

**Aus der Universitätsklinik für Anaesthesiologie  
und Transfusionsmedizin Tübingen  
Abteilung für Anaesthesiologie und Intensivmedizin  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Unertl**

**Immunologische und rheologische Konsequenzen von  
Leukozytenkontaminationen bei  
maschineller Autotransfusion**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Reiner Ries  
aus Schrozberg**

**2003**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Unertl

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. B. Neumeister

| <b>Inhaltsverzeichnis .....</b>              | <b>Seite</b> |
|--|--------------|
| 1. Einleitung.....                           | 1            |
| 2. Material und Methoden .....               | 5            |
| 2.1. Endothelzellkultur .....                | 5            |
| 2.1.1. Nabelschnurpräparation .....          | 5            |
| 2.1.2. Kultivierung der Endothelzellen ..... | 7            |
| 2.2. Gewinnung der Blutproben .....          | 8            |
| 2.2.1. Patientenauswahl .....                | 8            |
| 2.2.2. Vollblut.....                         | 9            |
| 2.2.3. Transfusat.....                       | 9            |
| 2.2.4. Standardisierung und Staining.....    | 10           |
| 2.3. Flusskammer .....                       | 11           |
| 2.4. Analyse der Leukozytenadhäsion .....    | 14           |
| 2.5. Durchflußzytometrie.....                | 18           |
| 2.6. Statistische Auswertung .....           | 22           |
| 2.7. Materialien und Geräte .....            | 22           |
| 3. Ergebnisse.....                           | 27           |
| 3.1. Rheologie/Leukozytenadhäsion.....       | 27           |
| 3.1.1. Sticking und Rolling .....            | 27           |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.1.2  | Geschwindigkeit des Rolling .....                    | 32 |
| 3.1.3. | Detachment assay .....                               | 33 |
| 3.2.   | Immunologie/Expression der Oberflächenmerkmale ..... | 35 |
| 3.2.1. | CD11b .....  | 35 |
| 3.2.2. | CD18 .....   | 37 |
| 3.2.3  | CD62L .....  | 38 |
| 4.     | Diskussion .....                                     | 39 |
| 4.1.   | Methodik .....                                       | 39 |
| 4.2.   | Ergebnisse zur maschinellen Autotransfusion .....    | 45 |
| 4.3.   | Schlussfolgerung .....                               | 51 |
| 5.     | Zusammenfassung .....                                | 54 |
| 6.     | Literaturverzeichnis.....                            | 57 |
| 7.     | Abkürzungsverzeichnis.....                           | 64 |
| 8.     | Danksagung .....                                     | 65 |
| 9.     | Lebenslauf .....                                     | 66 |

## 1. Einleitung

Leukozyten als immunkompetente Zellen im menschlichen Blutkreislauf können ihre eigentliche Aufgabe, die Elimination pathogener Mikroorganismen nur erfüllen, indem sie das Blutgefäß verlassen um die keimbesiedelten Gewebe im Extravasalraum zu infiltrieren. Voraussetzung für den Austritt aus dem Blutstrom ist der Kontakt der Leukozyten mit den Endothelzellen der Gefäßwand [66]. Dem Zellkontakt wirken die Scherkräfte des Blutstroms entgegen [41;43;44;63;72]. Erst die Expression leukozytärer und endothelialer Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche inflammatorisch aktivierter Zellen ermöglicht den Leukozyten erste Kurzkontakte (im Millisekundenbereich) mit der Gefäßwand, die diesen Scherkräften (shear rate, shear stress) widerstehen können. Dieser wichtige immunologische Mechanismus beeinflusst allerdings auch die Pathophysiologie bei der Verursachung von Gewebeschäden und kapillären Lecks bei kritisch Kranken [11].

Jeglicher Kontakt von Leukozyten mit Fremdoberflächen oder Antigenen führt zur Freisetzung von Zytokinen, die als Botenstoffe der Immunantwort eine Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen zur Folge haben [74]. Die molekularen Strukturen an der leukozytären Zelloberfläche interagieren mit den endothelialen Liganden und vermitteln Bindungen unterschiedlicher Stabilität. Mit reduzierter Flussgeschwindigkeit beginnt der Leukozyt entlang der Wand zu rollen. Dieser Vorgang wird von Selektinen induziert und als Rolling bezeichnet [42;43;44;46]. Hierbei wird der Abstand zwischen den Zellen immer mehr verringert, es bildet sich eine von leukozytären Integrinen und ihren endothelialen Liganden aus der Familie der Immunglobuline (intercellular adhesion molecule 1: ICAM-1; vascular cell adhesion molecule 1: VCAM-1) vermittelte feste Adhäsion heraus. Dies wird als Sticking bezeichnet, der Leukozyt ist an der Gefäßwand zum Stillstand gekommen. Im nächsten Schritt verlassen die Leukozyten unter Verformung das Gefäßlumen, ein ebenfalls von Integrinen vermittelter Prozess, der als Transmigration bezeichnet wird [52;53]. Da die verschiedenen Schritte und Parameter der Leukozytenadhäsion in der

überwiegenden Mehrzahl der Publikationen mit englischsprachigen Begriffen verknüpft sind, werden diese im Folgenden beibehalten.

Da die Expression von Adhäsionsmolekülen an eine vorangehende Aktivierung der Zellen durch proinflammatorische Mediatoren gebunden ist, kann die Adhäsion somit als physiologische Reaktion bei Infektionen und Gewebeuntergang verstanden werden [43]. Darüber hinaus führt das Einwandern von Leukozyten selbst zu Gewebeschäden, da in unmittelbarer Umgebung der Leukozyten hohe Konzentrationen toxischer Substanzen wie von Zytokinen, Eicosanoiden und O<sub>2</sub>-Radikalen auftreten [5;11;16;33]. Aus diesem Grund wird der Akkumulation von Leukozyten eine große pathogenetische Bedeutung für Organschäden bei Trauma, Schock, Sepsis sowie Ischämie/Reperfusion beigemessen [79;83;84].

Eine weitere Quelle aktivierter Leukozyten stellen Blutprodukte dar. Blutprodukte werden entweder von fremden Spendern gewonnen (homologe Transfusion) oder entstammen dem Patienten selbst (autologe Transfusion bei Eigenblutspende oder maschineller Autotransfusion). Zur Vermeidung der Risiken einer Gabe von Fremdblut, wie Infektion und Unverträglichkeitsreaktion, hat sich im perioperativen Bereich die maschinelle Autotransfusion in den letzten Jahrzehnten zusehends etabliert. Hierbei wird das intraoperativ in Saugern aufgefangene Blut in eine Zentrifuge geleitet, in der es gereinigt und in seine Bestandteile aufgetrennt werden kann [9]. Das auf diese Weise zurückgewonnene Blut des Patienten enthält neben Erythrozyten jedoch noch große Mengen an Leukozyten [10;64]. Der unvermeidliche Kontakt der Leukozyten mit der Fremdoberfläche und das Zentrifugationstrauma führen zu einer Aktivierung dieser Zellen [10;15;48].

Der Kontakt von Blutbestandteilen mit Fremdoberflächen und seine Auswirkungen sind in Studien zur Hämodialyse sowie zum extrakorporalen Kreislauf am Beispiel der Herz-Lungen-Maschine untersucht worden. Es zeigten sich neben ansteigenden Zytokinspiegeln eine Aktivierung der

leukozytären Integrinexpression [4]. Darüber hinaus wurden beim Einsatz der Herz-Lungen-Maschine positive Effekte auf die Morbidität nach erfolgter Leukozyten-Depletion berichtet [77]. Bei Blutprodukten wird hier unterschiedlich verfahren. Während Leukozytenkontaminationen bei homologen Transfusaten durch Filtrationsschritte weitgehend entfernt werden, ist eine weitere Filtration nach Aufarbeitung des Wundbluts in der Zentrifuge bei maschineller Transfusion nicht üblich.

