Eigenschaften des peripheren venösen Zugangs, die zu Problemen führen können, sind das Kathetermaterial (Gaukroger et al., 1988) und der Durchmesser des Katheters (Khawaja et al., 1988, Scalley et al., 1992, Davies, 1998). Die Benutzung einer Infusionspumpe kann ebenfalls zu einem erhöhten Risiko einer Phlebitis beitragen (Curran et al., 2000). Wichtig zur Minimierung des Risikos ist eine zuverlässige Desinfektion der Infusionsstelle vor dem Legen des Venenkatheters (Maki et al., 1991).

Unter den Substanzen, die intravenös verabreicht werden, sind besonders einige Antibiotika mit einem proinflammatorischen Potenzial behaftet (Stahlmann und Lode, 1999, Kilic et al., 2006). In den meisten Studien zur infusionsbedingten Phlebitis werden die Antibiotika als eine homogene Gruppe betrachtet, obwohl es viele klinische Anhaltspunkte dafür gibt, dass sowohl zwischen den einzelnen Klassen als auch zwischen Substanzen einer Antibiotikagruppe große Unterschiede bestehen. Antibiotika mit einem hohen Risiko sind Isoxazolylpenicilline, Quinupristin/Dalfopristin, Cephalosporine und Makrolide (Stahlmann und Lode, 1999, Lanbeck et

al., 2002). Weitere Substanzen, die ein hohes Potenzial für die Entwicklung einer Phlebitis besitzen, sind unter anderem Amiodaron, Phenytoin und Diazepam.

Um die Mechanismen und Effekte der Schädigungen der applizierten Medikamente zu untersuchen, werden sowohl *in vivo*- als auch *in vitro*-Modelle verwendet (Lanbeck und Paulsen, 1995, Kilic et al., 2006).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Zusammenhänge zwischen der Infusion von bestimmten Antibiotika, nämlich der Makrolide Erythromycin, Clarithromycin, Azithromycin und des Streptogramins Quinupristin/Dalfopristin, und dem Risiko einer infusionsbedingten Thrombophlebitis zu ermitteln. Dafür wurden die Zytotoxizitätspotenziale der Antibiotika bestimmt. Weiterhin wurden die Reaktionen von bestimmten Oberflächenproteinen auf Endothelzellen, die in der Inflammationskaskade eine Rolle spielen, analysiert.

1.2 Erythromycin

1.2.1 Allgemeines

Erythromycin (z. B. Eryhexal 250[®], Erythrocin[®] i.v.) ist ein Antibiotikum und gehört zur Gruppe der Makrolide. Es wurde erstmals 1952 aus Stoffwechselprodukten des *Streptomyces erythreus* isoliert (McGuire et al., 1952). Heute wird zur antibakteriellen Therapie das Erythromycin-Isomer A verwendet.

Erythromycin wird in diversen Ester- und Salzformen zur oralen und parenteralen Applikation angeboten. Das Salz ist schlecht wasserlöslich und hat einen leicht bitteren Geschmack.

1.2.2 Struktur

Die Struktur des Erythromycin basiert auf einem 14-gliedrigen Laktoring (Erythronolid) mit zwei glykosidisch gebundenen Zuckern. Bei diesen Zuckern handelt es sich um einen Neutralzucker (Cladinose) in Position 3 und einen Aminozucker (Desosamin) in Position 5. Dadurch wird dem Molekül die basische Eigenschaft verliehen. Die funktionellen Gruppen an Position 6 und 9 begründen die Säureinstabilität des Erythromycins (siehe Abbildung 1). Antibiotisch wirksam ist ausschließlich die freie Base.

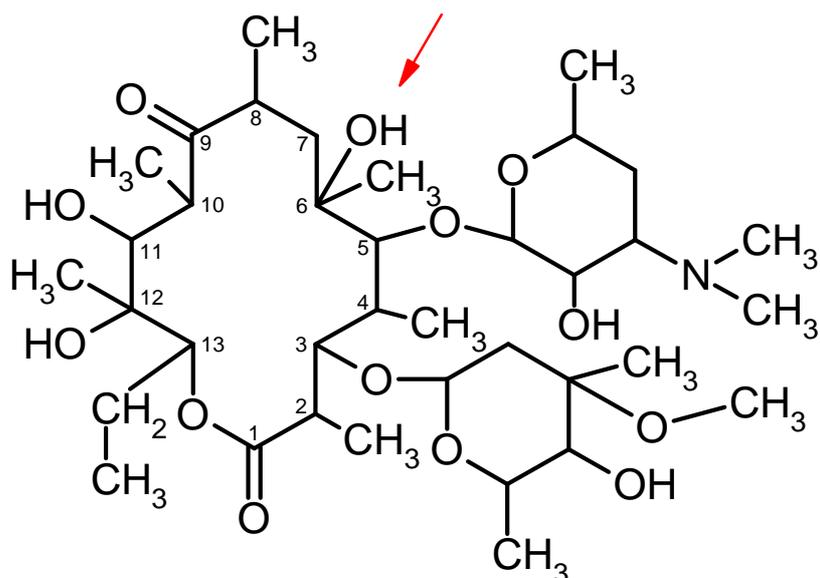


Abbildung 1: Strukturformel von Erythromycin; der Pfeil markiert die funktionelle Gruppe an Position 6, welche im Zusammenhang mit der Instabilität der Substanz im sauren Milieu steht.

1.2.3 Wirkmechanismus und antibakterielles Spektrum

Die Makrolid-Antibiotika greifen an der 50s-Untereinheit der 70s-Ribosomen von Bakterien an. Dort greifen sie in die Proteinbiosynthese während des dritten Schritts der Elongationsphase der Polypeptidkette am Ribosom ein. Sie binden an die Untereinheit und blockieren damit die Translokation der Peptidyl-t-RNA von der Akzeptorstelle zur Donorstelle. Die Proteinbiosynthese der Bakterien kommt zum Erliegen und in der Folge kommt es zur Bakteriostase.

Die Makrolide ähneln in ihrer Wirkungsweise am Ribosom den Antibiotika von Lincosamid-Typ (Lincomycin, Clindamycin). Es bestehen antagonistische Effekte in der Kombination, da die beiden Antibiotika funktionell miteinander interferieren. Weiterhin begründet der gleiche Angriffsmechanismus die weitgehende Parallelresistenz (Roberts, 2004).

Das Wirkungsspektrum von Erythromycin erstreckt sich primär auf grampositive Bakterien, wie Staphylokokken oder Streptokokken. Die Nocardien weisen eine natürliche Resistenz auf, da sie das Antibiotikum glykosylieren oder phosphorylieren (Yazawa et al., 1994). Weiterhin gehören zum Spektrum gramnegative Bakterien der Gattungen Neisseria, Haemophilus, Bordetella, Legionella und Brucella. Ebenfalls wirken Makrolide gegen einige Anaerobier. Außerdem sind schraubenförmige Bakterien, wie Treponemen, Borrelien und Campylobacter sowie zellwandlose Bakterien, wie Mykoplasmen, Chlamydien und Rickettsien, empfindlich. Nicht zum Wirkungsspektrum gehört die große Gruppe der Enterobakterien.

Das Spektrum beinhaltet somit häufige Erreger von bakteriellen Infektionen der Atemwege und sexuell übertragbaren Erkrankungen. Dies begründet auch den überwiegenden Anwendungsbereich von Erythromycin. Weiterhin wird Erythromycin als Ersatz für β -Laktamantibiotika bei einer bestehenden Penicillinallergie des Patienten, insbesondere auch in der Pädiatrie, eingesetzt (Guay, 1996).

Allerdings ist heute durch eine zunehmende Resistenz insbesondere gegenüber Erythromycin das Spektrum deutlich eingeschränkt. Die Resistenz wird bei Bakterien zum einen von einer RNA-Methylase (Erythromycin-Resistenz-Methylase = erm) vermittelt, die durch Methylierung der Bindungsstelle der Makrolide die Affinität stark vermindert. Zum anderen sorgen so genannte Effluxsysteme der Bakterien (Makrolid-Efflux = mef) für geringe Konzentrationen der Makrolide an der Bindungsstelle am bakteriellen Ribosom (Weisblum, 1995, Roberts et al., 1999, Luthje und Schwarz, 2007).

1.2.4 Pharmakokinetik

Makrolide werden in Deutschland hauptsächlich in oralen Applikationsformen eingesetzt. Für Erythromycin gibt es zusätzlich noch die Möglichkeit der intravenösen Applikation. Die i.v.-Gabe von 0,5 – 1,0 g als 1h-Infusion resultiert in einer maximalen Plasmakonzentration von etwa 20 – 30 mg/l. Direkt an der Infusionsstelle werden jedoch deutlich höhere Konzentrationen erreicht, da dort der Grad der Verdünnung durch den Blutfluss geringer ist als in den großen Hohlgefäßen.

Bei oraler Applikation wird durch die Säurelabilität nur eine geringe Bioverfügbarkeit erreicht, im Mittel sind es bei Erythromycin etwa 25%. Die Plasmaproteinbindung beträgt 60 – 70%.

Vom Blut ausgehend verteilt sich Erythromycin gut ins Gewebe. Da es in Phagozyten penetriert, kann es intrazellulär antibiotisch wirken, dies ist z. B. bei obligat intrazellulären Bakterien, wie Chlamydien, von klinischer Relevanz (Fassbender et al., 1996). Die Konzentration am Ort der Entzündung ist um mehr als das 100-fache höher als die Plasmakonzentration, was durch das basische Stickstoffatom im Molekül begründet ist. Das Molekül diffundiert im nichtionisierten Zustand durch die Gefäßwand zum Entzündungsherd. Dort wird es durch das saure Milieu ionisiert und kann nicht in den Blutkreislauf zurückdiffundieren. Dadurch reichert es sich im entzündeten Gewebe an. Dieses Prinzip wird „Ionenfalle“ genannt.

Erythromycin wird in der Leber über das Cytochrom-P450-System (CYP-3A4) metabolisiert und biliär in unveränderter Form bzw. als biologisch wirksamer Metabolit eliminiert. Die renale Elimination ist sehr gering.

1.2.5 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Interaktionen

Erythromycin ist ein insgesamt gut verträgliches Antibiotikum. Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAWs) sind hauptsächlich gastrointestinale Störungen, wie Erbrechen, Schmerzen im Oberbauch, Meteorismus und leichte Diarrhö (2 – 5% der Fälle) zu nennen. Allergische Reaktionen, wie Hautreaktionen, sind selten (< 0,5%).

Die gastrointestinalen Beschwerden werden durch die agonistische Wirkung des Erythromycins und noch stärker durch sein Abbauprodukt, ein Hemiketal, am Motilinrezeptor ausgelöst. Bei Patienten mit einer Störung der gastroduodenalen Motilität kann das Antibiotikum eine Verkürzung der Passagezeit verursachen (Janssens et al., 1990, Tack et al., 1992).

Weiterhin hat Erythromycin ein gewisses hepatotoxisches Potenzial (erkennbar durch einen Anstieg der Transaminasen) und es besteht die Gefahr der Ototoxizität, die sich durch einen reversiblen Hörverlust bemerkbar macht (Periti et al., 1993).

Die zu rasche Infusion, und damit die zu hohe Konzentration von Erythromycin an der Infusionsstelle, kann zu einem „Irritationssyndrom“ und zu einer Thrombophlebitis führen (Putzi et al., 1983).

Makrolide werden über die Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase 3A4 metabolisiert. Über die gleiche Monooxygenase werden auch beispielsweise der Kalziumkanalblocker Verapamil oder das Benzodiazepin Midazolam metabolisiert. Damit kann es zu einem Interaktionspotenzial zwischen dem Antibiotikum und anderen ähnlich metabolisierten Arzneimitteln kommen. Während der Schwangerschaft ist Erythromycin nach neueren Erkenntnissen mit einer gewissen Embryo- /Fetotoxizität behaftet. Die teratogenen Effekte betreffen zum einen das kardiovaskuläre System mit kardialen Fehlbildungen und weiterhin, bei Gabe in der frühen Schwangerschaft, eine Pylorusstenose (Hauben and Amsden, 2002, Kallen et al., 2005).

Kontraindikation für die Gabe von Erythromycin ist die Stillzeit (Übertritt in die Muttermilch), denn auch hier scheint das Risiko für eine Pylorusstenose beim Säugling erhöht zu sein. Eine weitere Kontraindikation ist eine bekannte Allergie gegen Makrolide.

1.3 Clarithromycin

1.3.1 Allgemeines

Eine Verbesserung des ersten isolierten und genutzten Makrolids Erythromycin wurde mit dem halbsynthetischen Clarithromycin (Klacid[®]) erreicht (Peters et al., 1992). Insbesondere die Säureinstabilität des Erythromycin konnte bei Clarithromycin durch Änderungen am Molekül reduziert werden.

1.3.2 Struktur

Clarithromycin basiert ebenso wie Erythromycin auf einem 14-gliedrigen Laktonring mit zwei glykosidisch gebundenen Zuckern (siehe Abbildung 2).

Im Vergleich zum Erythromycin weist Clarithromycin eine methylierte Hydroxylgruppe an Position 6 auf. Diese Gruppe ist für die Hemiketalbildung im sauren pH-Bereich und der damit verbundenen Säureinstabilität des Erythromycins verantwortlich. Genau bezeichnet ist Clarithromycin also ein „6-O-Methyl-Erythromycin“. Ein Abbauprodukt des Clarithromycin, der 14-Hydroxylmetabolit, ist ebenfalls gut antibakteriell wirksam.

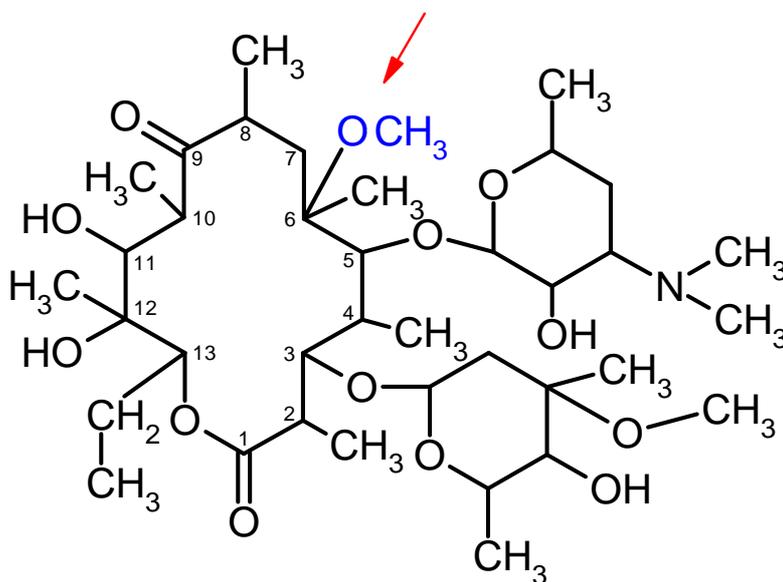


Abbildung 2: Strukturformel von Clarithromycin; Methylierung der Position 6 in blau markiert, der Pfeil markiert die funktionelle Gruppe, welche zur Stabilität der Substanz im sauren Milieu beiträgt.

1.3.3 Wirkungsmechanismus und antibakterielles Spektrum

Clarithromycin greift, genauso wie Erythromycin, an der 50s-Untereinheit der bakteriellen 70s-Ribosomen an. Dadurch wird die Proteinbiosynthese gehemmt (siehe 1.2.3).

Das Wirkungsspektrum ist dem der anderen Makrolide sehr ähnlich. Streptokokken werden im Vergleich zu Erythromycin (0,03 mg/l) bereits mit der halben Konzentration an Clarithromycin (0,015 mg/l) gehemmt. Auch andere grampositive Keime, wie z. B. Staphylokokken, sind sensibel.

Auch *Legionella pneumophila*, ein wichtiger Erreger von Pneumonien, gehört zum Spektrum des Clarithromycin. Für eine Hemmung sind deutlich niedrigere Konzentrationen als mit Erythromycin notwendig (Hardy et al., 1992). Ein weiteres gramnegatives Bakterium für den Anwendungsbereich von Makroliden ist *Haemophilus influenzae*. Clarithromycin weist eine vergleichbare Wirksamkeit zu Erythromycin auf, jedoch ist auch der 14-Hydroxylmetabolit des Clarithromycin gegenüber dem Keim wirksam, so dass insgesamt eine erhöhte Aktivität vorliegt. Teilweise ist aber auch hier eine klinische Wirksamkeit nicht garantiert, da die Erreger resistent sein können.

Der heutige Indikationsbereich für Clarithromycin liegt insbesondere bei bakteriell hervorgerufenen Infektionen des oberen und unteren Respirationstrakts. Die Substanz kann auch gegen Legionelleninfektionen und bei atypischen Pneumonien eingesetzt werden. Eine weitere Indikation ist die Otitis media.

1.3.4 Pharmakokinetik

Clarithromycin ist eine säurestabile Substanz, deren Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe bei 55% liegt. Die maximale Konzentration im Serum liegt bei 1 – 2 mg/l nach oraler Gabe und ein so genannter „steady state“ dieser Serumkonzentration wird nach fünf Dosen erreicht.

Die Metabolisierung führt zu einer oxidativen Abspaltung einer Methylgruppe mit anschließender Hydroxilierung an Position 14 zum 14-Hydroxylmetabolit, dem antibiotisch wirksamen Abbauprodukt des Clarithromycin (Alvarez-Elcoro und Enzler, 1999). Dieser Metabolismus ist bei hoher Dosierung aber sättigbar. Bei Nierengesunden beträgt die Eliminationshalbwertszeit etwa fünf bis sieben Stunden. Bei Niereninsuffizienten kann die Halbwertszeit auf bis zu zwölf Stunden steigen.

1.3.5 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Interaktionen

Clarithromycin ist besser verträglich als Erythromycin. Die häufigsten Beschwerden, die unter einer Therapie mit Erythromycin auftreten, sind gastrointestinaler Natur (ca. 20%). Bei Clarithromycin liegen diese Beschwerden, wie Übelkeit, Erbrechen, Krämpfe und Diarrhöen bei unter 5% aller behandelten Patienten. Weitere Nebenwirkungen, wie z. B. Hauterscheinungen, treten nur selten auf (Guay, 1993, Neu und Chick, 1993).

Clarithromycin kann die Ausscheidung von anderen Medikamenten, wie zum Beispiel Theophyllin, durch Hemmung der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen beeinflussen. Deshalb muss unter einer antibiotischen Therapie mit diesem Makrolid der Plasmaspiegel von Theophyllin überwacht werden.

1.4 Azithromycin

1.4.1 Allgemeines

Azithromycin (Zithromax[®]) ist ein halbsynthetisches Derivat des Erythromycins, das wegen der veränderten Grundstruktur auch als Azalid bezeichnet wird (Peters et al., 1992). Die Veränderungen führten zu Verbesserungen im Wirkungsspektrum, in der Pharmakokinetik und in der Verträglichkeit.

1.4.2 Struktur

Die Grundstruktur der Azalide basiert auf einem 15-gliedrigen Laktonring mit glykosidisch gebundenen Neutral- und Aminozuckern. Im Vergleich zum Erythromycin wurde an der Position 10 ein Stickstoffatom eingefügt. Azithromycin, der einzige Vertreter der Azalide, ist ein N-Methyl-Derivat (siehe Abbildung 3).

Dieses Molekül ist noch stärker basisch als die Makrolide, was durch das zusätzliche Stickstoffatom bedingt wird. Genauso wie bei Erythromycin ist nur die freie Base antibiotisch wirksam.

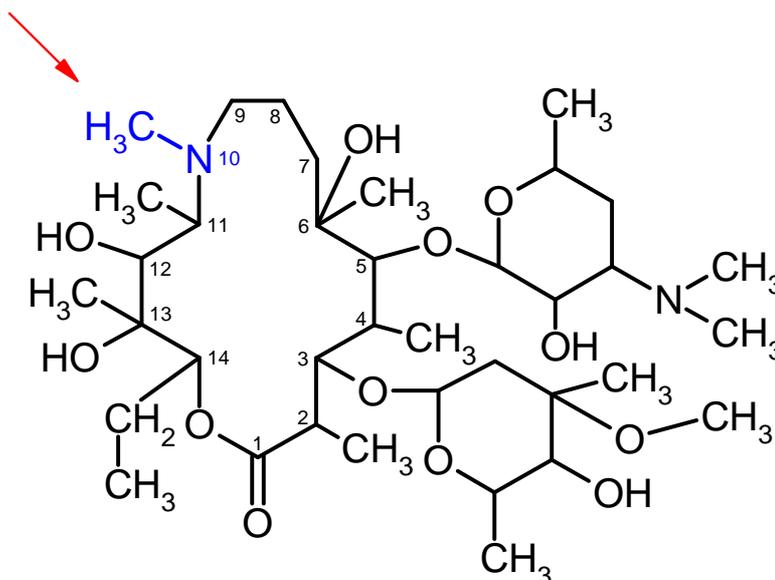


Abbildung 3: Strukturformel von Azithromycin; zusätzliches methyliertes Stickstoffatom in Position 10 in blau markiert, der Pfeil markiert die funktionelle Gruppe, welche zur Stabilität der Substanz im sauren Milieu beiträgt.

1.4.3 Wirkmechanismus und antibakterielles Spektrum

Der Wirkungsmechanismus des Azithromycins unterscheidet sich nicht von dem der Makrolide. Es greift ebenso in die Proteinbiosynthese der Bakterien ein, indem es an der 50s-Untereinheit der 70s-Ribosomen die Elongation verhindert (siehe 1.2.3).

Im Wirkungsspektrum hingegen gibt es Unterschiede. Azithromycin weist ein erweitertes Spektrum im Vergleich zu den Makroliden auf. Im grampositiven Bereich ist die Aktivität geringfügig gemindert. Eine verbesserte Aktivität besteht im gramnegativen Bakterienspektrum. Hier werden Erreger, wie Salmonellen, Neisserien u. ä., deutlich besser als durch Erythromycin erfasst. Am wichtigsten ist aber die deutlich erhöhte Aktivität gegen *Haemophilus influenzae*, einem häufigen Erreger von Infektionen der Atemwege (Niederman et al., 2006). Gegen diesen Erreger weisen die übrigen Makrolide im Allgemeinen keine zuverlässige klinische Wirksamkeit auf. Weiterhin hat Azithromycin aufgrund seiner höheren intrazellulären Konzentration eine verbesserte Wirksamkeit sowohl gegenüber intrazellulären als auch gegenüber zellwandlosen Bakterien, wie z. B. Chlamydien bzw. Mykoplasmen (Hauben und Amsden, 2002).

Die Indikationen für die orale Gabe von Azithromycin sind leichte bis mittelschwere Infektionen der Atemwege (z. B. Tonsillitis oder die so genannte „community acquired“ Pneumonie, CAP). Weitere Anwendungsbereiche sind unkomplizierte Haut- und Weichteilinfektionen und Urogenitalinfektionen.

Die i.v.-Applikation des Azalids ist angezeigt bei einer schweren ambulant erworbenen Pneumonie und bei einer Adnexitis.

1.4.4 Pharmakokinetik

Die Modifikation der Laktoringstruktur durch das Einfügen des N-Atoms an Position 10 resultiert in verbesserten pharmakinetischen Eigenschaften der Azalide im Vergleich zu den Makroliden. Die Säurestabilität konnte deutlich verbessert werden, so dass die Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe im Vergleich zum Erythromycin höher liegt. Die „area under the curve“ (AUC) von Azithromycin liegt bei 3,39 mg/l x h, die Bioverfügbarkeit wird mit 37% angegeben. Die gute Gewebegängigkeit der Makrolide konnte nochmals deutlich verbessert werden. Azithromycin zeigt eine sehr ausgeprägte intrazelluläre Anreicherung, was sich in einem Verteilungsvolumen von ca. 1500 l ausdrückt. Die Ursache dafür ist die größere Basizität der Verbindung. Im Vergleich dazu beläuft sich das Verteilungsvolumen von Erythromycin nur auf 40 – 80 l. Diese deutlich höhere Konzentration im Zellinneren erklärt die verbesserte Wirksamkeit gegen intrazelluläre Erreger. Dadurch, dass sich Azithromycin auch in Phagozyten anreichert, wird das Antibiotikum direkt an den Ort der Infektion gebracht. Die Gewebeaffinität ist höher als bei vielen anderen Antibiotika (Luke et al., 1996). Zudem bleibt bei einer nur dreitägigen Applikation die intrazelluläre Konzentration über sieben bis zehn Tage oberhalb der minimalen Hemmkonzentration (MHK) bestehen.

Die Spitzenwerte der Plasmakonzentration liegen bei maximalen 1,1 mg/l nach intravenöser Applikation von 500 mg Azithromycin im Vergleich zu 0,4 mg/l nach oraler Applikation von 500 mg.

Die Eliminationshalbwertszeit von Azithromycin beträgt 14 – 40 Stunden. Damit liegt sie weit höher als die Eliminationshalbwertszeit von Erythromycin mit ca. 2 Stunden (Rodvold und Piscitelli, 1993). Die Azalide werden, wie die Makrolide, hauptsächlich hepatisch metabolisiert und biliär ausgeschieden. Der unverändert im Urin ausgeschiedene Teil erhöht sich bei der intravenösen Applikation.

1.4.5 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Interaktionen

Die häufigste Nebenwirkung von Erythromycin sind gastrointestinale Störungen, wie Krämpfe, abdominelle Schmerzen und Übelkeit (siehe 1.2.5). Derartige Symptome treten bei einer Behandlung mit Azithromycin deutlich seltener auf (Whitman und Tunkel, 1992).

Azithromycin verursacht ebenso wie Makrolide in der intravenösen Applikationsform häufig lokale Reaktionen an der Infusionsstelle (58%). Diese äußern sich als Schmerzen bis hin zu einer Phlebitis.

In seltenen Fällen konnten reversible Funktionsstörungen des ZNS beobachtet werden. Hypersensitivitätsreaktionen werden nach Azithromycin-Gabe nur sehr selten beobachtet.

Azithromycin hat im Gegensatz zum Erythromycin ein sehr geringes Interaktionspotenzial. Es führt nicht zu Wettbewerbssituationen am Cytochrom-P450-System und zeigt auch sonst keine der für Makrolide typischen Interaktionen mit anderen Arzneimitteln (Stahlmann und Lode, 1996).

1.5 Quinupristin/Dalfopristin

1.5.1 Allgemeines

Quinupristin und Dalfopristin (Synercid[®]) gehören zur Gruppe der Streptogramine, einer Antibiotikafamilie zu der die Pristinamycine, Oestreomycine, Mikamycine und Virginiamycine gehören. Sie alle werden aus dem Mikroorganismus *Streptomyces pristinaespiralis* extrahiert. Erstmals gelang dies 1953. Die Familie der Streptogramine wird in eine Gruppe A und eine Gruppe B eingeteilt.

Vor wenigen Jahren gelang erstmals die Synthese eines Derivats von Pristinamycin IA (RP 57669, Quinupristin) und eines Derivats von Pristinamycin IIA (RP 54476, Dalfopristin), die als wasserlösliche Komponenten für die parenterale Verabreichung verfügbar sind.

Quinupristin gehört zur Gruppe B der Streptogramine, Dalfopristin ist ein Derivat der Gruppe A. Diese beiden semisynthetischen Pristinamycin-Derivate werden in einer 30:70 Mischung zum kommerziell erhältlichen Synercid[®] zusammengefasst (Lamb et al., 1999). Einzeln wirken die beiden Komponenten nur schwach antibakteriell, zusammen jedoch stark synergistisch.

1.5.2 Struktur

Die Strukturformeln der beiden Wirkstoffe des Synercid[®] sind in den Abbildungen 4 und 5 gezeigt. Die Struktur des Quinupristin, einem Streptogramin aus der Gruppe B, entspricht einem zyklischen Hexadepsipeptid. Die Streptogramine der Gruppe A, unter anderem Dalfopristin, bestehen in ihrer Grundstruktur aus mehrfach ungesättigten Makrolaktonen.

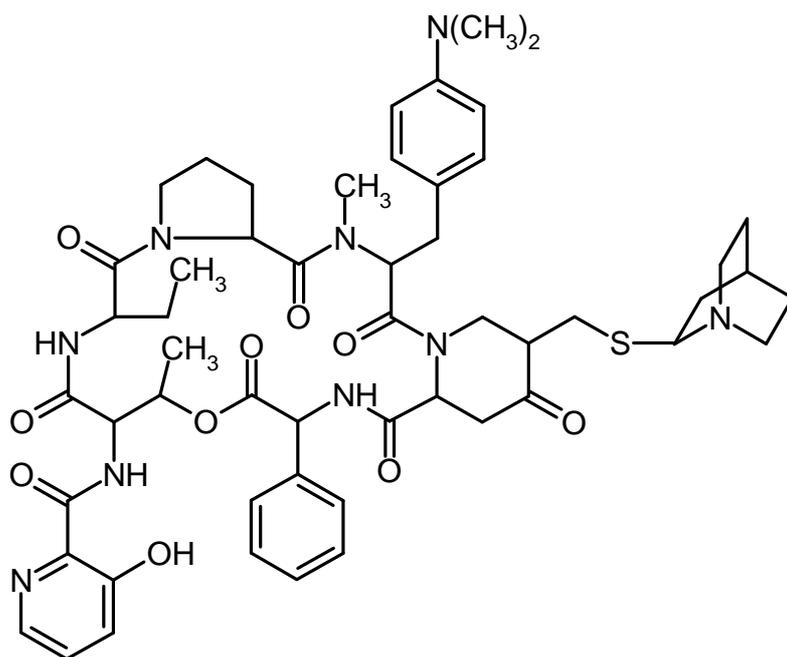


Abbildung 4: Strukturformel von Quinupristin.

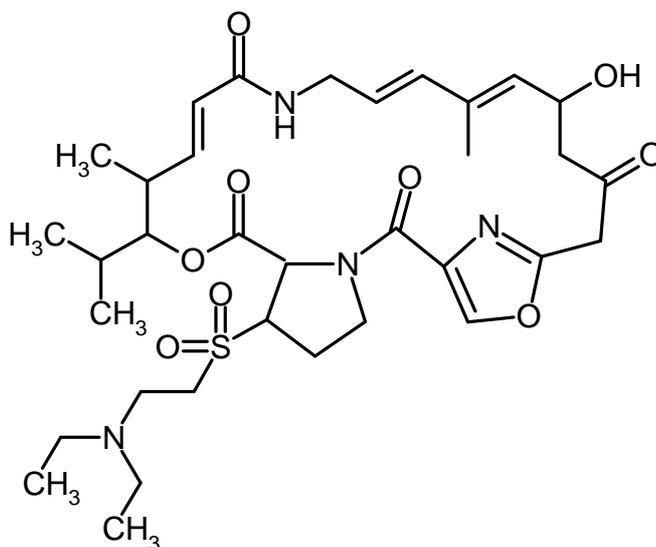


Abbildung 5: Strukturformel von Dalfopristin.

1.5.3 Wirkmechanismus und antibakterielles Spektrum

Quinupristin und Dalfopristin gehören beide zur Gruppe der Proteinbiosynthese-Inhibitoren, die an der 50s-Untereinheit der Ribosomen angreifen. Dabei bindet Quinupristin an dieselbe Stelle wie die Makrolide und hat dort auch den gleichen Effekt, nämlich die Verhinderung der Polypeptid-Elongation und die folgende Termination der Proteinbiosynthese.

Dalfopristin reagiert mit einer benachbarten Region der 50s-Untereinheit und erhöht synergistisch die Wahrscheinlichkeit einer Bindung von Quinupristin an dessen Angriffspunkt. Weiterhin hat Dalfopristin noch eine direkte Wirkung auf die Polypeptidketten-Bildung (Harms et al., 2004, Hancock, 2005).

Quinupristin/Dalfopristin ist sehr gut wirksam gegen grampositive Kokken, unter anderem *Streptococcus pneumoniae* (auch Penicillin-resistente Stämme), alpha- und beta-hämolyisierende Stämme von Streptokokken, *Enterococcus faecium* (nicht *E. faecalis*) und Koagulase-positive und -negative Staphylokokken. Gegen *E. faecium* wirkt das Antibiotikum bakteriostatisch und gegen die weiteren grampositiven Keime bakterizid. Es ist ebenfalls gut einzusetzen bei Infektionen durch MRSA (Methicillin-resistente *Staph. aureus*), VRSA (Vancomycin-resistente *Staph. aureus*) und VRE (Vancomycin-resistente Enterokokken) (Eliopoulos, 2003). Die Kombination von Quinupristin/Dalfopristin und Vancomycin ist gegenüber Staphylokokken synergistisch wirksam.

Synercid[®] ist weitgehend unwirksam gegenüber gramnegativen Bakterien. Lediglich *Moraxella catarrhalis* und Neisserien sind sensibel.

Die meisten Stämme von *Haemophilus influenzae* und *E. faecalis* sind resistent gegenüber dem Antibiotikum. Kreuzresistenzen zwischen Streptograminen und Antibiotika anderer Klassen bestehen nicht.

Quinupristin/Dalfopristin ist gegen Erreger der atypischen Pneumonie, wie z. B. *M. pneumoniae*, *Legionella* spp. und *Chlamydia pneumoniae* wirksam.

1.5.4 Pharmakokinetik

Quinupristin/Dalfopristin kann nur intravenös appliziert werden, da es nach oraler Gabe nicht ausreichend resorbiert wird. Die Infusionsdauer sollte eine Stunde nicht unterschreiten, um die lokalen Reaktionen zu begrenzen. Es kann es nur in einer 5%-igen Dextrose-Lösung infundiert werden, da es mit Natriumchlorid zu Wechselwirkungen kommt.

Die Plasmakonzentrationen der einzelnen Komponenten liegen in der „steady-state“ Phase bei ungefähr 3 µg/ml Quinupristin und 7 µg/ml Dalfopristin. Die Halbwertszeiten liegen bei 50 Minuten bzw. bei 42 Minuten.

Die Metabolisierung der Antibiotika verläuft hauptsächlich durch Konjugation in der Leber. Quinupristin wird dabei zu konjugiertem Quinupristin-Glutathion und Quinupristin-Cystein umgewandelt. Dalfopristin wird durch die Konjugation zu Pristinamycin IIa. Diese Metaboliten sind

auch noch antibakteriell wirksam. Etwa 80% der applizierten Dosis werden biliär ausgeschieden, der Rest wird renal eliminiert.

1.5.5 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Interaktionen

Die häufigste Nebenwirkung bei der Applikation von Quinupristin/Dalfopristin ist die lokale Reaktion an der Infusionsstelle. Die Reaktionen reichen von der Rötung mit Schmerzen bis zur voll ausgeprägten Thrombophlebitis. Dieses Risiko kann minimiert werden, indem man Synercid[®] über einen zentralen Venenkatheter (ZVK) infundiert, da dort die Verdünnung sehr viel schneller und stärker erfolgt.

Weitere Nebenwirkungen sind Juckreiz, Brennen, Erytheme an Gesicht, Nacken und Oberkörper sowie gastrointestinale Beschwerden, wie Übelkeit und Erbrechen (Rubinstein et al., 1999).

Es kann bei der Anwendung zu Arthralgien und Myalgien kommen, wobei diese Nebenwirkungen eher bei Patienten mit einer hepatischen Insuffizienz auftreten, da es bei ihnen zu einer Akkumulation der Metabolite kommt.

Quinupristin/Dalfopristin inhibiert das Cytochrom-P450-3A4. Bei gleichzeitiger Gabe von weiteren Stoffen, die über das CYP-3A4 metabolisiert werden, muss auf die veränderten Stoffwechselbedingungen geachtet werden. Zu diesen Medikamenten zählen unter anderem Antihistaminika (z. B. Terfenadin), Makrolide (z. B. Clarithromycin) und Psychopharmaka (z. B. Haloperidol). Weiterhin muss man bei einer Kombination von Synercid[®] und Medikamenten, die eine Verlängerung des QT-Intervalls bewirken, wie zum Beispiel die Antiarrhythmika Amiodaron oder Chinidin, die Patienten besonders engmaschig beobachten.

Während der Schwangerschaft oder der Stillzeit ist der Einsatz von Synercid[®] kontraindiziert.

1.6 Oberflächenmoleküle auf Endothelzellen

Unter normalen physiologischen Bedingungen zirkulieren die Leukozyten frei durch das Blutgefäßsystem. Die endotheliale Auskleidung der Innenwand der Blutgefäße hilft dabei, die Integrität zu erhalten, weil sie verhindert, dass die Leukozyten in die tiefer liegenden Gewebe migrieren. Bei bestimmten vaskulären Erkrankungen oder einer Inflammation des Endothels ändert sich jedoch die anti-adhäsive Oberflächenstruktur durch die vermehrte Präsentation von proinflammatorischen Zelladhäsionsmolekülen, wodurch die Rekrutierung und Migration der Leukozyten

durch die Gefäßwand gefördert wird. Dies führt dann zu einer Inflammation des Gewebes und der Bekämpfung der Erreger durch das Immunsystem (Madan et al., 2004).

Diese Rekrutierung verläuft durch die Aktivierung der Endothelzellen mittels verschiedener proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukine (z. B. IL 8) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α), welche von gewebeständigen Makrophagen ausgeschüttet werden. Weitere Aktivatoren des Immunsystems sind Lipopolysaccharide und Endotoxine, die von bakteriellen Erregern gebildet werden. Der Ablauf der Evasion der Leukozyten geschieht in vier Phasen: dem Rollen, der Aktivierung, der Adhäsion und der anschließenden Migration der Leukozyten zwischen den Endothelzellen hindurch (siehe Abbildung 6).

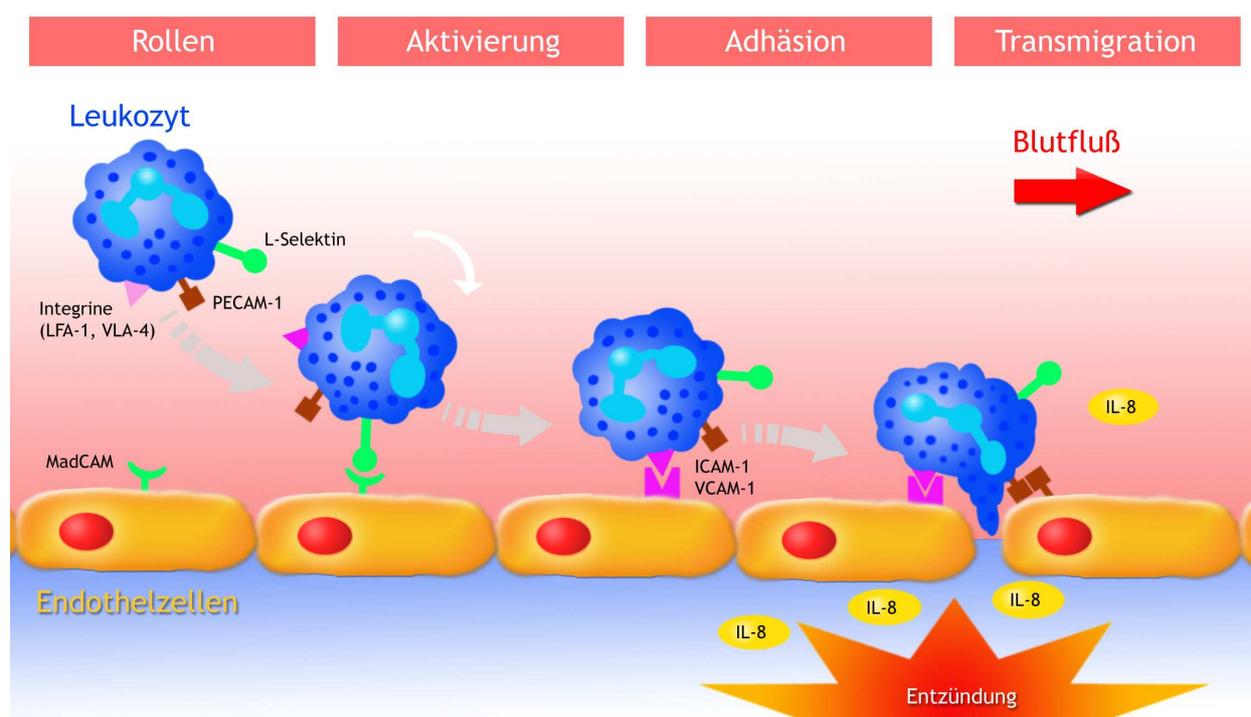


Abbildung 6: Rekrutierung der Leukozyten aus dem Blutstrom in das entzündete Gewebe durch die Expressions von proinflammatorischen Oberflächenantigenen durch die Endothelzellen.

Die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen vermittelt die Interaktion zwischen den verschiedenen Typen der Leukozyten, die im Blut zirkulieren, und den Endothelzellen. Von diesen Oberflächenmolekülen gibt es drei entscheidende Unterklassen: die Selektine, die Integrine und die Immunoglobulin-Superfamilien (Carlos und Harlan, 1994).

Die feste Adhäsion der Leukozyten an die Endothelzellen ist eine Voraussetzung für die Transmigration durch die Gefäßwand und wird durch die Oberflächenantigene ICAM-1 (CD 54) und VCAM-1 (CD 106) vermittelt. VCAM-1 ist ein Molekül, welches besonders die

Rekrutierung von Monozyten, einer Subpopulation der Leukozyten, fördert (Weber und Springer, 1998). Auf der Oberfläche der Leukozyten wird das Integrin CD 49d („very late antigen 4“, VLA-4), exprimiert, welches dann eine Interaktion mit VCAM-1 eingeht und die Bindung herstellt (Carrasco und Batista, 2006). ICAM-1 hingegen ist für die Extravasation von allen Leukozytenarten, besonders der polymorphkernigen Granulozyten, essentiell (Reiss et al., 1998, Wong et al., 2007). Der Kontakt von ICAM-1 auf den Endothelzellen mit „lymphocyte function-associated antigen 1“ (LFA-1) auf den Leukozyten führt zur Veränderung der Morphologie der beiden Zelltypen und der Ausbildung von Mikrovilli zur Adhäsion (Carman et al., 2003). Über die Aktivierung des ICAM-1 Rezeptors werden weitere Signalwege der Endothelzelle aktiviert. Eine wichtige Signalkaskade, die aktiviert wird, ist die Rho-Kaskade. Über diese Kaskade wird eine „Endothelzellkontraktion“ ausgelöst, wodurch sich die interzellulären Kontakte lösen und somit ein Weg für die Leukozyten zum Erreichen der tieferen Gewebeschichten ermöglicht wird (Thompson et al., 2002).