Nach Retransfusion von Wundblut ist in mehreren Studien über Komplikationen wie pulmonale Funktionsstörungen, systemische Entzündungsreaktionen und Schock berichtet worden [6;18;28;37;76]. Die Interpretation solcher Untersuchungen wird allerdings durch die teilweise erheblichen Unterschiede im Aufarbeitungsprotokoll des Wundbluts erschwert. So differiert die Elimination von Zytokinen zwischen den verschiedenen Formen der Autotransfusion erheblich [4;76;80] und die funktionellen Auswirkungen von Veränderungen der Leukozytenoberfläche sind bislang nicht bekannt. Diese könnten allerdings erheblich größere Bedeutung als die Zytokinfreisetzung besitzen, da die Zytokinkontamination mit geeigneten Aufarbeitungsprotokollen nahezu vollständig verhindert werden kann [4], während klinisch relevante Zellzahlen potentiell aktivierter Leukozyten im Autotransfusat verbleiben. Da die Auswirkungen des Herstellungsvorgangs auf die im Transfusat verbliebenen Leukozyten noch weitestgehend unbekannt sind, war unser Studienziel eine experimentelle Versuchsreihe zu den rheologischen und immunologischen Konsequenzen der Leukozytenkontamination.

Wir untersuchten Blutproben von Patienten, die sich orthopädischen Eingriffen unterziehen mußten, während denen ein System zur maschinellen Autotransfusion (CellSaver5<sup>®</sup>) zum Einsatz kam. Wir verglichen die Expression der leukozytären Adhäsionsmoleküle und das Adhäsionsverhalten der Leukozyten im Retransfusat mit einer peripher-venösen Blutprobe. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe eines Durchflusszytometers und einer Flusskammer durchgeführt.

Die Flusskammer (parallel plate flow chamber) ist ein gut etabliertes System zur Untersuchung von Adhäsion unter physiologischen Strömungsverhältnissen. Mehrere Studien wiesen den Einfluß von Scherkräften (shear rate bzw. shear stress) auf die Interaktion von Leukozyten und Endothel an diesem in vitro Modell nach [39;40;42;46]. Da Blutströmung und Scherkraft perioperativ großen Schwankungen unterliegen, untersuchten wir die Adhäsion in einem weiten Bereich von Strömungsbedingungen, ausgehend von normalen postkapillären Scherkräften bis zu nahezu statischen Bedingungen. Um Artefakte durch weitere Isolationsschritte nach der maschinellen Autotransfusion vermeiden zu können, entwickelten wir ein Verfahren zur Vollblutmikroskopie.

Parallel untersuchten wir im Durchflusszytometer die Leukozyten der Vollblut- und Autotransfusatproben auf ihre Expression von Oberflächenmolekülen, die an Adhäsionsvorgängen beteiligt sind. Wir wählten CD11b und CD18 als Vertreter der Integrine und CD62L als leukozytäres Selektin für unsere Messungen aus, da diese Moleküle entscheidenden Anteil an der Zelladhäsion haben und durch Zellaktivierung in ihrer Expression und Funktion deutlich beeinflusst werden [11;19;21;43;45;47;66;72;81]. Der Vergleich der Resultate der Durchflusszytometrie mit den Beobachtungen an der Flusskammer, die sich ergänzenden Resultate von Oberflächenmolekülen und Adhäsionsverhalten sollten die Frage beantworten, inwieweit die maschinelle Autotransfusion zu anhaltenden Veränderungen des Leukozytenrecruitments führt.

## 2. Material und Methoden

Alle im Folgenden erwähnten Reagenzien und Geräte sind am Ende des Kapitels tabellarisch aufgelistet.

### 2.1. Endothelzellkultur

#### 2.1.1. Nabelschnurpräparation

Die Nabelschnurpräparation erfolgt nach einer modifizierten Methode von Jaffe et al [35].

Grundprinzip: Mithilfe von Collagenase A werden aus der Nabelschnurvene die Human Umbilical Vein Endothelial Cells ( HUVEC ) enzymatisch ausgelöst. Zentrifugation der Suspension und im Folgenden Resuspension des Pellets mit Endothelzellmedium und Füllung einer 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche. Kultivierung eines Monolayers.

Transport: Transportgefäß mit 100 ml Phosphate Buffered Saline<sup>+</sup> (PBS<sup>+</sup>) und 1% Antibiotic/ Antimycotic Solution. Bearbeitet wurden Nabelschnüre aus unauffälligen Geburten nach ausgetragenen Schwangerschaften. Das Transportgefäß steht, bei 4°C gekühlt maximal 24 h zur Verfügung.

Material: Drei 50-ml-Röhrchen (kegelförmiges Zentrifugen-Röhrchen aus Polypropylen), zwei sterilisierte 50-ml-Bechergläser, ein sterilisiertes 600-ml-Becherglas, eine mit Kollagen beschichtete 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche, 0,22 µm Sterifilter, eine 2-ml-Spritze, eine 10-ml-Spritze und vier 20-ml-Spritzen, zwei Straussskanülen, eine 20G-Kanüle, vier rote Verschlusskappchen, vier sterile Kompressen, zwei sterile Abdecktücher, sterile Handschuhe, zwei Nierenschalen mit: einer Schere, zwei Klemmen, einer Pinzette, zwei Schläuchen, vier Kabelbindern und einer 20G-Kanüle (in den Nierenschalen sterilisiert).

Vorbereitung: 600-ml-Becherglas mit 300 ml Ringerlösung im Wasserbad auf 37°C erwärmen, 2 Cryo-Tubes mit je 1 ml Collagenase A bzw. 1 ml Antibiotic/Antimycotic Solution bei Raumtemperatur auftauen. Spüllösung I : 50 ml PBS<sup>+</sup> mit 1% Antibiotic/ Antimycotic Solution steril abfüllen. Spüllösung II : 50 ml Medium 199 mit 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% Natriumpyruvat und 1% Antibiotic/Antimycotic Solution steril abfüllen. 15 ml Endothelzellmedium im 50-ml-Röhrchen im Wasserbad erwärmen, 1 ml Collagenase A in 2-ml-Spritze aufziehen und durch Sterifilter in ein 50-ml-Röhrchen geben, anschließend mit 9 ml PBS<sup>-</sup> auffüllen und im Wasserbad auf 37°C erwärmen.

#### Präparation:

Sämtliche Schritte der Nabelschnur-Präparation werden unter sterilen Bedingungen unter der Werkbank durchgeführt.

Nabelschnur mit Pinzette aus dem Transportgefäß nehmen, in Nierenschale legen und äußerlich mit Kompressen reinigen, Klemmarken mit Schere abschneiden und auf Punktionsstellen prüfen.

Kabelbinder auf Nabelschnur oder Schlauch aufstecken, Vene kanülieren und Kabelbinder festziehen, so daß das Schlauchende in der Vene befestigt ist.

20-ml-Spritze mit Spüllösung I an Schlauch anschließen und durchspülen, selbiges von der anderen Seite, beide Schläuche abklemmen

37°C warme Collagenase A in 10-ml-Spritze aufziehen, auf ein Schlauchende aufstecken und durch die Nabelschnur spritzen bis am anderen Ende Flüssigkeit austritt, dann distale Klemme schließen und Vene prall füllen.

Nabelschnur mit geschlossenen Klemmen und aufgeschraubten roten Verschlusskäppchen für 5 bis 6 Minuten in 600-ml-Becherglas im Wasserbad halten, anschließend unter Werkbank 20-ml-Spritze mit Spüllösung II

aufstecken und durchspülen, in 50-ml-Röhrchen auffangen, danach nochmals mit Luft durchspritzen.