Die Selektine, wie E-Selektin auf den Endothelien und L-Selektin auf den Leukozyten, wirken als „Fänger“ der Leukozyten aus dem Blutstrom am Ort des entzündlichen Geschehens. Sie bewirken den ersten Schritt zur Evasion, nämlich das Rollen an der Gefäßwand. Diese Bindung ist jedoch nicht stark genug, um die Leukozyten dort festzuhalten (Hickey et al., 1999).

Durch das langsame Rollen der weißen Blutzellen sind diese in der Lage, über die an ihrer Oberfläche exprimierten Integrine eine stärkere Bindung auszubilden. Mit Hilfe dieser Adhäsion werden die Abwehrzellen aktiviert.

Das Oberflächenantigen CD 34 ist ein Marker für Stammzellen und wird in der Klinik für die Isolation und Manipulation von humanen Stammzellen im peripheren Blut benutzt. Die zunehmende Zelldifferenzierung der Stammzellen zu differenzierten Zellen führt zu einer Abnahme des CD 34-Epitops auf der Zelloberfläche (Krause et al., 1996). Aktuelle Studien zeigen, dass CD 34 noch weitere Funktionen neben der Stammzellendifferenzierung hat. Es hat einen transmembranären Anker und wird als ein mucinartiges Adressin auf Endothelzellen exprimiert. Es spielt bei der Zelladhäsion und beim „homing“ von Lymphozyten, die wiederum den Liganden L-Selektin exprimieren, eine wichtige Rolle (Gangenahalli et al., 2006).

1.7 Zelllinien

1.7.1 EA.hy 926: hybridisierte Endothelzelllinie

Die EA.hy 926 Endothelzellen sind eine permanente Zelllinie, die 1983 aus der Hybridisierung von menschlichen venösen Endothelzellen der Umbilical-Vene (HUVEC) und Zellen der humanen permanenten Lungenkarzinomzelllinie A549 entstanden sind. Der Nachweis für die erfolgreiche Hybridisierung wurde über die vermehrte Anzahl an Chromosomen ($n = 80$) geführt (Edgell et al., 1983).

Diese Zellen exprimieren konstitutiv den hochdifferenzierten von Willebrandt-Faktor (F VIII: vWF). Der vWF ist ein für Endothelzellen und Megakaryozyten spezifisches Oberflächenantigen, welches unter anderem in der Blutgerinnungskaskade eine Rolle spielt. Dieser Faktor konnte über viele Passagen (> 100) kontinuierlich nachgewiesen werden. Damit kann die EA.hy 926 Zelllinie als eine permanente Zelllinie angesehen werden (McCarthy et al., 1991).

Weiterhin exprimieren die EA.hy 926 Zellen ebenfalls konstitutiv ICAM-1 (CD 54), VCAM-1 (CD 106), E-Selektin (CD 62E) und das Oberflächenmolekül CD 34 (Lidington et al., 1999).

Die Zelllinie eignet sich, um *in vitro* modellhaft die Reaktionen eines Gefäßendothels auf exogene Einflüsse zu untersuchen.

1.7.2 HUVEC

Die HUVECs („human umbilical vascular endothelial cells“) sind eine Primärkultur von Endothelzellen, die aus Nabelschnurvenen gewonnen werden. Die Erstbeschreibung der Gewinnung und Kultivierung dieser Zellen stammt aus dem Jahr 1973 (Jaffe et al., 1973). Auch bei diesen Endothelzellen kann der vWF als Marker dafür gelten, dass die Zellen tatsächlich als Endothelzellen erkannt und bewertet werden können (Gospodarowicz et al., 1978, Vorbach et al., 2002).

Die primären Zellen aus der Umbilical-Vene exprimieren bereits ohne Stimulation ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin in geringem Maße (Barreiro et al., 2005).

Die HUVECs können nicht beliebig oft passagiert werden, wie das bei anderen immortalisierten Zelllinien der Fall ist. Die Zellen beginnen sich unterschiedlich gegenüber den gleichen Reizen zu verhalten, sie können sogar den vWF und damit ihre Grundcharakterisierung verlieren (Marin et al., 2001). Damit stellen die HUVECs eine weniger stabile Zellart dar. Um unter diesen Umständen vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden alle Experimente dieser Dissertation mit einer Passage (P 6) durchgeführt, bei der der vWF als Endothelzellmarker nachweisbar war.

1.7.3 BALB/C 3T3-Fibroblasten

Bei den verwendeten Fibroblasten handelt es sich um die „BALB/3T3 clone A31“, eine der vielen Zelllinien, die erstmals vor etwa 20 Jahren aus BALB/C-Mäuseembryonen an Tag 14 bis 17 pränatal isoliert wurden (Aaronson und Todaro, 1968).

Diese Zelllinie ist eine kontinuierliche und etablierte Zelllinie. Sie wird oft zur Bestimmung der allgemeinen Zytotoxizität verwendet und wurde auch in dieser Arbeit für die MTT-Zytotoxizitätsanalyse eingesetzt (Borenfreund und Puerner, 1985).

1.8 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Die Entwicklung einer lokalen Reizung bis hin zu einer voll ausgeprägten Phlebitis ist eine der häufigen unerwünschten Nebenwirkungen bei der intravenösen Applikation von Antibiotika und anderen Medikamenten.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Antibiotika aus der Gruppe der Makrolide, Erythromycin, Clarithromycin und Azithromycin, direkt miteinander verglichen. Weiterhin wurde Quinupristin/Dalfopristin als Positivkontrolle eingesetzt. Quinupristin/Dalfopristin ist ein Antibiotikum, welches ein sehr hohes Risiko für die Entwicklung einer Phlebitis aufweist (Rubinstein et al., 1999, Chevalier et al., 2001, Rehm et al., 2001).

Der direkte Vergleich der Makrolide in einer Studie an Probanden zeigte ein unterschiedliches Potenzial der Substanzen eine lokale Reaktion mit unterschiedlichem Schweregrad hervorzurufen. Eine milde Reaktion in Form eines „Irritationssyndroms“ trat bei Erythromycin und Azithromycin bei etwa der Hälfte der Patienten auf. Die schwere lokale Reaktion in Form der voll ausgebildeten Phlebitis trat nur bei der Infusion von Clarithromycin bei der Hälfte der Probanden auf. Clarithromycin verursachte weiterhin bei allen Patienten während der Infusion Schmerzen an der Infusionsstelle, wo hingegen bei Azithromycin nur 58 % und bei Erythromycin 25 % der Patienten darüber klagten (Zimmermann et al., 2001).

Um diese Unterschiede zwischen den Makroliden, welche in ihrer Struktur nur sehr geringe Unterschiede aufweisen, genauer zu untersuchen, wurden:

- im direkten Vergleich das zytotoxische Potenzial von Erythromycin, Clarithromycin und Azithromycin auf BALB/C 3T3-Fibroblasten und EA.hy 926 Endothelzellen in einem *in vitro* Zytotoxizitätstest ermittelt,

-
- und mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen die Reaktionen der proinflammatorischen Oberflächenantigene CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf EA.hy 926 Endothelzellen und auf Endothelzellen aus Umbilicalvenen (HUVEC) nach der Inkubation mit den vier zuvor beschriebenen Antibiotika untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Apparative Ausstattung

Die Arbeit basiert auf Experimenten, für die *in vitro* Arbeitstechniken grundlegend waren. Für eine Kultivierung von Zellen ist folgende Ausstattung nötig:

- Laminar-Air-Flow-Kabine (Fa. Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland)
- Begasungsbrutschrank B5060 EK/CO₂ mit elektronischer Regelung für CO₂ (37 °C, 5% CO₂, 96% Luftfeuchtigkeit) (Fa. Heraeus Holding GmbH, Osterode, Deutschland)
- Minifuge RF (Fa. Heraeus Holding GmbH, Osterode, Deutschland)
- Lichtmikroskop (Fa. Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- Lab 850 pH Meter (Fa. Schott Lab Technology GmbH, Wien, Österreich)
- Waage Typ A200S-*D1 (Fa. Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland)
- FACScan-Durchflusszytometer (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- Sonorex Super RK 103 H (Fa. Bandelin, Berlin Deutschland)
- Mikrotiter Shaker (Fa. Dynatech, England)
- Vortex-Schüttelgerät Reax 2000 (Fa. Heidolph, Schwabach, Deutschland)
- Opsys MR, Modell: 1478 (Fa. Dynex, Chantilly, USA)
- Costar 20 – 200 µl 8-pette Multichannel Pipettors (Fa. Corning, Corning, USA)
- Octapette 200 µl (Fa. Corning, Corning, USA)
- Hämozytometer Neubauer, Kat.Nr.: 718605 (Fa. Brand GmbH, Wertheim, Deutschland)
- Einmalplastikkulturflaschen, 75 cm², Kat.Nr.: 156499 (Fa. Nunc, Wiesbaden, Deutschland)
- Einmalplastikkulturflaschen, 25 cm², Kat.Nr.: 156367 (Fa. Nunc, Wiesbaden, Deutschland)
- Einmalplastikkulturflaschen, 75 cm², Kat.Nr.: 83.1813.002 (Fa. Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)
- Einmalpetrischalen Nunclon, 21,5 cm², Kat.Nr.: 150326 (Fa. Nunc, Wiesbaden, Deutschland)

- sterile Einmalpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml) (Fa. BD Falcon, Heidelberg, Deutschland)
- sterile Zentrifugenröhrchen (5 ml, 12 ml) (Fa. Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland)
- sterile Messzylinder (50 ml, 100 ml) und Bechergläser (20 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml) (Fa. Schott AG, Mainz, Deutschland)
- Sterilfilter, Typ FP 30/0,2 CA-S (Rotrand), Kat.Nr.: 10462200 (Fa. Whatman, Brentford, UK)
- 96-Loch-Mikrotiterplatten, Kat.Nr.: 92696 (Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz)
- Deckgläschen, 22 mm Durchmesser, Kat.Nr.: 83.1840.001 (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

2.2 Chemikalien

Kulturmedien und Pufferlösungen

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 1,0 g/l D-Glukose, Kat.Nr.: F0415 (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 4,5 g/l D-Glukose, Kat.Nr.: F0445 (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Endothelial Cell Growth Medium, Kat.Nr.: C-22010 (Fa. Promocell, Heidelberg, Deutschland)
- Endothelial Medium (komplett), mit L-Glutamin, Kat.Nr.: U15-002 (Fa. PAA, Pasching, Österreich)
- Glutamin (200mM), Kat.Nr.: K0280 (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Fötale Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS), Kat.Nr.: S0125 (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Eserserum, Kat.Nr.: S30-100ML (Fa. Millipore, Billerica, USA)
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS), calcium- und magnesiumhaltig, Kat.Nr.: L1815 (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Tris-Puffer, Kat.Nr.: 108382 (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumchlorid, Kat.Nr.: 106404 (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

- Triton X-100, 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene-glykol, Kat.Nr.: X100-100ml (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Zyankali, Kat.Nr.: QLS-200A (Fa. Sysmex Corporation, Kobe, Japan)
- HAT, Kat.Nr.: F0483 (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Dimethylsulfat (DMSO), Kat.Nr.: 102952 (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 5-Fluorouracil, Kat.Nr.: F6627 (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Methanol, Kat.Nr.: 8047 (Fa. J.T. Baker, New Jersey, USA)
- Human TNF- α , Kat.Nr.: W9511510 (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland)
- FACSSlow Sheath Fluid, Kat.Nr.: 342003 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Antikörper Immunhistochemie

- von Willebrandt-Faktor, Kat.Nr.: 55849 (Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- „donkey anti-mouse Cy-3“-Antikörper, Kat.Nr.: 715-165-151 (Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland)
- DAPI, (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid), Kat.Nr.: 10 236 276 001 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

Enzym

- Trypsin/EDTA, 0,05%/0,02% in PBS, calcium- und magnesiumfrei, Kat.Nr.: L2153 (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland)

Farbstoff – MTT Zytotoxizitätstest

- MTT, Thiazolylblau (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromid), Kat.Nr.: M5655 (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)

Desorptionslösung – MTT

Gemisch aus

- 4% 1N HCl, Kat.Nr.: 3256 (Fa. Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland)
- 96% Isopropanol (2-Propanol), Kat.Nr.: 1.09634.1011 (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

2.3 Antibiotika

Erythromycin, Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung

Das Antibiotikum Erythromycin lag als Pulver für die Herstellung einer Infusionslösung vor (Erythrocin[®]-i.v.). In der 10 ml-Durchstechflasche waren 500 mg Erythromycin als Erythromycin-Lactobionat enthalten.

Das Pulver wurde abgewogen und zu gleichen Teilen in sterile 5 ml-Röhrchen aufgeteilt. Dabei wurde eine Gesamtmenge von 744 mg = 500 mg Erythromycin abgewogen. Die Röhrchen mit dem darin enthaltenen Erythromycin wurden im Kühlschrank bei ca. 8 °C bis zur Ansetzung der Stammlösung aufbewahrt, maximal jedoch bis zum Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums.

Bezogen wurde das Erythrocin[®]-i.v. von der Firma Abbott GmbH & Co. KG (Wiesbaden, Deutschland).

Unmittelbar vor dem Einsatz wurde die Substanz in dem für die Zellen entsprechenden Medium gelöst, so dass eine Stammlösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml entstand. Von dieser Stammlösung wurden dann, je nach gewünschter Endkonzentration, die entsprechenden Volumina in das Kulturmedium gegeben und in die Zellkulturflaschen steril pipettiert.

Erythromycin, Reinsubstanz

Zur Untersuchung von Effekten, die möglicherweise durch Zusätze in den Infusionslösungen bedingt waren, wurde zusätzlich Erythromycin als Reinsubstanz untersucht. Es lag in Pulverform vor und wurde kühl, trocken und lichtgeschützt gelagert.

Erythromycin als Reinsubstanz wurde von LKT Laboratories, Inc. (Minnesota, USA) bezogen.

Die Reinsubstanz löste sich weder in Medium noch in sterilem Wasser. Eine Lösung der Substanz konnte erst in 37 °C warmem Methanol erzielt und so dem Medium zugegeben werden. Das Methanolvolumen wurde so gewählt, dass die Konzentration des Lösungsmittels im Medium maximal 2% betrug. Die Mengen von dem Methanol-Erythromycingemisch, die dem Medium zugegeben wurden, waren abhängig von der gewünschten Endkonzentration des Antibiotikums im Zellkulturmedium.

Clarithromycin, Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung

Das Makrolid Clarithromycin lag in Pulverform zur Herstellung einer Infusionslösung vor (Klacid[®] 500 mg). Die 10 ml-Durchstechflasche enthielt 500 mg Clarithromycin.

Auch dieses Antibiotikum wurde abgewogen und zu gleichen Teilen in sterilen 5 ml-Röhrchen im Kühlschrank bei 8 °C gelagert. Beim Abwiegen des Flascheninhalts betrug die Gesamtmenge

773 mg = 500 mg Clarithromycin. Weitere Bestandteile des Pulvers waren Lactobionsäure und Natriumhydroxid zur pH-Einstellung. Auch diese Substanz wurde bis maximal zum Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums aufbewahrt und verwendet.

Es wurde Klacid[®] 500 mg von Abbott GmbH & Co. KG (Wiesbaden, Deutschland) verwendet.

Die Herstellung der Stammlösung von 5 mg/ml und der Endkonzentrationen erfolgte analog zum Erythromycin.

Clarithromycin, Reinsubstanz

Auch von diesem Makrolid wurde die Reinsubstanz erworben, um die Effekte der Zusätze im Infusionspulver zu untersuchen. Es lag ebenfalls in Pulverform vor und wurde kühl, trocken und lichtgeschützt gelagert.

Die Reinsubstanz wurde von LKT Laboratories, Inc. (Minnesota, USA) bezogen.

Auch diese Substanz ließ sich nicht im Medium lösen, so dass die Lösung hier analog zum Erythromycin in 37 °C warmem Methanol erfolgte. Die Konzentration vom Lösungsmittel betrug 2% im Medium. Aus dem Gemisch wurden dann durch geeignete Verdünnungen die gewünschten Endkonzentrationen hergestellt.

Azithromycin, Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung

Diese Substanz lag als Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung vor und wurde als Zithromax[®] i.v. in einer 10 ml-Durchstechflasche von Pfizer Pharma GmbH (Karlsruhe, Deutschland) erworben. In der Flasche waren 500 mg Azithromycin enthalten. Sonstige Bestandteile des Pulvers waren Zitronensäure und Natriumhydroxid zur pH-Einstellung.

Das Antibiotikum wurde aufgeteilt und bei 8 °C gelagert und maximal bis zum Mindesthaltbarkeitsdatums verwendet.

Die Herstellung der Stammlösung und der Endkonzentrationen in den Zellkulturflaschen geschah entsprechend zu den bereits beschriebenen Makroliden.

Azithromycin, Reinsubstanz

Da auch bei Azithromycin weitere Stoffe im Infusionspulver vorhanden waren, wurde auch dieses Antibiotikum als Reinsubstanz untersucht, um mögliche Effekte der Zusatzstoffe von den Effekten des Antibiotikums zu differenzieren. Es lag in Pulverform vor und wurde trocken, kühl und lichtgeschützt aufbewahrt.

Die Reinsubstanz von Azithromycin wurde ebenso wie die anderen beiden Makrolide von LKT Laboratories, Inc. (Minnesota, USA) bezogen.

Die Herstellung der Endkonzentrationen der Reinsubstanz im Zellkulturmedium erfolgte wie beschrieben durch Lösung in 2% warmem Methanol und Zugabe des Mediums.

Quinupristin/Dalfopristin

Dieses Antibiotikum lag als Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung vor. Unter dem Handelsnamen Synercid[®] waren in einer 10 ml-Durchstechflasche 500 mg Antibiotikum enthalten. Die entsprechende Gesamtmenge an Infusionspulver betrug 609,2 mg.

Für die bessere Haltbarkeit der Substanz wurde sie abgewogen und in sterilen 5 ml-Röhrchen bei 8 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Sonstige Bestandteile im Infusionspulver waren Methansulfonsäure, Natriumhydroxid zur pH-Einstellung und Stickstoff als Schutzgas. Synercid[®] wurde von Aventis (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen.

Quinupristin/Dalfopristin wurde dann in Medium gelöst, so dass eine Stammlösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml entstand. Diese Stammlösung wurde schließlich in bestimmten Volumina zum Medium zugegeben, um die gewünschten Endkonzentrationen zu erreichen.

Als Reinsubstanz wurde Quinupristin/Dalfopristin nicht untersucht.

2.4 Zelllinien

In der Arbeit wurden für die Zellkulturen zwei kontinuierliche, etablierte Zelllinien und eine Primärkultur von Endothelzellen verwendet.

BALB/C 3T3-Fibroblasten

Die Zelllinie der Fibroblasten „BALB/C 3T3 clone A31“ wurde von der Firma ATCC (Virginia, USA), Kat.Nr.: CCL-163 erworben. Die für die experimentellen Arbeiten verwendeten Passagen lagen zwischen 104 und 108. Wenn die Zellen nicht kontinuierlich für *in vitro* Analysen verwendet wurden, wurden sie in flüssigem Stickstoff gelagert.

EA.hy 926 Endothelzellen

Die Endothelzelllinie wurde aus dem Labor Edgell (North Carolina, USA) erworben. Für die Experimente dieser Arbeit wurden Zellen in der Passage 25 – 43 eingesetzt.

HUVEC

Diese primären Endothelzellen wurden uns freundlicher Weise von Frau Birgit Hotz, Chirurgische Klinik I, Charité Universitätsmedizin Berlin, zur Verfügung gestellt. Alle Experimente wurden in der Zellpassage 6 durchgeführt.

2.5 TNF- α (Tumornekrosefaktor-alpha)

Die Substanz lag als Pulver vor und wurde von der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) bezogen. 10 μg TNF- α wurden in 100 μl sterilem Wasser gelöst, so dass man eine Stammlösung mit der Konzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ erhielt. Diese Stammlösung wurde portioniert und im Gefrierschrank bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Für die Experimente wurden die jeweils benötigten Aliquote aufgetaut. In den Versuchen wurde eine Konzentration von 10 ng/ml TNF- α eingesetzt. Dementsprechend wurden die Volumina zum Zellkulturmedium hinzugegeben und anschließend die Zellen inkubiert.

2.6 Zellkultivierung

2.6.1 Ansatz und Supplementierung des Kulturmediums für EA.hy 926 Endothelzellen

Als Medium für die Kultivierung der EA.hy 926 Zelllinie wurde DMEM (nach Dulbecco modifiziertes Eagle's Minimum Essential Medium) benutzt (Dulbecco und Freeman, 1959). Es wurde mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 1% L-Glutamin und 2% HAT (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) ergänzt. Diese Supplemente dienen der besseren Nährstoffversorgung der Zellen und garantierten damit ein besseres Wachstum. Nach Anbruch wurde das Medium bei $4 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das jeweils bei Bedarf neu angesetzte Medium wurde innerhalb von spätestens 14 Tagen verbraucht oder anderenfalls verworfen.

Die Herstellung des Mediums geschah unter sterilen Bedingungen.

2.6.2 Ansatz und Supplementierung des Kulturmediums für HUVEC

Zur Kultivierung der HUVECs wurde eine Mischung aus zwei unterschiedlichen Medien benutzt. Die beiden Medien wurden in einem Verhältnis von 1:1 (jeweils 10 ml, insgesamt 20 ml) in jeder Zellkulturflasche gemischt:

1. „Endothelial cell growth medium“ mit „Supplement mix“ (PromoCell), bestehend aus einem Basalmedium, welches mit dem „Supplement mix“ aufgefüllt wurde (Knedler und Ham, 1987). Die Konzentrationen der Zusatzstoffe in diesem Medium waren nach Zugabe 0,4% ECGS/H („endothelial cell growth supplement“ mit Heparin), 2% FCS, 0,1 ng/ml „Epidermal growth factor“, 1 µg/ml Hydrokortison und 1 ng/ml „basic fibroblast factor“. Die Konzentration des FCS wurde durch zusätzliche Zugabe auf einen Volumenanteil von 10% gebracht (Gorman et al., 1996).
2. „Endothelial medium“ (PAA). Dieses ist ein Kompletmedium für die Kultivierung von primären Endothelzellen mit nicht näher bezeichneten Inhaltsstoffen. Dieses serumfreie Medium wurde mit 10% FCS supplementiert.

Die Medien wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen hergestellt und direkt in den Zellkulturflaschen gemischt. Die Medien wurden innerhalb von zwei Wochen verbraucht oder anderenfalls verworfen.

2.6.3 Ansatz und Supplementierung des Kulturmediums für 3T3-Fibroblasten

Für die Kultivierung der 3T3-Fibroblasten wurde DMEM mit einem Zusatz von 4,5 g/l Glukose benutzt. Auch das Medium für die Fibroblasten wurde in Analogie zu dem der Endothelzellen supplementiert. Es wurden 10% FCS und 4 mM L-Glutamin zugesetzt.

Die Herstellung geschah unter sterilen Bedingungen, und das angesetzte Medium wurde innerhalb eines Zeitraumes von 2 Wochen verbraucht oder verworfen.

2.6.4 Kultivierung der EA.hy 926 Endothelzellen

Für die Kultivierung der Endothelzelllinie EA.hy 926 wurden die Zellen jeweils in Zellkulturflaschen (75 cm², Nunc) mit 10 ml Kulturmedium eingesät und in einem Begasungsbrutschrank (37 °C, 5% CO₂, 96% Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Das supplementierte Medium wurde ca. alle 48 – 72 Stunden unter sterilen Bedingungen gewechselt.

Aufgrund der guten Wachstumsbedingungen war es bei schnellem Wachstum möglich, die Endothelzellen bis zu zweimal pro Woche zu passagieren. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Zellkul-

turen eine 70 – 80%ige Konfluenz erreicht. Das Zellwachstum und die Sterilität wurden regelmäßig mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Carl Zeiss AG) kontrolliert.

2.6.5 Kultivierung der HUVECs

Die Kultivierung der HUVECs entsprach in weiten Teilen der Kultivierung der EA.hy 926 Endothelzellen. Hier wurden jedoch 20 ml Mediumgemisch, jeweils 10 ml von jedem Medium, in die Zellkulturflaschen (75 cm², Sarstedt) zu den Endothelzellen gegeben.

Die Wachstumsrate war deutlich geringer, so dass eine Subkultivierung nur ca. einmal pro Woche möglich war.

2.6.6 Kultivierung der 3T3-Fibroblasten

Die Kultivierung der 3T3-Fibroblasten erfolgte in deren speziellem Medium analog zur Kultivierung der EA.hy 926 Endothelzellen.

2.7 Subkultivierung („Passagieren“) der Zellen

Beim Zellwachstum konnte man drei Phasen unterscheiden: Nach dem Einbringen von Zellen in die Kulturflaschen mit dem enthaltenen Medium bzw. Mediumgemisch kam es zur Phase der Anpassung (lag-Phase). Nach dieser Adaptierungsphase gingen die Zellen zu einer exponentiellen Vermehrung, der log-Phase, über. Nach Beendigung des Wachstums folgte die Plateauphase (stationäre Phase), in der die Zellzahl in der Kulturflasche in etwa konstant blieb.

Wenn die im Medium verfügbaren Substrate verbraucht waren, hörte das Zellwachstum auf bzw. wurde reduziert (Sättigungsdichte). Eine weitere Möglichkeit, dass die neuen Zellen abstarben, war, dass aufgrund der hohen Konfluenz kein Platz am Boden der Zellkulturflaschen vorhanden war (Freshney, 1990). Damit die Zellen in diesem Stadium weiter wuchsen, musste man sie spätestens zu diesem Zeitpunkt in weiteren Kulturflaschen subkultivieren. Je nach Bedarf und Planung weiterer Experimente wurde ein Teil oder der gesamte Zellbestand in mehrere neue Zellkulturflaschen überführt oder aber kryokonserviert.

2.7.1 Prinzip der Subkultivierung

Die am Boden der Zellkulturflaschen anhaftenden Zellen wurden mittels Trypsin, einer Protease, vom Boden abgelöst, in Suspension gebracht und anschließend auf mehrere Gewebekulturflaschen verteilt.

2.7.2 Durchführung der Subkultivierung

Das Medium in der jeweiligen Zellkulturflasche wurde mit Hilfe einer sterilen Pipette entfernt und verworfen. PBS (10 ml/75 cm²) wurde in die Zellkulturflasche pipettiert, und diese wurde dann hin- und hergeschwenkt („Waschen der Zellen“). Damit wurden restliche Mediumspuren in der Zellkulturflasche entfernt, da das im Medium enthaltene Serum und Calcium die Wirkung der Protease hätte beeinflussen können, die im Anschluss hinzugefügt wurde. Das PBS wurde dann mit Hilfe einer neuen sterilen Pipette entfernt und verworfen. Das Waschen mit dem PBS wurde zweimal wiederholt, um eine optimale Wirkung des Trypsins zu gewährleisten.

Anschließend wurde das Trypsin (3 ml/75 cm²) mit Hilfe einer sterilen Pipette in die Zellkulturflasche gegeben. Die Zellkulturflasche wurde mehrfach geschwenkt, so dass die Zellschicht vollständig von dem Trypsin bedeckt war, und anschließend in den Brutschrank gestellt. Die Wärme verstärkte die Wirkung des Trypsins. Nach 2 – 3 Minuten begannen die Zellen sich abzurunden und vom Flaschenboden zu lösen. Beim Schwenken der Kulturflaschen lösten sich die Zellen als Rasen und verklumpten miteinander.

Die Wirkung der Protease wurde durch Zugabe von 4 ml Kulturmedium, bzw. durch das darin enthaltene Serum gestoppt. So wurden enzymatisch bedingte Veränderungen der Zelloberflächen verhindert.

Durch mehrfaches vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden noch eventuell bestehende Zellverbände aufgelöst und vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, so dass möglichst alle Zellen vereinzelt in der Suspension vorlagen.

Die Zellen wurden anschließend in einer Zentrifuge bei 2000 U/min ca. 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, ein Gemisch aus Trypsin und Medium, wurde vorsichtig abgekippt. Das Zellpellet wurde in 2 ml Medium resuspendiert. Durch diesen Schritt wurde sichergestellt, dass die Zellen auch nach der Subkultivierung in ihrem reinen Medium, ohne Verunreinigungen durch Trypsin, weiter wachsen konnten.

Diese Zellsuspension wurde je nach Bedarf auf mehrere Zellkulturflaschen, in der Regel 1:2, bei den HUVECs 1:4, aufgeteilt und mit neuem Kulturmedium aufgefüllt. Die Zellkulturflaschen wurden verschlossen und weiterkultiviert.

Die Zellen durften nur bis zu der Konzentration verdünnt werden, die ihnen den Wiederbeginn des Wachstumszyklus nach einer lag-Phase von 24 Stunden oder kürzer erlaubte. Ebenso war darauf zu achten, dass die Zellen nicht zu dicht eingesetzt wurden, da sonst innerhalb kürzester Zeit eine weitere Subkultivierung durchgeführt werden musste.

2.8 Kryokonservierung der Zelllinien

Die Zellen wurden portionsweise eingefroren, um einen Zellvorrat in der eingesetzten Passage zu erhalten und sie gegen die Kontaminationsgefahr und anderweitigen Verlust (z. B. durch Defekt des Inkubators) zu schützen. Bei Bedarf konnten sie jederzeit wieder aufgetaut werden.

2.8.1 Durchführung der Kryokonservierung

Die Zellen wurden auf Kontaminationsfreiheit überprüft, trypsiniert und pro Kulturflasche in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und der Boden mit dem Zellpellet in 6 ml Kulturmedium und einem 10%igen Zusatz von DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann auf drei Kryoröhrchen verteilt.

Diese Röhrchen kamen in die Kryobox, welche für 24 Stunden bei -80 °C gelagert wurde. In dieser Box wurden die Zellen im Medium langsam um etwa 1 °C/min eingefroren.

Die so eingefrorenen Endothelzellen wurden dann der Box entnommen und nach 24 Stunden rasch in flüssigen Stickstoff überführt.

2.8.2 Auftauen der kryokonservierten Zellen

Zum erneuten Anzuchten der eingefrorenen Zellen wurden unter Benutzung von Schutzbrille und Handschuhen je nach Zellbedarf ein oder zwei Kryoröhrchen aus dem Stickstoffbehälter entnommen und in einem kleinen Becherglas zur Laminar-Air-Flow-Kabine transportiert.

Die Kryoröhrchen wurden zum Erwärmen für etwa 5 Minuten unter fließendes warmes Wasser gehalten. Anschließend wurde der Verschluss mit 70%igem Ethanol gesäubert und der Inhalt in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Dann wurden 4 ml frisches Kulturmedium zur Zellsuspension gegeben und die Zellen resuspendiert.

Nach der Zentrifugation (10 min/2000 U/min) wurde der Überstand abdekantiert und verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml des normalen Kulturmediums resuspendiert und auf die Zellkulturflaschen verteilt.

2.9 Bestimmung der Zellzahl

2.9.1 Prinzip der Zellzahlbestimmung

Zur Erhaltung standardisierter Kulturbedingungen und gleich bleibender Zellzahlen bei der durchflusszytometrischen Auswertung wurden vor jedem Experiment die Zellen in einer Zählkammer nach Neubauer unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Konzentration ergab sich aus der visuell ermittelten Zellzahl innerhalb eines definierten Areals.

2.9.2 Durchführung der Zellzahlbestimmung

Die Zählkammer musste vor dem Zufügen der Zellsuspension vorbereitet werden. Ein richtiger Aufbau war gewährleistet, wenn es beim Betrachten der Neubauer-Kammer zu einem Auftreten von Interferenzstreifen („Newtonsche Ringe“) kam.

Die zu zählenden Zellen wurden trypsiniert und die Zellsuspension gründlich homogenisiert. Die Zellsuspension wurde anschließend 1:4 verdünnt und jeweils 10 µl der Verdünnungslösung sowohl am oberen als auch am unteren Kammerrand aufgetragen. Durch die Kapillarkräfte zog sich die Flüssigkeit in die Zählkammer. Mit einem 10er-Objektiv wurde das Zählnetz der Kammer fokussiert. In jeder Kammer wurden jeweils 4x4 Quadrate ausgezählt und dann der Mittelwert berechnet.

Bei einer zu hohen Dichte der Zellen konnte es durch Überlagerung von einzelnen Zellen zu Problemen bei der genauen Bestimmung kommen. Diese Zellsuspensionen wurden dann zunächst mit Medium verdünnt.

Die ermittelte Zellzahl wurde mit 10^4 multipliziert. Ein Verdünnungsfaktor musste in die Multiplikation mit eingerechnet werden. Das Ergebnis der Berechnung ergab die Zellzahl pro ml. Für die Berechnung der Zellzahl wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{) x Kammertiefe (mm) x Verdünnung}} = \text{Zellen/ml}$$

2.10 Sterile Versuchsbedingungen

Steriles Arbeiten ist eine der unabdingbaren Grundvoraussetzung für Kultivierung, Subkultivierung und Erhalt einer gut eingestellten und keimfreien Zellkultur. Der gute Zustand der Zellen ist für einen erfolgreichen Versuchsablauf essentiell. Verunreinigte Zellkulturen könnten die Zellen vorher schädigen, was dann möglicherweise Auswirkung auf die Ergebnisse der Experimente hat.

Da in der vorliegenden Arbeit Antibiotika und die Reaktionen der Zellen darauf getestet wurden, musste eine Adaption an antibiotische Reize durch die Zellkultur vermieden werden. Folglich wurde bei der Kultivierung der verwendeten Zellkulturen auf den sonst üblichen Einsatz von Antibiotika (z. B. Penicillin/Streptomycin) aber auch von Antimykotika (z. B. Amphotericin B) verzichtet.

Die Kultivierung und Subkultivierung fanden in einem Raum statt, der ausschließlich für die Arbeit mit Zellkulturen unter den oben genannten Bedingungen bestimmt war. Dieser Raum wurde abends regelmäßig mit UV-Licht bestrahlt und verfügte des Weiteren über eine Luftfilteranlage, um die Luft möglichst keimarm zu halten.

Es wurde unter einer Reinraumwerkbank (Laminar-Air-Flow-Kabine) gearbeitet. Die Arbeitsfläche konnte nach jeder Benutzung extra mit UV-Licht bestrahlt werden. Die Arbeitsfläche wurde vor und nach jeder Benutzung mit 70%igem Ethanol gründlich desinfiziert. Auch zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurde bei Bedarf die Arbeitsfläche desinfiziert.

Vor der Entnahme der Kulturflaschen aus dem Begasungsbrutschrank und dem Beginn der Subkultivierung bzw. des Experiments wurden die Hände gründlich gewaschen, gefolgt von einer Desinfektion der Hände. Es wurden unsterile Handschuhe angezogen, die häufig mit 70%igem Ethanol besprüht wurden. Darüber hinaus wurde auf das Tragen eines sauberen geschlossenen Schutzkittels geachtet.

2.11 Durchflusszytometrie

Die Expression der proinflammatorischen Oberflächenantigene der Endothelzellen wurde mit Hilfe der spezifischen immunologischen Markierung und der anschließenden Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei wurde die Häufigkeit der folgenden Antigene bestimmt: CD 34,

E-Selektin (CD 62E), ICAM-1 (CD 54) und VCAM-1 (CD 106). Für die Markierung wurden fluorchromkonjugierte Antikörper verwendet.

2.11.1 Antikörpermarkierung der Endothelzellen

Die untersuchten Oberflächenantigene wurden mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern immunologisch markiert. Die Antikörper sind spezifisch gegen ein bestimmtes Antigen auf den Endothelzellen gerichtet. Die in der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper waren entweder mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) oder mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt. Unter Anregung mit Laserlicht absorbieren die Farbstoffe einen Teil der Strahlungsenergie und reemittieren Fluoreszenzlicht einer definierten Wellenlänge. Die PE- und FITC-Antikörper haben eine unterschiedliche Reemissionswellenlänge.

| Antigen | Hersteller & Katalognummer | Isotyp/ Herkunftstier | Klonnummer | Konjugation |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|------------|-------------|
| CD 34 | Immunotech; IM1250 | IgG ₁ ; Maus | QBEnd-10 | PE |
| E-Selektin | Chemicon; CBL 180F | IgG ₁ ; Maus | 1.2B6 | FITC |
| ICAM-1 | Immunotech; IM0726 | IgG ₁ ; Maus | 84H10 | FITC |
| VCAM-1 | BD Pharmingen; 555647 | IgG ₁ ; Maus | 51-10C9 | PE |

Tabelle 1: Monoklonale Antikörper.

2.11.2 Prinzip der durchflusszytometrischen Messung

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich in Zellsuspensionen, die mit einem farbstoffkonjugierten Antikörper markiert sind, die Menge von bestimmten Oberflächenantigenen auf den Zellen analysieren. Es handelt sich somit um eine Weiterentwicklung der immunhistologischen Methodik.

Über eine Injektionskapillare wird die Zellsuspension in das Durchflusszytometer aspiriert und mit Hilfe eines Kapillarsystems zum Detektionspunkt transportiert. Der Injektor erzeugt eine Säule aus „Sheath Fluid“, der Trägerflüssigkeit. In dieser Flüssigkeit werden die Zellen einzeln

hintereinander in den Detektionspunkt freigesetzt. Dort passieren die Endothelzellen den Punkt, in dem sie auf den Laserstrahl treffen. Der Fluss ist laminar mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 1 bis 6 m/s.

Die „Sheath Fluid“ ist eine isotone und monodisperse Lösung von diversen Salzen. Sie bietet den Zellen eine optimale Umgebung, in der Verformungen und Beschädigungen auf ein Minimum reduziert werden.

Das in dem Durchflusszytometer verwendete Laserlicht wird durch Argongas mit einer Leistung von 15 mW emittiert. Es ist monochromatisch (488 nm) und kohärent, d. h. alle Lichtwellen laufen parallel. Der Laserstrahl wird durch den Strahlungsverlauf gebündelt und fokussiert. Am Detektionspunkt hat der Strahl einen Durchmesser von etwa der Größe einer Zelle (5-50 μm).

Wenn der Argonlaserstrahl auf eine Zelle, die nicht mit fluorchrommarkierten Antikörpern markiert ist, trifft, wird er in alle Richtungen (360°) reflektiert. Der Anteil der entlang der Achse des Laserstrahls gestreuten Strahlen ist proportional zur Größe der Zelle (forward angle light scatter, FSC). Die im 90° Winkel reflektierten Strahlen werden hauptsächlich von inneren Zellstrukturen ausgehen. Damit ist ein Rückschluss auf die Granularität der untersuchten Zellen möglich (side scatter, SSC).

Für die Analysen dieser beiden Parameter ist es Voraussetzung, dass die Zellen homogen und rund sind. Wenn diese Voraussetzungen nicht erfüllt sind, kann man die Werte nur als „ungefähre“ Parameter annehmen.

Der FSC und der SSC geben die intrinsischen, d. h. ohne Immunmarkierung bestimmbar, Eigenschaften der Zellen an. Sie dienen einer morphologischen Bestimmung der untersuchten Zellen.

Mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern lassen sich die extrinsischen Eigenschaften der Endothelzellen analysieren. Die Antikörper binden in der Zellsuspension an ihre spezifischen Oberflächenantigene. Wenn der Laserstrahl auf den Farbstoff trifft, absorbiert dieser einen Teil der eingestrahlten Energie und wird damit angeregt. Anschließend gibt er diese Energie wieder in Form von Licht mit geringerer Energie (= größere Wellenlänge) ab. Dieses Licht wird mit Hilfe von diversen Filtern und dichromatischen Spiegeln vom ebenfalls reflektierten Laserlicht abgetrennt.

Jedes Fluorochrom hat sein spezifisches Emissionsspektrum. PE-Antikörper emittieren Licht mit 580 nm (rot) und FITC-Antikörper mit 530 nm (grün). Die Lichtmenge einer Wellenlänge ist der Anzahl der markierten Epitope proportional. Da sich die Emissionsspektren von FITC und PE überschneiden, ist eine Korrektur und Auftrennung über ein Filtersystem notwendig.

Die an den einzelnen Detektoren eintreffenden Ereignisse (emittierte Lichtquanten) werden verstärkt und über eine Kompensationselektronik wird die Restinterferenz ausgeglichen. Die analogen Daten (elektrische Impulse) werden digitalisiert und als Rohdaten auf dem angeschlossenen PC gespeichert. Die weitere Bearbeitung und Auswertung der Rohdaten geschieht mit der Auswertungssoftware Winlist[®] 2.0 (Verity Software House Inc.).

2.11.3 Vorbereitung der Proben für die Antigenexpressionsbestimmung

Für die Analyse der Proben am Durchflusszytometer (FACScan[®]) wurden die Antikörper in die Probenröhrchen vorpipettiert. Für jeden Typ von Oberflächenantigen wurde eine Antikörpermenge, die zur Markierung von etwa einer Million Zellen ausreichte, verwendet. Da die unterschiedlich fluorchrommarkierten Antikörper vom Hersteller nur in verschiedenen Konzentrationen angeboten wurden, entsprach dies einem Volumen von 2 µl bei der FITC-konjugierten Antikörpersuspension und 5 µl bei den PE-konjugierten Antikörpern.

Um zufällige Fehler beim Pipettieren aufgrund von sehr kleinen Pipettierolumina zu vermeiden, wurde eine Verdünnung der ursprünglichen Antikörpersuspensionen vorgenommen. Die FITC-Antikörper wurden 1:4 verdünnt, das entsprach 2 µl Antikörpersuspension plus 8 µl PBS. Die Verdünnung für die PE-Antikörper entsprach 1:1, also 5 µl Antikörpersuspension plus 5 µl PBS. Damit ergab sich für beide Antikörpersuspensionen ein einheitliches Pipettierolumen von 10 µl pro Analysenröhrchen.

Nach Vorlage der Antikörper wurde die Zellsuspension zugegeben. Die Volumina der zuzugebenden Zellsuspensionen waren abhängig von der in der Neubauer Zählkammer gezählten Zellzahl. Ausgehend von dieser Zellzahl wurde das Zugabevolumen so gewählt, dass jeweils ca. 10^5 Zellen in die Analysebehälter für die Durchflusszytometrie zugegeben wurden.

Das Antikörper-Zellsuspensions-Gemisch wurde auf dem Vortex gut durchgemischt und anschließend für 30 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben gründlich gewaschen. Als Waschlösung wurden in jedes Probengefäß 2 ml einer 0,05%igen Azid-PBS-Lösung hinzupipettiert. Damit wurden alle nicht gebundenen Antikörper neutralisiert. Nach diesem Schritt wurde das Gemisch nochmals 10 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Im Anschluss an die zweite Inkubationsphase wurde die Suspension in der Zentrifuge für 10 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert und der Überstand mittels einer Pasteur-Pipette verworfen.