Zentrifugation bei 110 x g für 8 min (bei RT ) ohne Bremse

Überstand vorsichtig abpipettieren, Pellet mit 20ml Spüllösung II resuspendieren und erneut wie oben zentrifugieren.

Überstand abpipettieren, mit 15 ml Endothelzellmedium resuspendieren und eine 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche befüllen. Zellen im Brutschrank bei 37°C, 100% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultivieren.

### **2.1.2. Kultivierung der Endothelzellen**

Am ersten Tag nach Präparation und im Folgenden alle 2 Tage wird das Kulturmedium gewechselt. Vorsichtig wird das Medium abpipettiert, der Monolayer zweimal mit je 15 ml im Wasserbad angewärmtem PBS<sup>+</sup> gewaschen. Abschließend wird die Zellkulturflasche wieder mit 15ml frischem warmem Endothelzellmedium aufgefüllt.

Bei Flusskammerwells wird der Medienwechsel nach dem gleichen Prinzip durchgeführt, wobei hier 1ml PBS<sup>+</sup> pro Well benötigt werden.

Nach drei Tagen bis ca. einer Woche sind die Zellen des Monolayers präkonfluent (Mikroskopkontrolle), die Passage kann erfolgen. Das verbrauchte Kulturmedium wird abpipettiert, die Flasche mit 10 ml warmem Hanks Buffered Saline (HBSS) gespült, nach 30 s abpipettiert und mit 9 ml Trypsin aufgefüllt. Unter dem Mikroskop ist die enzymatische Ablösung des Monolayers zu verfolgen. Nach Ablösung der meisten Zellen werden zügig wiederum 9 ml Trypsin Neutralizing Solution (TNS) zugefügt. Das Gemisch wird nun in ein 50-ml-Röhrchen pipettiert, die Kulturflasche mit 4 ml HBSS nochmals nachgespült. Es folgt die Zentrifugation der Zellen bei 200 x g, 5 min bei RT mit Bremse. Anschließend wird mit Kulturmedium resuspendiert.

In zeitlicher Abstimmung mit dem Versuchstermin an der Flusskammer werden die Endothelzellen jetzt erneut in 75-cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen oder auf Flusskammerwells passagiert. Zum Einsatz kommen ausschließlich Zellen der ersten, maximal der zweiten Passage. Hierbei befüllt man mit 15 ml Zellsuspension pro Flasche sowie 1,2 ml pro Flusskammerwell. Flusskammerwells werden aus einem Deckglas aus Borosilikat (Dicke 1.5) und selbstklebenden Silikondichtungen angefertigt. Die Dichtung (5 mm Dicke, 40° shore) wird auf das Deckglas geklebt und dieses Well autoklaviert. Nach dem Autoklavieren trägt man ein Gemisch aus 50 µl Kollagen A und 950 µl PBS<sup>+</sup> zur Beschichtung der Grundfläche auf. Vor der Beschickung mit Zellsuspension wird nochmals mit 600 µl PBS<sup>+</sup> gespült. Die Suspension wird vor dem Auftragen durch eine Kanüle gespritzt um einen möglichst homogenen Monolayer zu erhalten. Am ersten Tag nach Passage erfolgt ein Medienwechsel, am zweiten oder dritten Tag kann der konfluente Monolayer für den Versuch verwendet werden. Zur Stimulierung der Endothelzellen bei einzelnen Wells erfolgt 4 h vor Versuchsbeginn ein erneuter Medienwechsel mit 25ng TNF $\alpha$ /ml Endothelzellmedium.

## **2.2. Gewinnung der Blutproben**

### **2.2.1. Patientenauswahl**

Mit dem Ziel einer möglichst regelmäßigen sowie zuverlässigen Probengewinnung wurden Patienten der orthopädischen Universitätsklinik Tübingen rekrutiert, bei deren OP das Autotransfusionsgerät Cellsaver5<sup>®</sup> regelmäßig zum Einsatz kam. Der überwiegende Teil der Patienten erhielt eine Hüft-Total-Endoprothese, wenige einen Eingriff an der Wirbelsäule. Die Blutentnahme zu Forschungszwecken war von der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums genehmigt worden, die Patienten wurden nach schriftlicher und mündlicher Aufklärung um ihr schriftliches Einverständnis gebeten. Eine maligne oder hämatologische Begleiterkrankung oder eine

Entzündungsreaktion stellten ein Ausschlusskriterien dar. Mit einem Patientenblatt wurden die letzte Medikation und relevante präoperative Laborparameter (Hkt, Hb, Ery, Leuko, Thr, CRP) erhoben. Insgesamt konnten somit von 27 Patienten Blutproben entnommen werden.

### **2.2.2. Vollblut**

Nach Einleitung der Narkose wurden den Probanden aus einem peripher- bzw. zentral-venösen Zugang 20ml Blut in eine 20ml-Spritze entnommen. Für eine ausreichende Vollblut-Heparinisierung wurden 120 µl Liquemin (5000 U/ml) in ein 50-ml-Röhrchen vorgelegt. Somit resultierte nach Zugabe der Blutprobe eine Heparin-Konzentration von 30 U/ml Vollblut (gut durchgemischt).

### **2.2.3. Transfusat**

Bei der maschinellen Autotransfusion wird Blut aus dem Operationsgebiet abgesaugt, in einer Zellwaschzentrifuge gewaschen und steht anschließend zur Retransfusion zur Verfügung. Zur Gewinnung des maschinellen Autotransfusats kam in unserer Studie der Cellsaver 5<sup>®</sup> der Firma Haemonetics zum Einsatz. Das System besteht aus Ansaug- und Koaguliereinheit, Reservoir mit Filter, Zentrifugenglocke, Rollenpumpe, Abfallbeutel, Retransfusionsbeutel und Schläuchen. Das Blut wird über ein Saugsystem, an dessen Spitze kontinuierlich Heparinlösung zugeführt wird, aus dem Wundgebiet abgesaugt, im Reservoir gesammelt und gefiltert. Bei ausreichender Füllung des Reservoirbehälters wird das Blut in die Zentrifugenglocke gepumpt und kontinuierlich zentrifugiert. Hierbei sedimentieren die Erythrozyten an der Wand des Gefäßes, während das Plasma und die Spülflüssigkeit in der Mitte durch einen Überlauf in den Abfallbeutel fließen und verworfen werden. Die Erythrozyten werden nach Erreichen einer bestimmten Menge unter kontinuierlicher Zentrifugation mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, in einen Retransfusionsbeutel gepumpt und können danach als Konzentrat retransfundiert werden. Die Einstellung des Gerätes wurde standardisiert:

|                      |         |
|----------------------|---------|
| Mindestwaschvolumen: | 1500 ml |
| Reservoir:           | 800 ml  |
| Re-Start:            | 400 ml  |
| Rote Zellen:         | Beutel  |
| Option kein Waschen: | NEIN    |
| Reservoirwaage:      | JA      |
| Geschw. Regulierung: | JA      |

Die Zentrifugation erfolgte stets in einer 125ml-Glocke. In ein 50ml-Röhrchen wurden zur Heparinisierung 120 µl Liquemin (5000U/ml) vorgelegt, nach Abschluß des Wasch- und Zentrifugationsvorganges 20 ml Retransfusat zugegeben.

#### **2.2.4. Standardisierung und Staining**

Nach Erhalt der beiden Proben erfolgte die zeitnahe Aufarbeitung im Labor. Nachdem von beiden Proben jeweils 4x 100µl dem Staining für die Durchflusszytometrie zugeführt wurden (weiteres Vorgehen siehe Kapitel 2.5.) erfolgte die Bestimmung des Hämatokrit durch 5-minütige Zentrifugation. Mit PBS<sup>+</sup> wurden daraufhin beide Proben auf einen Hämatokrit von 30% eingestellt. Dies war zur Standardisierung der strömungsrelevanten Werte für Viskosität und shear stress bei den zu untersuchenden Blutproben erforderlich.

##### Leukozytenzählung:

Prinzip: 25µl Vollblut werden mit 475µl 3% Essigsäure verdünnt. Zuerst vortexen, dann schütteln. Hierdurch werden die Erythrozyten lysiert und die Leukozyten fixiert. Anschließend Auszählung der Leukozyten in der NEUBAUER-Zählkammer. Die Summe n aller in den 4 Eckquadraten der Kammer enthaltenen Leukozyten wird bestimmt (Gesamtvolumen 0,4µl). Die obengenannte Essigsäure-Vollblut-Mischung entspricht einer Verdünnung von 1:20. Somit erhält man als Produkt die Leukozytenzahl/µl unverdünntem Blut.

$$\text{Leukozyten}/\mu\text{l} = n \times 20 \times 2,5$$

Es sind Doppelbestimmungen durchzuführen. Wenn die Ergebnisse nicht um mehr als 15% voneinander abweichen ist der Mittelwert zu bilden. Bei größeren Abweichungen ist die Zählung zu wiederholen.

#### Calcein-Staining:

30 min vor Beginn der Versuchsdurchführung an der Flusskammer erfolgt die Vollblut-Färbung mit Calcein. 50 µl Calcein gelöst in 50 µl DMSO ergeben eine Calcein-Lösung von 1 µg/µl. Um die angestrebte Calcein-Konzentration von 10 µg/ml Vollblut zu erreichen gibt man 10 µl Calcein-Lösung auf 1 ml Blut. Das Röhrchen mit dem Gemisch ist mit Alufolie vor Lichteinfall zu schützen. Danach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfmischer (langsam!).

### **2.3. Flusskammer**

Mit dem Einsatz einer mikroskopierbaren Flusskammer verfolgt man das Ziel, die Adhäsion der Leukozyten unter Bedingungen zu untersuchen, die denen der postkapillären Mikrozirkulation entsprechen. Der Arbeitsplatz besteht aus einer montierten Flusskammer, einem Mikroskop mit wahlweise Durchlicht oder Fluoreszenz-Licht, einer Farbkamera, einem Videorecorder sowie einer Anlage zur digitalen Bildverarbeitung. Die Flusskammer besteht aus einem durch Wasserschläuche temperierbaren Metallgehäuse, in das die Flusskammerwells mit den Endothel-Zellkulturen eingesetzt werden können. Die Flusskammer ist auf dem Objektisch des Mikroskops fixiert. Neben dem Flusskammerwell als Boden bildet ein transparenter Makrolonblock die obere Begrenzung der Kammer. Durch einen Metallschraubring kann der Makrolonblock auf eine definierte Kammerhöhe zugeschraubt werden, wodurch sich die Geometrie der Kammer ergibt. Der Durchfluss erfolgt über afferente bzw. efferente Öffnungen an den beiden Enden des Makrolonblocks. Die Spritzenpumpe ist über einen zuleitenden Schlauch mit dem Einlass der Kammer verbunden. Dies ermöglicht die Superfusion des Endothel-Monolayers mit Medium, Vollblut oder Transfusat. Über den ableitenden Schlauch wird die Flüssigkeit in einem Erlenmeyerkolben wieder aufgefangen.

Der benötigte Perfusatfluss wurde in ml/min über eine Perfusor-Pumpe eingestellt. Bei definierter Kammergeometrie war die Flußgeschwindigkeit die Variable um eine gewünschte shear rate (Scherrate) zu erzeugen. Die shear rate stellt wie der shear stress (Scherkraft, Schubspannung) ein gültiges Maß für die hydrodynamischen Bedingungen im Blutstrom dar. Sie kennzeichnet das Geschwindigkeitsgefälle in Flußrichtung in Abhängigkeit vom Abstand zur Gefäßwand. Shear rate und shear stress sind daher die entscheidenden hydrodynamischen Größen, die der Leukozytenadhäsion entgegenwirken. Die shear rate ist bei Vollblutproben der Bestimmung des shear stress als viskositätsabhängiger Größe vorzuziehen; da die Berechnung des shear stress neben einer laminaren Strömung mit parabelförmigem Geschwindigkeitsprofil die Eigenschaften einer Newtonschen Flüssigkeit (konstante Viskosität bei wechselnder shear rate) voraussetzt. Vollblut zeigt jedoch zum einen ein abgeändertes Strömungsprofil, zum anderen handelt es sich bei Vollblut mit abnehmender Viskosität bei steigender shear rate nicht um eine Newtonsche Flüssigkeit. Ferner tendieren Erythrozyten zur Flussmitte hin, so dass an der Gefäßwand ein niederer Hämatokrit und in Folge dessen auch eine geringere Viskosität als erwartet beobachtet werden. Als Konsequenz dieser hydrodynamischen Eigenschaften des Vollbluts wurde von uns an der Flusskammer mit der Größe „shear rate“ gearbeitet. Die Beziehung von shear rate  $\gamma$  [ $s^{-1}$ ] zu Flussrate  $Q$  [ml/s] ergibt sich nach folgender Formel:

$$Q = H^2 \times B \times \gamma / 6$$

$$Q = \text{Flussrate [ml/s]}$$

$$H = \text{Kammerhöhe [cm]}$$

$$B = \text{Kammerbreite [cm]}$$

$$\gamma = \text{shear rate [s}^{-1}\text{]}$$

$$\tau = \gamma \times \mu$$

$$\tau = \text{shear stress [dyn/cm}^2\text{]}$$

$$\mu = \text{Viskosität [P]}$$

Durch Multiplikation  $Q[\text{ml/s}] \times 60$  erhält man die bei der Programmierung von Perfusorpumpen übliche Dimension  $[\text{ml/min}]$ . Bei unserer Versuchsdurchführung wurde über Markierungen am Schraubring eine Kammerhöhe  $H$  von  $0,015 \text{ cm}$  eingestellt. Die Breite  $B$  von  $1,25 \text{ cm}$  war durch die Silikondichtung des Flusskammerwells vorgegeben. Zur Erzeugung der gewünschten shear rate wurden daher folgende Flußraten eingesetzt:

| shear rate [ $\text{s}^{-1}$ ] | flow [ $\text{ml/min}$ ] |
|--------------------------------|--------------------------|
| 50                             | 0,14                     |
| 100                            | 0,281                    |
| 200                            | 0,562                    |
| 300                            | 0,84                     |
| 400                            | 1,124                    |
| 800                            | 2,248                    |
| 1600                           | 4,496                    |

Die Kammer wurde zu Beginn luftblasenfrei (!) mit raumwarmem Medium 199 (vorher 30 min bei  $40^\circ\text{C}$  im Ultraschallbad entgast) bei einem flow von  $0,3 \text{ ml/min}$  gefüllt. Die Einstellung des Mikroskops und der digitalen Bildverarbeitung wurde unter Durchlicht-Einstellung des Mikroskops vorgenommen. Bei Versuchsbeginn erfolgte der Wechsel der Perfusorspritze zu Vollblut bzw. Transfusat sowie die Einstellung des Mikroskops auf Fluoreszenz-Licht. Ohne Wechsel des Flusskammerwells wurden konsekutiv shear rates in abfallender Reihe ( $300 \text{ s}^{-1}$ - $200 \text{ s}^{-1}$ - $100 \text{ s}^{-1}$ - $50 \text{ s}^{-1}$ ) erzeugt. Bei jeder shear rate betrug die Perfusionszeit 5 min, anschließend wurden von 5 Bildfeldern je 2 digitalisierte Bilder im Abstand von 10 s und die dazwischenliegende Sequenz auf Videoband gespeichert. Nach Abschluß der Perfusion mit Blut folgte ein Detachment assay, in dem bei fixiertem Bildfeld die Ablösung der adhärenen Leukozyten vom Endothel beobachtet wurde. Hierbei steigerten wir die shear rates von  $50 \text{ s}^{-1}$  über  $100 \text{ s}^{-1}$ ,  $200 \text{ s}^{-1}$ ,  $400 \text{ s}^{-1}$ ,  $800 \text{ s}^{-1}$  bis  $1600 \text{ s}^{-1}$ . Perfundiert wurde hier wieder mit Medium 199 jeweils 20 s pro shear rate mit

Bildspeicherung zu Beginn und Ende der 20 s -Intervalle. Der gesamte Versuch wurde auf Videoband aufgenommen, die Zelladhäsion auf einem Videomonitor beobachtet. Die Videobänder konnten anschließend zur Messung des Rolling sowie des Sticking adhärenter Leukozyten herangezogen werden.