Aufgrund der verwendeten Antikörpermenge (ausreichend für die Markierung von 10^6 Zellen) und der Menge der Zellen in der Zellsuspension (10^5 Zellen) konnte von einem deutlichen Überschuss an Antikörpern ausgegangen werden.

2.11.4 Durchführung der Messung

Für die durchflusszytometrische Messung wurde ein Durchflusszytometer vom Typ FACScan verwendet. Das Gerät wurde in regelmäßigen Abständen mit speziellen fluoreszenzmarkierten Latexpartikeln (Typ Calibrate[®], Becton Dickinson) geeicht.

Als erstes wurde eine Blankokontrolle, d. h. eine Zellsuspension mit nichtmarkierten Zellen, vermessen. Die Zellen zeigten eine so genannte „Autofluoreszenz“, d. h. ein Teil der Zellen führte zur Messung eines Fluoreszenzereignisses, obwohl sie nicht markiert waren. Mit Hilfe der Blankomessung konnte somit ein solcher systematischer Fehler vermieden werden.

Danach konnten die Messungen der eigentlichen Proben durchgeführt werden. Bei jeder Messung wurden 10.000 Zellen ausgewertet. Vor jeder Messung wurden die Proben einige Sekunden resuspendiert, um eine gleichmäßige Messung zu ermöglichen.

Die Messergebnisse wurden von dem Durchflusszytometer jeweils als separate Datei auf dem zugehörigen Rechner abgelegt. Diese Daten wurden mittels des Kopierprogramms FASTFILE 38[®] (Becton Dickinson) auf einen angeschlossenen PC übertragen.

Anschließend wurden sie mit der speziell für die Durchflusszytometrie angepassten Auswertungssoftware Winlist analysiert und ausgewertet.

2.11.5 Auswertung mit Winlist

Es wurden zwei Histogramme zur Auswertung ausgewählt:

1. Im ersten Histogramm (a) wurden die FSC (X-Achse) und die SSC (Y-Achse) gegeneinander aufgetragen. Damit wurden die intrinsischen Merkmale der untersuchten Endothelzellen dargestellt (siehe Abbildung 7).
2. Im zweiten Histogramm (b) wurde die Fluoreszenz (jeweils entweder FITC, HP3 oder PE, HP4) auf der X-Achse gegenüber der Anzahl der positiv markierten Zellen auf der Y-Achse aufgetragen (siehe Abbildung 7).

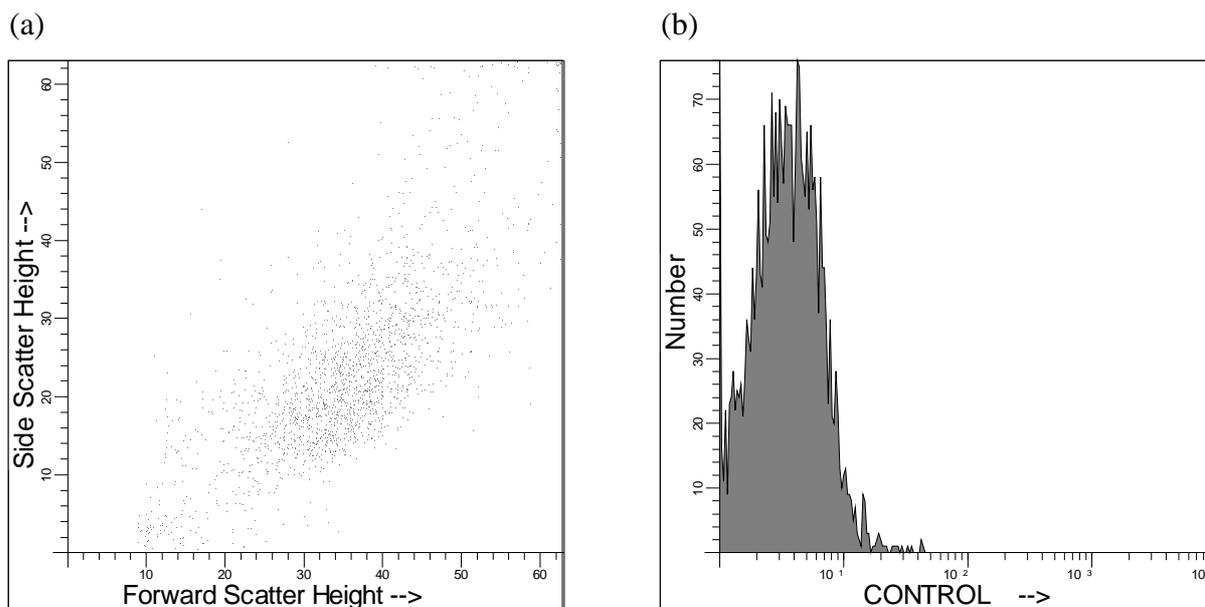


Abbildung 7: linkes Histogramm (a): Darstellung der intrinsischen Eigenschaften der einzelnen Zellen nach FSC und SSC; rechtes Histogramm (b): Darstellung der Fluoreszenz einer Kontrolle als Anzahl der positiv markierten Zellen einer bestimmten Fluoreszenz.

Im rechten Histogramm (b), welches die Fluoreszenz der Zellen in einem bestimmten Spektrum darstellt, wurde eine Region (Gate R1) generiert, die ca. 1% der Zellen im Fluoreszenzspektrum beinhaltet (siehe Abbildung 8). Da diese Region in der unmarkierten Blankokontrolle gewählt wurde, ging man also von einer gemessenen Autofluoreszenz von 1% aus. Da dieser Fehler auch bei der Messung der immunmarkierten Zellen auftreten würde, konnte dieser Fehler vermieden werden.

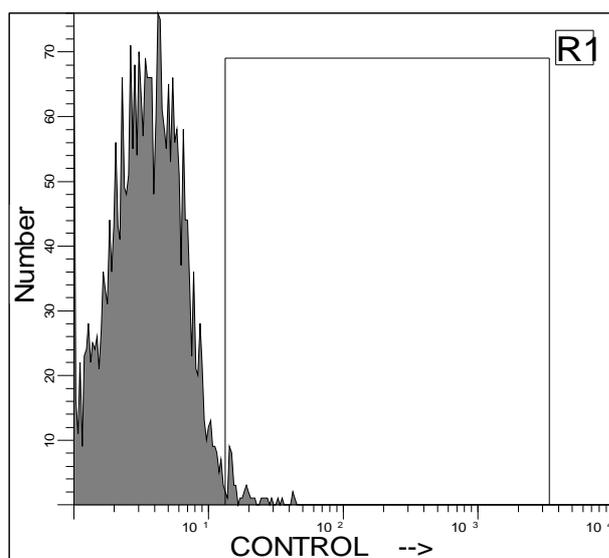


Abbildung 8: Erstellung des Gates R1 zur Markierung von 1% der Zellen, die eine Autofluoreszenz aufweisen (% aller analysierten Zellen der Probe: Gate R1: 0,96).

Mit diesen Voreinstellungen konnten die einzelnen Datensätze in einen so genannten „Batchfile“ geladen und nacheinander ausgewertet werden. Bestimmt wurde der prozentuale Anteil der positiv markierten Zellen für ein bestimmtes Oberflächenprotein (siehe Abbildung 9).

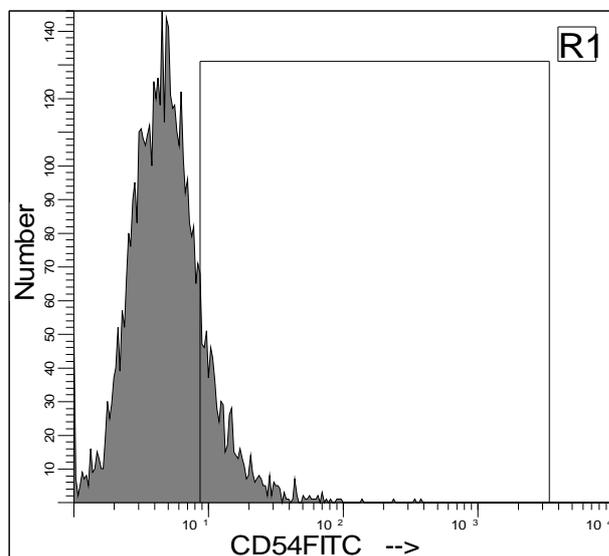


Abbildung 9: CD 54 markierte Gruppe mit Gate R1 (% aller analysierten Zellen der Probe: Gate R1: 15,98).

Diese Daten wurden anschließend statistisch analysiert.

2.11.6 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse der einzelnen Experimente erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS[®] 12.0 („Statistical Package for the Social Sciences“, SPSS Inc.). Die Daten der einzelnen Antibiotika wurden getrennt voneinander analysiert.

Mit Hilfe des „Univariate General Linear Model“ (ANOVA) wurden jeweils die folgenden beeinflussenden Faktoren untersucht: die Dosis und der Zeitpunkt. In den Zeitpunkt flossen auch die unterschiedlichen Passagen und tägliche Unterschiede ein. Der Einfluss dieser Faktoren auf die Anzahl der positiv markierten Zellen für jedes Oberflächenantigen wurde gegen ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ getestet.

Ob die Zunahme der einzelnen Oberflächenantigene gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant war, wurde mit dem Post-Hoc-t-Test nach Dunnett (zweiseitig) untersucht. Auch hier lag das getestete Signifikanzniveau bei $p < 0,05$. Statistisch signifikante Ergebnisse wurden im weiteren Verlauf mit einem * gekennzeichnet.

Aufgrund der Schwankungen der analysierten Oberflächenantigenkonzentration in den nicht behandelten Kontrollen wurden weiterhin die „Ratios“ (Quotienten der prozentualen Zunahme der Oberflächenantigene bei Behandlung im Vergleich zur zugehörigen Kontrolle) berechnet.

2.12 Zytotoxizitäts-Analyse

2.12.1 Prinzip des MTT-Zytotoxizitätstest

Der MTT-Zytotoxizitätstest wurde erstmal von Mosmann im Jahre 1983 beschrieben und seitdem weiter verbessert (Mosmann, 1983, Denizot und Lang, 1986, Hansen et al., 1989). Dieser Test wurde ursprünglich für Lymphom-Zellen entwickelt, kann aber auch für 3T3-Fibroblasten verwendet werden. 3T3-Zellen gelten heute als Standardzelllinie zur Evaluation der Zytotoxizität einer Substanz (Borenfreund und Puerner, 1985).

In dem verwendeten modifizierten MTT-Zytotoxizitätsprotokoll wurden die Zellen zehn Tage dem zu untersuchenden Agens in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt (Scholz et al., 1999). Anschließend gab man Thiazolylblau (MTT) zu den Zellen, wobei die noch vitalen Zellen es in einen blauen Farbstoff umwandelten (siehe 2.12.2). Dieser Farbumschlag wurde dann in den einzelnen Vertiefungen („wells“) der 96-Well-Platte mit einem Photometer durch die Messung der optischen Dichte bestimmt. Anhand der Extinktion konnte auf die Menge der noch vitalen Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle geschlossen werden. Die genaue Durchführung des 10-Tages-Protokolls wird nachfolgend beschrieben.

Nach Vorversuchen wurde in dieser Arbeit das gleiche Test-Protokoll auch für EA.hy 926 Endothelzellen angewandt.

2.12.2 MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromid)

MTT, auch Thiazolylblau genannt, ist ein Tetrazolium-Salz, welches in den Mitochondrien von vitalen Zellen durch verschiedene Dehydrogenase-Enzyme umgewandelt wird (Jones, 1968). Es verändert seine Farbe vom gelben Ausgangssubstrat zu einem dunkelblauen Formazan-Produkt. Die dunkelblauen Kristalle müssen dann mit der Desorptionslösung, die Isopropanol enthält, aufgelöst werden, um eine homogene Färbung des Wellinhalts zu erreichen. Diese Färbung ist gut in der Photometrie bei der Extinktionsmessung mit 570 nm Wellenlänge zu detektieren.

2.12.3 Herstellung der Lösungen

Zur Versuchsdurchführung mussten vor Beginn des Versuchsdurchlaufs verschiedene Lösungen vorbereitet werden.

Die Testsubstanzen, in diesem Fall Erythromycin, Azithromycin und Clarithromycin in den zur intravenösen Gabe vorgesehenen Formulierungen, wurden in Kulturmedium gelöst. Dies war bei den Reinsubstanzen nicht möglich, da diese sich nicht im Medium lösen ließen (siehe 2.3). Sie wurden in Methanol gelöst und dann mit Kulturmedium weiterverdünnt. Das Volumen des Methanols wurde so gewählt, dass die Konzentration im Medium 2% betrug. Die Lösungen der Testsubstanzen wurden jeweils unmittelbar vor ihrer Verwendung frisch angesetzt. Am Tag 1 mussten die Konzentrationen auf das 1,33 fache erhöht werden, da die 50 µl Zellsuspension, die am Beginn des Versuchs bereits in den Wells vorhanden waren, noch kein Antibiotikum enthielten. Vor der Zugabe zu den Zellen wurden die Medien nochmals steril filtriert.

Als Positivkontrolle wurde 5-Fluoruracil, ein Zytostatikum, verwendet. Die Substanz wurde zunächst in einer Konzentration von 2 mg/ml in destilliertem Wasser gelöst und in Portionen von 20 µl eingefroren. Zu Beginn des Versuches wurde es dann wieder aufgetaut und mit 980 µl Medium auf ein Verhältnis von 1:50 verdünnt. Dies entsprach einer Konzentration von 40 µg/ml. Anschließend wurde diese Lösung nochmals verdünnt und in einer Konzentration von 0,29 µg/ml als Positivkontrolle verwendet. Die geeignete Konzentration an 5-Fluoruracil als Positivkontrolle wurde in Vorversuchen ermittelt.

Für die MTT-Stammlösung wurden 5 mg MTT in 1 ml PBS (mit Calcium und Magnesium) gelöst. Die MTT-Desorptionslösung bestand aus 20 ml 1N HCl und 480 ml Isopropanol, welche miteinander vermischt wurden.

2.12.4 Versuchsdurchführung

Die Durchführung der Bestimmung der Zelltoxizität der einzelnen Antibiotika geschah nach einem modifizierten MTT-Zytotoxizitätsprotokoll mit zehn Tagen Inkubation. Um mögliche Einflüsse von Zusatzstoffen in den Infusionslösungen der Makrolide zu erkennen, wurden die Versuche mit den jeweiligen Reinsubstanzen wiederholt. Nach dem gleichen Prinzip wurden die Zytotoxizitäten neben den 3T3-Zellen auch an EA.hy 926 Endothelzellen bestimmt.

Um das Protokoll auch auf die Endothelzellen anwenden zu können, waren Vorversuche notwendig. In diesen Versuchen wurde die Menge der einzusäenden Zellen bestimmt, bei der eine Auswertung nach zehn Tagen möglich war.

Die 3T3-Zellen, wie auch die Endothelzellen, wurden in 96-Well-Platten eingesät, über zehn Tage dem Einfluss von diversen Konzentrationen der Antibiotika ausgesetzt und anschließend die Menge der noch vitalen Zellen mit Hilfe des Farbstoffes MTT photometrisch gemessen.

Das Protokoll sah eine Versuchsdauer von zehn Tagen vor. Bei jedem Versuch wurde ein Doppelansatz, also zwei Multiwell-Platten pro Antibiotikum, gewählt. Alle Versuche wurden zu einem weiteren Zeitpunkt wiederholt.

1. Tag:

Die in Zellkulturschalen kultivierten Zellen wurden analog zur Subkultivierung zunächst trypanisiert, zentrifugiert und in ihrem jeweiligen Medium resuspendiert. Die Zellen wurden dann mittels der Neubauerkammer gezählt, und anschließend wurden die 3T3-Fibroblasten auf eine Zellkonzentration von 1×10^4 Zellen/ml Kulturmedium eingestellt. Die Zellsuspension der EA.hy 926 Endothelzellen wurde auf eine Zellkonzentration von 2×10^4 Zellen/ml Kulturmedium eingestellt. Die einzelnen Wells der Multititer-Platte wurden mit einer Mehrkanal-Mikropipette folgendermaßen beschickt: 10 x 6 Wells wurden jeweils mit 50 µl Zellsuspension befüllt, so dass pro Well im Durchschnitt etwa 500 3T3-Fibroblasten bzw. 1000 EA.hy 926 Endothelzellen vorhanden waren. In die freien Wells am Rand der Platte (Blanks) wurden jeweils 200 µl Kulturmedium pipettiert. Die Multiwell-Platten wurden anschließend für zwei Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und 96% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Danach wurde im Mikroskop überprüft, ob die Zellen am Boden der Vertiefungen angewachsen waren. Die Vertiefungen mit den eingebrachten Zellen wurden dann nach einem festgelegten Schema mit 150 µl Kulturmedium mit einer 1,33 fachen Konzentration des zu untersuchenden Antibiotikums beschickt (siehe Abbildung 10). Da beim Einsäen der Zellen 50 µl Medium ohne Antibiotikum verwendet wurde, musste folglich am Tag 1 die 1,33 fache Konzentration dazugegeben werden, um bei 200 µl Gesamtvolumen auf die zu untersuchende Konzentration des Makrolides zu kommen. Auf jeder Platte wurde eine Positivkontrolle mit 5-Fluorouracil (0,29 µg/ml) und eine Negativkontrolle, d. h. Kulturmedium ohne Zusatz von Antibiotikum, mituntersucht. Bei den Reinsubstanzen wurde jeweils noch eine Vehikelkontrolle analysiert. Nachfolgend wurden die Multititer-Platten wieder im Brutschrank inkubiert.

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B |
| B | B | PK | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A7 | A8 | K | B |
| C | B | PK | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A7 | A8 | K | B |
| D | B | PK | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A7 | A8 | K | B |
| E | B | PK | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A7 | A8 | K | B |
| F | B | PK | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A7 | A8 | K | B |
| G | B | PK | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A7 | A8 | K | B |
| H | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B |

Abbildung 10: Pipettierschema für die Antibiotikabeschickung der 96-Well-Platte im MTT-Zytotoxizitätstest; PK = Positivkontrolle, A1-A8 = Antibiotikum in verschiedenen Konzentrationen, K = Kontrolle, B = „Blank“, Leerwert.

3. Tag:

Die Multiwell-Platten wurden aus dem Brutschrank entnommen und unter dem Mikroskop auf etwaige Verunreinigungen, Kontaminationen und auf das Wachstum der Zellen hin untersucht.

Das Medium wurde durch vorsichtiges Abdekantieren aus den Vertiefungen entfernt und die Platten wurden auf weichem sterilem Zellstoff ausgeklopft. In die äußeren Vertiefungen, die „Blanks“, wurden wieder 200 µl Kulturmedium pipettiert. In die 8 x 6 Wells mit den Zellen wurde nach dem Schema das Medium mit dem gelösten Antibiotikum zugegeben. Da nun 200 µl Volumen zugegeben werden konnte, wurde die einfache Konzentration eingestellt. Die Positiv-, Negativ- und gegebenenfalls Vehikelkontrollen wurden ebenfalls neu beschickt.

Die Multiwell-Platten kamen danach für die weitere Inkubation wieder in den Brutschrank.

6. Tag:

Die Multititer-Platten wurden wieder mikroskopisch auf Kontamination und Zellwachstum untersucht.

Das Medium wurde aus den einzelnen Wells abdekantiert und die Platten auf weichem sterilem Zellstoff vorsichtig ausgeklopft. Die „Blanks“ wurden mit 200 µl Kulturmedium aufgefüllt und die Positiv-, Negativ- und Vehikelkontrolle mit ihren jeweiligen Lösungen beschickt. In die 8 x 6 Vertiefungen der Proben wurden 200 µl des einfach-konzentrierten Antibiotikum-Medium-Gemischs pipettiert.

Die Multiwell-Platten wurden anschließend wieder in den Brutschrank zur Inkubation gestellt.

10. Tag:

Die Platten wurden aus dem Brutschrank entnommen. In alle Wells wurden 20 μ l MTT-Stammlösung pipettiert. Um das MTT gut mit dem noch vorhandenen Medium zu durchmischen, wurden die Multiwell-Platten für fünf Minuten auf einem Mikrotiter-Shaker geschüttelt. Anschließend kamen die Platten für weitere drei Stunden zur Inkubation in den Brutschrank.

Nach den drei Stunden klopfte man die Mikrotiter-Platten vorsichtig auf weichem sterilem Zellstoff aus, und es wurden 130 μ l MTT-Desorptionslösung in jede Vertiefung pipettiert. Die Platten wurden für 15 Minuten auf dem Mikrotiter-Shaker geschüttelt. Danach konnte dann die Messung der optischen Dichte mit einem Photometer durchgeführt werden.

2.12.5 Prinzip der Datenauswertung

Die Messung der einzelnen Proben auf den Multiwell-Platten wurde mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 570 nm durchgeführt. Die Photometrie ist ein spektrales Untersuchungsverfahren für quantitative Analysen, z. B. von vitalen Zellen. Sie basiert auf der Grundlage der Abhängigkeit der Absorptionsintensität von der sich im Strahlengang befindlichen Teilchenzahl. Man kann damit die Konzentrationen von fein verteilten oder auch gelösten Stoffen (Farbstoffen) durch den Intensitätsverlust des einfallenden Lichtes bestimmen.

Zur Auswertung wurden die Extinktionswerte des umgewandelten Farbstoffes der behandelten Proben mit den unbehandelten Kontrollen verglichen. Nach der Messung erhielt man pro Well einen Wert für die optische Dichte der Probe. Von allen „Blanks“ auf einer Multititer-Platte wurde der Mittelwert gebildet und von der optischen Dichte der behandelten Proben subtrahiert. Somit konnte man den Einfluss der Absorption des Kulturmediums und der MTT-Desorptionslösung von den Werten der untersuchten Proben eliminieren.

Anschließend wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen jener Wells berechnet, die mit der gleichen Konzentration des jeweiligen Antibiotikums inkubiert wurden. Diese wurden dann auf ihre statistische Signifikanz mittels des Post-Hoc-t-Tests nach Dunnett (zweiseitig) gegenüber der unbehandelten Kontrolle überprüft und in einem Diagramm graphisch aufgetragen.

2.13 Immunhistochemie

2.13.1 Prinzip der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine etablierte Methode, mit der bestimmte Oberflächen- oder auch intrazelluläre Proteine auf bzw. in verschiedenen Zellen nachgewiesen werden können.

Für die Immunhistochemie werden primäre Antikörper, sowohl polyklonale als auch monoklonale, die jeweils für bestimmte Epitope selektiv sind, verwendet. Die zu analysierenden Zellen werden mit dem Antikörper inkubiert und anschließend gewaschen. Danach erfolgt eine weitere Inkubation mit einem für den primären Antikörper spezifischen sekundären Antikörper an den ein Fluorochrom gebunden ist. Nach weiterer Waschung und Fixierung können die Zellen dann unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

2.13.2 Beschichten der Deckgläschen mit L-Lysin

Die untersuchten primären HUVEC Endothelzellen konnten nicht auf sterilen Glasplättchen angezchtet werden, da sie nicht anwachsen. Diese Problematik konnte durch vorheriges Beschichten („Coaten“) mit L-Lysin umgangen werden.

Dazu wurden die Glasplättchen gründlich mit PBS gespült und getrocknet. Anschließend wurden die Glasplättchen für 15 Minuten in eine L-Lysin-Lösung gegeben. Die L-Lysin-Lösung wurde aus einer Stammlösung mit einer L-Lysin-Konzentration von 0,1 mg/ml direkt vor der Inkubation durch eine Verdünnung von 1:100 in PBS verdünnt hergestellt. Danach wurden die Plättchen mit Aqua bidest. gespült und getrocknet.

Auf der L-Lysin-Oberfläche der Glasplättchen wuchsen die Zellen gut an und konnten für die immunhistochemischen Untersuchungen eingesetzt werden.

2.13.3 Herstellung von TBS

In der Immunhistochemie wurde für die Spülvorgänge und die Verdünnungen TBS verwendet. Das TBS wurde vor jedem Immunhistochemieversuch neu angesetzt. Es bestand aus 10% 10fach konzentriertem Tris-Puffer, 10% 10fach konzentrierter Natriumchlorid-Lösung und 80% destilliertem Wasser.

2.13.4 Versuchsdurchführung

Für die Anzucht der Endothelzellen auf den beschichteten Glasplättchen wurden jeweils drei Stück in einer Petrischale mit einer Zellsuspension und entsprechendem Zellkulturmedium überschichtet und im Brutschrank gemäß der Protokolle der Zellkultivierung inkubiert. Nach drei bis vier Tagen war auf den Deckgläschen ein gleichmäßig dichter Endothelzellrasen gewachsen. Das Medium wurde verworfen und die Plättchen mit TBS mehrfach gespült. Anschließend wurden sie in einer 4%igen Paraformaldehydlösung fixiert. Damit konnten sie bis zu einer Woche im Kühlschrank bei 4 °C in TBS aufbewahrt werden.

Bei Beginn des Versuches wurden die Glasplättchen vorsichtig aus den Petrischalen entnommen und in 6-Well-Platten überführt. Dort wurden sie dreimal jeweils 5 Minuten mit frischem TBS gespült. Da der von Willebrandt-Faktor, ein intrazelluläres zytoskelettständiges Protein, markiert werden sollte, mussten die Endothelzellen permeabilisiert werden. Dazu wurden die Zellen für 20 Minuten in einer Lösung aus TBS mit 5% Eseserum und 0,1% Triton X-100 (4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene-glykol) überschichtet. Währenddessen konnte der Primär-antikörper gegen den vWF vorbereitet werden. Der Antikörper wurde 1:20 in einer Lösung aus TBS mit 5% Eseserum und 0,1% Triton X-100 verdünnt und sorgfältig homogenisiert. Die Plättchen wurden jeweils mit 50 µl des verdünnten Primärantikörpers für 45 Minuten bei 20 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Endothelzellen wieder dreimal für jeweils 5 Minuten gründlich mit TBS gespült. Die Plättchen wurden anschließend sorgfältig trocken getupft, wobei darauf geachtet wurde, nicht die Endothelzellen herunterzuwischen. Im Anschluss wurde der Sekundärantikörper vorbereitet. Dafür wurde „donkey anti-mouse Cy-3“-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 und der für DNA spezifische Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) in einer Verdünnung von 1 ng/ml in TBS gemischt. Die Glasplättchen wurden dann für 45 Minuten in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Hinterher wurden die Plättchen dreimal jeweils 5 Minuten im Dunklen mit TBS gespült. Um die Endothelzellen auf den Glasplättchen zu fixieren, wurden sie mit Fluoromount G eingedeckelt und im Kühlschrank 15 Minuten ausgehärtet. Danach konnten die Endothelzellen und die Färbung der Zellkerne in DAPI bzw. die Färbung des vWF in Cy-3 unter den entsprechenden Filtern im Fluoreszenzmikroskop untersucht werden (Oberholzer et al., 2007).

3. Ergebnisse

3.1 Immunhistochemie des vWF in den HUVEC

In dieser Arbeit wurden primär Endothelzellen und ihre Reaktionen auf bestimmte Reize untersucht. Dafür musste man zuverlässig davon ausgehen können, dass die analysierten Primärkulturen ausschließlich humanen Endothelzellen entsprachen. Ein mögliches Problem wäre die Verunreinigung der Primärkultur mit Fibroblasten aus der Vena umbilicalis. Deshalb wurde vWF als ein Marker überprüft, der die Zellen eindeutig als Endothelzellen kennzeichnete.

3.1.1 Nachweis von vWF in HUVEC

Die primären Endothelzellen wurden in Passage 6 für die Immunhistochemie-Versuche verwendet. Sie wurden nach dem Protokoll für intrazelluläre Markierung von Proteinen in Zellen behandelt (siehe 2.13) und mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen den vWF und dem für DNA spezifischen Farbstoff (DAPI) zur Färbung des Zellkerns inkubiert.

Es wurden zwei Glasplättchen mit den oben genannten primären Antikörpern und einem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert. Zur Überprüfung, ob der sekundäre Antikörper keine weiteren Epitope als den primären Antikörper unspezifisch bindet, wurden zwei Kontrollen nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert.

Bei den HUVECs konnte spezifisch der vWF im Zellkörper an das Zytoskelett gebunden nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11). Es war auffällig, dass im Bereich des Zellkerns, angefärbt mit dem DAPI-Farbstoff, die Dichte des vWF geringer war (siehe Abbildung 12).

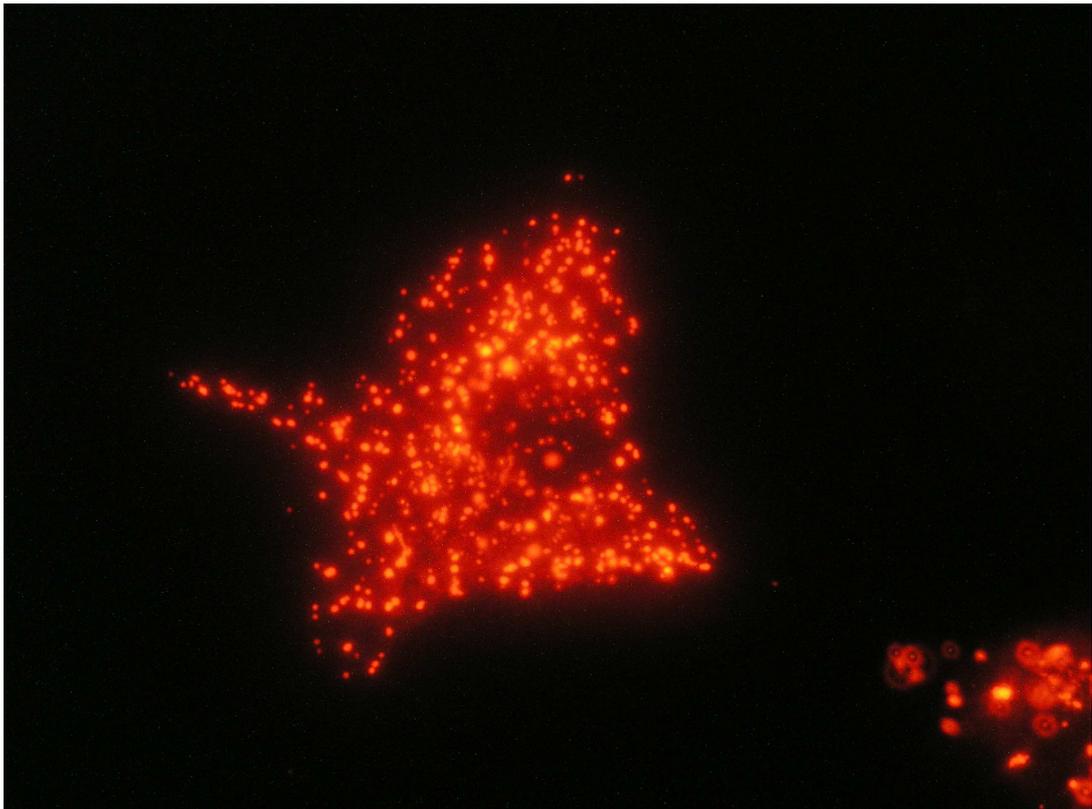


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung des vWF mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen vWF und dem sekundären Antikörper Cy-3 in HUVECs (Vergrößerung 400fach; gleicher Bildausschnitt wie Abb. 12).

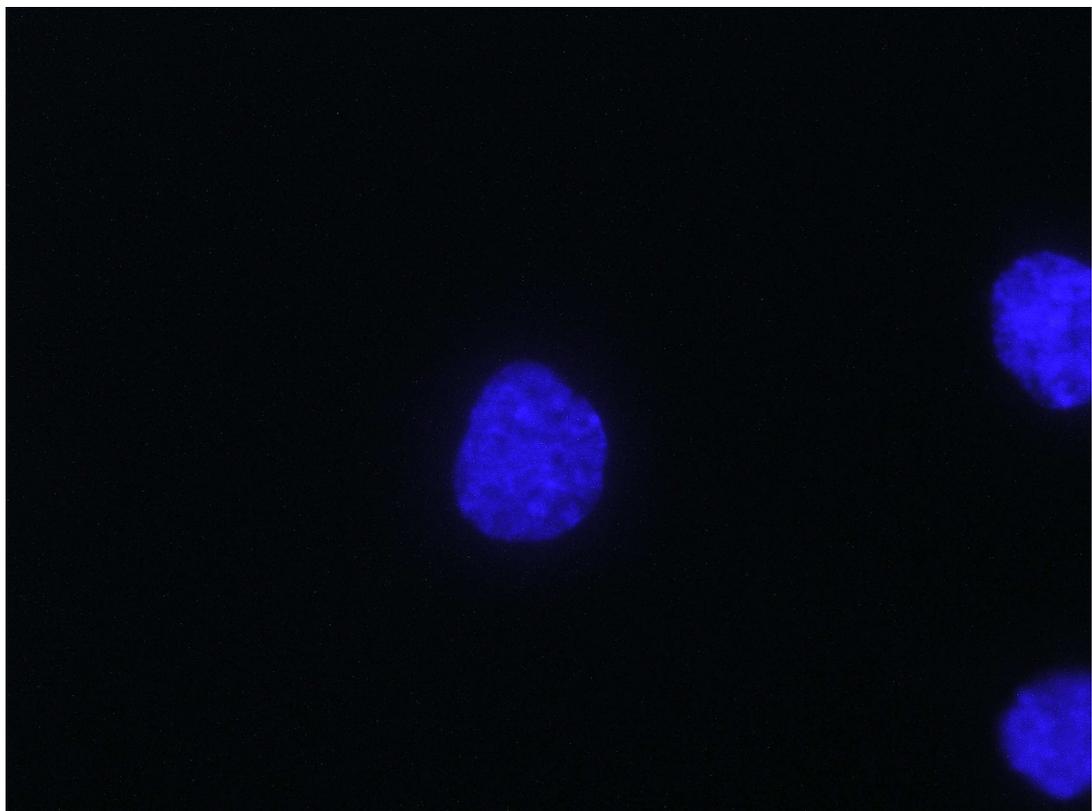


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung des Zellkerns mit dem DAPI-Farbstoff in HUVECs (Vergrößerung 400fach; gleicher Bildausschnitt wie Abb. 11).

3.2 pH-Wertbestimmung der Antibiotikallösungen

In der Literatur wird als ein möglicher Risikofaktor für die Entwicklung einer Infusionsphlebitis nach der i.v.-Applikation von Antibiotika der pH-Wert der infundierten Lösung angegeben (siehe 1.1).

Um den pH-Wert der Antibiotikallösungen zu überprüfen, wurden von den untersuchten Antibiotika Erythromycin, Clarithromycin, Azithromycin und Quinupristin/Dalfopristin Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Die Lösungen entsprachen denen, mit denen die Endothelzellen zwei Stunden lang inkubiert wurden, bevor die durchflusszytometrische Untersuchung erfolgte. Die pH-Werte der einzelnen Konzentrationen wurden mit einem pH-Meter (Schott Lab Technology GmbH) gemessen.

Die pH-Werte änderten sich gering zum basischen pH-Bereich im Vergleich zum normalen Kontrollmedium. Mit steigender Konzentration des Antibiotikums wurde die Lösung etwas basischer. Azithromycin erreichte in der maximalen untersuchten Konzentration von 800 mg/l einen pH-Wert von 8,24, Clarithromycin erreichte bei 600 mg/l 8,32, Erythromycin bei 1400 mg/l 8,28 und Quinupristin/Dalfopristin erreichte bei 800 mg/l einen pH-Wert von 8,2. Das Kontrollmedium ohne Zugabe von einem Antibiotikum hatte einen pH-Wert von 8,1 (Medium eine Woche alt). Bei frischem Medium, das noch keinen längeren Kontakt mit Luft hatte, lag der pH-Wert bei 7,5.

Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten pH-Werte lagen damit in einem Bereich, der kein zusätzliches Risiko für eine Phlebitis bedeutet.

3.3 Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von Erythromycin, Clarithromycin und Azithromycin auf 3T3-Fibroblasten und EA.hy 926 Endothelzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zytotoxischen Wirkungen von Erythromycin, Clarithromycin und Azithromycin untersucht. Da der Fokus auf den Wirkungen verschiedener Antibiotika auf Endothelzellen lag, sollte die Zytotoxizität der Substanzen auf Endothelzellen analysiert werden. Deshalb musste in Vorversuchen das modifizierte MTT-Zytotoxizitätsprotokoll für die EA.hy 926 Endothelzellen angepasst werden.

Die Auswertung der mit dem Photometer gemessenen Werte führte zu einigen Kenngrößen für die untersuchten Antibiotika. Als erstes wurde die NOEC (no observed effect concentration),

d. h. die höchste untersuchte Konzentration bei der gerade noch kein zytotoxischer Effekt beobachtet werden konnte, bestimmt. Des Weiteren wurde die EC_{50} (50% effect concentration) berechnet. Das ist die Konzentration, bei der der gemessene Extinktionswert um 50% zur unbehandelten Kontrollgruppe verringert war.

3.3.1 Adaption des MTT-Protokolls auf EA.hy 926 Endothelzellen

Um das 10-Tage-MTT-Protokoll von den 3T3-Fibroblasten auch auf andere Zelllinien zu übertragen, musste auf die Unterschiede zwischen ihnen eingegangen werden. Die 3T3-Fibroblasten hatten eine in etwa doppelt so hohe Teilungsrate wie im Vergleich dazu die EA.hy 926 Endothelzellen. Weiterhin waren die Fibroblasten deutlich anspruchsloser in ihrer Einsaatdichte, wohingegen die Endothelzellen bei zu geringer Dichte nicht anzüchtbar waren. Folglich musste die optimale Zellkonzentration an Endothelzellen in der Zellsuspension, mit der die Multiwell-Platten beschickt wurden, ermittelt werden.

- **Anpassung der Zellzahl**

In diesem Vorversuch wurden in zwei 96-Well-Platten unterschiedliche Dichten an EA.hy 926 Endothelzellen eingesät. Es wurden Anfangszellzahlen von 1000, 2000, 4000, 8000, 16000, 20000, 25000 und 30000 Endothelzellen pro Well gewählt. Auf jeder Platte wurden sechs Wells mit jeweils der gleichen Zellzahl beschickt, insgesamt hatten also zwölf Wells die gleiche Zellzahl (siehe Abbildung 13). Die Zellen wurden für 10 Tage in den Multiwell-Platten kultiviert. Als Medium wurde das Standardmedium für die Endothelzellen verwendet, welches am dritten und am siebten Tag gewechselt wurde. Anschließend wurden die 96-Well-Platten mit dem MTT-Test im Photometer gemessen und ausgewertet. Das Ziel war es, diejenige Anfangszellkonzentration von EA.hy 926 Endothelzellen zu finden, bei der die Zellen dicht genug eingesät waren, um anzuwachsen. Weiterhin musste eine Extinktion der späteren Kontrolle ermittelbar sein, die innerhalb der Extinktionswerte des MTT-Zytotoxizitätstest lag, in denen eine Auswertung möglich war.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|----|----|
| A | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B |
| B | B | B | 1000 | 2000 | 4000 | 8000 | 16000 | 20000 | 25000 | 30000 | B | B |
| C | B | B | 1000 | 2000 | 4000 | 8000 | 16000 | 20000 | 25000 | 30000 | B | B |
| D | B | B | 1000 | 2000 | 4000 | 8000 | 16000 | 20000 | 25000 | 30000 | B | B |
| E | B | B | 1000 | 2000 | 4000 | 8000 | 16000 | 20000 | 25000 | 30000 | B | B |
| F | B | B | 1000 | 2000 | 4000 | 8000 | 16000 | 20000 | 25000 | 30000 | B | B |
| G | B | B | 1000 | 2000 | 4000 | 8000 | 16000 | 20000 | 25000 | 30000 | B | B |
| H | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B |

Abbildung 13: Schema einer 96-Well-Platte mit unterschiedlichen Einsaatdichten an EA.hy 926 Endothelzellen (B = „Blank“, Leerwert).

Der Extinktionswert bei der kleinsten Zellkonzentration von 1000 Endothelzellen nach 10 Tagen Kultivierung betrug ca. 33% des Wertes, der bei 500 eingesäten 3T3-Fibroblasten gemessen wurde. Er lag aber innerhalb des Extinktionsbereiches, der bei einem MTT-Zytotoxizitätstest von Fibroblasten gemessen wurde. Ab einer Anfangszellkonzentration von 4000 Endothelzellen änderte sich die Extinktion nicht und blieb bei 50% der Extinktion von 500 eingesäten 3T3-Zellen (siehe Abbildung 14). Im Mikroskop war zu beobachten, dass sich die Endothelzellen ablösten, wie es bei einer zu hohen Zelldichte in einer Zellkultur zu erwarten ist.

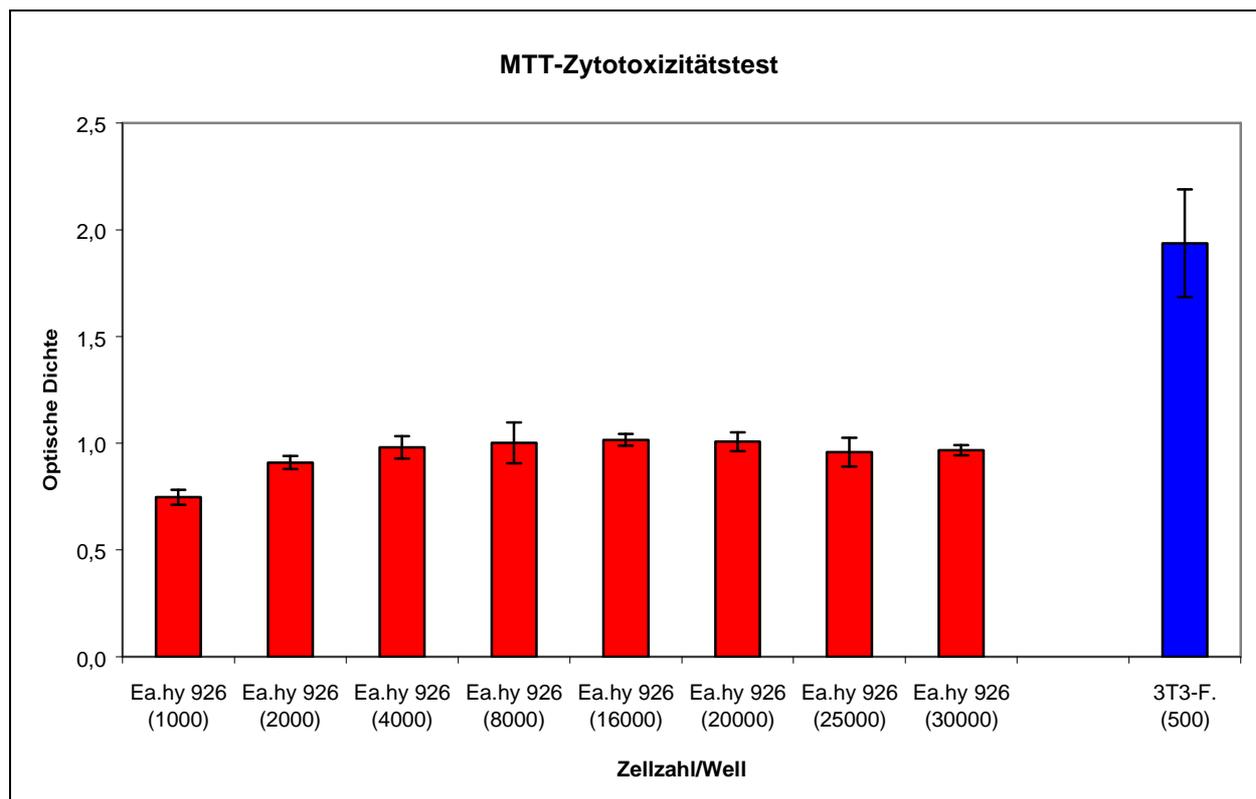


Abbildung 14: Optische Dichte der verschiedenen Anfangszellzahlen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit 3T3-Fibroblasten (EA.hy 926 = Endothelzellen, 3T3-F. = 3T3-Fibroblasten); n = 12; Messung bei 570 nm.

3.3.2 Bestimmung der Zytotoxizität der Infusionslösungen

In diesen Versuchen wurden verschiedene Konzentrationen der einzelnen Antibiotika untersucht. Es wurden 3T3-Fibroblasten mit einer Anfangszellzahl von 500 Zellen/Well und EA.hy 926 Endothelzellen mit einer Anfangszellzahl von 1000 Zellen/Well verwendet. Die untersuchten Konzentrationen lagen für Azithromycin und Clarithromycin zwischen 0,5 mg/l und 200 mg/l. Für Erythromycin wurden höhere Konzentrationen zwischen 50 mg/l und 400 mg/l gewählt, da diese Substanz ein geringeres zytotoxisches Potenzial besaß.

Für Azithromycin lag die höchste Konzentration, bei der kein statistisch signifikanter Unterschied zur Extinktion der Kontrolle nachweisbar war (NOEC), bei 50 mg/l für die 3T3-Fibroblasten und 10 mg/l für die EA.hy 926 Endothelzellen. Die EC_{50} , das heißt die Konzentration bei der die Extinktion auf 50% der Extinktion der unbehandelten Kontrolle gefallen war, lag für die 3T3-Zellen bei 80 mg/l und für die Endothelzellen bei 40 mg/l (siehe Abbildung 15 / Tabelle 2). Diese Werte wurden interpoliert.

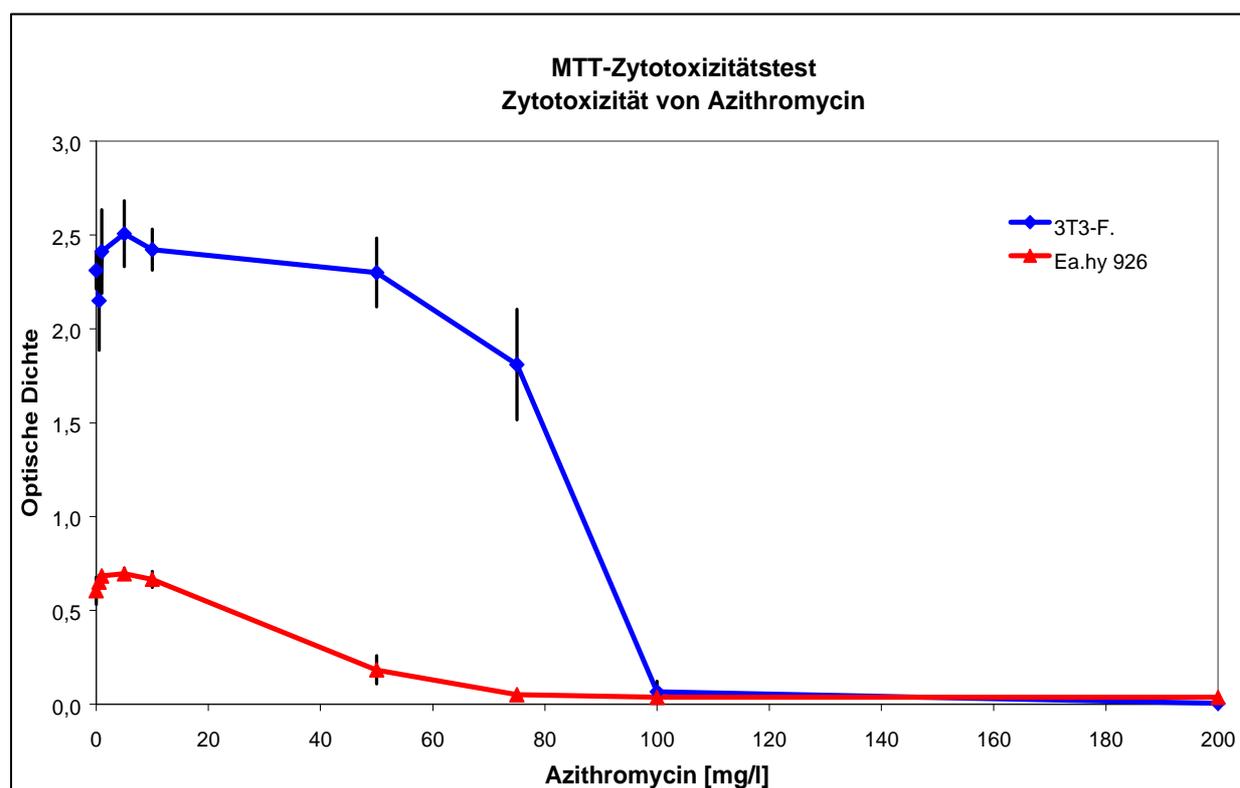


Abbildung 15: Zytotoxizität von Azithromycin im MTT-Zytotoxizitätstest. 3T3-F. = 3T3-Fibroblasten, EA.hy 926 = EA.hy 926 Endothelzellen. Zur Vergleichbarkeit wurden jeweils die Mittelwerte aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte, n = 12.

| 3T3-Fibroblasten | | | EA.hy 926 Endothelzellen | | |
|---------------------|--------|--------|--------------------------|-------|--------|
| Azithromycin [mg/l] | MW | SD | Azithromycin [mg/l] | MW | SD |
| 0 | 2,31 | ± 0,10 | 0 | 0,61 | ± 0,07 |
| 0,5 | 2,15 | ± 0,26 | 0,5 | 0,65* | ± 0,04 |
| 1 | 2,41 | ± 0,22 | 1 | 0,68* | ± 0,02 |
| 5 | 2,51 | ± 0,18 | 5 | 0,70* | ± 0,03 |
| 10 | 2,42 | ± 0,11 | 10 | 0,67* | ± 0,04 |
| 50 | 2,30* | ± 0,18 | 50 | 0,18* | ± 0,07 |
| 75 | 1,81* | ± 0,29 | 75 | 0,05* | ± 0,01 |
| 100 | 0,07* | ± 0,05 | 100 | 0,04* | ± 0,00 |
| 200 | 0,006* | ± 0,02 | 200 | 0,04* | ± 0,01 |

Tabelle 2: Optische Dichte der mit Azithromycin inkubierten Zelllinien bei der photometrischen Messung bei 570 nm. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung. Statistisches Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$, behandelte Probe gegen unbehandelte Kontrolle, n = 12.

| NOEC [mg/l] | | EC ₅₀ [mg/l] | |
|-------------|-----------|-------------------------|-----------|
| 3T3-F. | EA.hy 926 | 3T3-F. | EA.hy 926 |
| 50 | 10 | 80 | 40 |

Tabelle 3: Kenngrößen des zytotoxischen Potenzials von Azithromycin *in vitro*. NOEC = höchste Konzentration, bei der es noch keinen Effekt auf die Zellen gab, EC₅₀ = Konzentration bei der 50% der Zellen vital waren (interpoliert), 3T3-F. = 3T3-Fibroblasten, EA.hy 926 = EA.hy 926 Endothelzellen, n = 12.

Für Clarithromycin wurden die gleichen Konzentrationen wie für Azithromycin untersucht. Es konnte im untersuchten Konzentrationsbereich eine Hemmung im Zellwachstum bei beiden Zelllinien nachgewiesen werden.

Bei dieser Substanz reagierten die EA.hy 926 Endothelzellen genauso empfindlich wie die 3T3-Fibroblasten und somit konnte für beide Zelllinien eine NOEC von 10 mg/l bestimmt werden. Auch bei Clarithromycin wurde die EC₅₀ für die Endothelzellen (30 mg/l) und für die Fibroblasten (40 mg/l) berechnet (siehe Abbildung 16 / Tabelle 4).

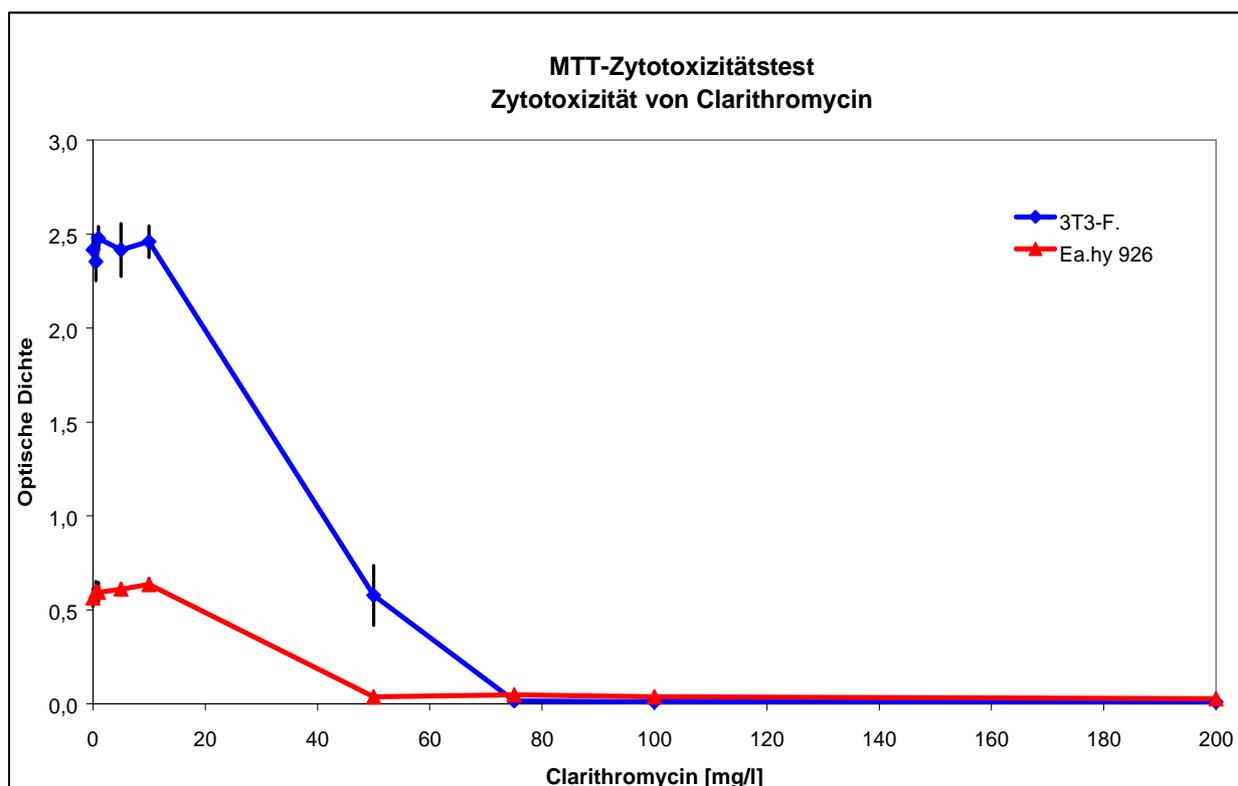


Abbildung 16: Zytotoxizität von Clarithromycin im MTT-Zytotoxizitätstest. 3T3-F. = 3T3-Fibroblasten, EA.hy 926 = EA.hy 926 Endothelzellen. Zur Vergleichbarkeit wurden jeweils die Mittelwerte aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte, n = 12.

| 3T3-Fibroblasten | | | EA.hy 926 Endothelzellen | | |
|-----------------------|-------|--------|--------------------------|-------|--------|
| Clarithromycin [mg/l] | MW | SD | Clarithromycin [mg/l] | MW | SD |
| 0 | 2,42 | ± 0,08 | 0 | 0,56 | ± 0,05 |
| 0,5 | 2,35 | ± 0,10 | 0,5 | 0,60 | ± 0,05 |
| 1 | 2,48 | ± 0,06 | 1 | 0,59* | ± 0,05 |
| 5 | 2,42 | ± 0,14 | 5 | 0,61* | ± 0,03 |
| 10 | 2,46 | ± 0,08 | 10 | 0,64* | ± 0,03 |
| 50 | 0,58* | ± 0,16 | 50 | 0,04* | ± 0,01 |
| 75 | 0,02* | ± 0,01 | 75 | 0,05* | ± 0,02 |
| 100 | 0,01* | ± 0,00 | 100 | 0,04* | ± 0,01 |
| 200 | 0,01* | ± 0,01 | 200 | 0,03* | ± 0,01 |

Tabelle 4: Optische Dichte der mit Clarithromycin inkubierten Zelllinien bei der photometrischen Messung bei 570 nm. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung. Statistisches Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$, behandelte Probe gegen unbehandelte Kontrolle, $n = 12$.

| NOEC [mg/l] | | EC ₅₀ [mg/l] | |
|-------------|-----------|-------------------------|-----------|
| 3T3-F. | EA.hy 926 | 3T3-F. | EA.hy 926 |
| 10 | 10 | 40 | 30 |

Tabelle 5: Kenngrößen des zytotoxischen Potenzials von Clarithromycin *in vitro*. NOEC = höchste Konzentration, bei der es noch keinen Effekt auf die Zellen gab, EC₅₀ = Konzentration bei der 50% der Zellen vital waren (interpoliert), 3T3-F. = 3T3-Fibroblasten, EA.hy 926 = EA.hy 926 Endothelzellen, $n = 12$.

Im MTT-Zytotoxizitätstest konnte für Erythromycin bei den untersuchten Konzentrationen ein hemmender Effekt in beiden Zelllinien ermittelt werden.

Bei der Endothelzelllinie betrug die höchste Konzentration, bei der kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle beobachtet wurde (NOEC), 200 mg/l. Für die Fibroblasten lag sie ebenfalls bei 200 mg/l. Die Konzentration, bei der die MTT-Biotransformation im Vergleich zur Kontrolle um 50% reduziert war (EC₅₀), betrug bei den Fibroblasten 220 mg/l und bei den Endothelzellen 310 mg/l (siehe Abbildung 17 / Tabelle 6).

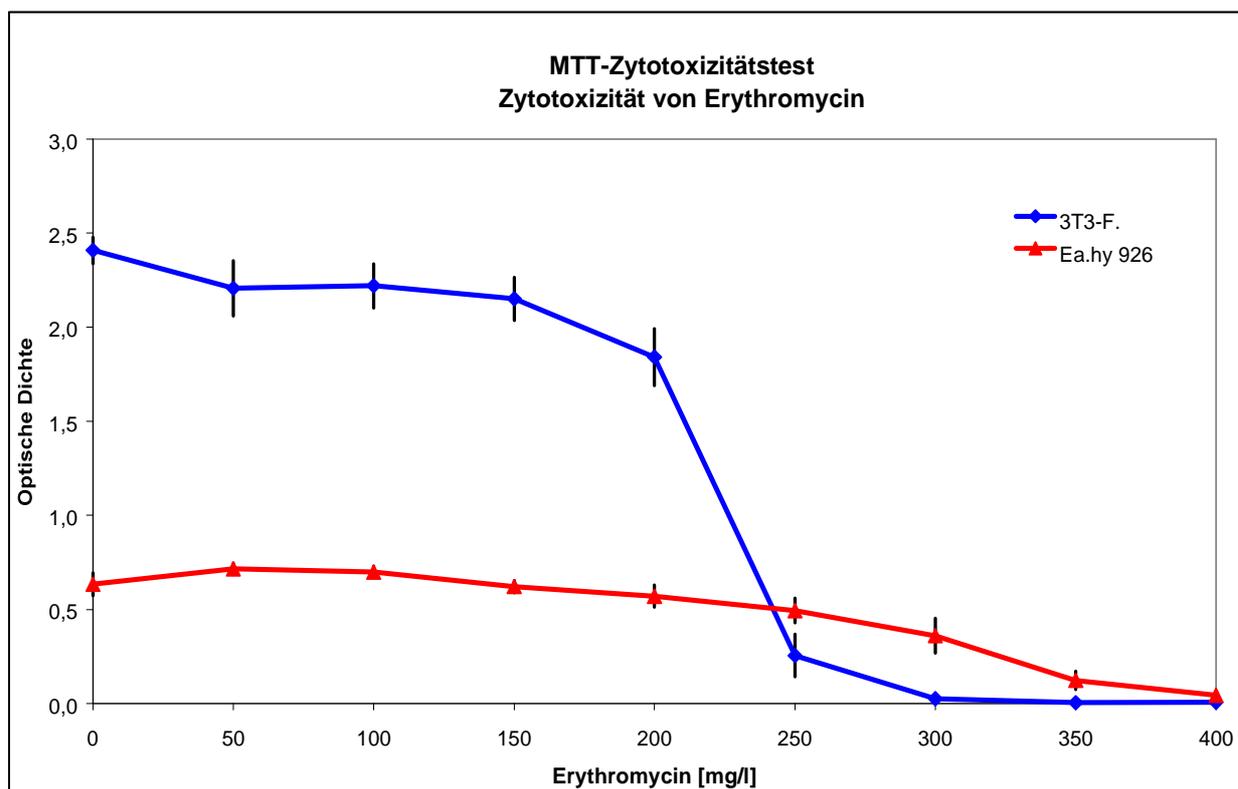


Abbildung 17: Zytotoxizität von Erythromycin im MTT-Zytotoxizitätstest. 3T3-F. = 3T3-Fibroblasten, EA.hy 926 = EA.hy 926 Endothelzellen. Zur Vergleichbarkeit wurden jeweils die Mittelwerte aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte, n = 12.

| 3T3-Fibroblasten | | | EA.hy 926 Endothelzellen | | |
|---------------------|-------|--------|--------------------------|-------|--------|
| Erythromycin [mg/l] | MW | SD | Erythromycin [mg/l] | MW | SD |
| 0 | 2,41 | ± 0,07 | 0 | 0,63 | ± 0,06 |
| 50 | 2,21* | ± 0,15 | 50 | 0,72* | ± 0,03 |
| 100 | 2,22* | ± 0,12 | 100 | 0,70 | ± 0,03 |
| 150 | 2,15* | ± 0,11 | 150 | 0,62* | ± 0,03 |
| 200 | 1,84* | ± 0,15 | 200 | 0,57* | ± 0,06 |
| 250 | 0,26* | ± 0,11 | 250 | 0,49* | ± 0,07 |
| 300 | 0,03* | ± 0,01 | 300 | 0,36* | ± 0,09 |
| 350 | 0,01* | ± 0,01 | 350 | 0,12* | ± 0,05 |
| 400 | 0,01* | ± 0,01 | 400 | 0,04* | ± 0,02 |

Tabelle 6: Optische Dichte der mit Erythromycin inkubierten Zelllinien bei der photometrischen Messung bei 570 nm. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung. Statistisches Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$, behandelte Probe gegen unbehandelte Kontrolle, n = 12.

| NOEC [mg/l] | | EC ₅₀ [mg/l] | |
|-------------|-----------|-------------------------|-----------|
| 3T3-F. | EA.hy 926 | 3T3-F. | EA.hy 926 |
| 200 | 200 | 220 | 310 |

Tabelle 7: Kenngrößen des zytotoxischen Potenzials von Erythromycin *in vitro*. NOEC = höchste Konzentration, bei der es noch keinen Effekt auf die Zellen gab, EC₅₀ = Konzentration bei der 50% der Zellen vital waren (interpoliert), 3T3-F. = 3T3-Fibroblasten, EA.hy 926 = EA.hy 926 Endothelzellen, n = 12.

3.3.3 Zusammenfassung – MTT-Zytotoxizitätstest mit Infusionslösungen

Die Kenngrößen der zytotoxischen Potenziale von Azithromycin, Clarithromycin und Erythromycin auf 3T3-Fibroblasten bzw. EA.hy 926 Endothelzellen *in vitro* sind in drei Tabellen angegeben (siehe Tabelle 3, Tabelle 5 und Tabelle 7).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Clarithromycin und das Azalid Azithromycin ein höheres zytotoxisches Potenzial hatten als Erythromycin. Die Effekte von Clarithromycin waren in diesem Zytotoxizitätstest am stärksten, direkt gefolgt von Azithromycin mit nur einer Konzentrationsstufe höher. Die Effekte auf die Fibroblasten und auf die Endothelzellen waren bei diesen beiden Substanzen vergleichbar.

Das Makrolid Erythromycin verhielt sich anders. Die Zytotoxizität *in vitro* war deutlich geringer und der konzentrationsabhängige Hemmeffekt auf das Wachstum wurde erst bei höheren Konzentrationen signifikant. Auch zwischen den beiden Zelllinien gab es Unterschiede. Die EA.hy 926 Endothelzellen waren weniger empfindlich als die Fibroblasten.

Das Ausmaß der Zytotoxizität in den untersuchten Konzentrationsbereichen entsprach den Erfahrungen aus den durchflusszytometrischen Experimenten, bei denen die Zellzahlen nach der Inkubation bestimmt wurden, wonach Clarithromycin zytotoxischer als Azithromycin war und Erythromycin erst bei deutlich höheren Konzentrationen folgte. Obwohl die Inkubationszeiten kürzer waren, nämlich nur zwei Stunden statt zehn Tage, und die untersuchten Konzentrationen sehr viel höher lagen, blieb die Rangfolge gleich.

3.3.4 Bestimmung der Zytotoxizität der Reinsubstanzen

Da sowohl die MTT-Zytotoxizitätsversuche als auch die durchflusszytometrischen Experimente nur mit den Infusionslösungen, in denen noch teilweise andere Zusatzstoffe enthalten waren (siehe 2.3), durchgeführt wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich noch die zytotoxischen Potenziale der Reinsubstanzen bestimmt.

Erythromycin und Azithromycin konnten nicht direkt im Kulturmedium gelöst werden. Erst in warmem Methanol konnte eine Lösung erreicht werden. Das Methanol hatte einen Volumenanteil an dem Inkubationsmedium von 2%. Als unbehandelte Kontrollen wurden sowohl eine Kontrolle mit reinem Kulturmedium und eine Vehikelkontrolle mit 2% Methanol mitgeführt.

Clarithromycin als Reinsubstanz konnte nicht in Lösung gebracht werden. Auch höhere Konzentrationen von Methanol oder die Verwendung eines Ultraschallbades führten nicht zur Lösung. Daher wurden nur die beiden erstgenannten Antibiotika als Reinsubstanz untersucht.

Für die Versuche wurden nur die 3T3-Fibroblasten in einer Anfangszellzahl von 500 Zellen/Well verwendet. Ansonsten wurde die Bestimmung der zytotoxischen Potenziale der Reinsubstanzen gemäß dem modifizierten MTT-Protokoll durchgeführt.

Um einen möglichen zytotoxischen Effekt des Methanols in den Ergebnissen der Zytotoxizitätsanalyse der Reinsubstanzen berücksichtigen zu können, wurden verschiedene Volumenanteile von Methanol untersucht. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 0,5% bis 5% Methanolanteil im Inkubationsmedium analysiert. Auch hier wurde das modifizierte MTT-Zytotoxizitätsprotokoll verwendet.

Für Methanol konnte ein statistisch signifikantes zytotoxisches Potenzial im untersuchten Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Die Konzentration, welche keinen statistisch signifikanten zytotoxischen Einfluss auf die untersuchten Zellen hatte (NOEC), war 1% Methanol im Inkubationsmedium. Die EC_{50} konnte bei 4,5% ermittelt werden (siehe Abbildung 18 / Tabelle 8).

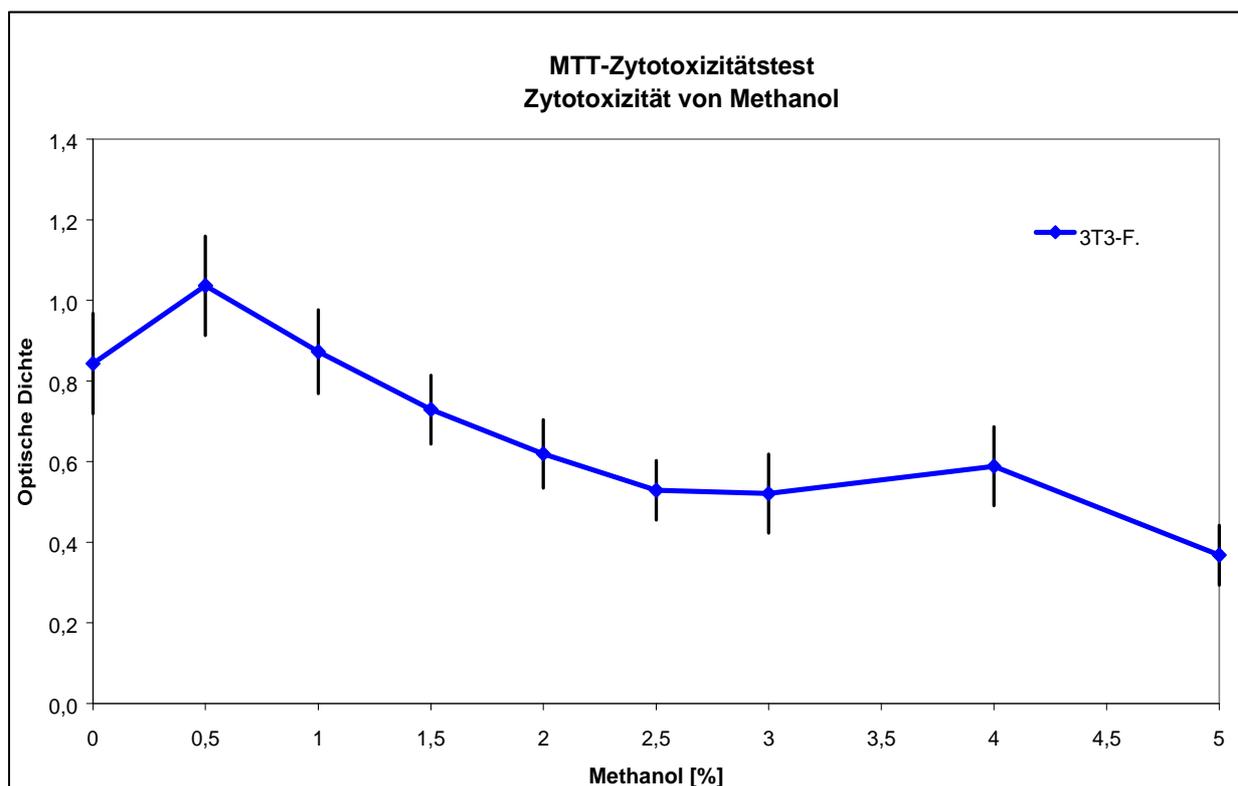


Abbildung 18: Zytotoxizität von Methanol im MTT-Zytotoxizitätstest. 3T3-F. = 3T3-Fibroblasten. Zur Vergleichbarkeit wurden die Mittelwerte aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte, $n = 12$.

3T3-Fibroblasten

| Methanol [%] | MW | SD |
|--------------|-------|--------|
| 0 | 0,84 | ± 0,12 |
| 0,5 | 1,04 | ± 0,12 |
| 1 | 0,87* | ± 0,10 |
| 1,5 | 0,73* | ± 0,09 |
| 2 | 0,62* | ± 0,08 |
| 2,5 | 0,53* | ± 0,07 |
| 3 | 0,52* | ± 0,10 |
| 4 | 0,59* | ± 0,10 |
| 5 | 0,37* | ± 0,07 |

Tabelle 8: Messwerte der optischen Dichte der mit Methanol inkubierten 3T3-Fibroblasten bei der photometrischen Messung bei 570 nm. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung. Statistisches Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$, behandelte Probe gegen unbehandelte Kontrolle, $n = 12$.

| NOEC [%] | EC ₅₀ [%] |
|----------|----------------------|
| 1 | 4,5 |

Tabelle 9: Kenngrößen des zytotoxischen Potenzials von Methanol *in vitro*. NOEC = höchste Konzentration, bei der es noch keinen Effekt auf die Zellen gab, EC₅₀ = Konzentration bei der 50% der Zellen vital waren (interpoliert), n = 12.

Bei reinem Azithromycin konnte für den untersuchten Konzentrationsbereich ein zytotoxisches Potenzial ermittelt werden. Die Konzentration, bei der noch keine statistisch signifikante Abnahme der Extinktion im Vergleich zur Kontrolle vorhanden war (NOEC), lag bei 10 mg/l. 50% der Fibroblasten waren bei 30 mg/l noch vital (EC₅₀) (siehe Abbildung 19 / Tabelle 10).

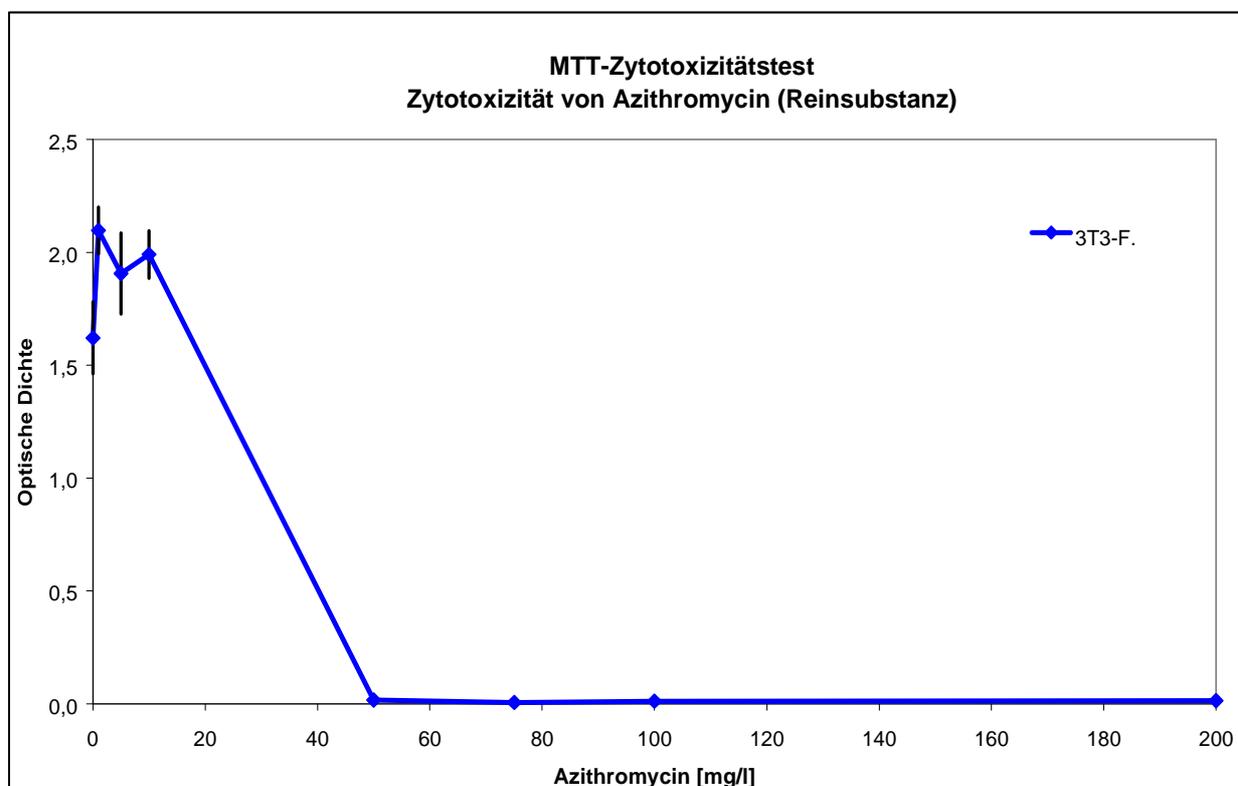


Abbildung 19: Zytotoxizität von Azithromycin als Reinsubstanz im MTT-Zytotoxizitätstest. 3T3-F. = 3T3-Fibroblasten. Als Kontrolle wurde die Vehikelkontrolle mit 2% Methanol verwendet. Zur Vergleichbarkeit wurden die Mittelwerte aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte, n = 12.

3T3-Fibroblasten

| Azithromycin [mg/l] Reinsubstanz | MW | SD |
|-------------------------------------|-------|--------|
| 0 | 1,62 | ± 0,16 |
| 1 | 2,10* | ± 0,10 |
| 5 | 1,91 | ± 0,18 |
| 10 | 1,99 | ± 0,11 |
| 50 | 0,02* | ± 0,02 |
| 75 | 0,01* | ± 0,01 |
| 100 | 0,01* | ± 0,01 |
| 200 | 0,01* | ± 0,01 |

Tabelle 10: Messwerte der optischen Dichte der mit Azithromycin als Reinsubstanz inkubierten 3T3-Fibroblasten bei der photometrischen Messung bei 570 nm. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung. Statistisches Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$, behandelte Probe gegen Vehikelkontrolle, $n = 12$.

| NOEC [mg/l] | EC ₅₀ [mg/l] |
|-------------|-------------------------|
| 10 | 30 |

Tabelle 11: Kenngrößen des zytotoxischen Potenzials von Azithromycin als Reinsubstanz *in vitro*. NOEC = höchste Konzentration, bei der es noch keinen Effekt auf die Zellen gab, EC₅₀ = Konzentration bei der 50% der Zellen vital waren (interpoliert), 3T3-F. = 3T3-Fibroblasten, $n = 12$.

Im MTT-Zytotoxizitätstest konnte für das reine Erythromycin ebenfalls eine Zytotoxizität der Substanz im untersuchten Konzentrationsbereich, nachgewiesen werden. Die höchste Konzentration, bei der noch kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle nachgewiesen werden konnte (NOEC), lag bei 200 mg/l. Bei einer Konzentration von 220 mg/l war die Extinktion der Probe auf die Hälfte der Kontrolle abgefallen (siehe Abbildung 20 / Tabelle 12).

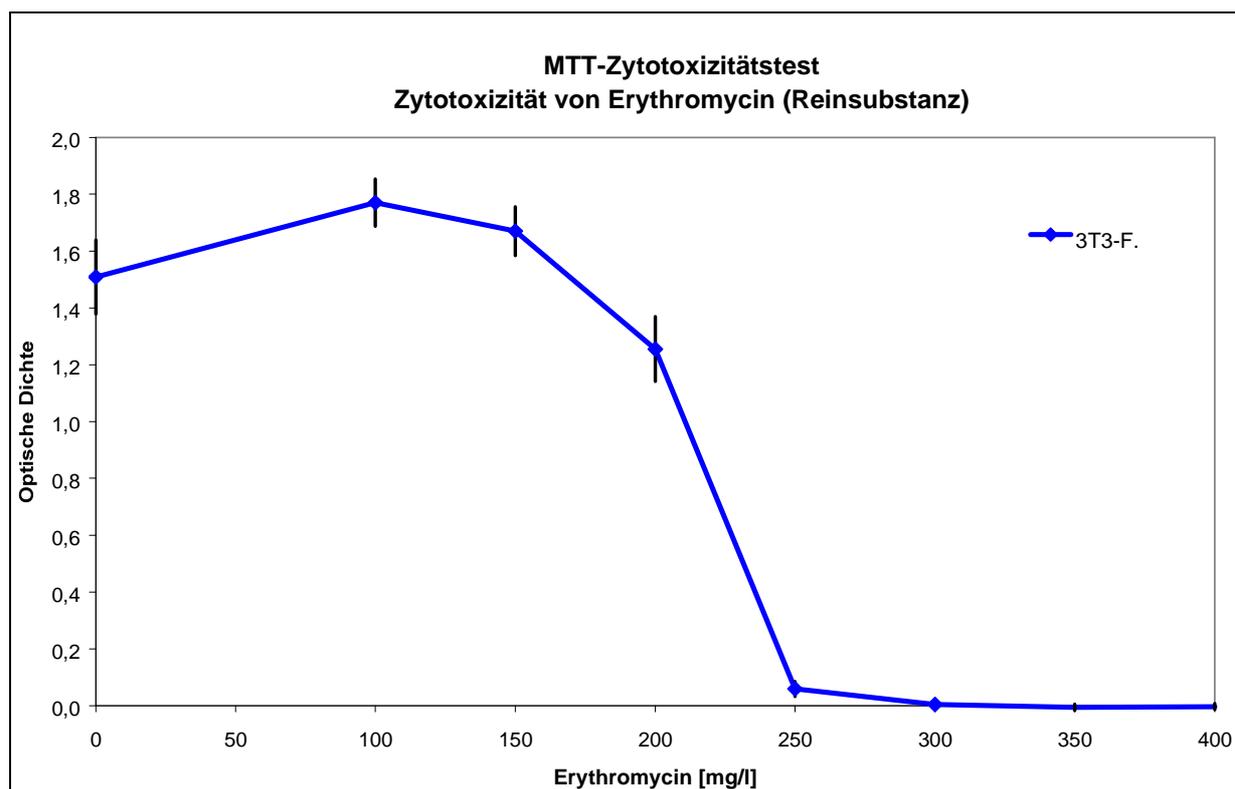


Abbildung 20: Zytotoxizität von Erythromycin als Reinsubstanz im MTT-Zytotoxizitätstest. 3T3-F. = 3T3-Fibroblasten. Als Kontrolle wurde die Vehikelkontrolle mit 2% Methanol verwendet. Zur Vergleichbarkeit wurden die Mittelwerte aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte, n = 12.

3T3-Fibroblasten

| Erythromycin [mg/l] Reinsubstanz | MW | SD |
|-------------------------------------|--------|--------|
| 0 | 1,51 | ± 0,13 |
| 100 | 1,77 | ± 0,08 |
| 150 | 1,67* | ± 0,09 |
| 200 | 1,26* | ± 0,11 |
| 250 | 0,06* | ± 0,03 |
| 300 | 0,00* | ± 0,01 |
| 350 | -0,01* | ± 0,01 |
| 400 | 0,00* | ± 0,01 |

Tabelle 12: Messwerte der optischen Dichte der mit Erythromycin als Reinsubstanz inkubierten 3T3-Fibroblasten bei der photometrischen Messung bei 570 nm. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung. Statistisches Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$, behandelte Probe gegen Vehikelkontrolle, n = 12.

| NOEC [mg/l] | EC ₅₀ [mg/l] |
|-------------|-------------------------|
| 200 | 220 |

Tabelle 13: Kenngrößen des zytotoxischen Potenzials von Erythromycin als Reinsubstanz *in vitro*. NOEC = höchste Konzentration, bei der es noch keinen Effekt auf die Zellen gab, EC₅₀ = Konzentration bei der 50% der Zellen vital waren (interpoliert), 3T3-F. = 3T3-Fibroblasten, n = 12.

3.3.5 Zusammenfassung – MTT-Zytotoxizitätstest mit Reinsubstanzen

Die Rangfolge der Zytotoxizitäten, die in den Versuchen mit den Infusionslösungen festgestellt werden konnte, wurde mit den Reinsubstanzen für Erythromycin und Azithromycin bestätigt. Die Kenngrößen der beiden Antibiotika sind in zwei Tabellen zusammengefasst (Tabelle 11 und Tabelle 13).

Azithromycin hat im Vergleich zu Erythromycin ein deutlich größeres Zytotoxizitätspotenzial *in vitro*. Die zytotoxischen Konzentrationen lagen in den gleichen Größenordnungen wie die der Infusionslösungen.

Wie im Vorversuch der Zytotoxizitätsbestimmung von Methanol auf die 3T3-Fibroblasten gezeigt wurde, kann ein Effekt des Lösungsmittlers in den Versuchen mit den Reinsubstanzen nicht vernachlässigt werden. Es zeigte sich durchgängig, sowohl im Vorversuch als auch in den Vergleichen der Vehikelkontrollen gegenüber den normalen Kontrollen, dass die 2% Methanol im Medium als Lösungsmittler eine Erniedrigung der gemessenen optischen Dichte um 25% bewirkte. Somit konnte unter Berücksichtigung des Unterschieds zwischen der Vehikelkontrolle und der Kontrolle ohne Methanol davon ausgegangen werden, dass die Infusionslösungen ebenso zytotoxisch wie die Reinsubstanzen waren, da sich die Extinktionswerte bei gleicher Konzentration und Substanz zwischen der Infusionsformulierung und der Reinsubstanz um 25% unterschieden.

3.4 Untersuchung der proinflammatorischen Oberflächenantigene durch die Durchflusszytometrie

Nachdem Daten über die zytotoxischen Potenziale und die Unterschiede in diesem Bereich zwischen den verschiedenen Antibiotika erhoben worden waren, sollte noch analysiert werden, ob sich die Substanzen auch in unterschiedlicher Weise auf die proinflammatorischen Oberflächen-

antigene auswirkten. Es wurden solche Oberflächenantigene untersucht, von denen bekannt ist, dass sie in der Entzündungskaskade an der Gefäßwand eine Rolle spielen. Zusätzlich zu den in der Zytotoxizitätsanalyse untersuchten Makroliden bzw. dem Azalid wurden in den durchflusszytometrischen Experimenten noch die Wirkungen von TNF- α und dem Streptogramin Quinupristin/Dalfopristin untersucht.

Die Auswertung der ermittelten Daten geschah mit Hilfe des WinList-Programms. Es wurde die so genannte „99%-Thresholdmethode“ verwendet, wobei die Fluoreszenz von nicht markierten Zellen (Autofluoreszenz) als Negativkontrolle diente. Es wurde so ausgewertet, dass jede Fluoreszenzzunahme jenseits der Fluoreszenz von 99% der unmarkierten Zellen als positive Zunahme des jeweils untersuchten Oberflächenantigens gewertet wurde. Die statistische Auswertung der Daten geschah mit Hilfe des „Univariate General Linear Model“ mit nachfolgendem zweiseitigem Post-Hoc-t-Test nach Dunnett. Als statistisches Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ gewählt.