## **2.4. Analyse der Leukozytenadhäsion**

### Videoanalyse:

Zur Visualisierung adhärenter Zellen in Vollblut-Proben wurden sämtliche Flusskammerversuche unter ständiger mikroskopischer Kontrolle (DMIRB, Leica, Bensheim) durchgeführt. Das von einer Quecksilber-Dampf-Lampe erzeugte Licht passiert einen Filter und trifft auf das Blutprodukt in der Flusskammer. Nach vorausgegangener Markierung mit Calcein konnten die nun fluoreszierenden Leukozyten und Thrombozyten gut beobachtet werden. Dieser Versuchsaufbau ermöglichte die Beobachtung von Adhäsionsvorgängen im Vollblut-Assay, während bisherige Versuchsanordnungen meist unter Verwendung von Leukozytenisolaten durchgeführt wurden. Die Flusskammerwells wurden mit einem 20 x Objektiv fokussiert, parallel dazu das Livebild über eine s/w-CCD-Kamera (Sony/AVT Horn) an einen Digital-Videorecorder (Sony) und einen Framegrabber (CFG 512, Imaging Technology Inc., USA) zur Digitalisierung überspielt. Durch Beobachtung am Monitor konnten Bild- und Flussqualität kontrolliert und bei Bedarf umgehend modifiziert werden. Der vollständige Versuchsablauf wurde auf Videoband dokumentiert. Zur differenzierten Bewertung der leukozytären Adhäsion wurden anhand der Versuchsprotokolle Bildsequenzen von 10 s Länge von den Videobändern in digitalisierte Form umgewandelt und gespeichert. Zur Auswertung des Detachment assays wurden einzelne Frames (digitalisierte Bilder) im Abstand von 20 s auf der Computerfestplatte gespeichert. Dadurch wurde eine Bearbeitung durch eine Software zur Bildanalyse (Celltracker; C. Zanke, Uni Tübingen) ermöglicht. In diesem Programm wurden durch Größe sowie Lumineszenz-Eigenschaften Leukozyten erkannt, während ihrer Interaktion mit

dem Flusskammer-Endothel verfolgt und daraufhin dem Rolling bzw. Sticking zugeordnet.

Die Definition eines Rollers erfolgte nach dem von Goldman und Lawrence eingeführten Begriff der kritischen Geschwindigkeit [25;39;40;42]. Hiernach können Interaktionen zwischen Adhäsionsmolekülen angenommen werden, sobald sich ein Leukozyt mit max. 70% der Geschwindigkeit bewegt, die sich für einen frei beweglichen Leukozyten in derselben Entfernung von der Gefäßwand errechnen würde.

Die Geschwindigkeit einer Zelle in Abhängigkeit vom Abstand zur Wand ( $v_z$ ) wird nach der folgenden Formel bestimmt:

$$v_z = 3Q/4ab[1-(x/a)^2]$$

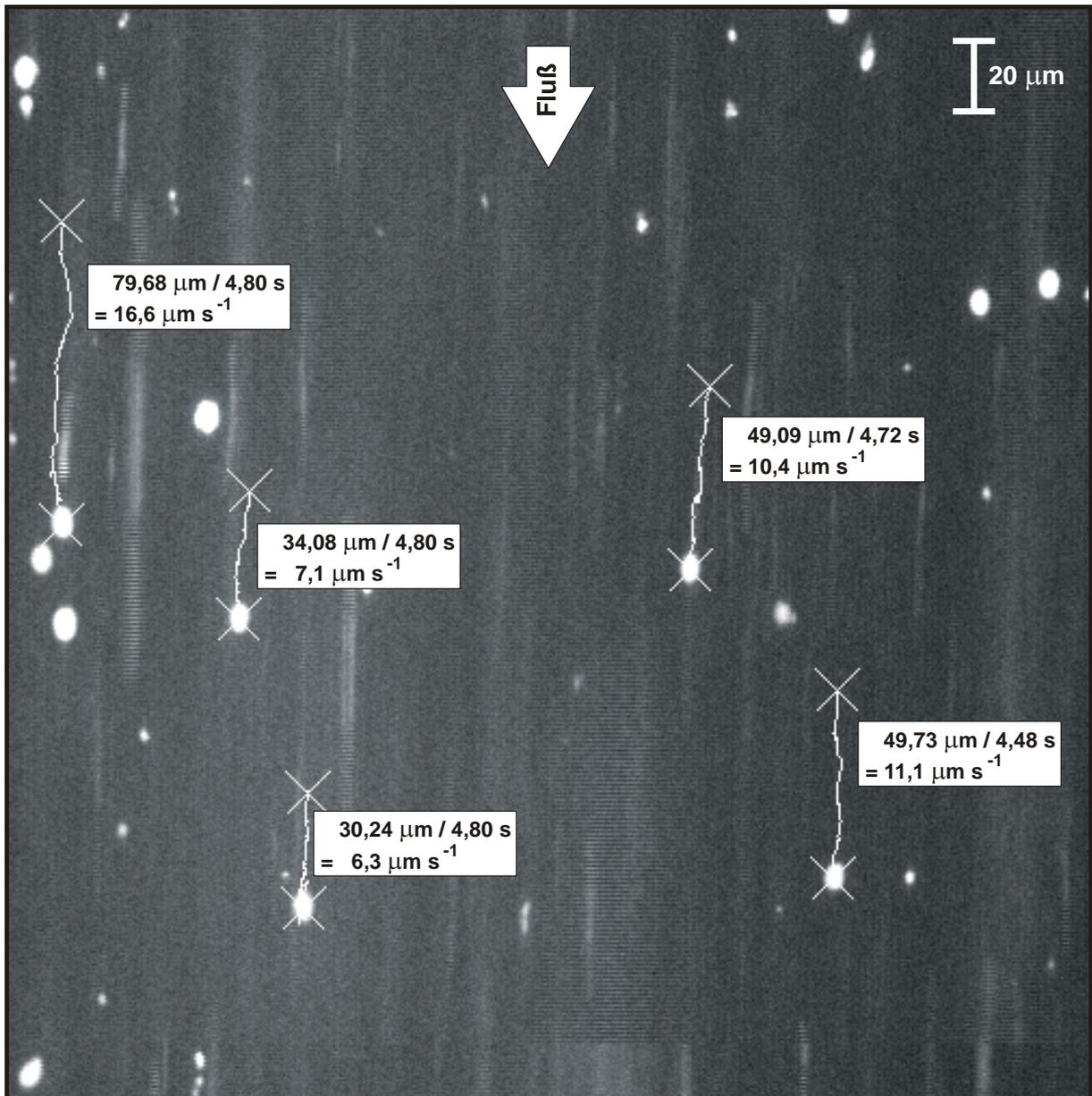
Hierbei werden die Flussgeschwindigkeit  $Q$  (ml/s), die halbe Kammerhöhe  $a$  (cm) als Flussmitte sowie die Kammerbreite  $b$  (cm) eingefügt. Definitionsgemäß stellt  $x=0$  die Kammermitte und  $x=a$  den Kammerrand dar. In unserer Anordnung wurde  $b=1,25$  cm und  $2a=0,015$  cm eingestellt. Der Zelldurchmesser eines Leukozyten wurde mit  $10 \mu\text{m}$  angenommen. Für unsere Gegebenheiten ergab sich für die niedrigste Flußrate von  $0,14\text{ml/min}$  (entspr. einer shear rate von  $50 \text{ s}^{-1}$ ) somit eine theoretische kritische Geschwindigkeit von  $168 \mu\text{m/s}$ . Dieses berechnete Geschwindigkeitsmaximum liegt allerdings weit über den realen Werten für adhärenente Leukozyten [42]. Wir konnten in unserem in vitro Modell Zellinteraktionen nur in einem Bereich deutlich unterhalb von  $100 \mu\text{m/s}$  beobachten, so dass die Definition von Rolling bzw. Sticking in Ergänzung zu früheren Studien nach folgenden Kriterien festgelegt wurde:

Eine Zelle, die sich in 10 s um weniger als einen Zelldurchmesser fortbewegt, wurde als Sticker definiert.

Die Fortbewegung um mehr als einen Zelldurchmesser innerhalb von 10 s bis zu einer Geschwindigkeit von 100  $\mu\text{m/s}$  kennzeichnet das Rolling. In die Berechnung der mittleren Rollinggeschwindigkeit gingen ausschließlich Zellen ein, die mindestens eine Sekunde beobachtet werden konnten und die in diesem Zeitraum keinen Kontakt mit anderen Leukozyten hatten.

#### Analysenintervalle:

Im Tracking Modul des Programmes wurden die dem Rolling zugeordneten Leukozyten über die gesamten 10 s verfolgt sowie Geschwindigkeit und Richtung bestimmt. Darüber hinaus wurden für Rolling und Sticking die jeweilige Zellkonzentration pro  $\text{mm}^2$  bestimmt, woraus für jede Blutprobe und shear rate ein individuelles Adhäsionsprofil aus Rollinggeschwindigkeit, Rolling fraction und Zelldichte ermittelt werden konnte. Zusätzlich wurden im 20 s - Abstand aufgenommene Frames eines gleichbleibenden Bildfeldes als Detachment assay ausgewertet. Nach 20 s Superfusion mit Medium 199 bei  $50 \text{ s}^{-1}$  bestimmten wir als Ausgangswert die Zahl adhärenter Leukozyten. In der Folge verdoppelten wir alle 20 s Flussgeschwindigkeit und damit auch shear rate bis auf  $1600 \text{ s}^{-1}$ . Jeweils am Intervallende wurde die Anzahl der am gleichen Ort verbliebenen Zellen bestimmt. Hierbei wurde beginnend mit der niedrigsten shear rate ( $50 \text{ s}^{-1}$ ) die Anzahl der fest adhärenen Zellen (Sticking) bestimmt und deren quantitative Abnahme als Maß für die Stabilität der Bindung ermittelt. Durch den zeitlich am Versuchsende positionierten Versuchsteil konnten nicht mehr bei allen Proben einwandfreie Flussbedingungen hergestellt werden (Verstopfung der Kammer).



**Abbildung 1:** Ansicht einer Vollblutperfusion bei shear rate 300 s<sup>-1</sup>. Hell leuchtend erkennt man Calcein-gefärbte Leukozyten (groß) und Thrombozyten (klein) vor dunklem Hintergrund (Vollblut/Endothel). Arbeitsweise des Celltracker am Beispiel von 5 fluoreszierenden Leukozyten. Verfolgt werden Zellen in einer Abfolge von Einzelbildern im Abstand von 0,04 sec. Kollisionen zwischen Leukozyten stellen das Ende einer Bahn dar und gehen somit nicht in die Geschwindigkeitsberechnung ein

## 2.5. Durchflusszytometrie

Zur Untersuchung der immunologischen Konsequenzen wurden leukozytäre Oberflächenmoleküle mittels Durchflusszytometrie analysiert.

### Methodik:

Bei der Durchflusszytometrie oder FACS<sup>®</sup> (fluorescence activated cell sorting) werden die Zellen der Vollblutprobe in Einzelzellsuspension gebracht, wobei sie in Tröpfchenform an einem Laserstrahl vorbeigeleitet werden. Der Laser arbeitet nach dem Prinzip der evozierten Emission. Trifft der Laserstrahl auf eine mit fluorochrom-konjugierten Antikörpern verbundene Zelle, resultieren eine Anregung des Farbstoffes und die Emission von Licht einer Wellenlänge, die für das eingesetzte Fluorochrom spezifisch ist. Der Nachweis von Oberflächenmolekülen gelingt infolgedessen durch Kombination der jeweiligen Antikörper mit diversen Farbstoffen. Das emittierte Licht wird mit Sammeloptiken gebündelt, verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt, welches der Fluoreszenzintensität sowie den Zellstrukturen proportional ist. Das Signal kann nun vom auswertenden Modul aufgefangen werden. Die morphologische Zellanalyse beruht auf dem Grad der Lichtstreuung. Zellgröße (FSC, Vorwärts-Lichtstreuung) und Granularität (SSC, seitliche Lichtstreuung; im Winkel von 90° gemessen) sind die Kenngrößen zur morphologischen Zuordnung, welche über die wahlweise als Histogramm oder dot plot dargestellten Fluoreszenz- und Streulichtimpulse ermöglicht wird. Verwendet wurde das Durchflusszytometer FACSort und die Software CellQuest 3.1 (Becton Dickinson; San Jose, CA). Das Gerät enthält einen Argon-Laser. Vor Beginn der Versuchsreihe wurde die Geräteeinstellung den Erfordernissen der Vollblutproben entsprechend justiert und nach Kontrollmessungen mit unspezifischen Isotyp-Antikörpern festgelegt.