3.4.1 Anpassung des Modells an die klinische Infusionsapplikation

Die in den Fachinformationen angegebenen Infusionszeiträume lagen bei den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen zwischen 30 Minuten für Clarithromycin (Klacid[®]) und 3 Stunden für Azithromycin (Zithromax[®]). Eine durchschnittliche Infusionsdauer im klinischen Alltag liegt bei etwa 2 Stunden. Um diese Situation im *in vitro* System möglichst genau nachbilden zu können, wurde in einem Vorversuch die Auswirkung von unterschiedlich langen Inkubationszeiten mit einem Antibiotikum auf die EA.hy 926 Zellen untersucht.

Dazu wurden die Endothelzellen für 15 Minuten, 1 Stunde bzw. 2 Stunden mit dem Streptogramin Quinupristin/Dalfopristin mit jeweils einer Konzentration von 400 mg/l bzw. 800 mg/l inkubiert. Die Messung der positiv markierten Zellen für alle untersuchten Oberflächenantigene wurde nach einer insgesamten Versuchsdauer von 24 Stunden durchgeführt. Es wurden 10.000 Endothelzellen im Durchflusszytometer gemessen. Die Versuche wurden zwei Tagen durchgeführt (jeweils $n = 3$). Da die Daten eine gute Übereinstimmung aufwiesen, konnten sie gepoolt werden.

Es war zu beobachten, dass die Reaktion mit steigender Dauer der Inkubation bei einer Konzentration von 400 mg/l stärker wurde. Das Oberflächenantigen CD 34 stieg etwa um das Vierfache von 2,5% positive Zellen auf 9,37% positive Zellen. Auch die anderen Antigene stiegen an. Bereits bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten konnte bei einem der Marker, ICAM-1, eine statistisch signifikante Steigerung der positiv markierten Zellen gemessen werden. Bei einer Inkubationszeit von 2 Stunden und einer anschließenden Kultur ohne Testsubstanz von 22 Stunden

war für alle untersuchten proinflammatorischen Oberflächenantigene die Anzahl der positiv markierten Endothelzellen statistisch signifikant gestiegen (siehe Abbildung 21 / Tabelle 14).

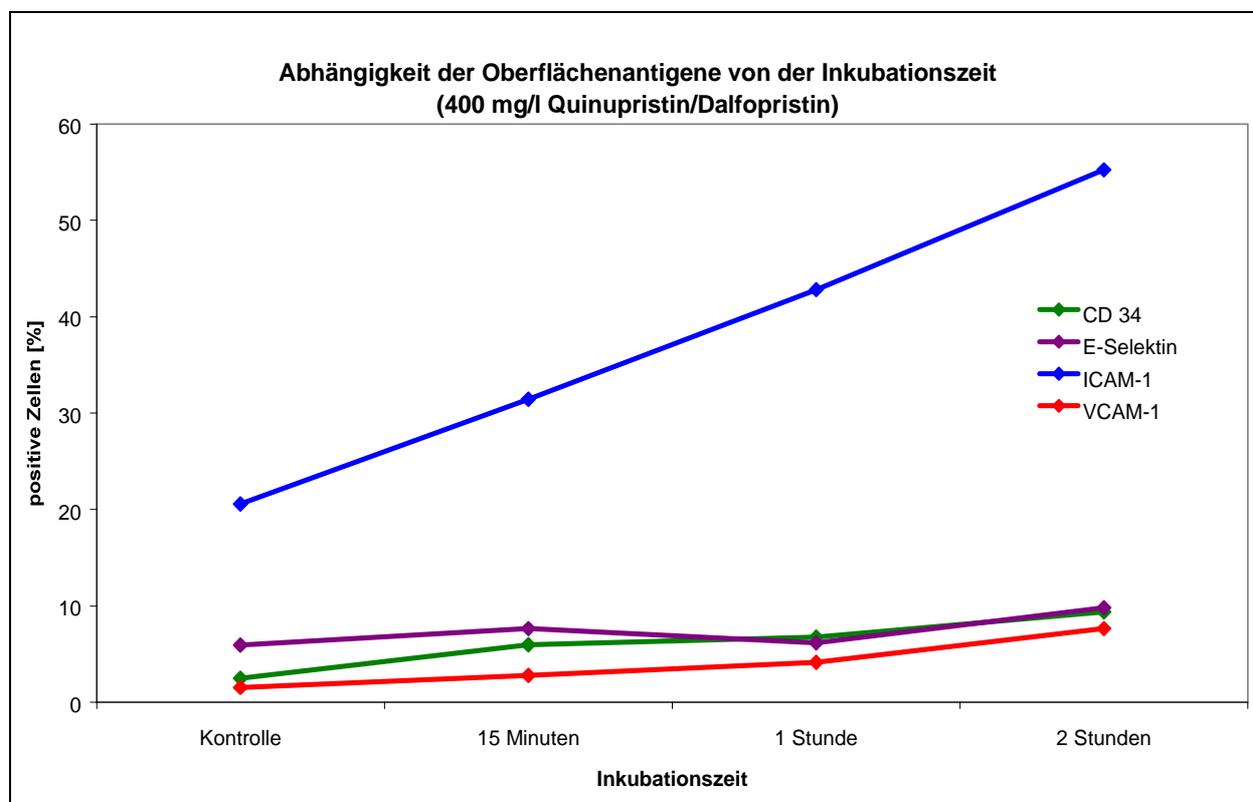


Abbildung 21: Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach verschieden langen Inkubationszeiten mit 400 mg/l Quinupristin/Dalfopristin. Messzeitpunkt 24 Stunden nach Beginn der Inkubation. n = 6 (Zellzahl pro Messung: 10.000).

| | 400 mg/l Quinupristin/Dalfopristin | | | |
|-------------------|------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| | Kontrolle | 15 Minuten | 1 Stunde | 2 Stunden |
| CD 34 | 2,50 ± 1,53 | 5,96 ± 5,01 | 6,79 ± 3,16 | 9,37* ± 3,24 |
| E-Selektin | 5,94 ± 0,90 | 7,66 ± 3,55 | 6,16 ± 0,85 | 9,82* ± 2,64 |
| ICAM-1 | 20,58 ± 3,57 | 31,45* ± 6,63 | 42,81* ± 8,29 | 55,23* ± 8,41 |
| VCAM-1 | 1,56 ± 0,76 | 2,81 ± 1,77 | 4,16 ± 1,67 | 7,65* ± 2,87 |

Tabelle 14: Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach unterschiedlich langer Inkubationszeit mit 400 mg/l Quinupristin/Dalfopristin (Mittelwert ± Standardabweichung; Angaben in %). Statistisches Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$, behandelte Probe gegen unbehandelte Kontrolle, n = 6 (Zellzahl pro Messung: 10.000).

Bei der Inkubation mit 800 mg/l Quinupristin/Dalfopristin über die unterschiedlichen Inkubationszeiten konnte ebenfalls eine eindeutige Abhängigkeit der Veränderungen von der Zeitdauer der Substanzexposition ermittelt werden. Die Reaktion der Endothelzellen auf das Antibiotikum war stärker ausgeprägt als bei der geringeren Konzentration von 400 mg/l. VCAM-1 stieg nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde statistisch signifikant von 2% positiv markierten Zellen auf etwa das Fünffache, 11,8% positive Zellen. Die weiteren untersuchten Oberflächenantigene stiegen ebenfalls statistisch signifikant an, E-Selektin von 3,2% auf 10,1% und ICAM-1 von 20,7% auf 57,9% positive Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden sank der Anteil der positiv markierten Zellen für ICAM-1 und VCAM-1 leicht (CD 54 auf 45,9% positive Zellen und CD 106 auf 10,5% positiv markierte Zellen). Weiterhin konnte nach einer Inkubation von 2 Stunden mit 800 mg/l Quinupristin/Dalfopristin eine Abnahme der Zellzahl auf bis zu 50% der gezählten Zellen im Vergleich zur Zellzahl in der unbehandelten Kontrolle gemessen werden. Auch bei diesen Versuchen wurden die 10.000 Endothelzellen erst nach einer Gesamtbehandlungsdauer von 24 Stunden im FACScan analysiert (siehe Abbildung 22 / Tabelle 15).

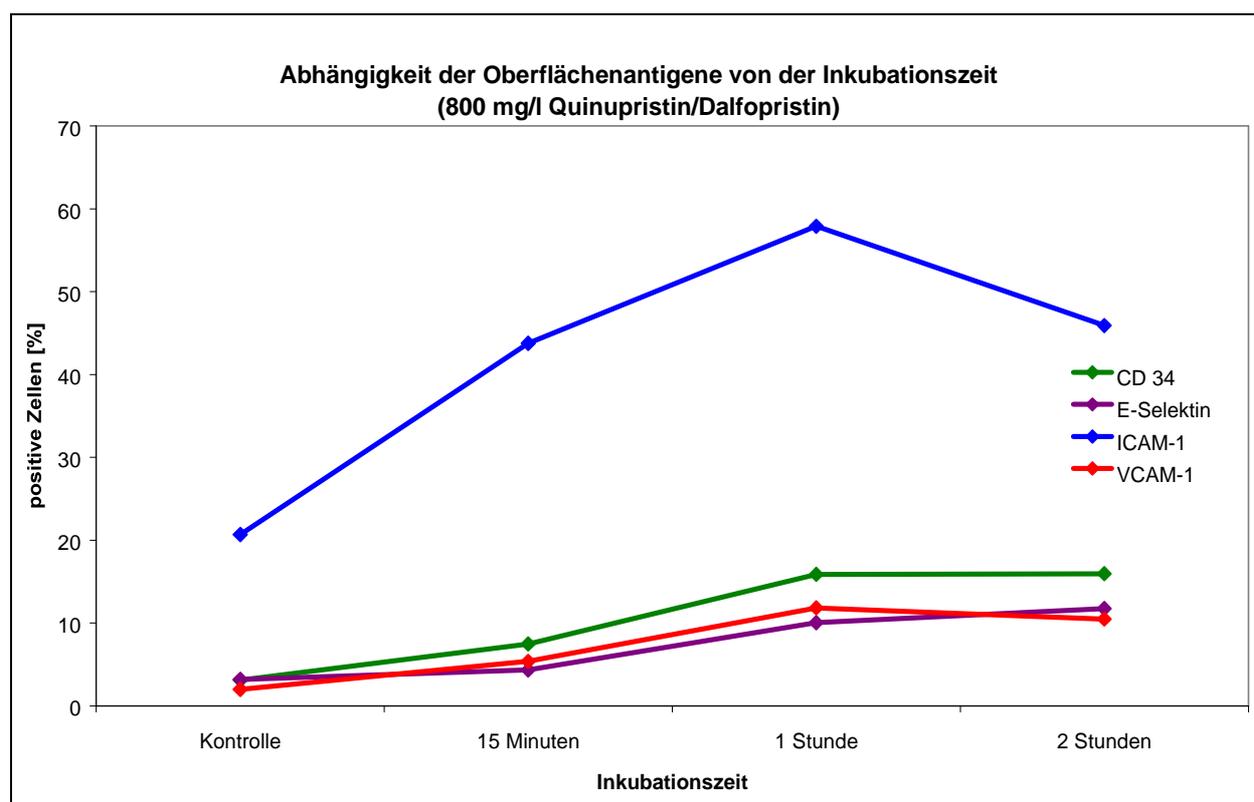


Abbildung 22: Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach verschieden langen Inkubationszeiten mit 800 mg/l Quinupristin/Dalfopristin. Messzeitpunkt 24 Stunden nach Beginn der Inkubation. n = 6 (Zellzahl pro Messung: 10.000).

| | 800 mg/l Quinupristin/Dalfopristin | | | |
|-------------------|------------------------------------|---------------|---------------|----------------|
| | Kontrolle | 15 Minuten | 1 Stunde | 2 Stunden |
| CD 34 | 3,16 ± 0,70 | 7,49 ± 4,06 | 15,87* ± 9,07 | 15,97* ± 2,36 |
| E-Selektin | 3,17 ± 2,21 | 4,33 ± 1,74 | 10,06* ± 4,04 | 11,73* ± 2,08 |
| ICAM-1 | 20,69 ± 3,75 | 43,76* ± 9,55 | 57,88* ± 2,92 | 45,90* ± 10,26 |
| VCAM-1 | 2,00 ± 0,31 | 5,37 ± 1,92 | 11,84* ± 5,23 | 10,49* ± 3,41 |

Table 15: Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach unterschiedlich langer Inkubationszeit mit 800 mg/l Quinupristin/Dalfopristin (Mittelwert ± Standardabweichung; Angaben in %). Statistisches Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$, behandelte Probe gegen unbehandelte Kontrolle, $n = 6$ (Zellzahl pro Messung: 10.000).

In der klinischen Situation, die bei diesen *in vitro* Experimenten möglichst realistisch nachgebildet werden sollte, entsteht das voll ausgeprägte Bild einer infusionsbedingten Thrombophlebitis nicht sofort nach Ende der Infusion. Es dauert eine gewisse Zeit, in der sich die Entzündung entwickelt. Um möglichst aussagekräftige Resultate der Reaktionen der Oberflächenantigene auf den Endothelzellen zu erhalten, wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden die behandelten Zellen in einem Zellkulturmedium ohne Arzneimittelzusatz für verschiedene Zeiträume belassen. So sollte berücksichtigt werden, dass die Zellen eine gewisse Zeit brauchen, um auf den Reiz durch die Infusionssubstanz eine volle inflammatorische Reaktion zu entwickeln.

Die EA.hy 926 Endothelzellen wurden für zwei Stunden mit 200 mg/l Quinupristin/Dalfopristin inkubiert. Anschließend wurde das Medium mit dem Antibiotikum gewechselt und gegen ein Medium ohne Arzneimittel ausgetauscht. Hierin wurden die Zellen 1, 4 bzw. 22 Stunden belassen und nach Ende der expositionsfreien Zeit wurden sofort mit Hilfe der Durchflusszytometrie 10.000 Endothelzellen analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass bereits nach einer Stunde expositionsfreier Zeit eine signifikante Reaktion der Endothelzellen bei zwei Oberflächenantigenen nachzuweisen war. Die maximale Ausprägung der Reaktion mit einem Maximum an positiv markierten Zellen war nach einer Gesamtzeit von 24 Stunden, d. h. nach zwei Stunden Inkubation und 22 Stunden expositionsfreier Zeit, vorhanden. Es waren alle untersuchten proinflammatorischen Oberflächenantigene im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle statistisch signifikant erhöht, CD 34 von 3,31% positive Zellen auf 10,41% positive Zellen und VCAM-1 von 3,03% positive Zellen auf 7,85% positive Zellen. Auch E-Selektin stieg um etwa das Fünffache und der Anteil der ICAM-1-positiven Zellen verdoppelte sich (siehe Abbildung 23 / Tabelle 16).

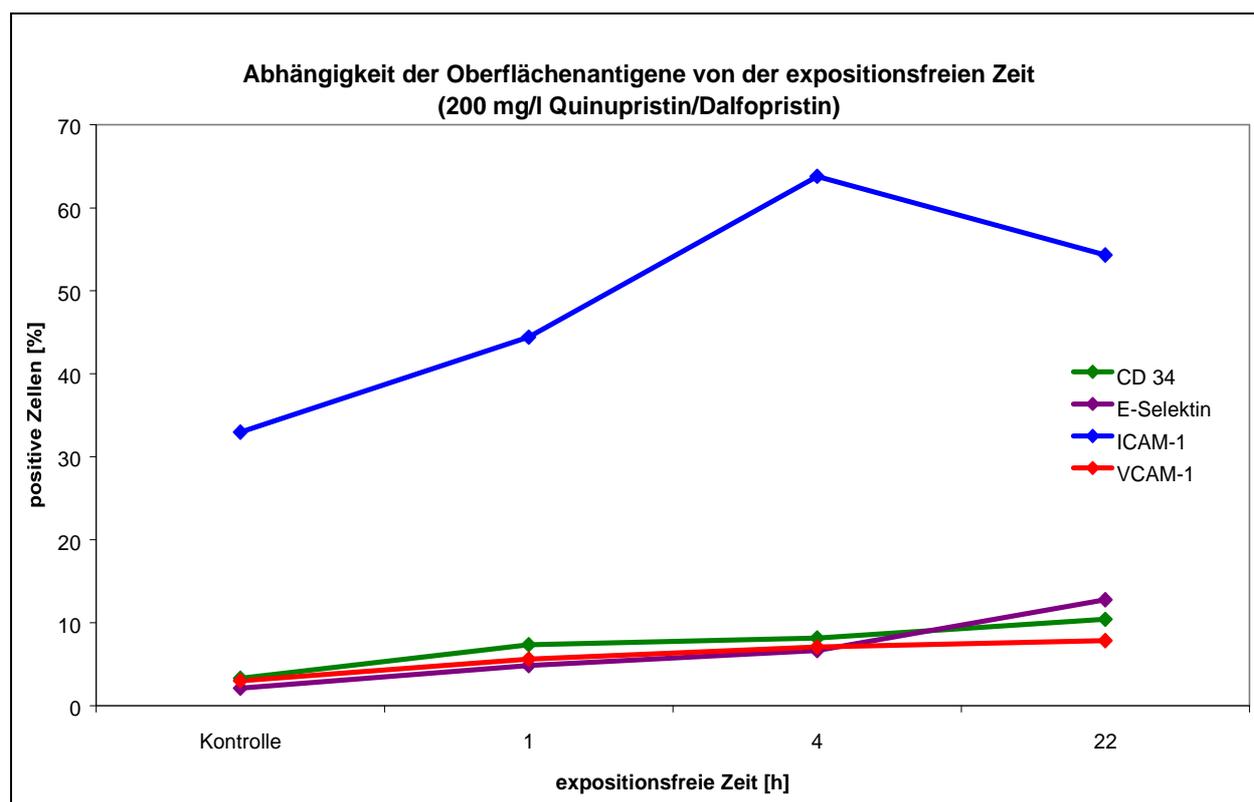


Abbildung 23: Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach verschiedenen langen expositionsfreien Zeiten mit 200 mg/l Quinupristin/Dalfopristin. Messzeitpunkt 3, 6 bzw. 24 Stunden nach Beginn der Inkubation. n = 3 (Zellzahl pro Messung: 10.000).

| expositionsfreie Zeit | 200 mg/l Quinupristin/Dalfopristin | | | |
|--------------------------|------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| | Kontrolle | 1 Stunde | 4 Stunden | 22 Stunden |
| CD 34 | 3,31 ± 0,77 | 7,36* ± 1,13 | 8,15* ± 0,75 | 10,41* ± 2,71 |
| E-Selektin | 2,12 ± 0,18 | 4,84 ± 1,38 | 6,67 ± 0,41 | 12,77* ± 4,21 |
| ICAM-1 | 32,97 ± 4,53 | 44,43* ± 6,60 | 63,79* ± 1,37 | 54,34* ± 3,11 |
| VCAM-1 | 3,03 ± 0,85 | 5,65 ± 1,89 | 7,09* ± 0,56 | 7,85* ± 1,88 |

Tabelle 16: Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach unterschiedlich langen expositionsfreien Zeiten mit 200 mg/l Quinupristin/Dalfopristin (Mittelwert ± Standardabweichung; Angaben in %). Statistisches Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$, behandelte Probe gegen unbehandelte Kontrolle, n = 3 (Zellzahl pro Messung: 10.000).

Um eine realistische Nachbildung der zeitlichen Verhältnisse bei einer Infusion zu erreichen, musste eine entsprechende Inkubationszeit und auch eine ausreichend lange expositionsfreie Zeit vor der durchflusszytometrischen Analyse gewählt werden. In dieser Arbeit wurden aufgrund der

Ergebnisse aus den Vorversuchen zwei Stunden Inkubationszeit und anschließend 22 Stunden expositionsfreie Zeit gewählt.

Die Inkubationszeit ist ein Kompromiss aus den unterschiedlich langen, von den Herstellern empfohlenen Zeiträumen, über die die Medikamente infundiert werden sollen. Auch die Ergebnisse der Experimente, mit denen die Zeitabhängigkeit untersucht wurde, zeigten eine maximale Ausprägung der Oberflächenantigene nach zwei Stunden Inkubation. Damit die Endothelzellen auf den zwei Stunden dauernden Reiz vollständig reagieren können, braucht es eine gewisse Zeit, in der sich die Zusammensetzung der Oberflächenantigene ändert. Die Analysen der Epitope haben eine Zeitabhängigkeit in der Anzahl der positiv markierten Zellen nach einer Inkubation von zwei Stunden gezeigt. Die maximale Ausprägung war nach 22 Stunden expositionsfreier Zeit erreicht.

3.4.2 Optimierung der Durchflusszytometrie

Um möglichst genau beurteilen zu können, in welchem Maße verschiedene Variablen zwischen den einzelnen Versuchstagen die Ergebnisse beeinflussten, wurden noch zwei weitere Vorversuche durchgeführt.

Der Zeitraum zwischen der Gewinnung der behandelten Zellen durch Trypsinierung und der tatsächlichen Messung im Durchflusszytometer betrug je nach Probenanzahl zwischen 90 und 150 Minuten. In dieser Zeit befanden sich die Endothelzellen nicht in Zellkulturmedium sondern in PBS. Es bestand die Möglichkeit, dass das PBS in diesem Zeitraum einen Einfluss auf die Zellen nehmen könnte. Um diesen Effekt beurteilen zu können, wurde der Einfluss von PBS auf behandelte Zellen in seiner Zeitabhängigkeit untersucht.

Aus einer Versuchsdurchführung mit verschiedenen Konzentrationen (100, 200 und 400 mg/l) von Azithromycin wurden jeweils 10.000 Endothelzellen für die Durchflusszytometrie aufgearbeitet. Die erste Messung wurde nach einer Zeitdauer von 90 Minuten zwischen Trypsinieren und Messen durchgeführt. Für die zweite Messung wurden die übrigen Zellen noch zwei Stunden länger im Kühlschrank im Dunklen bei 4 °C aufbewahrt, bevor sie gemessen wurden. Es wurden jeweils alle vier untersuchten proinflammatorischen Oberflächenantigene auf 10.000 Endothelzellen analysiert. Die statistische Analyse der gewonnenen Daten erfolgte mit dem t-Test für unverbundene Stichproben zwischen den jeweiligen Datenpaaren mit den unterschiedlich langen PBS-Expositionszeitdauern. Als statistisches Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ gewählt.

In der Zeitdauer von zwei Stunden, in denen die Zellen nicht bearbeitet wurden, konnte ein deutlicher Rückgang der Anzahl der für die Oberflächenantigene positiven Zellen nachgewiesen werden. Sowohl die Kontrollen als auch alle behandelten Proben zeigten statistisch signifikant weniger positive Zellen in der Messung mit dem Durchflusszytometer. In der Kontrolle reduzierte sich beispielsweise die Anzahl von CD 34-positiven Zellen von 2,33% auf 0,99%. Bei einer Konzentration von 200 mg/l Azithromycin sank die Anzahl der positiven Zellen für E-Selektin bzw. VCAM-1 auf ein Drittel (siehe Abbildung 24 / Tabelle 17).

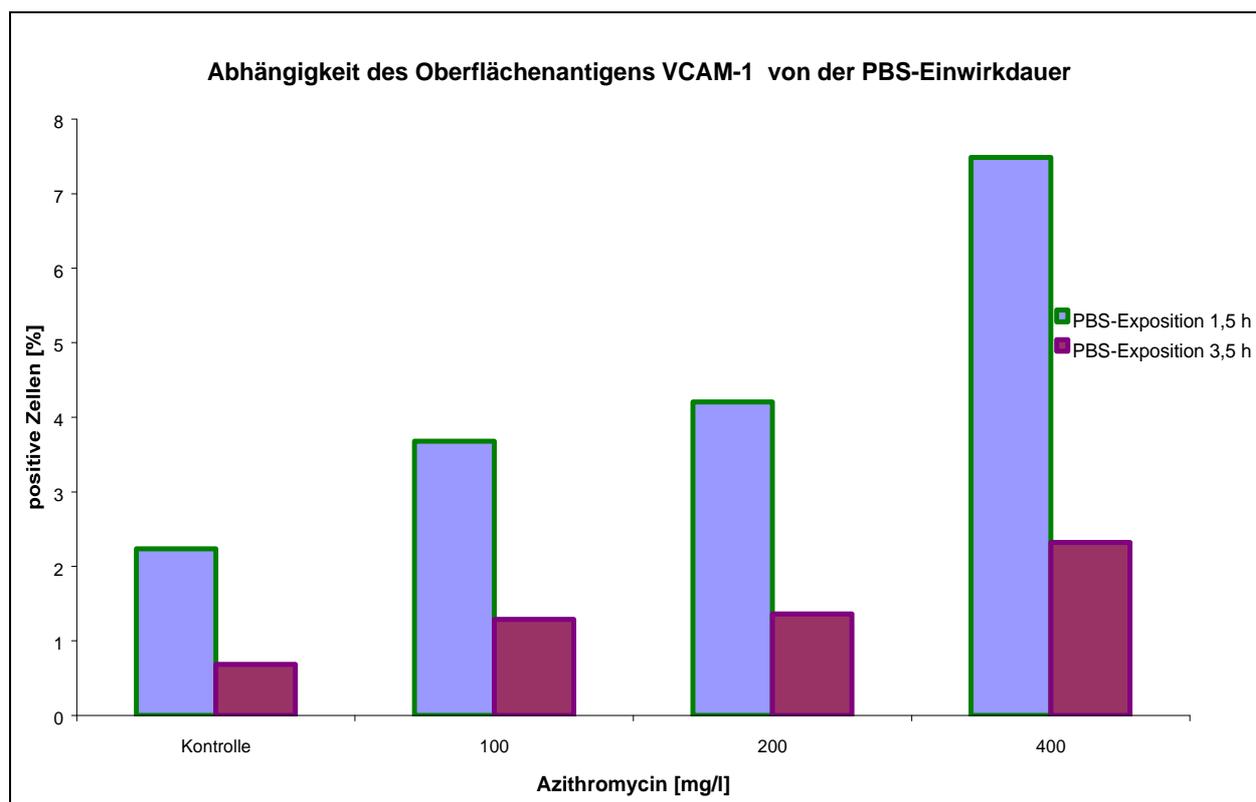


Abbildung 24: Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für VCAM-1 nach verschieden langen PBS-Expositionszeiten nach zwei Stunden Inkubation mit Azithromycin und 22 Stunden expositionsfreier Zeit. Messzeitpunkt 1,5 bzw. 3,5 Stunden nach Trypsinierung, n = 3 (Zellzahl pro Messung: 10.000).

| | PBS- Exposition [h] | Azithromycin | | | |
|------------|---------------------------|--------------|---------------|---------------|--------------|
| | | Kontrolle | 100 mg/l | 200 mg/l | 400 mg/l |
| CD 34 | 1,5 | 2,33 ± 1,04 | 5,92 ± 1,24 | 7,93 ± 1,34 | 11,43 ± 3,36 |
| CD 34 | 3,5 | 0,99 ± 0,08 | 1,63* ± 0,24 | 1,74* ± 0,20 | 2,48* ± 0,59 |
| E-Selektin | 1,5 | 4,89 ± 1,88 | 15,98 ± 2,70 | 15,45 ± 4,85 | 13,24 ± 0,71 |
| E-Selektin | 3,5 | 1,45 ± 0,24 | 3,23* ± 0,43 | 4,25 ± 0,12 | 5,77* ± 0,53 |
| ICAM-1 | 1,5 | 22,25 ± 3,75 | 33,85 ± 4,31 | 37,89 ± 9,59 | 35,91 ± 6,23 |
| ICAM-1 | 3,5 | 13,42 ± 4,20 | 16,31* ± 5,89 | 21,33* ± 2,45 | 30,13 ± 2,82 |
| VCAM-1 | 1,5 | 2,23 ± 0,06 | 3,68 ± 0,22 | 4,20 ± 0,86 | 7,49 ± 1,21 |
| VCAM-1 | 3,5 | 0,69* ± 0,09 | 1,29* ± 0,28 | 1,36* ± 0,28 | 2,32* ± 0,28 |

Tabelle 17: Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach verschiedenen langen PBS-Expositionszeiten nach zwei Stunden Inkubation mit Azithromycin und 22 Stunden expositionsfreier Zeit (Mittelwert ± Standardabweichung; Angaben in %). Messzeitpunkt 1,5 bzw. 3,5 Stunden nach Trypsinierung. Statistisches Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$, Probe mit 1,5 Stunden PBS-Exposition gegen Probe mit 3,5 Stunden PBS-Exposition, $n = 3$ (Zellzahl pro Messung: 10.000).

Um sicherzustellen, dass die Endothelzelllinie EA.hy 926 in diesem *in vitro* Modell charakteristisch reagierten, wurde ein Vorversuch mit dem proinflammatorischen Zytokin Tumornekrosefaktor α (TNF- α) durchgeführt.

Die Endothelzellen wurden für zwei Stunden mit 10 mg/l TNF- α inkubiert und anschließend für 22 Stunden in normales Zellkulturmedium gegeben. Anschließend wurden die Zellen für die durchflusszytometrische Analyse aufbereitet und gemessen. Für die statistische Analyse wurde der t-Test für unverbundene Stichproben mit einem statistischen Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ verwendet.

Es zeigte sich eine charakteristische Reaktion der EA.hy 926 Zellen. Die Zellen reagierten mit einer maximalen Ausprägung von ICAM-1 auf ihrer Zelloberfläche (98,08% positiv markierte Zellen). Die anderen drei untersuchten Epitope reagierten nicht statistisch signifikant (siehe Abbildung 25 / Tabelle 18).

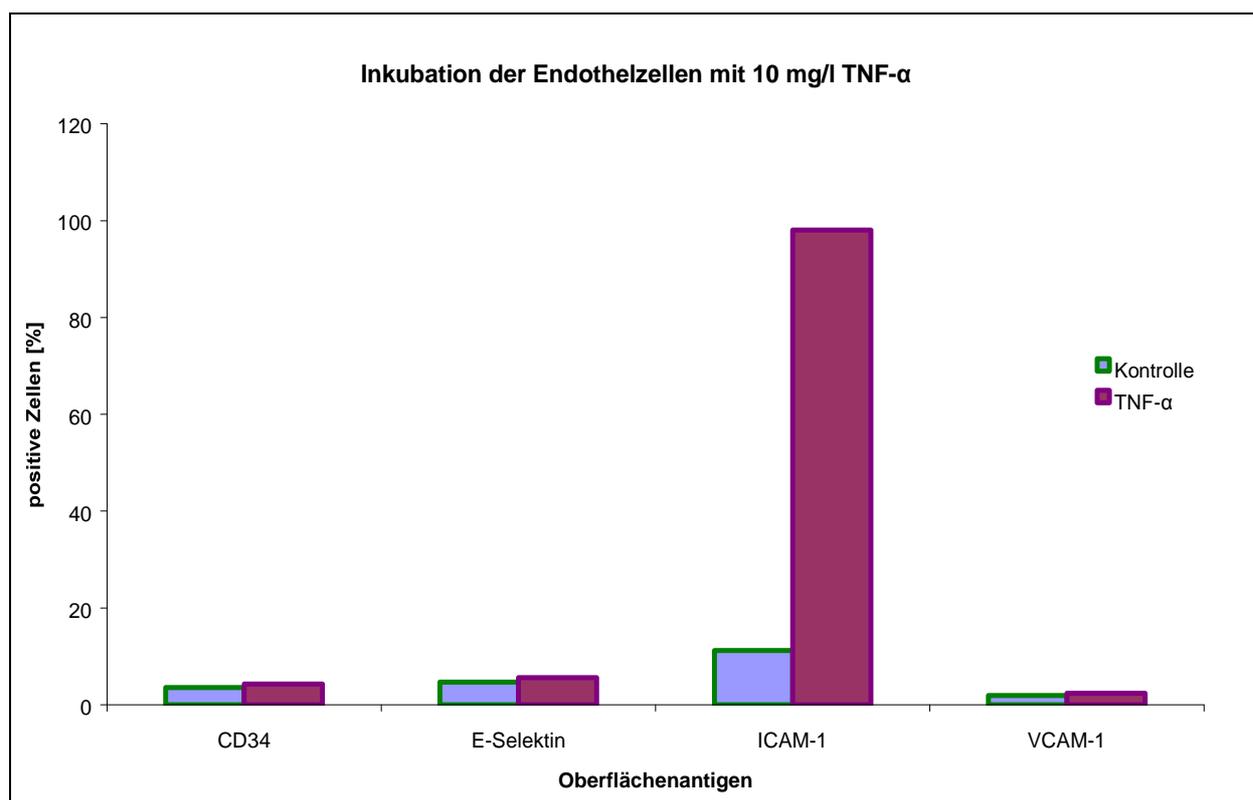


Abbildung 25: Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach zwei Stunden Inkubation mit 10 mg/l TNF- α und 22 Stunden expositionsfreier Zeit, n = 6 (Zellzahl pro Messung: 10.000).

| | TNF- α | |
|-------------------|------------------|-------------------|
| | Kontrolle | 10 mg/l |
| CD 34 | 3,56 \pm 1,46 | 4,27 \pm 1,26 |
| E-Selektin | 4,68 \pm 1,39 | 5,62 \pm 1,52 |
| ICAM-1 | 11,23 \pm 2,83 | 98,08* \pm 0,47 |
| VCAM-1 | 1,89 \pm 0,38 | 2,38 \pm 0,88 |

Tabelle 18: Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach zwei Stunden Inkubation mit 10 mg/l TNF- α und 22 Stunden expositionsfreier Zeit (Mittelwert \pm Standardabweichung; Angaben in %). Statistisches Signifikanzniveau: * p \leq 0,05, behandelte Probe gegen unbehandelte Kontrolle, n = 6 (Zellzahl pro Messung: 10.000).

Die Endothelzelllinie reagierte auf das Zytokin TNF- α nur mit einer Steigerung von ICAM-1 auf ca. 100% positive Zellen, während die anderen untersuchten Oberflächenantigene nicht reagierten. Damit zeigten die Zellen eine charakteristische Reaktion auf diesen Stimulus.

Es konnte eine Abhängigkeit von der Zeitdauer im PBS für die Anzahl der positiv markierten Zellen für alle untersuchten proinflammatorischen Oberflächenantigene nachgewiesen werden. Damit wird deutlich, dass man, um die daraus resultierende Variabilität in den Ergebnissen möglichst gering zu halten, die Aufbereitung der Zellen für die Durchflusszytometrie möglichst kurz und einheitlich halten muss.

3.4.3 Wirkung von Quinupristin/Dalfopristin auf proinflammatorische Oberflächenantigene

Als Vorversuch wurden die Wirkungen von Quinupristin/Dalfopristin auf die Epitope CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 untersucht. Die Substanz gehört zur Gruppe der Streptogramine und hat ein besonders hohes Potenzial für die Entwicklung einer infusionsbedingten Thrombophlebitis. Um feststellen zu können, ob das *in vitro* Modell in der Lage ist, Änderungen durch die Inkubation mit einem Antibiotikum an den proinflammatorischen Oberflächenantigenen nachzuweisen, wurde der Versuchsaufbau mit diesem Antibiotikum als positive Kontrolle getestet. Die untersuchten Konzentrationen wurden in Konzentrationsfindungsversuchen ermittelt, indem die Zunahme der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen ermittelt wurde, bis zytotoxische Effekte in Form einer Abnahme der Anzahl der markierten Zellen nachweisbar wurden.

In den Vorversuchen mit Quinupristin/Dalfopristin wurden Konzentrationen von 100 mg/l, 200 mg/l, 400 mg/l, 600 mg/l und 800 mg/l durchflusszytometrisch untersucht. Die Endothelzellen wurden gemäß der in den Vorversuchen ermittelten Versuchsdurchführung zwei Stunden mit der jeweiligen Konzentration des Antibiotikums inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden für 22 Stunden im Brutschrank gelagert. Danach wurden sie zügig für die durchflusszytometrische Analyse aufgearbeitet und gemessen. Für die Ermittlung der einflussnehmenden Faktoren und der Bestimmung der statistischen Signifikanz der Daten wurden diese mit ANOVA mit nachfolgendem Post-Hoc-t-Test nach Dunnett analysiert. Das dabei angewendete statistische Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$. Die Versuche wurden an zwei Tagen mit einer Anzahl von jeweils $n = 3$, insgesamt also $n = 6$, durchgeführt. Es ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der beiden Versuchstage, so dass die Daten gepoolt werden konnten.

Die höchste absolute Ausprägung von den vier untersuchten Oberflächenantigenen wurde bei ICAM-1 gemessen. In der unbehandelten Kontrolle waren 16,53% der Zellen positiv für ICAM-1 markiert, bei 600 mg/l Quinupristin/Dalfopristin waren maximal 60,06% der Zellen

positiv markiert. Die höchsten relativen Zunahmen im Vergleich zu ihren Kontrollen zeigten CD 34 und VCAM-1. Beide Epitope stiegen um das Zwanzigfache. VCAM-1 war auf 34,03% der analysierten Zellen positiv markiert und CD 34 auf 51,74% der Zellen. Auch hier wurden die Zellen mit einer Konzentration von 600 mg/l inkubiert. E-Selektin stieg um das Zehnfache von 3,96% positiv markierte Zellen in der unbehandelten Kontrolle auf 42,86% positiv markierte Zellen. Sämtliche Veränderungen waren im Vergleich zu den Kontrollen statistisch signifikant (siehe Abbildung 26 / Tabelle 19).

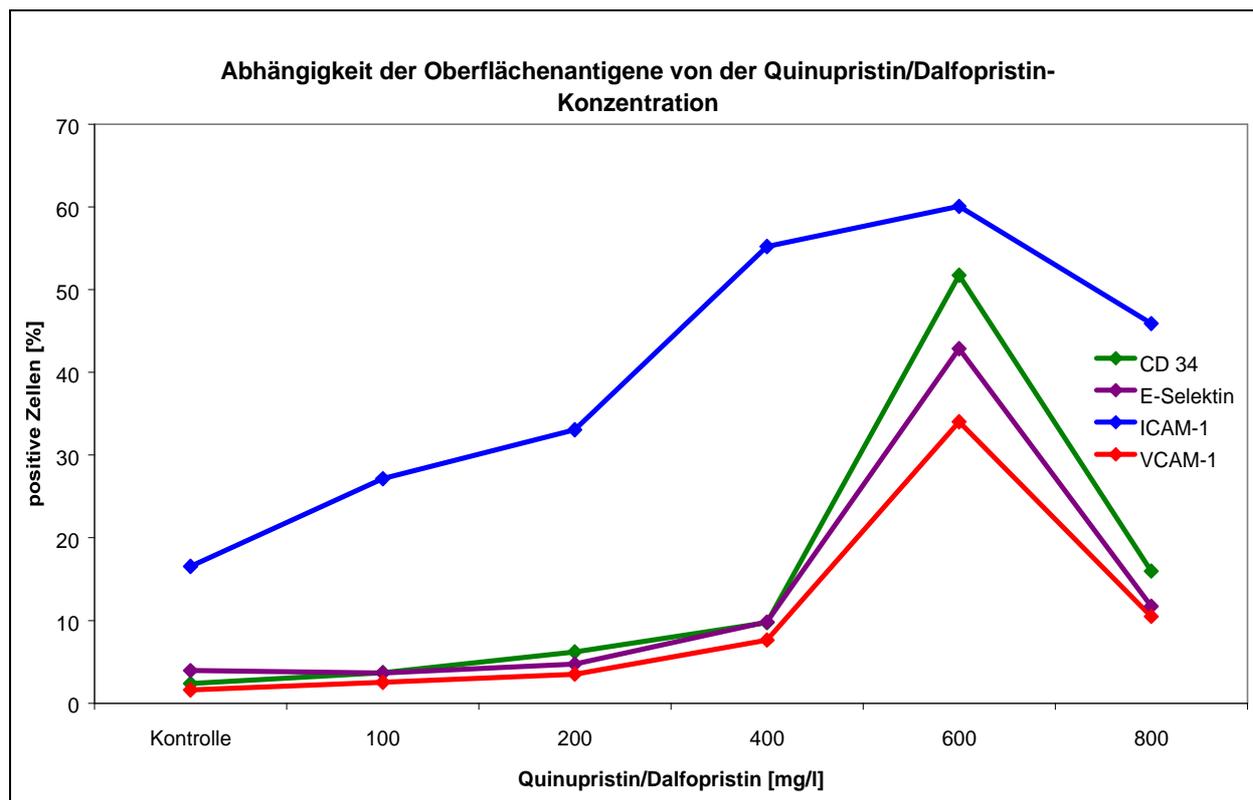


Abbildung 26: Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach zwei Stunden Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen für Quinupristin/Dalfopristin und 22 Stunden expositionsfreier Zeit, n = 6 (Zellzahl pro Messung: 10.000).

| <i>EA.hy 926</i> | Quinupristin/Dalfopristin | | | | | |
|-------------------|---------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | Kontrolle | 100 mg/l | 200 mg/l | 400 mg/l | 600 mg/l | 800 mg/l |
| CD 34 | 2,36 ± | 3,69 ± | 6,18* ± | 9,73* ± | 51,74* ± | 15,97* ± |
| | 1,05 | 1,52 | 1,98 | 3,24 | 5,93 | 2,36 |
| E-Selektin | 3,96 ± | 3,67 ± | 4,75 ± | 9,82* ± | 42,86* ± | 11,73* ± |
| | 1,85 | 0,85 | 1,07 | 2,64 | 4,64 | 2,08 |
| ICAM-1 | 16,53 ± | 27,13* ± | 33,06* ± | 55,23* ± | 60,06* ± | 45,90* ± |
| | 5,79 | 4,93 | 3,27 | 8,41 | 3,30 | 10,26 |
| VCAM-1 | 1,60 ± | 2,52 ± | 3,52* ± | 7,65* ± | 34,03* ± | 10,49* ± |
| | 0,51 | 0,89 | 0,78 | 2,87 | 3,11 | 3,41 |

Tabelle 19: Prozentanteil der positiv markierten *EA.hy 926* Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach zwei Stunden Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen für Quinupristin/Dalfopristin und 22 Stunden expositionsfreier Zeit (Mittelwert ± Standardabweichung; Angaben in %). Statistisches Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$, behandelte Probe gegen unbehandelte Kontrolle, $n = 6$ (Zellzahl pro Messung: 10.000).

3.4.4 Wirkung von Erythromycin auf proinflammatorische Oberflächenantigene

Erythromycin gehört zu den Makrolid-Antibiotika. Diese sind bekannt dafür, als häufige unerwünschte Wirkung nach Infusionen eine Thrombophlebitis des Gefäßes auszulösen. Die in der Fachinformation angegebenen Daten zu der Infusionslösung von Erythromycin (Erythrocin®-i.v.) beschreiben eine Endkonzentration von 5000 mg/l und eine Infusionsdauer von einer Stunde. In den Versuchen wurden geringere Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von zwei Stunden untersucht. Durch den ständigen Blutstrom in der für die Infusion verwendeten Vene ist eine geringere Konzentration des Antibiotikums an der Venenwand, als in der Infusionslösung, zu erwarten. Es wurde eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung für proinflammatorische Oberflächenantigene aufgenommen. Dafür wurden Endothelzellen der Zelllinie *EA.hy 926* verwendet. Um zu überprüfen, ob die Zelllinie tatsächlich eine vergleichbare Reaktion wie Endothelzellen *in vivo* zeigt, wurden bestimmte Konzentrationen nochmals an der Primärkultur HUVEC überprüft. Die *EA.hy 926* Zellen wurden mit Konzentrationen von 200 mg/l, 400 mg/l, 800 mg/l und 1200 mg/l über einen Zeitraum von zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt und die Zellen blieben für 22 Stunden im Brutschrank. Nach einer Gesamtdauer von 24 Stunden wurden die Endothelzellen möglichst rasch für die Durchflusszytometrie aufgearbeitet und gemessen. Dabei wurden die Oberflächenantigene CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 analysiert. Die gewonnenen Daten wurden statistisch mit ANOVA und einem nachfolgenden Post-Hoc-t-Test nach Dunnett mit einem statistischen Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ analysiert. Die Experimente wurden an zwei verschie-

denen Tagen mit einer Anzahl von jeweils $n = 3$, insgesamt also $n = 6$, durchgeführt. Es ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der beiden Versuchstage, so dass die Daten gepoolt werden konnten.

Die Reaktion der HUVECs wurde nur bei einer Konzentration von 800 mg/l Erythromycin untersucht. Sie wurden für zwei Stunden inkubiert und für 22 Stunden in Zellkulturmedium belassen, bevor sie schnellstmöglich aufbereitet wurden. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die proinflammatorischen Epitope untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test für unverbundene Stichproben bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. Die Versuche wurden ebenso wie die Versuche mit der Infusionsformulierung an zwei Tagen durchgeführt und die Daten anschließend gepoolt.

Erythromycin verursachte bei allen Epitopen eine signifikante Zunahme der positiv markierten Endothelzellen der Zelllinie EA.hy 926. Die stärkste relative Zunahme zeigte VCAM-1 von 1,47% positive Zellen auf das Dreifache (6,09% positive Zellen) nach einer Exposition mit 800 mg/l Erythromycin. Ähnlich reagierte auch CD 34 mit einem Anstieg von 1,93% auf 7,23% positiv markierte Zellen. E-Selektin zeigte ebenfalls bei einer Konzentration von 800 mg/l Erythromycin eine maximale Ausprägung von 9,25% positive Zellen. ICAM-1 stieg auf das Doppelte an. Bei 1200 mg/l Erythromycin nahm die Anzahl der positiv markierten Zellen wieder ab, weil die zytotoxischen Effekte überwogen und viele Endothelzellen abstarben (siehe Abbildung 27 / Tabelle 20).

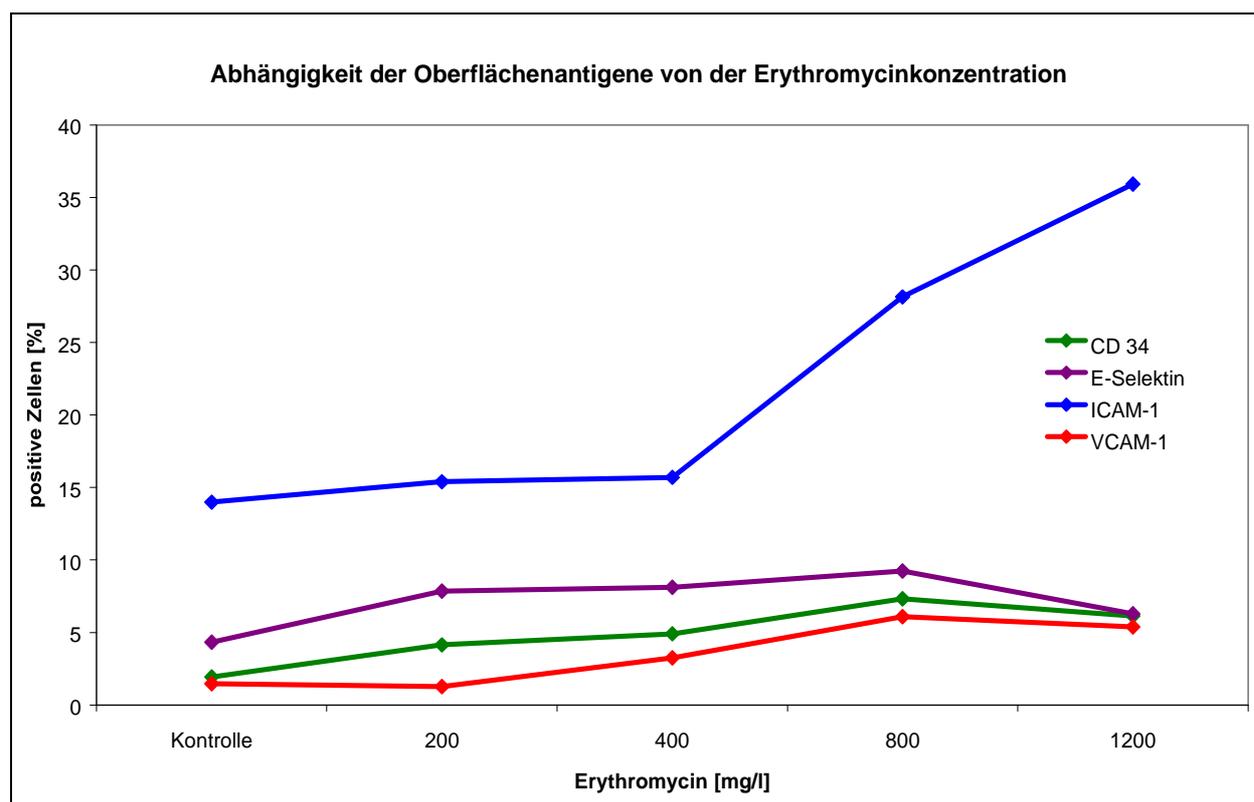


Abbildung 27: Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach zwei Stunden Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen für Erythromycin und 22 Stunden expositionsfreier Zeit, n = 6 (Zellzahl pro Messung: 10.000).

| <i>EA.hy 926</i> | Erythromycin | | | | |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| | Kontrolle | 200 mg/l | 400 mg/l | 800 mg/l | 1200 mg/l |
| CD 34 | 1,93 ± 0,64 | 4,14* ± 1,54 | 4,91* ± 2,74 | 7,32* ± 0,73 | 6,14* ± 3,91 |
| E-Selektin | 4,33 ± 1,60 | 7,85* ± 3,22 | 8,10* ± 2,75 | 9,25* ± 0,90 | 6,30 ± 1,15 |
| ICAM-1 | 13,99 ± 6,24 | 15,40 ± 2,02 | 15,69 ± 11,44 | 28,14* ± 2,49 | 35,92* ± 5,98 |
| VCAM-1 | 1,47 ± 0,36 | 1,26* ± 0,76 | 3,25* ± 1,47 | 6,09* ± 1,72 | 5,40 ± 1,91 |

Tabelle 20: Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach zwei Stunden Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen für Erythromycin und 22 Stunden expositionsfreier Zeit (Mittelwert ± Standardabweichung; Angaben in %). Statistisches Signifikanzniveau: $p \leq 0,05$, behandelte Probe gegen unbehandelte Kontrolle, n = 6 (Zellzahl pro Messung: 10.000).

Auch die Primärkultur HUVEC reagierte mit einem Anstieg der positiv markierten Zellen für die untersuchten Oberflächenantigene. Das Epitop CD 34 stieg von 1,82% positive Zellen in der Kontrolle auf 4,19% positiv markierte Endothelzellen nach einer zweistündigen Inkubation mit

800 mg/l Erythromycin. E-Selektin stieg um das Doppelte auf 3,02% positive Zellen. In der un-
behandelten Kontrolle waren 8,5% der Zellen positiv für ICAM-1 markiert. Bei den behandelten
Zellen war ein Anteil von 12,5% positiv markiert. VCAM-1 zeigte eine Zunahme der positiv
markierten Zellen von 1,22% auf 2,35%. Alle Zunahmen der Oberflächenantigene waren statis-
tisch signifikant (siehe Abbildung 28 / Tabelle 21).

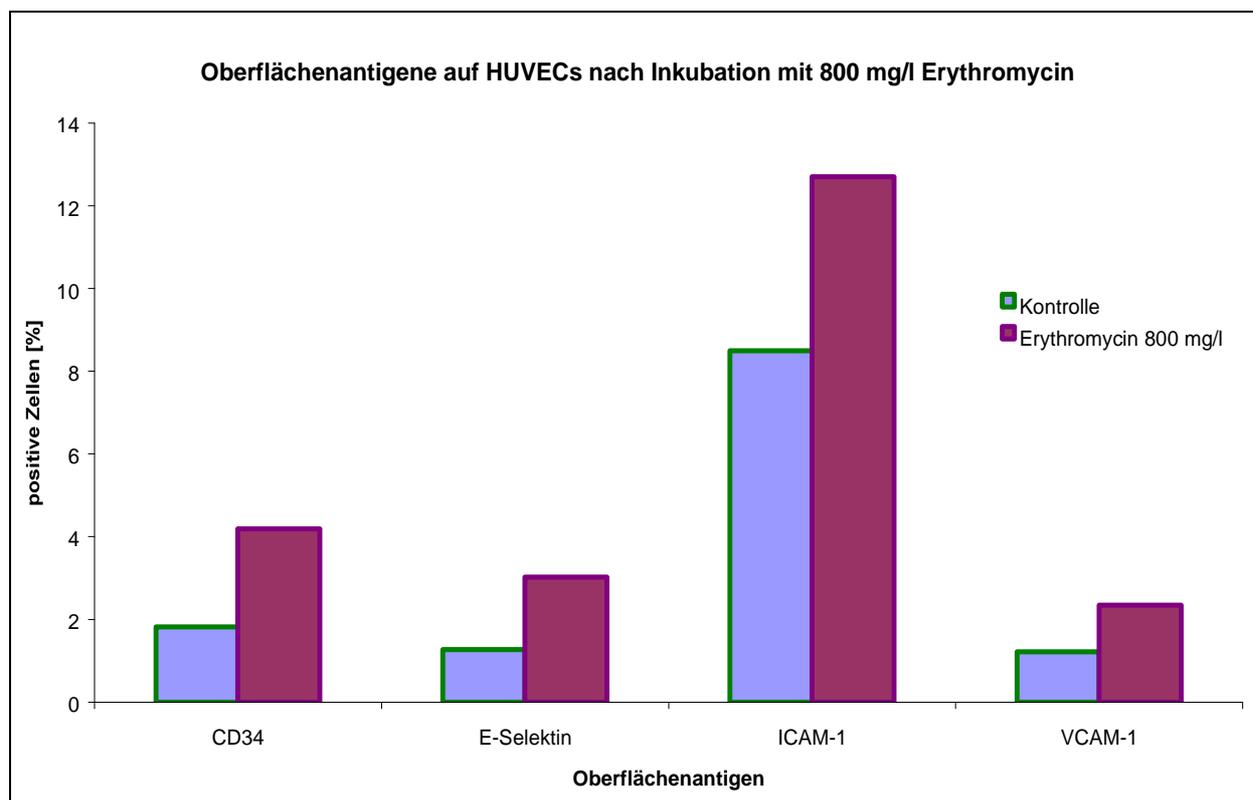


Abbildung 28: Prozentanteil der positiv markierten HUVECs für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach zwei Stunden Inkubation mit 800 mg/l Erythromycin und 22 Stunden expositionsfreier Zeit, n = 6 (Zellzahl pro Messung: 10.000).

| <i>HUVEC</i> | Erythromycin | |
|-------------------|---------------------|-----------------|
| | Kontrolle | 800 mg/l |
| CD 34 | 1,82 ± 0,31 | 4,19* ± 0,64 |
| E-Selektin | 1,27 ± 0,17 | 3,02* ± 0,34 |
| ICAM-1 | 8,50 ± 0,69 | 12,70* ± 0,49 |
| VCAM-1 | 1,22 ± ,011 | 2,35* ± 0,24 |

Tabelle 21: Prozentanteil der positiv markierten HUVECs für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach zwei Stunden Inkubation mit 800 mg/l Erythromycin und 22 Stunden expositionsfreier Zeit (Mittelwert ± Standardabweichung; Angaben in %). Statistisches Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$, behandelte Probe gegen unbehandelte Kontrolle, $n = 6$ (Zellzahl pro Messung: 10.000).

3.4.5 Wirkung von Clarithromycin auf proinflammatorische Oberflächenantigene

Clarithromycin gehört wie Erythromycin zur Stoffgruppe der Makrolide. Es wurde aufgrund der vielen Nebenwirkungen des Erythromycins entwickelt, um ein vergleichbares Antibiotikum zu haben, das eine geringere Anzahl an Nebenwirkungen aufweist. In der untersuchten Infusionslösung (Klacid[®]) liegt es in einer Konzentration von 2000 mg/l vor. Es sollte eine Dosis-Wirkungsbeziehung bei den untersuchten Epitopen CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 untersucht werden. Zum Vergleich wurden die Reaktionen auch an der Primärkultur der HUVECs überprüft.

Bei den Versuchen mit der Zelllinie wurden die Zellen mit Konzentrationen von 100 mg/l, 200 mg/l, 400 mg/l und 600 mg/l Clarithromycin für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 22 Stunden in Zellkulturmedium im Brutschrank belassen, um die Entwicklung einer vollständig ausgeprägten Reaktion der Zellen zuzulassen. Sie wurden dann für die Durchflusszytometrie aufgearbeitet und durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse für die positiv markierten Zellen wurden für die jeweiligen proinflammatorischen Oberflächenantigene mit Hilfe von ANOVA mit einem Post-Hoc-t-Test nach Dunnett auf ihre statistische Signifikanz untersucht. Das statistische Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$. Die Versuche wurden an zwei Tagen mit einer Anzahl von jeweils $n = 3$, insgesamt also $n = 6$, durchgeführt. Es ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der beiden Versuchstage, so dass die Daten gepoolt werden konnten.

Für die Versuche mit den HUVECs wurden die primären Endothelzellen nur mit 200 mg/l Clarithromycin inkubiert und analog zu den Versuchen mit den EA.hy 926 Endothelzellen aufbereitet und durchflusszytometrisch ausgewertet. Die Werte für die positiv markierten Zellen wurden

mit einem t-Test für unverbundene Stichproben zwischen der unbehandelten Kontrolle und der behandelten Probe auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Das statistische Signifikanzniveau wurde auch hier auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Alle Versuche wurden an einem weiteren Tag (jeweils $n = 3$) wiederholt und die Daten gepoolt (insgesamt $n = 6$).

Bei den Inkubationen mit Clarithromycin reagierten die proinflammatorischen Oberflächenantigene mit einer statistisch signifikanten Zunahme in den positiv markierten Zellen. Da Clarithromycin von den untersuchten Antibiotika die stärkste Zytotoxizität aufwies, konnte nur der Konzentrationsbereich bis 600 mg/l untersucht werden, da bei höheren Konzentrationen alle Zellen abstarben. Auch der Abfall der positiv markierten Zellen zwischen 400 mg/l und 600 mg/l Clarithromycin ist durch den zytotoxischen Effekt der Substanz zu erklären. ICAM-1 wurde in der Kontrolle mit 14,27% positiv markierten Zellen nachgewiesen und stieg auf ein Maximum von 37,79% positiv markierten Zellen bei 400 mg/l Clarithromycin. VCAM-1 stieg auf das Dreifache der Kontrolle mit 5,56% positive Zellen für dieses Epitop. Ähnlich verhielt sich auch die Reaktion des Oberflächenantigens CD 34 auf den Endothelzellen mit einer maximalen Ausprägung von 7,11% positive Zellen. E-Selektin stieg signifikant auf 11,26% positiv markierte Zellen (siehe Abbildung 29 / Tabelle 22).

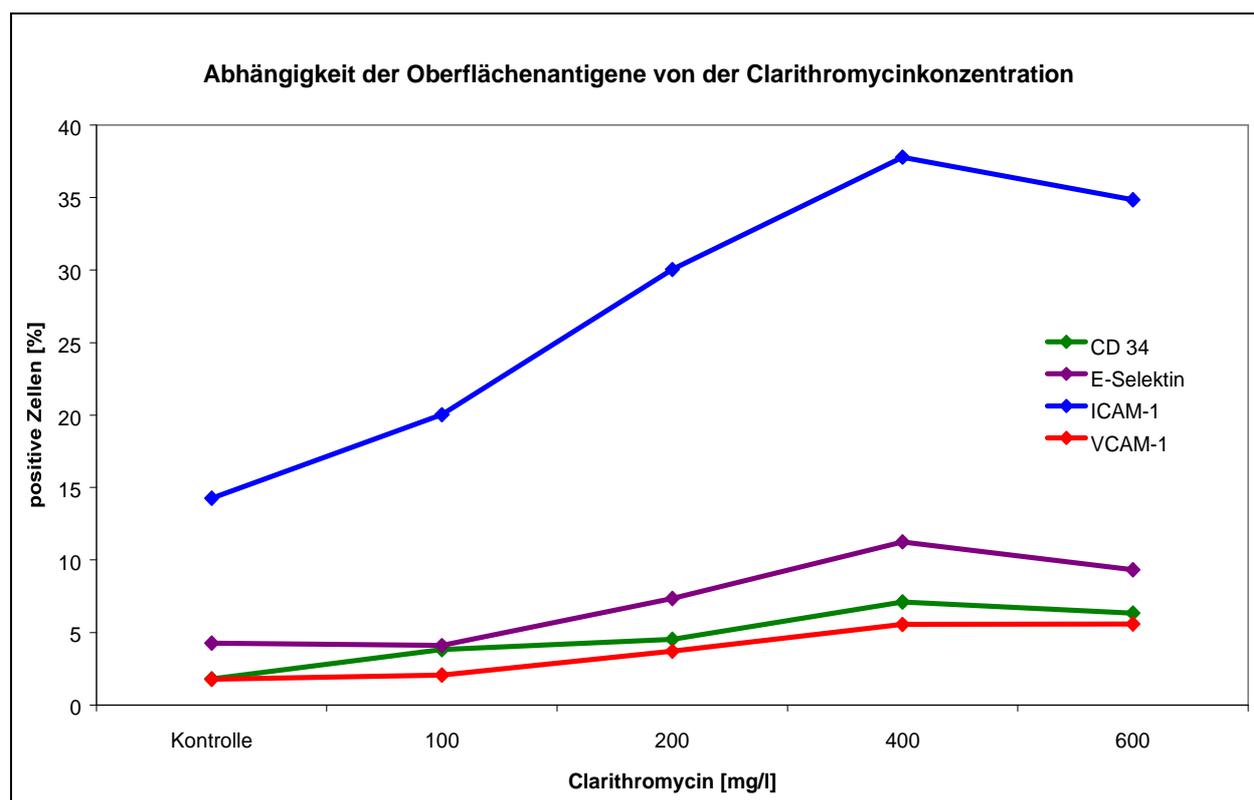


Abbildung 29: Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach zwei Stunden Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen für Clarithromycin und 22 Stunden expositionsfreier Zeit, n = 6 (Zellzahl pro Messung: 10.000).

| <i>EA.hy 926</i> | Clarithromycin | | | | |
|-------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | Kontrolle | 100 mg/l | 200 mg/l | 400 mg/l | 600 mg/l |
| CD 34 | 1,80 ± 0,58 | 3,83 ± 4,26 | 4,53 ± 1,98 | 7,11* ± 4,12 | 6,35* ± 2,11 |
| E-Selektin | 4,26 ± 1,51 | 4,10 ± 0,98 | 7,34 ± 2,44 | 11,26* ± 3,47 | 9,33* ± 4,95 |
| ICAM-1 | 14,27 ± 3,05 | 20,02* ± 2,44 | 30,05* ± 5,69 | 37,79* ± 5,11 | 34,86* ± 2,76 |
| VCAM-1 | 1,77 ± 0,56 | 2,07 ± 0,58 | 3,70* ± 0,56 | 5,56* ± 2,08 | 5,58* ± 1,19 |

Tabelle 22: Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach zwei Stunden Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen für Clarithromycin und 22 Stunden expositionsfreier Zeit (Mittelwert ± Standardabweichung; Angaben in %). Statistisches Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$, behandelte Probe gegen unbehandelte Kontrolle, n = 6 (Zellzahl pro Messung: 10.000).

Auf den HUVECs stiegen die untersuchten proinflammatorischen Oberflächenantigene signifikant an. CD 34 stieg signifikant auf 3,65% positive Zellen im Vergleich zu 1,57% positiv markierten Zellen in der Kontrolle. E-Selektin stieg um das Doppelte nach einer Inkubation mit

200 mg/l Clarithromycin an. Die Markierung für ICAM-1 erhöhte sich von 7,3% positive Zellen in der unbehandelten Kontrolle auf 10,93% positive Zellen. VCAM-1 wurde in der Kontrolle auf 1,07% der Zellen positiv markiert und stieg signifikant in der behandelten Probe auf 2,01% positive Zellen (siehe Abbildung 30 / Tabelle 23).

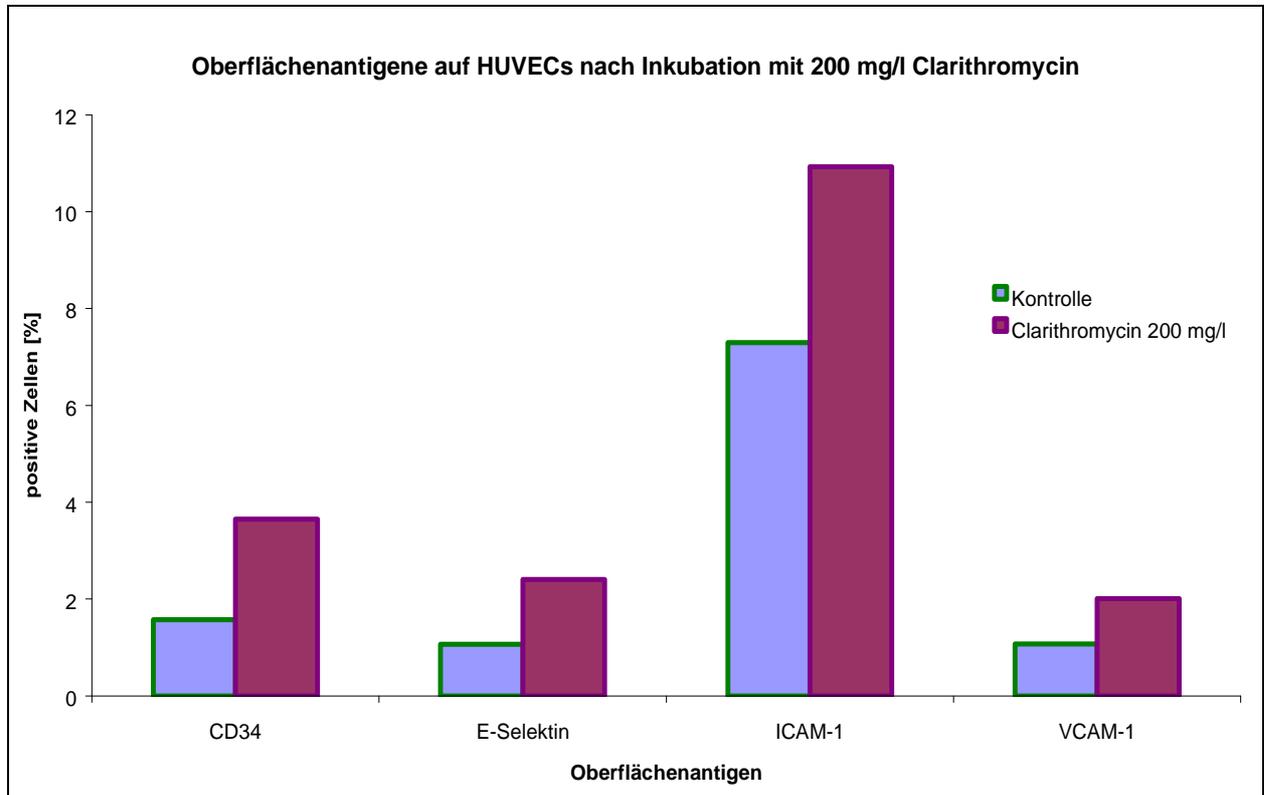


Abbildung 30: Prozentanteil der positiv markierten HUVECs für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach zwei Stunden Inkubation mit 200 mg/l Clarithromycin und 22 Stunden expositionsfreier Zeit, n = 6 (Zellzahl pro Messung: 10.000).

| <i>HUVEC</i> | Clarithromycin | |
|-------------------|----------------|---------------|
| | Kontrolle | 200 mg/l |
| CD 34 | 1,57 ± 0,22 | 3,65* ± 0,62 |
| E-Selektin | 1,07 ± 0,15 | 2,40* ± 0,38 |
| ICAM-1 | 7,30 ± 0,67 | 10,93* ± 0,55 |
| VCAM-1 | 1,07 ± ,011 | 2,01* ± 0,14 |

Tabelle 23: Prozentanteil der positiv markierten HUVECs für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach zwei Stunden Inkubation mit 200 mg/l Clarithromycin und 22 Stunden expositionsfreier Zeit (Mittelwert ± Standardabweichung; Angaben in %). Statistisches Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$, behandelte Probe gegen unbehandelte Kontrolle, $n = 6$ (Zellzahl pro Messung: 10.000).

3.4.6 Wirkung von Azithromycin auf proinflammatorische Oberflächenantigene

Azithromycin ist der einzige Vertreter der Gruppe der Azalide. Diese sind eine Weiterentwicklung der Makrolide. Die Wirkung des Antibiotikums auf proinflammatorische Oberflächenantigene wurde untersucht. In der untersuchten Infusionslösung ist Azithromycin in einer Konzentration von 1000 mg/l enthalten. Auch bei diesem Medikament wurde der Unterschied in der Reaktion zwischen der Zelllinie EA.hy 926 und der Primärkultur HUVEC bestimmt.

Die Wirkung von Azithromycin wurde in den Konzentrationen von 100 mg/l, 200 mg/l, 400 mg/l, 600 mg/l und 800 mg/l analysiert. Die Endothelzellen der Zelllinie wurden für zwei Stunden inkubiert und anschließend für 22 Stunden in antibiotikafreiem Medium im Brutschrank gelagert. Die Zellen wurden nach einer Gesamtdauer von 24 Stunden zügig für die Durchflusszytometrie aufbereitet und gemessen. Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe von ANOVA mit einem Post-Hoc-t-Test nach Dunnett statistisch analysiert. Das statistische Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$. Die Versuche wurden an zwei Tagen mit einer Anzahl von jeweils $n = 3$, insgesamt also $n = 6$, durchgeführt. Es ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der beiden Versuchstage, so dass die Daten gepoolt werden konnten.

Azithromycin bewirkte bereits in der geringsten untersuchten Konzentration von 100 mg/l bei der Anzahl der für CD 34 positiv markierten Zellen eine statistisch signifikante Zunahme. Ein Maximum wurde bei 600 mg/l Azithromycin mit 19,23% positiven Zellen im Vergleich zu 2,72% positiven Zellen in der unbehandelten Kontrolle erreicht. Für E-Selektin waren bei der gleichen Konzentration 22,96% der Zellen positiv markiert. Dies entsprach einer Steigerung um das Dreifache der Kontrolle. ICAM-1 hatte die stärkste absolute Ausprägung mit 42,17% positiven Zellen, aber die geringste relative Steigerung im Vergleich zur Kontrolle. VCAM-1 reagierte

auf Azithromycin in einer Konzentration von 600 mg/l mit einer maximalen Steigerung auf 19,48% positiv markierte Zellen. In der unbehandelten Kontrolle waren nur 2,36% der Zellen für dieses Epitop positiv markiert. Die Abnahme aller proinflammatorischen Oberflächenantigene bei 800 mg/l Azithromycin war mit dem in diesem Konzentrationsbereich beginnenden zytotoxischen Effekt des Azalids zu erklären (siehe Abbildung 31 / Tabelle 24).

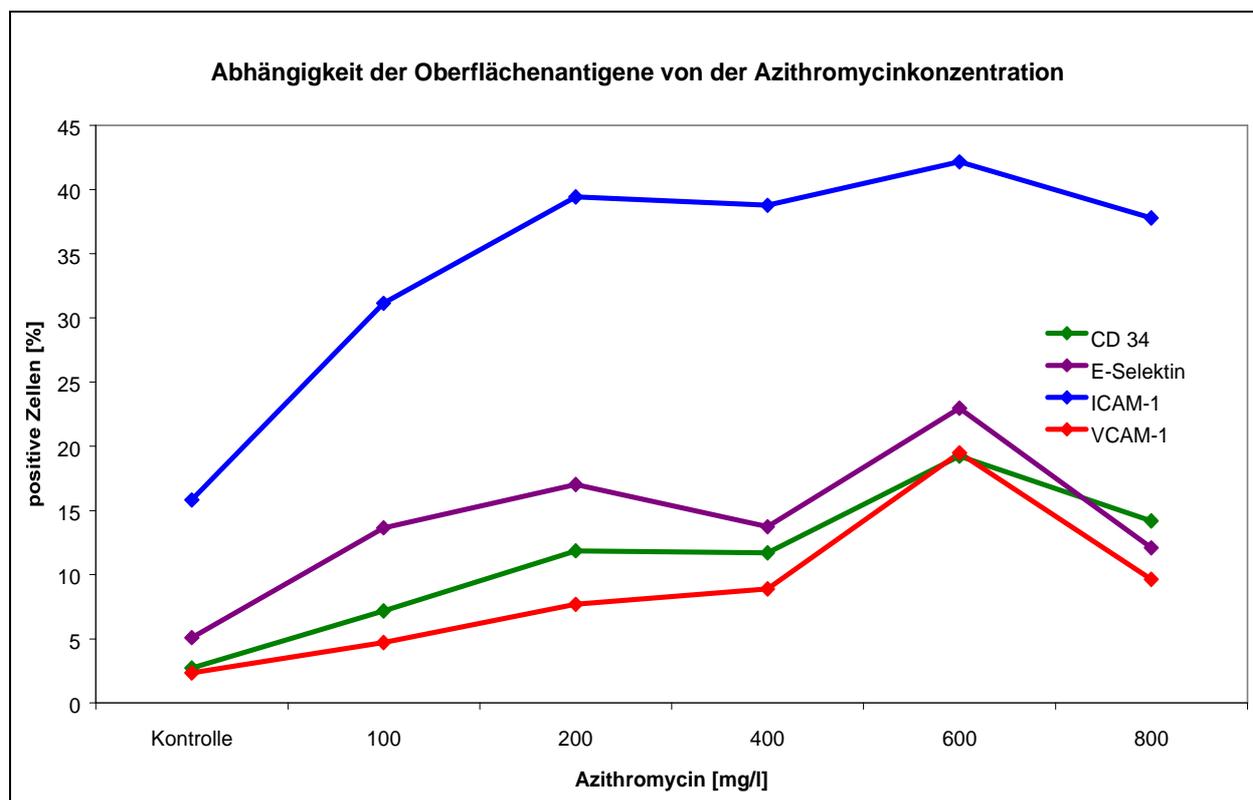


Abbildung 31: Prozentanteil der positiv markierten EA.hy 926 Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach zwei Stunden Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen für Azithromycin und 22 Stunden expositionsfreier Zeit, n = 6 (Zellzahl pro Messung: 10.000).

| <i>EA.hy 926</i> | Azithromycin | | | | | |
|-------------------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | Kontrolle | 100 mg/l | 200 mg/l | 400 mg/l | 600 mg/l | 800 mg/l |
| CD 34 | 2,72 ± | 7,81* ± | 11,85* ± | 11,69* ± | 19,23* ± | 14,19* ± |
| | 1,45 | 1,61 | 5,30 | 2,22 | 5,23 | 5,48 |
| E-Selektin | 5,10 ± | 13,64* ± | 17,02* ± | 13,74* ± | 22,96* ± | 12,09* ± |
| | 2,67 | 3,17 | 3,56 | 1,15 | 3,39 | 3,76 |
| ICAM-1 | 15,81 ± | 31,13* ± | 39,43* ± | 38,78* ± | 42,17* ± | 37,80* ± |
| | 4,69 | 4,75 | 6,68 | 5,14 | 10,12 | 3,98 |
| VCAM-1 | 2,36 ± | 4,71 ± | 7,68* ± | 8,89* ± | 19,48* ± | 9,63* ± |
| | 1,52 | 1,16 | 4,16 | 1,73 | 3,81 | 3,86 |

Tabelle 24: Prozentanteil der positiv markierten *EA.hy 926* Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach zwei Stunden Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen für Azithromycin und 22 Stunden expositionsfreier Zeit (Mittelwert ± Standardabweichung; Angaben in %). Statistisches Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$, behandelte Probe gegen unbehandelte Kontrolle, $n = 6$ (Zellzahl pro Messung: 10.000).

Die durchflusszytometrischen Experimente wurden mit den HUVECs bei einer Konzentration von 400 mg/l Azithromycin wiederholt. Bei dieser Konzentration des Azalids konnte bei keinem der untersuchten Oberflächenantigene CD 34, E-Selektin, ICAM-1 oder VCAM-1 eine statistisch signifikante Steigerung der Anzahl der positiv markierten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des t-Tests für unverbundene Stichproben bei einem statistischen Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. Die Versuche wurden an zwei Tagen mit einer Anzahl von jeweils $n = 3$ (insgesamt $n = 6$) durchgeführt. Es ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der beiden Versuchstage, so dass die Daten gepoolt werden konnten. (siehe Tabelle 25).

| <i>HUVEC</i> | Azithromycin | |
|-------------------|--------------|-------------|
| | Kontrolle | 400 mg/l |
| CD 34 | 1,57 ± 0,22 | 3,83 ± 1,78 |
| E-Selektin | 1,07 ± 0,15 | 3,17 ± 1,58 |
| ICAM-1 | 7,30 ± 0,67 | 7,66 ± 2,14 |
| VCAM-1 | 1,07 ± 0,11 | 1,75 ± 0,86 |

Tabelle 25: Prozentanteil der positiv markierten HUVEC Endothelzellen für CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach zwei Stunden Inkubation mit 400 mg/l Azithromycin und 22 Stunden expositionsfreier Zeit (Mittelwert ± Standardabweichung; Angaben in %). Statistisches Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$, behandelte Probe gegen unbehandelte Kontrolle, $n = 6$ (Zellzahl pro Messung: 10.000).

3.4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der Makrolid-Antibiotika

Alle drei untersuchten Antibiotika Erythromycin, Clarithromycin und Azithromycin riefen bei den Endothelzellen sowohl der EA.hy 926 Zelllinie als auch der Primärkultur HUVEC ähnliche Reaktionen hervor. Die proinflammatorischen Oberflächenantigene reagierten in unterschiedlicher Weise. ICAM-1 war stets das Epitop, welches die stärkste absolute Ausprägung hatte, jedoch in der Steigerung mit dem Reiz des Antibiotikums die geringste relative Zunahme im Vergleich zur Kontrolle zeigte. Die stärksten relativen Reaktionen zeigten sich auf in etwa gleichem Niveau bei CD 34 und VCAM-1. Beide zeigten Zunahmen um bis zu 300% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Azithromycin war die Substanz, welche die stärkste Reaktion auf den Endothelzellen der Zelllinie induzierte. Auf den HUVECs konnten mit ihr jedoch keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden. Aufgrund der Zytotoxizität der Substanz konnten nur Konzentrationen bis 800 mg/l untersucht werden (siehe 3.3.2). Clarithromycin und Erythromycin zeigten gleichstarke Effekte auf die Oberflächenantigene auf den Zellen, jedoch bei deutlich unterschiedlichen Konzentrationen. Clarithromycin war die zytotoxischste Substanz von den drei untersuchten Antibiotika, Erythromycin zeigte erst bei höheren Konzentrationen zytotoxische Effekte. Bei einer Konzentration von 800 mg/l von Erythromycin konnte die maximale Ausprägung der analysierten Antigene nachgewiesen werden. Bei dieser Konzentration von Clarithromycin waren bereits alle Zellen abgestorben. Die Zunahme der Epitope war bei unterschiedlichen Konzentrationen trotzdem auf dem gleichen Niveau. Die HUVECs zeigten bei den untersuchten Konzentrationen sowohl bei Clarithromycin als auch bei Erythromycin signifikante Zunahmen der Oberflächenantigene. Die Rangfolge in der Stärke der relativen Zunahme der Epitope im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war gleich zur Endothelzelllinie. Die absolute Reaktion war jedoch sehr viel niedriger ausgeprägt als bei den EA.hy 926 Zellen.

4. Diskussion

Die intravenöse Infusion von Antibiotikallösungen kann mit einem Risiko für die Entwicklung einer infusionsbedingten Phlebitis behaftet sein (Stahlmann und Lode, 1999, Kilic et al., 2006). In der Klinik werden für diverse Indikationen die Makrolide Erythromycin und Clarithromycin, das Azalid Azithromycin und bei speziellen Indikationen auch das Streptogramin Quinupristin/Dalfopristin in Form von Infusionszubereitungen appliziert. Das Risiko für die Entwicklung einer Phlebitis ist für die Gruppe der Makrolide gut beschrieben, es gibt jedoch nur wenig Informationen über mögliche Unterschiede zwischen den Substanzen hinsichtlich ihrer proinflammatorischen Wirkung. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die Antibiotika *in vitro* vergleichend untersucht. Quinupristin/Dalfopristin ist ebenfalls mit einem hohen Risiko für eine infusionsbedingte Phlebitis behaftet (Stahlmann und Lode, 1996, Rubinstein et al., 1999).

Die Arbeit beschäftigte sich speziell mit den Reaktionen von Endothelzellen am Infusionsort der Antibiotika. Endothelzellen haben *in vivo* verschiedenste Aufgaben (Bachetti und Morbidelli, 2000). Wichtig für die hier diskutierten Arzneimittel-Nebenwirkungen sind die natürlichen Reaktionen des Endothels auf ein schädigendes Agens. Dies ist zum einen die proinflammatorische Wirkung durch die vermehrte Präsentation von proinflammatorischen Oberflächenantigenen und der dadurch vermehrten Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutstrom (Thornhill et al., 1993). Zum anderen bewirken die Endothelzellen, wenn sie mit proinflammatorischen Stimuli in Kontakt kommen, eine Blutgerinnung mit Thrombusbildung durch eine Aktivierung der Gerinnungskaskade über die Thrombozyten und die Gerinnungsfaktoren im Blutplasma (Becker et al., 2000). Das bedeutet, dass die Endothelzellen auf eine Schädigung mit einer akuten Entzündung, der Phlebitis, und einer Aktivierung der Gerinnungskaskade, gekennzeichnet durch Vasokonstriktion, Thrombozytenaktivierung und Thrombinbildung, reagieren. Dies führt dann zum Vollbild einer Thrombophlebitis, welche histologisch nachgewiesen werden kann (Woodhouse, 1980, Subrahmanyam, 1983). Auch die Apoptose, der programmierte, kontrollierte Zelltod, kann zu einer Aktivierung von Thrombozyten führen, wie Bombeli und Mitarbeitern (1999) zeigen konnten. Damit gibt es folglich verschiedene Wege, über die bei einer Inflammation der Venenwand eine Thrombophlebitis entstehen kann.

Durch die Kultivierung der Endothelzellen in einem *in vitro* System ohne den Einfluss von anderen Zelltypen, wie Leukozyten, oder Zytokinen kann man die endothelspezifischen Reaktionen

auf die Schädigung mit einem Antibiotikum untersuchen. Jedoch ist zu beachten, dass die Kultivierung einer Zellart zum Verlust ihrer spezifischen Eigenschaften führen kann (Bachetti und Morbidelli, 2000, Lacorre et al., 2004). Weiterhin ist die gesamte Inflammations- und Gerinnungskaskade ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Einflüssen, die in einem *in vitro* System nicht nachgebildet werden können (Levi und van der Poll, 2005). Deshalb ist die Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation auch nur bedingt möglich.

Es wurden zwei unterschiedliche Arten von humanen Endothelzellen verwendet. Zum einen wurde die Endothelzelllinie EA.hy 926 ausgewählt. Für die Verwendung einer Zelllinie für *in vitro* Studien spricht, dass die Zellen auf eine vorhersehbare Art wachsen und zudem über viele Jahre hinweg stabil, d. h. ohne Verlust von zelltypspezifischen Eigenschaften, passagiert werden können. Sie werden häufig verwendet um den zeit- und kostenintensiven Prozess der Gewinnung und Kultivierung von Primärkulturen zu umgehen und um Experimente an einem stabilen Modell durchzuführen (Bouis et al., 2001).

Des Weiteren wurden in der Arbeit HUVECs verwendet. Für Endothelzellen sind die HUVECs eine Standardprimärkultur, deren Gewinnung und Kultivierung in zahlreichen Arbeiten gut beschrieben ist (Übersicht: Marin et al., 2001). Als Primärkultur haben diese Zellen jedoch nur eine sehr begrenzte Lebensdauer von maximal zehn Passagen. In der Arbeit von Taylor und Mitarbeitern (1994) wird beschrieben, dass HUVECs in Passagen vier bis sechs zu verstärkter spontaner Verletzung mit nachfolgendem Absterben neigen im Gegensatz zu HUVECs der Passage eins. Aufgrund der langen Kulturdauer verlieren sie ihre charakteristischen endothelialen Eigenschaften und man kann sie nicht mehr als ein *in vitro* Modell für die Reaktion von Endothelzellen auf proinflammatorische Reize verwenden. Ein Problem der HUVECs ist die Herkunft aus immunprivilegiertem Gewebe, der Nabelschnurvene. Um diesem Problem nachzugehen haben Klein und Mitarbeiter (1994) die Primärkultur der HUVECs mit Endothelzellen aus der Vena saphena vom Menschen verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktionen zwischen den beiden Endothelzellarten vergleichbar waren. Somit sind die HUVECs ein relevantes Modell für die Untersuchung von Adhäsionsmolekülen.