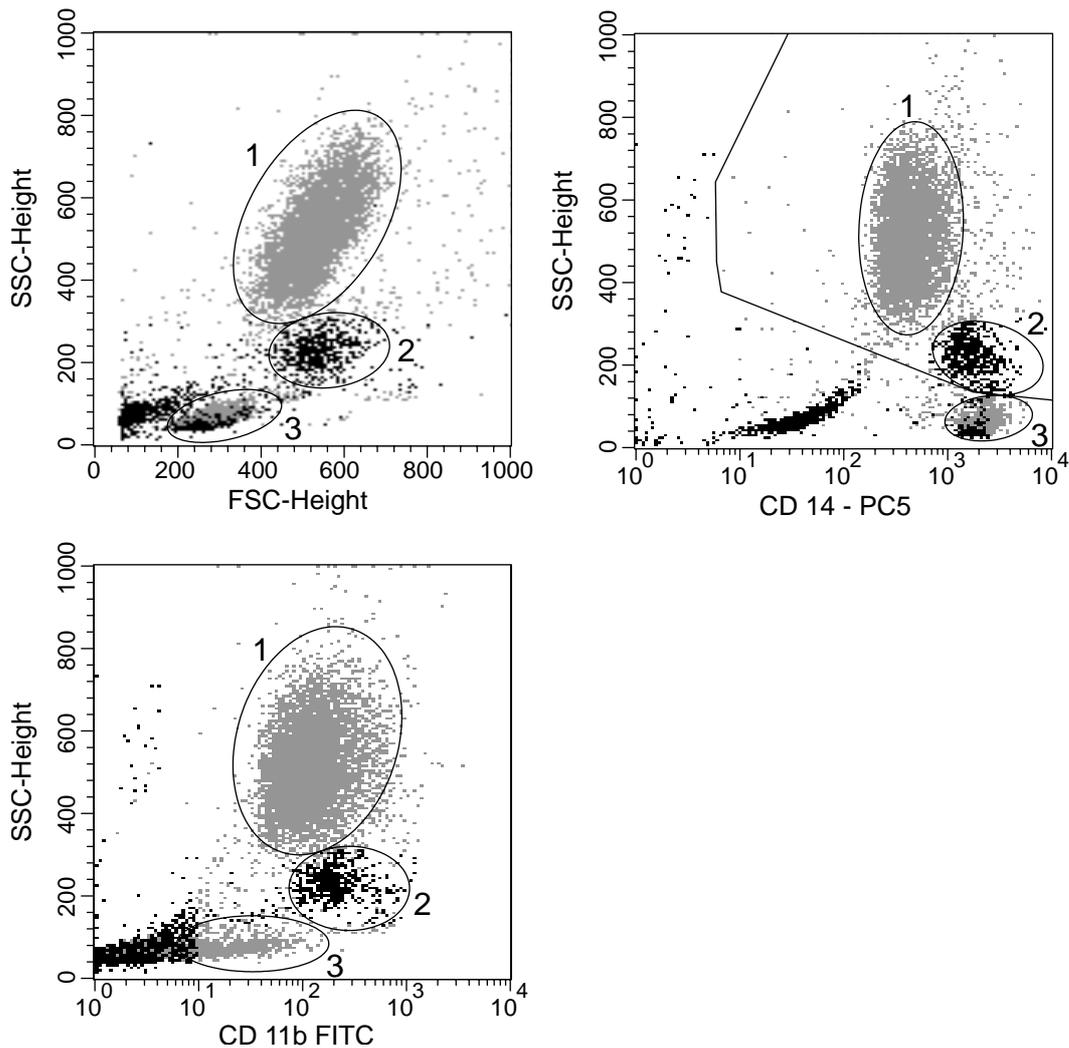
### Gemessene Parameter:

Bestimmt wurden jeweils die für die leukozytäre Adhäsion relevanten Oberflächenmoleküle CD62L (L-Selektin), sowie CD11b und CD18 ( $\beta_2$ -

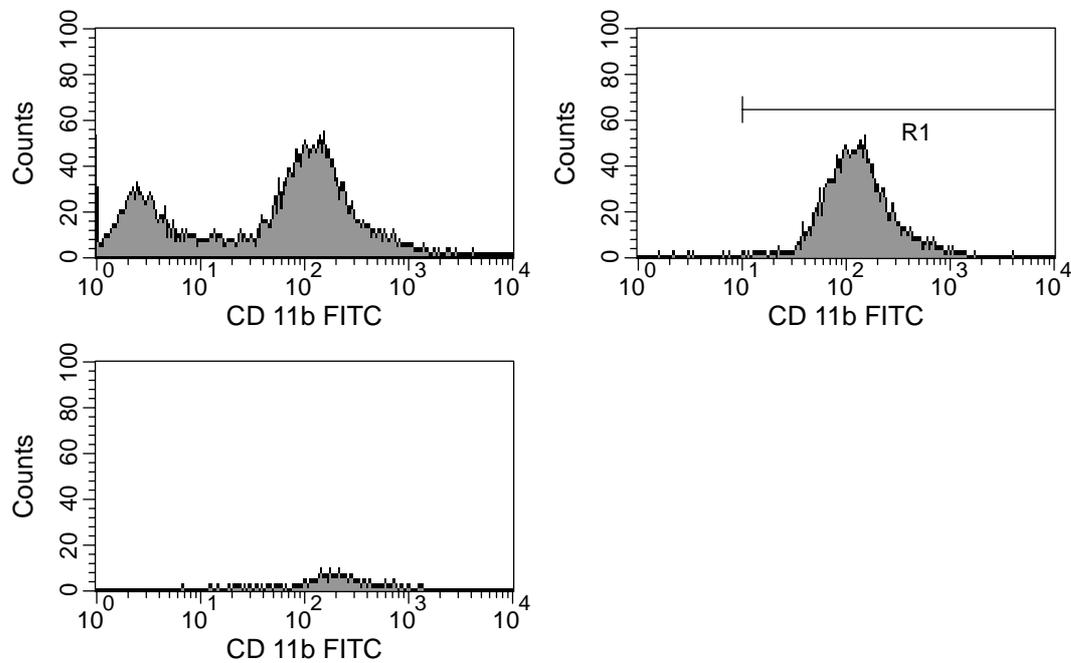
Integrine). Sie sind entscheidend für Rolling und Sticking und werden nach Zellaktivierung in verändertem Ausmaß exprimiert [61]. CD14 wird unterschiedlich stark auf den verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen exprimiert und gilt als klassischer Marker für Monozyten. Die Kombination von CD14 und morphologischen Größen wie Zellgröße und Granularität ermöglicht die Auftrennung und Auswertung der Leukozyten-Subpopulationen Polymorphonuclear leucocyte (PMN) und Monozyten. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten (Median aus 10000 Zellen) korrelieren mit der Oberflächenexpression von CD14, CD62L, CD11b und CD18. Die Darstellung der Subpopulationen in den Diagrammen gelingt durch das Prinzip des Gating: Größe, Granularität und Expression von CD14 lassen eine mit farblichen Markierungen untermalte Zuordnung der im FACS gezählten Einzelereignisse zu.

#### Markierung:

Der Nachweis der genannten Oberflächenmoleküle erfolgte mittels fluoreszenz-konjugierter Antikörper, welche in Polypropylen-Röhrchen mit jeweils 100 µl Blutprobe für 20 min bei RT inkubiert wurden. Wir gaben 10 µl Anti-CD11b-Fitc, 10 µl Anti-CD18-Fitc oder 20 µl Anti-CD62L-Fitc sowie jeweils 10 µl Anti-CD14-PC5 zu. Um unspezifische Antigen-Antikörper-Bindungen abgrenzen zu können wurde bei jedem Versuch eine Isotyp-Kontrolle (IgG1 und IgG2a) mitbestimmt. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Lyse der Erythrozyten mit 2 ml FACS-Lysing<sup>®</sup> Solution (20 min, 4°C). Anschließend folgten 5 min Zentrifugation bei 1200 U/min, Abkippen des Überstandes, Waschen mit 2 ml CellWash<sup>®</sup>, erneute Zentrifugation wie oben und nach erneutem Abkippen des Überstandes Resuspension mit 200 µl Fixativ (CellFix<sup>®</sup>). Daran schloß sich umgehend die Messung am Durchflusszytometer an.



**Abbildung 2:** Differenzierung der Leukozyten im Durchflusszytometer, hier aus einer Vollblutprobe. Im dot plot oben links: Auftrennung nach Größe (Forward scatter/ FSC-Height) und Granularität (Sideward scatter/ SSC-Height). Die Subpopulationen sind durch Ellipsen markiert. PMN = 1, Monozyten = 2, Lymphozyten = 3. Oben rechts: Oberflächenexpression von CD14, ausgeprägt bei Monozyten. Unten: Oberflächenexpression von CD11b



**Abbildung 3:** Oberflächenexpression von CD11b auf allen Leukozyten (oben links), auf PMN (oben rechts) und auf Monozyten (unten). Bestimmt wurde der Median der Fluoreszenzintensität.

## 2.6. Statistische Auswertung

Die statistische Bewertung erfolgte mit Hilfe des Programmes JMP<sup>®</sup>, Version 3.2.2. (SAS Institute, Cary, N.C.).