Wenn man von den Reaktionen einer Zelllinie auf die Reaktionen einer Primärkultur schließen will, ist es wichtig, dass die beiden humanen Endothelzellarten in ihren Eigenschaften und Reaktionen auf bestimmte Reize vergleichbar sind (L'Azou et al., 2005). In einer Arbeit von Lidington und Mitarbeitern (1999) wurde die Ausprägung von verschiedenen proinflammatorischen Oberflächenantigenen auf HUVEC und auf EA.hy 926 Endothelzellen untersucht und verglichen. Dies geschah sowohl mit unbehandelten Kontrollen als auch nach vorheriger Stimulation mit TNF- α . Sie zeigten, dass sowohl auf den HUVECs als auch auf der Zelllinie EA.hy 926

ICAM-1 konstitutiv vorhanden war. Die Anzahl der positiv markierten Zellen war mit 20% vergleichbar zu den in dieser Arbeit verwendeten EA.hy 926 Zellen. Auch die Reaktion auf die Stimulation mit TNF- α war vergleichbar mit einem starken Anstieg von ICAM-1 positiven Zellen aber keiner Reaktion der anderen Epitope. Die von Lidington beschriebenen HUVECs zeigten jedoch eine deutlich stärkere konstitutive Ausprägung von ICAM-1 als die in dieser Arbeit verwendeten primären Zellen.

Mutin und Mitarbeitern (1997) untersuchten ebenfalls verschiedene Oberflächenantigene, darunter auch die proinflammatorischen Epitope, auf HUVECs und EA.hy 926 Endothelzellen. Die Ergebnisse für die unbehandelten Kontrollen dieser Primärkultur sind qualitativ vergleichbar mit den HUVECs in dieser Arbeit. ICAM-1 ist das Epitop, das am stärksten markiert wird. CD 34 wird in beiden Arbeiten gering konstitutiv auf den Primärzellen nachgewiesen. Die anderen Oberflächenantigene sind nicht konstitutiv nachweisbar. Die Ergebnisse für die Zelllinie stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, da auch hier, wie bei Lidington, die HUVECs eine stärkere Ausprägung für ICAM-1 in der unbehandelten Kontrolle als die Zellen der EA.hy 926 Zelllinie zeigten. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten war jedoch verschieden, da hier die Antikörper pro Zelle und nicht die Anzahl von positiv markierten Zellen an einer Gesamtzahl von analysierten Zellen gemessen wurde. Deshalb ist eine Vergleichbarkeit der Daten nur qualitativ möglich.

Es ist eine Heterogenität im genauen Phänotyp und der endothelialen Funktion bei Endothelzellen bekannt (Page et al., 1992). Diese ist abhängig vom Ursprungsort der Zellen im Organismus (Hickey et al., 1999, Muller et al., 2002). Ein weiterer Faktor, der den Phänotyp der Zellen mitbestimmt, ist die Größe des Gefäßes, aus der die Zellen stammen (Lang et al., 2001). Einer der wichtigsten Unterschiede ist jedoch die Reaktion auf die Stimulierung einer Inflammation durch Zytokine. In verschiedenen Arbeiten von Murakami und Mitarbeitern (2001) und McDouall und Mitarbeitern (2001) wurde gezeigt, dass primäre Endothelzellen aus der Haut oder dem Herzen auf die Stimulierung mit Zytokinen signifikant anders reagieren als HUVECs. Dies zeigt die spezialisierte Rolle von Endothelzellen in ihrem jeweiligen Organ. Wie in der Arbeit von de Bono und Green (1984) gezeigt werden konnte, haben außerdem die Dichte der Zellkultur und die Zeitdauer seit dem Erreichen der Konfluenz einen Einfluss auf die proinflammatorischen Reaktionen der Endothelzellkultur. Mit steigender Dichte und längerer Zeitdauer seit der Konfluenz nimmt die Leukozytenadhäsion an den Endothelzellen ab. In dieser Arbeit wurden HUVECs als Primärkultur verwendet, da sie nach den bisher publizierten Arbeiten die größten Vergleichsmöglichkeiten haben. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurden alle Experimente mit Zellen der gleichen Passage und nach gleicher Zeitdauer nach der letzten Passagierung durchgeführt.

In allen Experimenten und in der Kultivierung der Zellen wurde versucht, den möglichen Einfluss von weiteren Substanzen, abgesehen von den untersuchten Antibiotika selbst, zu minimieren. Deshalb wurde die Supplementierung des Zellkulturmediums mit Streptomycin und Penicillin unterlassen, damit die Zellen keine Vorstimulierung oder sonstige Beeinflussung durch Antimykotika oder Antibiotika erhielten (Garcia-Trapero et al., 2004).

Um eine Einschätzung der Wirkung der in dieser Arbeit untersuchten Antibiotika Erythromycin, Clarithromycin und Azithromycin zu erhalten und einen direkten Vergleich zwischen ihnen zu ermöglichen, wurde zunächst das zytotoxische Potenzial der Antibiotika in einem *in vitro* System bestimmt.

Für diese Fragestellung gibt es verschiedene Ansätze, um solche Aussagen treffen zu können. Es gibt den Ansatz der Beurteilung von morphologischen Veränderungen an behandelten Zellen. Diese morphologischen Veränderungen, wie z. B. das Abschnüren von Membranvesikeln von der geschädigten Zelloberfläche, werden als ein Anzeichen für die Zellschädigung gewertet (Liepins, 1989). Ein weiteres Herangehen an die Bestimmung von Zytotoxizitäten ist der in der Arbeit von Mosmann (1983) zuerst beschriebene kolorimetrische Test mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT oder Thiazolylblau). In der Erstbeschreibung dieses *in vitro* Testsystems wurde die Zytotoxizität von verschiedenen Substanzen auf BALB/C 3T3-Fibroblasten untersucht. Ein anderer Ansatz ist die Bestimmung von intrazellulärem Adenosin-5-triphosphat (ATP) und Adenosin-5-diphosphat (ADP). Vorbach und Mitarbeiter (2002) bestimmten diese beiden Energiespeicherformen der Zelle mit Hilfe der „high-performance liquid chromatography“ (HPLC) nach Inkubation mit zytotoxischen Substanzen. Mit Hilfe dieser Aussagen über die Energieproduktion der Endothelzellen konnte eine Aussage über den Metabolismus der Zellen getroffen werden. Die ATP-Erschöpfung ist ab einem bestimmten Punkt irreversibel und führt über eine Schwellung der Zellen mit Ruptur der Zellorganellen und der Plasmamembran zum nicht-apoptischen Zelltod durch Nekrose (Tatsumi et al., 2003).

Azithromycin wurde im MTT-Zytotoxizitätstest in einem Konzentrationsbereich von 0,5 mg/l bis 200 mg/l über einen Zeitraum von zehn Tagen untersucht. Dabei waren die zytotoxischen Effekte zwischen den beiden untersuchten Zelltypen, den 3T3-Fibroblasten und den EA.hy 926 Endothelzellen, unterschiedlich. Beide Zellarten wurden mit den gleichen Konzentrationen untersucht und bei den Endothelzellen zeigte sich bereits ab einer Konzentration von 50 mg/l ein zytotoxischer Effekt, während die Fibroblasten erst ab einer Konzentration von 75 mg/l eine Abnahme der Zellzahlen zeigten. In der Analyse der Zytotoxizität der Reinsubstanz zeigte sich für Azithromycin ein Effekt ab einer Konzentration von 10 mg/l. Der Unterschied zwischen der

Zytotoxizität der Reinsubstanz und der gebrauchsfertigen Infusionslösung mit ihren Zusatzstoffen ist durch den Methanoleinfluss bei der Reinsubstanz zu erklären. Bei einem Volumenanteil von 2% Methanol, wie er zur Lösung der Reinsubstanzen verwendet wurde, konnte in Vorversuchen nachgewiesen werden, dass die optische Dichte um ein Viertel abnahm. Dieser Einfluss begründet die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen der Reinsubstanz und der intravenösen Formulierung.

Eine Studie von Luke und Mitarbeitern (1996) zeigte an 24 Probanden, dass die lokale Verträglichkeit von Azithromycin in Einzeldosen bis zu einem Gramm in Form von einer Infusionslösung von 2 mg/ml gut war. Bei höheren Konzentrationen (4 mg/ml und 5 mg/ml) kam es dagegen zu häufigeren und schweren lokalen Entzündungsreaktionen.

Vorbach und Mitarbeiter (2002) untersuchten in einem *in vitro* System den Effekt von Azithromycin auf die intrazelluläre ATP-Menge, um daraus eine Aussage über den Zustand des Zellmetabolismus treffen zu können. Es wurden HUVECs mit 2 mg/ml, 1 mg/ml (die Konzentration der kommerziell erhältlichen Substanzzubereitung) und 0,5 mg/ml Azithromycin für 20 bzw. 60 Minuten inkubiert. Es zeigte sich nur bei der höchsten analysierten Konzentration nach 60 Minuten eine signifikante Abnahme der intrazellulären ATP-, ADP- und GTP-Konzentration.

Clarithromycin wurde von 0,5 mg/l bis zu einer Konzentration von 200 mg/l auf seine zytotoxischen Effekte untersucht. In beiden untersuchten Zellarten konnte mit der Infusionssubstanz ab einer Konzentration von 50 mg/l eine beginnende Zytotoxizität ermittelt werden. Clarithromycin konnte als Reinsubstanz nicht untersucht werden, weil es sich auch in höheren Methanolkonzentrationen nicht lösen ließ. Wie bereits in der Arbeit von Nakagawa und Mitarbeitern (1992) gezeigt wurde, ist Clarithromycin deutlich weniger löslich als Erythromycin. In sterilem Wasser ließ es sich bei Zimmertemperatur nicht ausreichend lösen.

Weitere Erfahrungen mit *in vitro* Systemen stehen in Übereinstimmung mit dem in dieser Arbeit ermittelten relativ hohen zytotoxischen Potenzial von Clarithromycin. Von Vorbach und Mitarbeitern (1998) wurde die Zytotoxizität von Clarithromycin in einem *in vitro* Modell getestet. Die HUVECs wurden für 20 bzw. 60 Minuten mit der Konzentration der kommerziell erhältlichen Infusionslösung von 2 mg/ml und niedrigeren Konzentrationen von 1 mg/ml und 0,5 mg/ml inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe der HPLC die Menge an ATP, ADP, GTP und GDP bestimmt, um eine Beeinträchtigung des zellulären Stoffwechsels nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass es mit der höchsten Konzentration bereits nach 20 Minuten zu einem signifikanten Abfall des ATP in der Zelle kam. Nach 60 Minuten war dieser Effekt noch sehr viel deutlicher ausgeprägt. GTP und GDP fielen erst nach 60 Minuten signifikant ab. Eine Konzentration von

1 mg/ml führte nur nach 60 Minuten zu einem Abfall des intrazellulären ATP. 0,5 mg/ml Clarithromycin führten nicht zu Veränderungen des ATP-Gehalts in der Zelle.

In der Arbeit von Guay und Mitarbeitern (1993) wurde die Reaktion von Ohrvenen von Kaninchen nach der intravenösen Applikation von Clarithromycin untersucht. Es wurden Konzentrationen von 7,5 mg/ml, 15 mg/ml und 30 mg/ml Clarithromycin über 25 bis 35 Minuten infundiert. Die Venen wurden nach 22 bis 23 Stunden präpariert und histologisch untersucht. Es konnte eine milde, dosisabhängige Irritation des Endothels nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde weiterhin noch das zytotoxische Potenzial von Erythromycin untersucht. Dieses Makrolid zeigte auf beiden untersuchten Zellarten im Vergleich zu Clarithromycin oder Azithromycin erst bei deutlich höheren Konzentrationen zytotoxische Effekte. Sowohl bei der EA.hy 926 Endothelzelllinie als auch bei den 3T3-Fibroblasten konnte erst ab einer Konzentration von 250 mg/l Erythromycin eine Abnahme der Zellzahl festgestellt werden. Das zytotoxische Potenzial der Reinsubstanz war, unter Berücksichtigung des Einflusses des Methanols, mit einer beginnenden Abnahme der Zellzahl bei einer Konzentration von 200 mg/l mit der Zytotoxizität der gebrauchsfertigen Infusionssubstanz vergleichbar. Die Zytotoxizität von Erythromycin ist in einigen weiteren Publikationen beschrieben worden.

In einer Studie wurde das zytotoxische Potenzial von Erythromycin mit verschiedenen anderen Antibiotika in einem Neutral-Rot-Test und einem Kristallviolett-Test untersucht (Kruse et al., 2006). Dabei zeigte sich in der Neutral-Rot-Färbung nach einer 24stündigen Inkubation eine NOEC von 200 mg/l für 3T3-Fibroblasten und 500 mg/l für EA.hy 926 Endothelzellen. Die EC_{50} lag bei 340 mg/l (3T3-Fibroblasten) bzw. bei 880 mg/l (EA.hy 926 Endothelzellen). Die Färbung mit Kristallviolett zeigte analoge Ergebnisse. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit, wobei die Unterschiede in den ermittelten Konzentrationen mit den unterschiedlichen Inkubationszeiten (24 Stunden bzw. 10 Tage) und unterschiedlichen Färbungen (Neutral-Rot und Kristallviolett bzw. MTT) zu erklären sind.

Vorbach und Mitarbeiter (2002) beobachteten einen Abfall von intrazellulärem Adenosin-5-triphosphat und Adenosin-5-diphosphat bei Zellen einer HUVEC Primärkultur. Dieser Abfall kann zum Zelltod führen (Pearson und Gordon, 1985). Nach einer 60minütigen Behandlung mit einer Konzentration von 1000 mg/l konnte ein Abfall bemerkt werden.

Lanbeck und Mitarbeiter (2002) führten eine große klinische Studie zur Analyse des Risikos einer Phlebitis bei verschiedenen Antibiotika durch. In dieser Studie wurden 550 Patienten mit unterschiedlichen Antibiotika behandelt und nach einem festgelegten Bewertungssystem die Häufigkeit und Schwere der lokalen Nebenwirkungen bestimmt. Erythromycin und Dicloxacillin verursachten am häufigsten eine Phlebitis (odds ratio 5,33).

In einer weiteren klinischen Studie wurde von de Dios Garcia-Diaz und Mitarbeitern (2001) die Inzidenz von Phlebitiden nach der Infusion von Erythromycin und Clarithromycin verglichen. Für Erythromycin betrug sie 79,9% bei 19 untersuchten Patienten und für Clarithromycin 76% bei 25 untersuchten Patienten.

In der Zytotoxizitätsanalyse in dieser Arbeit konnte eine Rangfolge bezüglich der Zytotoxizität auf Endothelzellen von Clarithromycin > Azithromycin > Erythromycin bestimmt werden. Viluksela und Mitarbeiter (1996) haben die zytotoxischen Wirkungen dieser drei Antibiotika auf Hepatozyten im MTT-Zytotoxizitätstest untersucht. Dabei konnte eine analoge Rangfolge der Zytotoxizitäten der Substanzen gefunden werden.

In einer klinischen Studie von Zimmermann und Mitarbeitern (2001) wurde das Risikopotenzial für die Entwicklung einer infusionsbedingten Phlebitis bei den Makroliden Erythromycin, Clarithromycin und dem Azalid Azithromycin direkt verglichen. Die häufigste Reaktion auf die Antibiotika war die Ausbildung eines „Irritationssyndroms“. Erythromycin (sieben von zwölf Probanden) und Azithromycin (acht von zwölf Probanden) waren hierbei am häufigsten vertreten. Weitere beobachtete Symptome waren eine Inflammation und Schmerzen an der Infusionsstelle. Das Vollbild einer Phlebitis entwickelte sich nur unter der Einwirkung von Clarithromycin bei sechs von zwölf Probanden. Schmerzen an der Infusionsstelle wurden bei Clarithromycin bei 100% der Probanden, bei Azithromycin bei 58% der Probanden und bei Erythromycin bei 25% der Probanden angegeben.

In dieser Dissertation wurde die Untersuchung der Zytotoxizität von Makroliden mit Hilfe eines modifizierten MTT-Zytotoxizitätstest durchgeführt (Hansen et al., 1989). Dieser Test ist gut standardisiert und zeichnet sich durch seine Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit aus. Aus diesen Gründen wird er sehr häufig für routinetoxikologische Analysen verwendet.

Die in dieser Arbeit verwendeten BALB/C 3T3-Fibroblasten wurden für die MTT-Zytotoxizitätsanalyse ausgewählt, da sie als Standardzelllinie für diese Art von *in vitro* Testung etabliert sind (Borenfreund und Puerner, 1985). Damit war auch die Vergleichbarkeit mit Ergebnissen anderer Arbeiten möglich. Allerdings lässt der MTT-Zytotoxizitätstest nur eine quantitative Aussage über einen Endpunkt, nämlich die Vitalität der Zellen, zu. Es ist nicht möglich mit diesem Test eine genaue Charakterisierung der Reaktion der Zellen zu erhalten.

Um zu überprüfen, ob die Substanzen nicht nur auf die BALB/C 3T3-Fibroblasten, sondern auch auf andere Zellarten im gleichen Konzentrationsbereich zytotoxisch wirken, wurde das Protokoll modifiziert und an EA.hy 926 Endothelzellen adaptiert. Damit konnte das zytotoxische Potential auf einem, für die Fragestellung relevanteren, Zelltyp untersucht werden.

Das Routine-Protokoll für den verwendeten MTT-Zytotoxizitätstest sieht den Einsatz von den 3T3-Fibroblasten vor. In dieser Arbeit wurden zusätzlich EA.hy 926 Endothelzellen verwendet. Die beiden Zellarten unterscheiden sich in einigen Punkten. Die 3T3-Fibroblasten haben eine höhere Zellteilungsrate als die Endothelzellen. Weiterhin benötigen beide Zelltypen unterschiedliche Medien, die einen unterschiedlichen Einfluss auf die optische Dichte der gemessenen MTT-Suspension haben können. Die EA.hy 926 Endothelzellen haben einen geringeren Stoffwechsel als die Fibroblasten, so dass nach gleicher Inkubationszeit mit der MTT-Lösung am Ende des Experiments der Umsatz des MTT in das farbige Salz bei den Endothelzellen geringer ist. Daher ist die optische Dichte nach gleicher Inkubationszeit von drei Stunden zwischen den beiden Zellarten unterschiedlich. Ziel der Adaption war es, die optische Dichte am Ende des 10-Tageprotokolls zwischen den unbehandelten Kontrollen der Fibroblasten und der Endothelzellen vergleichbar zu machen. Dazu musste eine optimale Einsaatdichte an Endothelzellen gefunden werden, um einen vergleichbaren Umsatz an MTT in drei Stunden zu erreichen. Dies gelang nicht, da ab einer anfangs eingesäten Zellzahl von 8000 – 16000 Endothelzellen pro Well der Umsatz von MTT und damit schlussendlich die optische Dichte nicht mehr gesteigert werden konnte. Eine Erklärung dafür ist, dass die Endothelzellen ab 8000 Zellen pro Well nach zehn Tagen konfluent gewachsen sind. Da Endothelzellen, wie in der Arbeit von de Bono und Green (1983) beschrieben, in *in vitro* Systemen nur als ein Monolayer wachsen, konnte auch bei höheren Einsaatkonzentrationen keine höhere Endzellzahl nach zehn Tagen im Well erreicht werden. Dass die optische Dichte auch bei einer maximal möglichen Anzahl an vitalen Endothelzellen noch niedriger lag als bei den Fibroblasten, liegt vermutlich am geringer aktiven Stoffwechsel der Endothelien. Die Zellen verstoffwechseln das MTT langsamer zum farbigen Salz, so dass bei gleicher MTT-Inkubationszeit die resultierende optische Dichte geringer ausfällt.

Da in diesen Experimenten die optische Dichte nur eine Beschreibung eines zytotoxischen Effektes der untersuchten Antibiotika ist, war es wichtiger, ob die Abnahme der Endothelzellzahlen durch die Zytotoxizität zu einem nachweisbaren Abfall des MTT-Umsatzes in den Mitochondrien der Zellen führten. Da dies in der gewählten Adaption des MTT-Zytotoxizitätsprotokolls der Fall war, konnte somit ein Vergleich der Zytotoxizitäten der einzelnen Substanzen zwischen den beiden untersuchten Zellarten, den Endothelzellen und den Fibroblasten, getroffen werden.

Da im MTT-Zytotoxizitätstest sowohl die Fibroblasten als auch die Endothelzellen zu Anfang nur mit den fertigen, im Handel erhältlichen Antibiotikallösungen behandelt wurden, konnte ein Einfluss durch weitere Zusatzstoffe, die in der Infusionsformulierung des Wirkstoffes enthalten waren, nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurde der MTT-Zytotoxizitätstest mit den 3T3-Fibroblasten und den Reinsubstanzen von Erythromycin und Azithromycin wiederholt.

Ein Problem war die geringe Löslichkeit der Reinsubstanzen im Zellkulturmedium. Während die gebrauchsfertigen Infusionslösungen gut mit dem Medium gemischt werden konnten, konnten die Reinsubstanzen nicht in Lösung gebracht werden. Es wurden eine Erwärmung des Mediums und eine Ultraschallbehandlung zur Verbesserung der Löslichkeit versucht, was aber beides nicht den gewünschten Erfolg brachte. Deshalb wurde als Lösungsvermittler warmes Methanol verwendet. Im Methanol lösten sich beide Reinsubstanzen und konnten dann zum Medium hinzugegeben werden, ohne dass sie wieder ausfielen. Da aber die Zytotoxizitätstests mit den Reinsubstanzen durchgeführt wurden, um den Einfluss von allen anderen Substanzen als dem reinen Antibiotikum auszuschließen, musste der zytotoxische Effekt von Methanol alleine getestet werden. Es wurde sowohl eine Zytoxizitätsanalyse einer Reihe von Methanolvolumenanteilen als auch bei allen Experimenten mit Methanolbeteiligung eine Vehikelkontrolle analysiert. Diese Experimente zeigten, dass Methanol einen Effekt auf die Zellen hatte, so dass bei dem verwendeten Volumenanteil von 2% die optische Dichte, und daraus rückgeschlossen die Zellzahl, ungefähr um ein Viertel geringer war. Diese Ergebnisse mussten im Vergleich der Zytotoxizitäten der Infusionssubstanz und der Reinsubstanzen unbedingt berücksichtigt werden.

Die Konzentrationen der gebrauchsfertigen untersuchten Infusionslösungen der Antibiotika waren bei Erythromycin 5000 mg/l, bei Clarithromycin ungefähr 2000 mg/l und bei Azithromycin 1000 mg/l. Diese Konzentrationen sind jedoch zu hoch, um sie in einem MTT-Zytotoxizitätstest mit einem 10-Tagesprotokoll zu untersuchen. Deshalb wurde in Konzentrationsfindungsversuchen in großen Konzentrationsschritten für alle Antibiotika der zytotoxische Bereich eingegrenzt. Daraus resultierten die unterschiedlichen Konzentrationsbereiche von 0,5 – 200 mg/l bei Azithromycin und Clarithromycin bzw. 50 – 400 mg/l bei Erythromycin.

Die zu erwartenden Plasmakonzentrationen der untersuchten Antibiotika liegen deutlich unter der geringsten hier untersuchten Konzentration. Deshalb ist es wichtig darauf hinzuweisen, dass die Ergebnisse nur eine Aussage über die lokale und nicht über die systemische Toxizität zulassen.

Die Bestimmung der Zytotoxizität von Substanzen in einem *in vitro* System wie dem MTT-Zytotoxizitätstest erfasst nur den Endpunkt des tatsächlichen Zelltodes. Es lässt keine Aussagen über die Reaktionen der Zellen auf das schädigende Agens, Veränderungen des Zellmetabolismus oder Interaktionen mit anderen Zelltypen zu. Über die Einbeziehung von biokinetischen und toxikodynamischen Modellen wäre eine bessere Simulation der *in vivo* Situation möglich (Blaauboer, 2003). Eine genaue Abbildung der *in vivo* Situation in einem *in vitro* System erscheint zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich.

Die MTT-Zytotoxizitätsanalyse zeigt nur unspezifisch die zytotoxische Wirkung der untersuchten Substanz und das Absterben von Zellen an. Um eine genauere Aussage über die spezifischen Reaktionen von Zellen auf ein schädigendes Agens treffen zu können, muss man genauere Methoden anwenden. In dieser Arbeit wurde die Reaktion von Endothelzellen auf Antibiotika und die proinflammatorischen Mechanismen untersucht.

Obwohl in vielen klinischen Studien die infusionsbedingte Phlebitis häufig beobachtet wird, ist die zu Grunde liegende Pathogenese nicht vollständig geklärt und verstanden. Es werden sehr viele Faktoren angeführt, die ein erhöhtes Risiko für diese Phlebitis verursachen. Dazu zählen die Osmolarität und der pH-Wert der infundierten Lösung, patientenbezogene Faktoren wie Alter, Geschlecht, Art der Vene, die Konzentration des Hämoglobins und als einer der wichtigsten Faktoren das infundierte Medikament (Monreal et al., 1999, Kilic et al., 2006). Dies kann im schlimmsten Fall zum Vollbild einer infusionsbedingten Thrombophlebitis führen.

An der Entstehung der Phlebitis spielen neben den Endothelzellen auch noch Leukozyten und Thrombozyten sowie diverse Oberflächenantigene auf diesen Zellen eine Rolle. Solch eine Inflammation der Venenwand geht mit einer Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutstrom zum Ort der Entzündung und einer Migration durch die Gefäßwand einher. Dies ist ein aktiver Prozess, an dem sowohl die migrierenden Leukozyten als auch die Endothelzellen, die den Kontakt herstellen und die Migration der Leukozyten in das tiefer liegende Gewebe kontrollieren, teilhaben. Für die Transmigration gibt es zwei mögliche Wege, zum einen den parazellulären Weg zwischen den Endothelzellen hindurch, und den transzellulären Weg, mittels Endozytose, direkt durch die Endothelzelle hindurch (Engelhardt und Wolburg, 2004). An der Rekrutierung sind vor allem Oberflächenantigene beteiligt, die eine proinflammatorische Wirkung haben. Diese Epitope gehören zu drei großen Gruppen: den Selektinen, den Integrinen und den Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie. Wichtige proinflammatorische Oberflächenantigene, welche von Endothelzellen exprimiert werden, sind CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 (Carlos und Harlan, 1994). Für die Beurteilung des Einflusses der Endothelzellen in der Entstehung der Phlebitis ist es sinnvoll, die Reaktion von proinflammatorischen Mechanismen zu untersuchen (Madan et al., 2004).

Zur Beschreibung der Reaktionen dieser Oberflächenepitope gibt es verschiedene geeignete Methoden. Der Immunfluoreszenzassay verwendet primäre Antikörper, die ein spezielles Oberflächenantigen auf den untersuchten Zellen binden. Anschließend wird mit sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörpern der Fc-Teil der primären Antikörper gebunden. Die Analyse erfolgt dann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Diese Methode bietet sich an, wenn man eine bestimmte Subpopulation, charakterisiert durch ein spezifisches Oberflächenepitop, in einem Zell-

gemisch markieren will. Weiterhin kann man mit dieser Methode die genaue Lokalisation des Antigens auf der einzelnen Zelle bestimmen (Stewart et al., 2000).

Eine Weiterentwicklung des Immunofluoreszenzassays ist die Methode der Durchflusszytometrie zur Untersuchung von Oberflächenantigenen. Dieses Verfahren ermöglicht sowohl die quantitative Bestimmung von Oberflächenantigenen und intrazellulären Molekülen als auch eine Charakterisierung der Zelle durch ihre Größe und Granularität. Die Epitope werden von spezifischen Antikörpern, die einen Fluoreszenzfarbstoff gebunden haben, markiert und können im Durchflusszytometer durch hydrodynamische Fokussierung einzeln analysiert werden (Meland, 2001). Diese Methode hat den Vorteil, sehr viele Zellen in kurzer Zeit auf ihr individuelles Oberflächenantigenmuster zu untersuchen.

In der vorliegenden Dissertation wurden die Reaktionen von proinflammatorischen Oberflächenantigenen auf Endothelzellen durch das Streptogramin Quinupristin/Dalfopristin, die Makrolide Erythromycin und Clarithromycin sowie das Azalid Azithromycin mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die untersuchten Epitope waren CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1. Die verwendeten Endothelzellarten waren sowohl die Primärkultur der HUVECs als auch die Endothelzelllinie EA.hy 926.

Quinupristin/Dalfopristin führte, wie auch in den klinischen Studien beschrieben war, zu einer deutlichen Zunahme der proinflammatorischen Epitope auf den markierten Endothelzellen. Die maximalen Reaktionen wurden nach zweistündiger Inkubation mit 600 mg/l Quinupristin/Dalfopristin beobachtet. CD 34 und VCAM-1 stiegen beispielsweise um das 20fache an.

In der Arbeit von Kilic und Mitarbeiter (2006) wurden die Auswirkungen von Quinupristin/Dalfopristin, Erythromycin und Levofloxacin auf die proinflammatorischen Oberflächenantigene untersucht. In dieser Arbeit wurden geringere Konzentrationen und eine deutlich längere Inkubationsdauer von 24 Stunden untersucht. Bei einer Konzentration von 100 mg/l Quinupristin/Dalfopristin zeigte sich eine Zunahme der positiv markierten Zellen für ICAM auf 51,92% und für VCAM-1 auf 3,12%. Mit einer Konzentration von 30 mg/l konnte noch für ICAM-1 eine signifikante Zunahme der Expression beobachtet werden. Für E-Selektin und für CD 34 konnte ebenfalls nur bei der höchsten Konzentration von 100 mg/l eine signifikante Zunahme beobachtet werden. Die untersuchten Konzentrationen waren deutlich geringer als die in dieser Arbeit untersuchten Konzentrationen, jedoch bestanden methodische Unterschiede. Zum Beispiel wurden die Antibiotika nicht in Medium sondern in PBS gelöst und dann für 24 Stunden inkubiert.

Zum Risiko der Entwicklung einer infusionsbedingten Phlebitis nach der Gabe von intravenösem Quinupristin/Dalfopristin sind bereits mehrere klinische Studien veröffentlicht worden.

Chevalier und Mitarbeiter (2001) beschreiben in ihrer Arbeit die hohe Inzidenz von Nebenwirkungen, die die lokale Verträglichkeit bei intravenöser Gabe betreffen. 16 von 20 der mit Quinupristin/Dalfopristin behandelten Probanden hatten eine lokale Gefäßirritation. In einer klinischen Studie von Rehm und Mitarbeitern (2001) wurde die Inzidenz von lokalen Reaktionen nach der intravenösen Applikation von Quinupristin/Dalfopristin bei ambulant behandelten Patienten untersucht. Von 37 Patienten bekamen 16 (43,2%) lokale Nebenwirkungen wie Schmerzen, Ödeme oder eine Phlebitis an der Infusionsstelle. Auch in einer Zusammenfassung von verschiedenen vergleichenden klinischen Studien mit Quinupristin/Dalfopristin von Rubinstein und Mitarbeiter (1999) wird ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer infusionsbedingten Phlebitis beschrieben. Von den 947 mit Quinupristin/Dalfopristin behandelten Patienten entwickelten 711 (75,1%) eine lokale Reaktion an der Infusionsstelle. Als Vergleichsgruppe wurden 949 Patienten, die mit Erythromycin oder Vancomycin behandelt wurden, ausgewählt. In dieser Gruppe lag die Inzidenz für lokale Nebenwirkungen bei 54,6%. Um die hohe Inzidenz von Phlebitiden mit Quinupristin/Dalfopristin zu vermeiden, wird vorgeschlagen, die Konzentration in der Infusionslösung zu verringern oder das Antibiotikum über einen zentralen Venenkatheter zu infundieren.

Aus der Gruppe der Makrolide reagierten die untersuchten Oberflächenantigene unter Azithromycin-Einfluss am stärksten. Die größten Veränderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konnte bei einer Konzentration von 600 mg/l erreicht werden. Die CD 34-positiven Zellen stiegen das Siebenfache an, während die E-Selektin-positiven Zellen auf das Viereinhalbfache anstiegen. Ebenfalls mit einer Steigerung in der Ausprägungsrate reagierte ICAM-1 (42,17% positiv markierte Zellen). Die VCAM-1-positiven Zellen stiegen von 2,36% auf 19,48%.

Erythromycin und Clarithromycin verursachten eine vergleichbare Reaktion der proinflammatorischen Oberflächenantigene. Ein Unterschied zwischen den beiden Makroliden war, dass Clarithromycin das Maximum bereits bei einer Konzentration von 400 mg/l hervorrief. Erythromycin benötigte für die gleiche Reaktion eine Konzentration von 800 mg/l. Dieser Unterschied steht mit den Ergebnissen des MTT-Zytotoxizitätstest in Übereinstimmung. Die Steigerung der positiv markierten Zellen für die einzelnen Epitope blieb jedoch deutlich unter den Maxima der von Azithromycin ausgelösten Reaktionen. E-Selektin und ICAM-1 stiegen auf das Doppelte an. VCAM-1 stieg von 1,47% positiv markierte Zellen auf 6,09%.

Für Erythromycin gibt es eine vergleichbare experimentelle Studie, die das Nebenwirkungspotenzial einer Phlebitis beschreibt (Lanbeck et al., 2004). Nach einer Inkubation mit TNF- α rea-

gierte ICAM-1 sowohl auf den EA.hy 926 Endothelzellen als auch auf den HUVECs mit einem starken Anstieg. E-Selektin reagierte nicht. Weiterhin wurden die Endothelzellen mit verschiedenen Konzentrationen an Erythromycin (maximal 6250 mg/l) für eine Stunde inkubiert. Für die HUVECs zeigte sich eine statistisch signifikante Zunahme von 29,6% der für ICAM-1 positiv markierten Zellen. Bei den EA.hy 926 Endothelzellen konnte eine statistisch nicht signifikante Zunahme um 8,2% beobachtet werden. Bei einem Vergleich der Ergebnisse mit den eigenen Daten muss berücksichtigt werden, dass die Zellen nur für eine Stunde inkubiert wurden, während in dieser Arbeit die Zellen dem Antibiotikum zwei Stunden ausgesetzt waren. Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der TNF- α Inkubation sein.

Um eine Nachbildung der klinischen Situation einer intravenösen Applikation zu erreichen, musste die Durchführung der Experimente daran angepasst werden. Um ein möglichst optimales *in vitro* System zu gestalten, wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Für die untersuchten Antibiotika gibt es unterschiedliche Empfehlungen bezüglich ihrer Infusionsdauer in der jeweiligen Fachinformation. Um den Einfluss der Inkubationsdauer auf die Anzahl der für die proinflammatorischen Oberflächenantigene positiv markierten Zellen zu bestimmen, wurden in Vorversuchen EA.hy 926 Endothelzellen mit Quinupristin/Dalfopristin für 15 Minuten bzw. eine und zwei Stunden inkubiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass mit länger dauernder Inkubationszeit die Steigerung der positiv markierten Zellen stärker zunahm. In der Arbeit von Kilic und Mitarbeitern (2006) wurde der Einfluss von Quinupristin/Dalfopristin auf die gleiche Endothelzelllinie nach einer 24stündigen Inkubationszeit untersucht. Da sich diese Dissertation jedoch auf die Darstellung der klinischen Situation einer Infusion der untersuchten Antibiotika beschränken sollte, wurde hier die Inkubationszeit auf zwei Stunden festgesetzt. Weiterhin sollte das System nicht nur die Infusionsdauer als Inkubationszeit, sondern auch die Entwicklung der Phlebitis berücksichtigen. Daher wurde in weiteren Vorversuchen der Einfluss einer expositionsfreien Zeit in einem Zellkulturmedium ohne Antibiotikazusatz nach der Inkubation untersucht. Diese Überlegung basierte auf der Tatsache, dass in klinischen Studien beobachtet wurde, dass eine gewisse Zeitdauer zwischen der Infusionsapplikation und der Beobachtung der charakteristischen Phlebitissymptome lag (Hershey et al., 1984, Myrianthefs et al., 2005). Nach einer zwei-stündigen Inkubation mit Quinupristin/Dalfopristin wurden die proinflammatorischen Oberflächenantigene mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach einer, vier bzw. 22 weiteren Stunden analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Endothelzellen auch ohne Antibiotikumeinfluss weiter auf den induzierten Stress reagierten und drei der vier analysierten Epitope ihre maximale Ausprägung erst nach insgesamt 24 Stunden zeigten.

Während der Vorversuche fiel auf, dass die Ergebnisse zwischen den einzelnen Versuchstagen relativ große Schwankungen aufwiesen. Diese zufälligen Fehler mussten minimiert werden, um eine statistisch signifikante Aussage über die Reaktion der proinflammatorischen Epitope machen zu können. Eine mögliche Fehlerquelle war die unterschiedlich lange Vorbereitungszeit, die z. B. von der Anzahl der Proben abhängig war, zwischen der Trypsinierung der Endothelzellen bis zur endgültigen Messung im Durchflusszytometer. Um zu überprüfen, ob die Verweildauer der Zellen im PBS einen Einfluss auf die Oberflächenantigene hatte, wurden in einem Vorversuch die Zellen unterschiedlich lange im PBS belassen und anschließend die Ausprägung der Epitope bestimmt. Dabei wurde deutlich, dass der PBS-Einfluss eine deutliche Verringerung der Anzahl der positiv markierten Zellen bewirkt. Deshalb wurden alle Versuche mit der gleichen Anzahl an Proben und dementsprechend mit einer gleich langen Vorbereitungszeit möglichst zügig bearbeitet, um diesen zufälligen Fehler zu minimieren.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die Zelllinie EA.hy 926 die vier wichtigsten proinflammatorischen Oberflächenantigene exprimiert. In Arbeiten, wie beispielsweise von Lidington und Mitarbeitern (1999), wird als Positivkontrolle für einen schädigenden Reiz das Zytokin TNF- α verwendet. Auch in dieser Dissertation wurde TNF- α eingesetzt und das zuvor beschriebene Ergebnis, nämlich nur die Reaktion von ICAM-1 bei gleichzeitiger Nicht-Exprimierung der anderen proinflammatorischen Epitope, konnte bestätigt werden. Daraus wird von Lidington geschlossen, dass die EA.hy 926 Endothelzellen kein gutes Modell der Endothelzellen darstellen, um Inflammationsassays durchzuführen. In dieser Arbeit konnte mit allen vier untersuchten Antibiotika, aber vor allem mit Quinupristin/Dalfopristin als Positiv-Kontrolle, gezeigt werden, dass CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf dieser Zelllinie in deutlicher Ausprägung nachgewiesen werden können.

Der Unterschied zwischen der von TNF- α bzw. der von den Antibiotika induzierten Reaktion könnte möglicherweise in unterschiedlichen Signalkaskaden liegen. TNF- α sowie andere Zytokine erhöhen die Expression von E-Selektin und ICAM-1 über die „nuclear factor- κ B (NF- κ B)“ Signalkaskade. Es gibt jedoch noch andere Signalkaskaden, über die ICAM-1 erhöht werden kann. In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass ICAM-1 auch über einen NF- κ B-unabhängigen Weg reagieren kann. So kann die ICAM-1 Expression auch über eine Aktivierung des Zellreparaturproteins p53 gesteigert werden (Gorgoulis et al., 2003). Ein Effekt von p53 ist die Unterbrechung des Zellzyklus, was letztlich zu einer Abnahme der Zellen führen kann. Hypoxie und Zytostatika wie Cisplatin oder 5-Fluoruracil führen ebenfalls über einen NF- κ B-unabhängigen Weg zu einer Erhöhung des ICAM-1 (Takizawa et al., 1999).

VCAM-1 ist ein weiteres proinflammatorisches Oberflächenantigen, welches auf Endothelzellen nach Stimulierung exprimiert wird. Dieses Epitop bindet das VLA-4 auf aktivierten Monozyten. Lawson und Mitarbeiter (1999) konnten zeigen, dass eine Bindung des ICAM-1 auf ruhenden HUVECs mit spezifischen Antikörpern zu einer Steigerung der Expression von VCAM-1 führt. Die Bindung von ICAM-1 initiiert nicht den NF- κ B Signalweg. Auch dieses Ergebnis zeigt, dass die proinflammatorischen Oberflächenantigene auch über andere Signalwege als die von TNF- α aktivierten in ihrer Expression erhöht werden können. In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die EA.hy 926 Endothelzellen sowohl CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 exprimieren und auch auf Reize durch Antibiotika reagieren. Damit zeigen diese Zellen eine charakteristische proinflammatorische Reaktion und folglich ist diese Zelllinie geeignet, um proinflammatorische Reaktionen von Endothelien in einem *in vitro* System zu untersuchen. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kilic und Mitarbeitern (2006).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der Unterschied zwischen den Ergebnissen des MTT-Zytotoxizitätstest und den Ergebnissen aus den durchflusszytometrischen Ergebnissen. In den Zytotoxizitätsassays konnte ermittelt werden, dass Clarithromycin die zytotoxischste Substanz, gefolgt von Azithromycin, war. Erythromycin zeigte zytotoxische Wirkungen erst bei sehr viel höheren Konzentrationen. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass der Anstieg der proinflammatorischen Epitope auf den Endothelzellen nur eine Reaktion auf die Schädigung der Zellen ist. Daher sollte Clarithromycin die größten Reaktionen der Antigene induzieren.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Versuche zeigen, dass Azithromycin mit Abstand die stärksten Reaktionen der vier proinflammatorischen Antigene bewirkt. Der von Clarithromycin induzierte Effekt ist deutlich geringer, wobei er sogar vergleichbar war mit dem Effekt von Erythromycin bei höheren Konzentrationen. Eine Möglichkeit, diese unterschiedlichen Ergebnisse zu erklären, sind Unterschiede in der Pharmakokinetik der Makrolide. Fassbender und Mitarbeiter (1996) beschreiben in ihrer Arbeit eine intrazelluläre Anreicherung von Azithromycin. In einem Vergleich zwischen Erythromycin, Clarithromycin und Azithromycin zeigte sich, dass Erythromycin in geringen Konzentrationen im Serum und in moderaten Konzentrationen in polymorphonukleären Neutrophilen (PNMs) vorhanden ist. Clarithromycin erreicht in beiden Kompartimenten hohe Konzentrationen und Azithromycin hat die niedrigsten Serumkonzentrationen aber die höchsten Konzentrationen in den Zellen. Aufgrund dieser Unterschiede in der Pharmakokinetik der Substanzen kann man davon ausgehen, dass Azithromycin sich auch in Endothelzellen in höherem Maße anreichert als die anderen Antibiotika. Weitere Untersuchungen wären notwendig, um diese Vermutung endgültig zu bestätigen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit in einem *in vitro* System kann man – im Bewusstsein der problematischen Übertragung von *in vitro* auf *in vivo* Daten – in Zusammenhang mit klinischen Studien zur Inzidenz der infusionsbedingten Phlebitis bei intravenöser Makrolidapplikation bringen. In der bereits vorher zitierten Studie von Zimmermann und Mitarbeitern (2001) zeigten sich für Azithromycin eine hohe Anzahl an lokalen Reizungen und für Clarithromycin viele voll ausgebildete Thrombophlebitiden. Es kann vermutet werden, dass die Hochregulierung der proinflammatorischen Oberflächenantigene zu einer entzündlichen Reaktion in Form von lokaler Rötung und Schmerz führt, die allerdings zumindest im Fall von Azithromycin nicht ausreicht, um eine Thrombophlebitis auszulösen. Clarithromycin hingegen führt zu vermehrtem Zelltod und weniger zu einer übermäßigen Steigerung der proinflammatorischen Epitope. Somit ist zu vermuten, dass beide Reaktionen in Zusammenhang mit der Entwicklung einer infusionsbedingten Thrombophlebitis stehen. Die proinflammatorischen Oberflächenantigene und die Interaktion mit den Leukozyten führen zum Beginn einer Phlebitis. Der vermehrte Zelltod der Endothelien gibt schließlich den Ausschlag zur Entwicklung des Vollbildes einer Thrombophlebitis.

In den hier beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass alle vier untersuchten proinflammatorischen Oberflächenantigene auch *in vitro* auf eine Exposition mit den Antibiotika reagieren. Zu den Nachteilen dieses *in vitro* Assays gehört, dass keinerlei Interaktionen mit anderen Faktoren in der Inflammationskaskade, wie Leukozyten oder Zytokinen, vorhanden sind. Die *in vitro* Systeme haben den Vorteil, dass man problemloser und ökonomisch günstiger einzelne proinflammatorische Potenziale von Substanzen miteinander vergleichen kann. In Ergänzung zu den bestehenden *in vivo* Tiermodellen könnte das hier beschriebene *in vitro* Modell zur Einschätzung des Risikos einer Phlebitis beitragen. So könnte ein Beitrag zur Arzneimittelsicherheit und -Verträglichkeit bei der Entwicklung neuer antibiotisch wirksamer Arzneistoffe geleistet werden.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden *in vitro* die Mechanismen der Entstehung einer Infusionsphlebitis untersucht. Dafür wurden die Oberflächenantigene CD 34, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf der Oberfläche von Endothelzellen analysiert. Weiterhin wurden *in vitro* die proinflammatorischen Potenziale des Streptogramins Quinupristin/Dalfopristin, der Makrolide Erythromycin und Clarithromycin sowie des Azalids Azithromycin bestimmt. Dafür wurden die zytotoxischen Wirkungen der Substanzen miteinander verglichen und die Ausprägung der proinflammatorischen Oberflächenantigene mit einer Immunmarkierung untersucht.

Die Bestimmung und der Vergleich der zytotoxischen Potenziale der Infusionsformulierungen der untersuchten Substanzen geschah mit Hilfe eines modifizierten MTT-Zytotoxizitätstests zunächst mit Fibroblasten (BALB/C 3T3) und anschließend mit einer Endothelzelllinie (EA.hy 926). Weiterhin wurden mit dem gleichen Test auch die Reinsubstanzen von Erythromycin und Clarithromycin untersucht.

Clarithromycin zeigte bei beiden Zellarten die höchste Zytotoxizität im untersuchten Konzentrationsbereich. Nur bis zu einer Konzentration von 10 mg/l konnte kein hemmender Effekt auf die Zellen nachgewiesen werden. Azithromycin zeigte ein nur wenig geringeres zytotoxisches Potenzial, wobei bei den Fibroblasten ein hemmender Effekt ab 50 mg/l und bei den Endothelzellen ab 10 mg/l ein hemmender Effekt gezeigt werden konnte. Erythromycin hingegen zeigte erst bei deutlich höheren Konzentrationen einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen. Erst ab einer Konzentration von 200 mg/l zeigten sich konzentrationsabhängig zytotoxische Effekte in beiden Zellsystemen.

Die Reinsubstanzen der Antibiotika wurden mit Methanol gelöst. Für Methanol konnte in dem verwendeten Konzentrationsbereich in Vorversuchen ein zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden, der bei einem Vergleich der Ergebnisse zwischen den Infusionsformulierungen und den Reinsubstanzen berücksichtigt werden muss. Für Azithromycin zeigten sich ab 10 mg/l konzentrationsabhängig zytotoxische Effekte. Bei Erythromycin konnten ab einer Konzentration von 200 mg/l hemmende Effekte nachgewiesen werden. Die beobachteten Unterschiede zwischen

den zytotoxischen Effekten der Reinsubstanzen und den Infusionsformulierungen ist durch den Einfluss des Methanols als Lösungsmittler zu erklären. Die Ergebnisse aus dem MTT-Zytotoxizitätstest zeigen, dass die Konzentrationen die an der Infusionsstelle erreicht werden können, zytotoxische Wirkungen an den Zellen hervorrufen können. Dies muss als eine Ursache für die inflammatorischen Veränderungen der Vene bei intravenöser Gabe angesehen werden.

Für eine detailliertere durchflusszytometrische Analyse der proinflammatorischen Oberflächenantigene wurden Zellen der EA.hy 926 Endothelzelllinie verwendet. Dafür wurden die Zellen mit unterschiedlich hohen Konzentrationen der untersuchten Antibiotika für zwei Stunden inkubiert und nach einer expositionsfreien Zeit von 22 Stunden mit monoklonalen Antikörpern gegen die untersuchten Oberflächenantigene markiert.

Die Behandlung der Zellen mit der Positivkontrolle Quinupristin/Dalfopristin führte mit steigender Konzentration zu den stärksten Zunahmen der als positiv markierten Zellen für alle vier untersuchten proinflammatorischen Epitope. In der höchsten untersuchten Konzentration von 800 mg/l zeigten sich auch bereits nach zwei Stunden Inkubation zytotoxische Effekte, die die Zellen zu einer geringeren Expression der Oberflächenantigene beeinflussten.

Das Azalid Azithromycin erzeugte im Vergleich zu den untersuchten Makroliden die am stärksten ausgeprägten Reaktionen der Endothelzellen. Es konnten in einem Konzentrationsbereich von 200 mg/l bis 600 mg/l für alle untersuchten Epitope statistisch signifikante Zunahmen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen gezeigt werden. Clarithromycin und Erythromycin zeigten ähnlich ausgeprägte Reaktionen auf den Endothelzellen. Diese waren aber weniger prägnant ausgeprägt als die durch Azithromycin induzierten Veränderungen. Während Clarithromycin in einem Bereich von 200 mg/l bis 600 mg/l eine konzentrationsabhängige Zunahme der Oberflächenantigene bewirkte waren mit Erythromycin zur Induktion einer vergleichbaren Reaktion Konzentrationen von 400 mg/l bis 1200 mg/l notwendig.

Zum Vergleich wurde eine Inkubation der Endothelzellen mit TNF- α durchgeführt. Sie führte zu einer sehr deutlichen Zunahme von ICAM-1 auf den Zellen, während CD 34, E-Selektin und VCAM-1 anders als bei Quinupristin/Dalfopristin unter TNF- α unverändert blieben.

Da die durchflusszytometrischen Experimente mit Endothelzellen einer Zelllinie durchgeführt wurden, wurden einzelne Konzentrationen der vier untersuchten Antibiotika auf ihre Reaktionen an einer Primärkultur von HUVECs untersucht. Es zeigte sich, dass die HUVECs deutlich weniger ausgeprägt auf die Antibiotika-Inkubation reagierten als die EA.hy 926 Endothelzellen. Für Clarithromycin und Erythromycin konnten jedoch statistisch signifikante Zunahmen der proinflammatorischen Oberflächenantigene im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle nachgewiesen. Bei Azithromycin überwogen die zytotoxischen Effekte, so dass keine statistisch signifikanten Unterschiede bei der Expression der Oberflächenmarker gezeigt werden konnten.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmung, dass alle untersuchten Antibiotika die Ausprägung verschiedener Adhäsionsmoleküle, die am Ablauf einer Inflammation beteiligt sind, konzentrationsabhängig verändern. Die Rangfolge der Ausprägung solcher Veränderungen spiegelt die Reihenfolge der Inzidenzen von infusionsbedingten Phlebitiden der Substanzen der therapeutischen Verwendung wieder.

6. Literaturverzeichnis

- AARONSON, S. A. & TODARO, G. J. (1968) Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. *J Cell Physiol*, 72, 141-8.
- ALVAREZ-ELCORO, S. & ENZLER, M. J. (1999) The macrolides: erythromycin, clarithromycin, and azithromycin. *Mayo Clin Proc*, 74, 613-34.
- BACHETTI, T. & MORBIDELLI, L. (2000) Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol Res*, 42, 9-19.
- BARREIRO, O., YANEZ-MO, M., SALA-VALDES, M., GUTIERREZ-LOPEZ, M. D., OVALLE, S., HIGGINBOTTOM, A., MONK, P. N., CABANAS, C. & SANCHEZ-MADRID, F. (2005) Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood*, 105, 2852-61.
- BECKER, B. F., HEINDL, B., KUPATT, C. & ZAHLER, S. (2000) Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol*, 89, 160-7.
- BLAAUBOER, B. J. (2003) Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. *Altern Lab Anim*, 31, 277-81.
- BOMBELI, T., SCHWARTZ, B. R. & HARLAN, J. M. (1999) Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood*, 93, 3831-8.
- BORENFREUND, E. & PUERNER, J. A. (1985) Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*, 24, 119-24.
- BOUIS, D., HOSPERS, G. A., MEIJER, C., MOLEMA, G. & MULDER, N. H. (2001) Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis*, 4, 91-102.
- BREGENZER, T., CONEN, D., SAKMANN, P. & WIDMER, A. F. (1998) Is routine replacement of peripheral intravenous catheters necessary? *Arch Intern Med*, 158, 151-6.
- CAMPBELL, L. (1998a) I.v.-related phlebitis, complications and length of hospital stay: 1. *Br J Nurs*, 7, 1304-6, 1308-12.
- CAMPBELL, L. (1998b) I.v.-related phlebitis, complications and length of hospital stay: 2. *Br J Nurs*, 7, 1364-6, 1368-70, 1372-3.
- CARLOS, T. M. & HARLAN, J. M. (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, 84, 2068-101.

- CARMAN, C. V., JUN, C. D., SALAS, A. & SPRINGER, T. A. (2003) Endothelial cells proactively form microvilli-like membrane projections upon intercellular adhesion molecule 1 engagement of leukocyte LFA-1. *J Immunol*, 171, 6135-44.
- CARRASCO, Y. R. & BATISTA, F. D. (2006) B-cell activation by membrane-bound antigens is facilitated by the interaction of VLA-4 with VCAM-1. *Embo J*, 25, 889-99.
- CHEVALIER, P., REY, J., PASQUIER, O., ROUZIER-PANIS, R., HARDING, N. & MONTAY, G. (2001) Multiple-dose pharmacokinetics and safety of two regimens of quinupristin/dalfopristin (Synercid) in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, 41, 404-14.
- CHIU, L. M., MENHINICK, A. M., JOHNSON, P. W. & AMSDEN, G. W. (2002) Pharmacokinetics of intravenous azithromycin and ceftriaxone when administered alone and concurrently to healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother*, 50, 1075-9.
- COLLIN, J., COLLIN, C., CONSTABLE, F. L. & JOHNSTON, I. D. (1975) Infusion thrombophlebitis and infection with various cannulas. *Lancet*, 2, 150-3.
- CORNELY, O. A., BETHE, U., PAULS, R. & WALDSCHMIDT, D. (2002) Peripheral Teflon catheters: factors determining incidence of phlebitis and duration of cannulation. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 23, 249-53.
- CURRAN, E. T., COIA, J. E., GILMOUR, H., MCNAMEE, S. & HOOD, J. (2000) Multi-centre research surveillance project to reduce infections/phlebitis associated with peripheral vascular catheters. *J Hosp Infect*, 46, 194-202.
- DAVIES, S. R. (1998) The role of nurses in intravenous cannulation. *Nurs Stand*, 12, 43-6.
- DE BONO, D. & GREEN, C. (1983) Interaction between vascular endothelial cells and vascular intimal spindle-shaped cells in vitro. *J Cell Sci*, 60, 89-102.
- DE BONO, D. P. & GREEN, C. (1984) The adhesion of different cell types to cultured vascular endothelium: effects of culture density and age. *Br J Exp Pathol*, 65, 145-54.
- DE DIOS GARCIA-DIAZ J, SANTOLAYA PERRIN R, PAZ MARTINEZ-ORTEGA M, MORENO-VAZQUEZ M (2001) Phlebitis due to intravenous administration of macrolide antibiotics. A comparative study of erythromycin versus clarithromycin. *Med Clin (Barc)*, 116, 133-5.
- DENIZOT, F. & LANG, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, 89, 271-7.
- DIBBLE, S. L., BOSTROM-EZRATI, J. & RIZZUTO, C. (1991) Clinical predictors of intravenous site symptoms. *Res Nurs Health*, 14, 413-20.
- DULBECCO, R. & FREEMAN, G. (1959) Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, 8, 396-7.

- EDGE, C. J., MCDONALD, C. C. & GRAHAM, J. B. (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 3734-7.
- ELIOPOULOS, G. M. (2003) Quinupristin-dalfopristin and linezolid: evidence and opinion. *Clin Infect Dis*, 36, 473-81.
- ENGELHARDT, B. & WOLBURG, H. (2004) Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol*, 34, 2955-63.
- FASSBENDER, M., LODE, H., SCHILLER, C., ANDRO, R., GOETSCHI, B., BORNER, K. & KOEPPE, P. (1996) Comparative pharmacokinetics of macrolide antibiotics and concentrations achieved in polymorphonuclear leukocytes and saliva. *Clin Microbiol Infect*, 1, 235-243.
- FRESHNEY, R. (1990) *Tierische Zellkulturen - Methodenhandbuch*, Walther de Gruyter Verlag, Berlin - New York, 33-60.
- GANGENAHALLI, G. U., SINGH, V. K., VERMA, Y. K., GUPTA, P., SHARMA, R. K., CHANDRA, R. & LUTHRA, P. M. (2006) Hematopoietic stem cell antigen CD34: role in adhesion or homing. *Stem Cells Dev*, 15, 305-13.
- GARCIA-TRAPERO, J., CARCELLER, F., DUJOVNY, M. & CUEVAS, P. (2004) Perivascular delivery of neomycin inhibits the activation of NF-kappaB and MAPK pathways, and prevents neointimal hyperplasia and stenosis after arterial injury. *Neurol Res*, 26, 816-24.
- GAUKROGER, P. B., ROBERTS, J. G. & MANNERS, T. A. (1988) Infusion thrombophlebitis: a prospective comparison of 645 Vialon and Teflon cannulae in anaesthetic and postoperative use. *Anaesth Intensive Care*, 16, 265-71.
- GORGOLIS, V. G., ZACHARATOS, P., KOTSINAS, A., KLETSAS, D., MARIATOS, G., ZOUMPOURLIS, V., RYAN, K. M., KITTAS, C. & PAPAVALASSIOU, A. G. (2003) p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF-kappaB-independent manner. *Embo J*, 22, 1567-78.
- GORMAN, L., MERCER, L. P. & HENNIG, B. (1996) Growth requirements of endothelial cells in culture: variations in serum and amino acid concentrations. *Nutrition*, 12, 266-70.
- GOSPODAROWICZ, D., BROWN, K. D., BIRDWELL, C. R. & ZETTER, B. R. (1978) Control of proliferation of human vascular endothelial cells. Characterization of the response of human umbilical vein endothelial cells to fibroblast growth factor, epidermal growth factor, and thrombin. *J Cell Biol*, 77, 774-88.
- GRUNE, F., SCHRAPPE, M., BASTEN, J., WENCHEL, H. M., TUAL, E. & STUTZER, H. (2004) Phlebitis rate and time kinetics of short peripheral intravenous catheters. *Infection*, 32, 30-2.
- GUAY, D. R., PATTERSON, D. R., SEIPMAN, N. & CRAFT, J. C. (1993) Overview of the tolerability profile of clarithromycin in preclinical and clinical trials. *Drug Saf*, 8, 350-64.

- GUAY, D. R. (1996) Macrolide antibiotics in paediatric infectious diseases. *Drugs*, 51, 515-36.
- HANCOCK, R. E. (2005) Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *Lancet Infect Dis*, 5, 209-18.
- HANSEN, M. B., NIELSEN, S. E. & BERG, K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, 119, 203-10.
- HARDY, D. J., GUAY, D. R. & JONES, R. N. (1992) Clarithromycin, a unique macrolide. A pharmacokinetic, microbiological, and clinical overview. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 15, 39-53.
- HARMS, J. M., SCHLUNZEN, F., FUCINI, P., BARTELS, H. & YONATH, A. (2004) Alterations at the peptidyl transferase centre of the ribosome induced by the synergistic action of the streptogramins dalbapristin and quinupristin. *BMC Biol*, 2, 4.
- HAUBEN, M. & AMSDEN, G. W. (2002) The association of erythromycin and infantile hypertrophic pyloric stenosis: causal or coincidental? *Drug Saf*, 25, 929-42.
- HERSHEY, C. O., TOMFORD, J. W., MCLAREN, C. E., PORTER, D. K. & COHEN, D. I. (1984) The natural history of intravenous catheter-associated phlebitis. *Arch Intern Med*, 144, 1373-5.
- HICKEY, M. J., KANWAR, S., MCCAFFERTY, D. M., GRANGER, D. N., EPPIHIMER, M. J. & KUBES, P. (1999) Varying roles of E-selectin and P-selectin in different microvascular beds in response to antigen. *J Immunol*, 162, 1137-43.
- HÖFFKEN, G., LORENZ, J., KERN, W., WELTE, T., BAUER, T., DALHOFF, K., DIETRICH, E., EWIG, S., GASTMEIER, P., GRABEIN, B., HALLE, E., KOLDITZ, M., MARRE, R. & SITTER, H. (2005) [S3-guideline on ambulant acquired pneumonia and deep airway infections]. *Pneumologie*, 59, 612-64.
- HOUCK, P. M., BRATZLER, D. W., NSA, W., MA, A. & BARTLETT, J. G. (2004) Timing of antibiotic administration and outcomes for Medicare patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med*, 164, 637-44.
- JAFFE, E. A., NACHMAN, R. L., BECKER, C. G. & MINICK, C. R. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*, 52, 2745-56.
- JANSSENS, J., PEETERS, T. L., VANTRAPPEN, G., TACK, J., URBAIN, J. L., DE ROO, M., MULS, E. & BOUILLON, R. (1990) Improvement of gastric emptying in diabetic gastroparesis by erythromycin. Preliminary studies. *N Engl J Med*, 322, 1028-31.
- JONES, G. R. (1968) Quantitative cytochemical studies of the stimulation of rat-liver succinate-neotetrazolium reductase by phenazine methosulphate and quinones, and of inhibition by neotetrazolium, with observations on altered formazan localisation. *Exp Cell Res*, 49, 251-65.

- KALLEN, B. A., OTTERBLAD OLAUSSON, P. & DANIELSSON, B. R. (2005) Is erythromycin therapy teratogenic in humans? *Reprod Toxicol*, 20, 209-14.
- KHAWAJA, H. T., CAMPBELL, M. J. & WEAVER, P. C. (1988) Effect of transdermal glyceryl trinitrate on the survival of peripheral intravenous infusions: a double-blind prospective clinical study. *Br J Surg*, 75, 1212-5.
- KILIC, B., KRUSE, M. & STAHLMANN, R. (2006) The in vitro effects of quinupristin/dalfopristin, erythromycin and levofloxacin at low concentrations on the expression of different cell adhesion molecules on the surface of endothelial cells (Eahy926). *Toxicology*, 218, 30-8.
- KLEIN, C. L., KOHLER, H., BITTINGER, F., WAGNER, M., HERMANN, I., GRANT, K., LEWIS, J. C. & KIRKPATRICK, C. J. (1994) Comparative studies on vascular endothelium in vitro. I. Cytokine effects on the expression of adhesion molecules by human umbilical vein, saphenous vein and femoral artery endothelial cells. *Pathobiology*, 62, 199-208.
- KNEDLER, A. & HAM, R. G. (1987) Optimized medium for clonal growth of human microvascular endothelial cells with minimal serum. *In Vitro Cell Dev Biol*, 23, 481-91.
- KRAUSE, D. S., FACKLER, M. J., CIVIN, C. I. & MAY, W. S. (1996) CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 87, 1-13.
- KRUSE, M., KILIC, B., FLICK, B. & STAHLMANN, R. (2007) Effect of quinupristin/dalfopristin on 3T3 and Eahy926 cells in vitro in comparison to other antimicrobial agents with the potential to induce infusion phlebitis. *Arch Toxicol*, 81, 447-52.
- KUWAHARA, T., ASANAMI, S., KAWAUCHI, Y. & KUBO, S. (1999) Experimental infusion phlebitis: tolerance pH of peripheral vein. *J Toxicol Sci*, 24, 113-21.
- KUWAHARA, T., ASANAMI, S. & KUBO, S. (1998) Experimental infusion phlebitis: tolerance osmolality of peripheral venous endothelial cells. *Nutrition*, 14, 496-501.
- L'AZOU, B., FERNANDEZ, P., BAREILLE, R., BENETEAU, M., BOURGET, C., CAMBAR, J. & BORDENAVE, L. (2005) In vitro endothelial cell susceptibility to xenobiotics: comparison of three cell types. *Cell Biol Toxicol*, 21, 127-37.
- LACORRE, D. A., BAEKKEVOLD, E. S., GARRIDO, I., BRANDTZAEG, P., HARALDSEN, G., AMALRIC, F. & GIRARD, J. P. (2004) Plasticity of endothelial cells: rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment. *Blood*, 103, 4164-72.
- LAMB, H. M., FIGGITT, D. P. & FAULDS, D. (1999) Quinupristin/dalfopristin: a review of its use in the management of serious gram-positive infections. *Drugs*, 58, 1061-97.
- LANBECK, P., ODENHOLT, I. & PAULSEN, O. (2002) Antibiotics differ in their tendency to cause infusion phlebitis: a prospective observational study. *Scand J Infect Dis*, 34, 512-9.

- LANBECK, P., ODENHOLT, I. & RIESBECK, K. (2004) Dicloxacillin and erythromycin at high concentrations increase ICAM-1 expression by endothelial cells: a possible factor in the pathogenesis of infusion phlebitis. *J Antimicrob Chemother*, 53, 174-9.
- LANBECK, P. & PAULSEN, O. (1995) Cytotoxic effects of four antibiotics on endothelial cells. *Pharmacol Toxicol*, 77, 365-70.
- LANG, I., HOFFMANN, C., OLIP, H., PABST, M. A., HAHN, T., DOHR, G. & DESOYE, G. (2001) Differential mitogenic responses of human macrovascular and microvascular endothelial cells to cytokines underline their phenotypic heterogeneity. *Cell Prolif*, 34, 143-55.
- LAWSON, C., AINSWORTH, M., YACOUB, M. & ROSE, M. (1999) Ligation of ICAM-1 on endothelial cells leads to expression of VCAM-1 via a nuclear factor-kappaB-independent mechanism. *J Immunol*, 162, 2990-6.
- LEVI, M. & VAN DER POLL, T. (2005) Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med*, 15, 254-9.
- LIDINGTON, E. A., MOYES, D. L., MCCORMACK, A. M. & ROSE, M. L. (1999) A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transpl Immunol*, 7, 239-46.
- LIEPINS, A. (1989) Morphological, physiological and biochemical parameters associated with cell injury: a review. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 11, 539-58.
- LUKE, D. R., FOULDS, G., COHEN, S. F. & LEVY, B. (1996) Safety, toleration, and pharmacokinetics of intravenous azithromycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 40, 2577-81.
- LUTHJE, P. & SCHWARZ, S. (2007) Molecular basis of resistance to macrolides and lincosamides among staphylococci and streptococci from various animal sources collected in the resistance monitoring program BfT-GermVet. *Int J Antimicrob Agents*, 29, 528-35.
- MADAN, B., PRASAD, A. K., PARMAR, V. S. & GHOSH, B. (2004) 1,4-dihydroxyxanthone modulates the adhesive property of endothelial cells by inhibiting intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and E-selectin. *Bioorg Med Chem*, 12, 1431-7.
- MADDOX, R. R., RUSH, D. R., RAPP, R. P., FOSTER, T. S., MAZELLA, V. & MCKEAN, H. E. (1977) Double-blind study to investigate methods to prevent cephalothin-induced phlebitis. *Am J Hosp Pharm*, 34, 29-34.
- MAKI, D. G. & RINGER, M. (1991) Risk factors for infusion-related phlebitis with small peripheral venous catheters. A randomized controlled trial. *Ann Intern Med*, 114, 845-54.
- MAKI, D. G., RINGER, M. & ALVARADO, C. J. (1991) Prospective randomised trial of povidone-iodine, alcohol, and chlorhexidine for prevention of infection associated with central venous and arterial catheters. *Lancet*, 338, 339-43.

- MARIN, V., KAPLANSKI, G., GRES, S., FARNARIER, C. & BONGRAND, P. (2001) Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J Immunol Methods*, 254, 183-90.
- MCCARTHY, S. A., KUZU, I., GATTER, K. C. & BICKNELL, R. (1991) Heterogeneity of the endothelial cell and its role in organ preference of tumour metastasis. *Trends Pharmacol Sci*, 12, 462-7.
- MCDOUALL, R. M., FARRAR, M. W., KHAN, S., YACOUB, M. H. & ALLEN, S. P. (2001) Unique sensitivities to cytokine regulated expression of adhesion molecules in human heart-derived endothelial cells. *Endothelium*, 8, 25-40.
- MCGUIRE, J. M., BUNCH, R. L., ANDERSON, R. C., BOAZ, H. E., FLYNN, E. H., POWELL, H. M. & SMITH, J. W. (1952) [Ilotycin, a new antibiotic.]. *Schweiz Med Wochenschr*, 82, 1064-5.
- MELAMED, M. R. (2001) A brief history of flow cytometry and sorting. *Methods Cell Biol*, 63, 3-17.
- MICEK, S. T., ROUBINIAN, N., HEURING, T., BODE, M., WILLIAMS, J., HARRISON, C., MURPHY, T., PRENTICE, D., RUOFF, B. E. & KOLLEF, M. H. (2006) Before-after study of a standardized hospital order set for the management of septic shock*. *Crit Care Med*, 34, 2707-13.
- MONREAL, M., QUILEZ, F., REY-JOLY, C., RODRIGUEZ, S., SOPENA, N., NEIRA, C. & ROCA, J. (1999) Infusion phlebitis in patients with acute pneumonia: a prospective study. *Chest*, 115, 1576-80.
- MOSMANN, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- MULLER, A. M., HERMANN, M. I., CRONEN, C. & KIRKPATRICK, C. J. (2002) Comparative study of adhesion molecule expression in cultured human macro- and microvascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol*, 73, 171-80.
- MURAKAMI, S., MORIOKA, T., NAKAGAWA, Y., SUZUKI, Y., ARAKAWA, M. & OITE, T. (2001) Expression of adhesion molecules by cultured human glomerular endothelial cells in response to cytokines: comparison to human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells. *Microvasc Res*, 62, 383-91.
- MUTIN, M., DIGNAT-GEORGE, F. & SAMPOL, J. (1997) Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules. *Tissue Antigens*, 50, 449-58.
- MYRIANTHEFS, P., SIFAKI, M., SAMARA, I. & BALTOPOULOS, G. (2005) The epidemiology of peripheral vein complications: evaluation of the efficiency of differing methods for the maintenance of catheter patency and thrombophlebitis prevention. *J Eval Clin Pract*, 11, 85-9.

- NAKAGAWA, Y., ITAI, S., YOSHIDA, T. & NAGAI, T. (1992) Physicochemical properties and stability in the acidic solution of a new macrolide antibiotic, clarithromycin, in comparison with erythromycin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 40, 725-8.
- NEU, H. C. & CHICK, T. W. (1993) Efficacy and safety of clarithromycin compared to cefixime as outpatient treatment of lower respiratory tract infections. *Chest*, 104, 1393-9.
- NIEDERMAN, M. S., ANZUETO, A., SETHI, S., CHOUDHRI, S., KUREISHI, A., HAVERSTOCK, D. & PERRONCEL, R. (2006) Eradication of H. influenzae in AECB: A pooled analysis of moxifloxacin phase III trials compared with macrolide agents. *Respir Med*, 100, 1781-90.
- NIEDERMAN, M. S., MANDELL, L. A., ANZUETO, A., BASS, J. B., BROUGHTON, W. A., CAMPBELL, G. D., DEAN, N., FILE, T., FINE, M. J., GROSS, P. A., MARTINEZ, F., MARRIE, T. J., PLOUFFE, J. F., RAMIREZ, J., SAROSI, G. A., TORRES, A., WILSON, R. & YU, V. L. (2001) Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention. *Am J Respir Crit Care Med*, 163, 1730-54.
- OBERHOLZER, A., JOHN, T., KOHL, B., GUST, T., MULLER, R. D., LA FACE, D., HUTCHINS, B., ZREIQAT, H., ERTEL, W. & SCHULZE-TANZIL, G. (2007) Adenoviral transduction is more efficient in alginate-derived chondrocytes than in monolayer chondrocytes. *Cell Tissue Res*, 328, 383-90.
- PAGE, C., ROSE, M., YACOUB, M. & PIGOTT, R. (1992) Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *Am J Pathol*, 141, 673-83.
- PEARSON, J. D. & GORDON, J. L. (1985) Nucleotide metabolism by endothelium. *Annu Rev Physiol*, 47, 617-27.
- PERITI, P., MAZZEI, T., MINI, E. & NOVELLI, A. (1993) Adverse effects of macrolide antibacterials. *Drug Saf*, 9, 346-64.
- PETERS, D. H., FRIEDEL, H. A. & MCTAVISH, D. (1992) Azithromycin. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. *Drugs*, 44, 750-99.
- PUTZI, R., BLASER, J., LUTHY, R., WEHRLI, R. & SIEGENTHALER, W. (1983) Side-effects due to the intravenous infusion of erythromycin lactobionate. *Infection*, 11, 161-3.
- REHM, S. J., GRAHAM, D. R., SRINATH, L., PROKOCIMER, P., RICHARD, M. P. & TALBOT, G. H. (2001) Successful administration of quinupristin/dalfopristin in the outpatient setting. *J Antimicrob Chemother*, 47, 639-45.
- REISS, Y., HOCH, G., DEUTSCH, U. & ENGELHARDT, B. (1998) T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: essential role for ICAM-1 and ICAM-2 in transendothelial migration of T cells. *Eur J Immunol*, 28, 3086-99.
- ROBERTS, M. C. (2004) Resistance to macrolide, lincosamide, streptogramin, ketolide, and oxazolidinone antibiotics. *Mol Biotechnol*, 28, 47-62.

- ROBERTS, M. C., SUTCLIFFE, J., COURVALIN, P., JENSEN, L. B., ROOD, J. & SEPPALA, H. (1999) Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 2823-30.
- RUBINSTEIN, E., PROKOCIMER, P. & TALBOT, G. H. (1999) Safety and tolerability of quinupristin/dalfopristin: administration guidelines. *J Antimicrob Chemother*, 44 Suppl A, 37-46.
- RODVOLD, K. A. & PISCITELLI, S. C. (1993) New oral macrolide and fluoroquinolone antibiotics: an overview of pharmacokinetics, interactions, and safety. *Clin Infect Dis*, 17 Suppl 1, S192-9.
- RUOKONEN, E. & PETTILA, V. (2005) Surviving Sepsis campaign--outcome of severe sepsis can be improved by revising procedural standards. *Acta Anaesthesiol Scand*, 49, 597-8.
- SCALLEY, R. D., VAN, C. S. & COCHRAN, R. S. (1992) The impact of an i.v. team on the occurrence of intravenous-related phlebitis. A 30-month study. *J Intraven Nurs*, 15, 100-9.
- SCHOLZ, G., POHL, I., GENSCHOW, E., KLEMM, M. & SPIELMANN, H. (1999) Embryotoxicity screening using embryonic stem cells in vitro: correlation to in vivo teratogenicity. *Cells Tissues Organs*, 165, 203-11.
- SHAPIRO, N. I., HOWELL, M. D., TALMOR, D., LAHEY, D., NGO, L., BURAS, J., WOLFE, R. E., WEISS, J. W. & LISBON, A. (2006) Implementation and outcomes of the Multiple Urgent Sepsis Therapies (MUST) protocol. *Crit Care Med*, 34, 1025-32.
- STAHLMANN, R. & LODE, H. (1996) Macrolides: Tolerability and Interactions with Other Drugs. *Antiinfective Drugs and Chemotherapy*, 155-162.
- STAHLMANN, R. & LODE, H. (1999) Toxicity of quinolones. *Drugs*, 58 Suppl 2, 37-42.
- STEWART, N. T., BYRNE, K. M., HOSICK, H. L., VIERCK, J. L. & DODSON, M. V. (2000) Traditional and emerging methods for analyzing cell activity in cell culture. *Methods Cell Sci*, 22, 67-78.
- STONEHOUSE, J. & BUTCHER, J. (1996) Phlebitis associated with peripheral cannulae. *Prof Nurse*, 12, 51-4.
- SUBRAHMANYAM, M. (1989) Infusion thrombophlebitis--histological and bacteriological study. *Indian J Med Sci*, 43, 231-4.
- TACK, J., JANSSENS, J., VANTRAPPEN, G., PEETERS, T., ANNESE, V., DEPOORTERE, I., MULS, E. & BOUILLON, R. (1992) Effect of erythromycin on gastric motility in controls and in diabetic gastroparesis. *Gastroenterology*, 103, 72-9.
- TAGALAKIS, V., KAHN, S. R., LIBMAN, M. & BLOSTEIN, M. (2002) The epidemiology of peripheral vein infusion thrombophlebitis: a critical review. *Am J Med*, 113, 146-51.

- TAKIZAWA, K., KAMIJO, R., ITO, D., HATORI, M., SUMITANI, K. & NAGUMO, M. (1999) Synergistic induction of ICAM-1 expression by cisplatin and 5-fluorouracil in a cancer cell line via a NF-kappaB independent pathway. *Br J Cancer*, 80, 954-63.
- TATSUMI, T., SHIRAISHI, J., KEIRA, N., AKASHI, K., MANO, A., YAMANAKA, S., MATOBA, S., FUSHIKI, S., FLISS, H. & NAKAGAWA, M. (2003) Intracellular ATP is required for mitochondrial apoptotic pathways in isolated hypoxic rat cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*, 59, 428-40.
- TAYLOR, C. G., DAME, M. K., MURPHY, H. S., WARD, P. A. & VARANI, J. (1994) Spontaneous injury to human umbilical vein endothelial cells increases during in vitro culture and is blocked by protein kinase activation. *Lab Invest*, 70, 822-9.
- THOMPSON, P. W., RANDI, A. M. & RIDLEY, A. J. (2002) Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not ICAM-2, activates RhoA and stimulates c-fos and rhoA transcription in endothelial cells. *J Immunol*, 169, 1007-13.
- THORNHILL, M. H., LI, J. & HASKARD, D. O. (1993) Leucocyte endothelial cell adhesion: a study comparing human umbilical vein endothelial cells and the endothelial cell line EA-hy-926. *Scand J Immunol*, 38, 279-86.
- VILUKSELA, M., VAINIO, P. J. & TUOMINEN, R. K. (1996) Cytotoxicity of macrolide antibiotics in a cultured human liver cell line. *J Antimicrob Chemother*, 38, 465-73.
- VORBACH, H., WEIGEL, G., ROBIBARO, B., ARMBRUSTER, C., SCHAUMANN, R., HLOUSEK, M., REITER, M., GRIESMACHER, A. & GEORGOPOULOS, A. (1998) Endothelial cell compatibility of clarithromycin for intravenous use. *Clin Biochem*, 31, 653-6.
- VORBACH, H., ARMBRUSTER, C., ROBIBARO, B., GRIESMACHER, A., EL-MENYAWI, I., DAXECKER, H., RAAB, M. & MULLER, M. M. (2002) Endothelial cell compatibility of azithromycin and erythromycin. *J Antimicrob Chemother*, 49, 407-9.
- WEBER, C. & SPRINGER, T. A. (1998) Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration. *J Immunol*, 161, 6825-34.
- WEISBLUM, B. (1995) Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 577-85.
- WHITMAN, M. S. & TUNKEL, A. R. (1992) Azithromycin and clarithromycin: overview and comparison with erythromycin. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 13, 357-68.
- WONG, D., PRAMEYA, R. & DOROVINI-ZIS, K. (2007) Adhesion and migration of polymorphonuclear leukocytes across human brain microvessel endothelial cells are differentially regulated by endothelial cell adhesion molecules and modulate monolayer permeability. *J Neuroimmunol*, 184, 136-48.
- WOODHOUSE, C. R. (1980) Infusion thrombophlebitis: the histological and clinical features. *Ann R Coll Surg Engl*, 62, 364-8.

- YAZAWA, K., MIKAMI, Y., SAKAMOTO, T., UENO, Y., MORISAKI, N., IWASAKI, S. & FURIHATA, K. (1994) Inactivation of the macrolide antibiotics erythromycin, midecamycin, and rokitamycin by pathogenic *Nocardia* species. *Antimicrob Agents Chemother*, 38, 2197-9.
- ZIMMERMANN, T., LAUFEN, H., RIEDEL, KD., TREADWAY, G., WILDFEUER, A. (2001) Comparative tolerability of intravenous azithromycin, clarithromycin and erythromycin in healthy volunteers. *Clin Drug Invest*, 21, 527-36.

7. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

| | |
|------------------|---|
| AUC | Area under the curve |
| CAP | Community aquired pneumonia |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| DMEM | Dulbecco modifiziertes Eagle's Minimum Essential Medium |
| DMSO | Dimethylsulfat |
| EC ₅₀ | 50% effect concentration |
| ECGS/H | „endothelial cell growth supplement“ mit Heparin |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| FSC | Forward angle light scatter |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| HAT | Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin |
| HUVEC | Human umbilical vascular endothelial cells |
| MHK | Minimale Hemmkonzentration |
| MTT | 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromid |
| NOEC | No observed effect concentration |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PE | Phycoerythrin |
| SSC | Side scatter |
| TBS | Tris buffered saline |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor α |
| vWF | Von Willebrandt-Faktor |

Lebenslauf

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

Veröffentlichungen

Poster

47. DGPT Frühjahrstagung, April 2006, Mainz

MILLROSE, M., KRUSE, M., KILIC, B., BAUMANN-WILSCHKE, I., STAHLMANN, R., (2006)

Proinflammatory effects of quinupristin/dalfopristin in cultured endothelial cells – a possible mechanism of infusion phlebitis

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 372 (Suppl 1), Abstract-Nr. 364.

20. Jahrestagung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., September 2006, Bonn

MILLROSE, M., MAZUR, D., KILIC, B., BAUMANN-WILSCHKE, I., STAHLMANN, R., (2006)

Proinflammatorische Effekte von Quinupristin/Dalfopristin auf Endothelzellen (EA.hy 926) in vitro

20. Jahrestagung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2006.

17th European Students Conference, Oktober 2006, Berlin

MILLROSE, M., MAZUR, D., KILIC, B., FLICK, B., WEBB, J., STAHLMANN, R., (2006)

Effects of quinupristin/dalfopristin on different cell adhesion molecules on cultured endothelial cells (EA.hy 926)

European Journal of Medical Research, 11 (Suppl II), 127.

Vorträge

48. DGPT Frühjahrstagung, Mainz, März 2007

MILLROSE, M., ROESENER, N., WEBB, J., STAHLMANN, R., (2007)

Effects of macrolide antibiotics on proinflammatory surface antigens on human endothelial cells *in vitro*

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 375 (Suppl 1), Abstract-Nr. 374.

**17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) und
25th International Congress of Chemotherapy (ICC), München, April 2007**

MILLROSE, M., BAUMANN-WILSCHKE, I., WEBB, J., STAHLMANN, R., (2007)

Proinflammatory effects of erythromycin, clarithromycin and azithromycin on human endothelial cells *in vitro*

Clinical Microbiology and Infection, 13 (Suppl 1), S89, Abstract-Nr. O427.

International Journal of Antimicrobial Agents, 29 (Suppl 2), S89, Abstract-Nr. O427.

**47th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy
(ICAAC), Chicago, September 2007**

MILLROSE, M., BAUMANN-WILSCHKE, I., STAHLMANN R., (2007)

In vitro Assay to Assess the Potential of Antibiotics to Cause an Infusion-related Phlebitis

Erklärung

„Ich, Michael Millrose, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Wirkung verschiedener Makrolid-Antibiotika im Vergleich zu Quinupristin/Dalfopristin auf Endothelzellen *in vitro*“ 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

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ralf Stahlmann danke ich für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas und die sehr gute Betreuung. Besonders bedanken möchte ich mich für die stete Diskussionsbereitschaft und die rege Unterstützung sowie die intensive Förderung.

Ich danke Herrn Dr. Matthias Kruse für die geduldige Einführung in den Umgang mit dem FACScan Durchflusszytometer und die fachlichen Diskussionen der Ergebnisse. Ebenso bedanke ich mich bei Jessie Webb für die Hilfe und seinen fachkundigen Rat bei Problemen in der Durchflusszytometrie.

Frau Irmela Baumann-Wilschke danke ich ganz besonders für die Einführung in die Zellkulturtechnik und die überaus tatkräftige Unterstützung bei der Kultivierung sowie die herzliche Atmosphäre im Labor.

Frau Annegret Felies und Herrn Dr. Burkhard Flick danke ich für die Einführung und Unterstützung bei den MTT-Zytotoxizitätsversuchen.

Ich danke Frau Dr. Gundula Schulze-Tanzil und weiteren Mitarbeitern in ihrer Arbeitsgruppe für die Vermittlung und tatkräftige Unterstützung bei den immunhistochemischen Färbungen der Zellen.

Weiterhin danke ich Frau Dipl. math. Christine Gericke für die kompetente Diskussion der statistischen Auswertung der Ergebnisse und Herrn Harald Weinrich für die Behebung verschiedenster EDV-Probleme.

Mein herzlichster Dank gilt Frau Dr. Judith Sendzik für die besondere Hilfsbereitschaft, die fachlichen Diskussionen und die Vermittlung von sehr interessanten Kontakten. Weiterhin danke ich ihr für die tatkräftige Unterstützung bei vielen Problemen und die angenehme Unterstützung auf den Kongressteilnahmen.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Lebensgefährtin Nicole und meiner Familie bedanken, die mich im Verlauf meiner gesamten Arbeit stets sehr unterstützt haben.