Die Differenz der Expression von Oberflächenmolekülen zwischen Vollblut und Transfusat wurde mit einem 2-seitigen Ein-Stichproben t-Test überprüft. Der Einfluß der maschinellen Autotransfusion auf Leukozytenadhäsion/Fläche, Rollinggeschwindigkeit und Rolling fraction wurde in einer Kovarianzanalyse untersucht. Das verwendete statistische Modell berücksichtigte darüber hinaus Effekte der shear rate, patientenabhängige Einflüsse sowie Wechselwirkungen zwischen beiden Parametern. Bei den Detachment assays wurde angenommen, daß bei jeder shear rate ein Anteil Leukozyten abgelöst wird, der nur vom Typ der Blutprobe nicht aber vom Blutspender abhängt. Für die Anzahl abgelöster Zellen wurde eine Binomialverteilung angenommen. Mittels maximum likelihood wurden die 5 Anteile (50 s<sup>-1</sup> → 100 s<sup>-1</sup>,.....,800 s<sup>-1</sup> → 1600 s<sup>-1</sup>) jeweils für Vollblut und Transfusat ermittelt. Signifikanz wurde angenommen, wenn das 95%-Konfidenzintervall für die Differenz (Vollblut – Transfusat) der jeweiligen Anteile den Wert 0 nicht enthielten.

Im Folgenden sind die Ergebnisse als arithmetisches Mittel (MW) mit 95% Konfidenzintervallen dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p \leq 0,01$  bzw.  $p \leq 0,05$  festgelegt.

## 2.7. Materialien und Geräte

**Tabelle 1:** Monoklonale Antikörper

| Antikörper   | Bestell-Nr. | Hersteller               |
|--|-------------|--------------------------|
| Anti-CD11b-Fluorescein-isothiocyanat (=FITC) (IgG <sub>1</sub> , mouse anti human) | MHCD11b01   | Caltag,<br>San Francisco |
| Anti-CD14-Perchlorat5 (=PC5) (IgG <sub>1</sub> , mouse anti human)                 | PNIM2640    | Immunotech,<br>Marseille |

| <b>Antikörper</b>   | <b>Bestell-Nr.</b> | <b>Hersteller</b>                |
|---|--------------------|----------------------------------|
| Anti-CD18-FITC<br>(IgG <sub>1</sub> , mouse anti human)             | MHCD1801           | Caltag,<br>San Francisco         |
| Anti-CD62L (L-Selektin)-FITC<br>(IgG <sub>1</sub> mouse anti human) | 347443             | Becton Dickinson,<br>San Jose CA |
| Isotyp Kontrolle FITC<br>(IgG <sub>1</sub> , mouse anti human)      | MG101              | Caltag,<br>San Francisco         |
| Isotyp Kontrolle PC5<br>(IgG <sub>2a</sub> , mouse anti human)      | PNIM2664           | Immunotech,<br>Marseille         |

**Tabelle 2:** Reagenzien

| <b>Reagenzien</b>               | <b>Bestell-Nr.</b> | <b>Hersteller</b>                |
|---------------------------------|--------------------|----------------------------------|
| Antibiotic Antimycotic Solution | A-5955             | Sigma, St. Louis                 |
| Calcein, AM                     | C-3100             | MoBiTec, Göttingen               |
| Cell wash                       | 349524             | Becton Dickinson,<br>San Jose CA |
| CellFix                         | 340181             | Becton Dickinson,<br>San Jose CA |
| Collagen, Type 1 5.0 mg/ml      | 354236             | BD biosciences,<br>Bedford, MA   |
| Collagenase A                   | 103578             | Boehringer,<br>Mannheim          |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)         | D-5879             | Sigma, Steinheim                 |

| Reagenzien   | Bestell-Nr.  | Hersteller                                  |
|--|--|---|
| Endothelial Cell Basal Medium<br>Supplemental Pack/<br>Endothelial Cell Growth Medium<br>-FCS-10<br>-ECGS/H-2<br>-h EGF-0.05<br>-hbFGF-0.5<br>-Gentamicin-25<br>-Ampho B-0.025 | C-22110<br>C-39210<br>C-37320<br>C-30120<br>C-30220<br>C-30310<br>C-36030<br>C-36040 | PromoCell,<br>Heidelberg                    |
| FACS <sup>®</sup> Flow   | 342003   | Becton Dickinson,<br>San Jose CA            |
| FACS <sup>®</sup> Lysing Solution  | 92-0002  | Becton Dickinson,<br>San Jose CA            |
| FACS <sup>®</sup> Rinse  | 340346   | Becton Dickinson,<br>San Jose CA            |
| FACS <sup>®</sup> Safe   | 340345   | Becton Dickinson,<br>San Jose CA            |
| Hanks Buffered Saline (HBSS)   | CC5022   | Bio Whittacker<br>Europe, Verviers          |
| Liquemin <sup>®</sup> Injektionslösung N1  | N 25000  | Hofmann- La Roche,<br>Grenzach-Wyhlen       |
| Medium 199   | M-4530   | Sigma, St. Louis                            |
| PBS <sup>-</sup> Dulbecco´s Phosphate Buffered<br>Saline; w/o Sodium Bicarbonate   | 14040-091  | Gibco BRL,<br>Life Technologies,<br>Paisley |
| PBS <sup>+</sup> Dulbecco´s Phosphate Buffered<br>Saline; with Calcium, Magnesium,<br>Sodium Bicarbonate   | 14190-094  | Gibco BRL,<br>Life Technologies,<br>Paisley |
| Ringerlösung   |  | Fresenius,<br>Bad Homburg                   |
| Sodium Pyruvate  | S-8636   | Sigma, St. Louis                            |

| Reagenzien                                     | Bestell-Nr. | Hersteller                         |
|--|-------------|------------------------------------|
| TNS Trypsin Neutralizing Solution              | CC-5002     | Bio Whittacker<br>Europe, Verviers |
| Trypsin/EDTA                                   | CC-5012     | Bio Whittacker<br>Europe, Verviers |
| Tumor Necrosis Factor $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) | T-0157      | Sigma, St. Louis                   |

**Tabelle 3:** Materialien

| Materialien   | Bestell-Nr. | Hersteller  |
|---|-------------|---|
| ACCUVETTE Einweg-Proben-Becher  | 9366014     | Beckman Coulter,<br>Krefeld                           |
| Bio Coat Collagen I Zellkulturflaschen<br>75 cm <sup>2</sup>            | 354462      | Becton Dickinson,<br>San Jose CA                      |
| Combitips plus  |             | Eppendorf, Hamburg                                    |
| Falcon Blue Max Konisches Röhrchen<br>50 ml                             | 352070      | Becton Dickinson,<br>San Jose CA                      |
| Flusskammer-Zubehör<br>-Silikondichtung PCM Standard,<br>Klebeband etc. |             | Physikalisch<br>Technische Studien<br>(PTS), Freiburg |
| Hämatokrit-Kapillaren heparinisiert                                     | ST 06550 A  | Bayer, Leverkusen                                     |
| Neubauer Zählkammer   |             | Assient   |
| Pipettenspitzen   |             | Eppendorf, Hamburg                                    |
| Polypropylen-Röhrchen   | 6.115201    | Greiner,<br>Frickenhausen                             |
| Stripetten  |             | Costar, Cambridge                                     |

**Tabelle 4: Geräte**

| <b>Geräte</b>   | <b>Hersteller</b>                                  |
|---|--|
| Brutschrank Cytoperm                                      | Heraeus Instruments, Stuttgart                     |
| Cellsaver 5 <sup>®</sup>                                  | Haemonetics <sup>®</sup> , Braintree MA            |
| Durchflusszytometer FACSort<br>Software Cellquest 3.1f    | Becton Dickinson, San Jose CA                      |
| Fluoreszenz-Mikroskop Leitz DMIRB                         | Leica, Bensheim                                    |
| Framegrabber CFG 512                                      | Imaging Technology Inc., MA,                       |
| Hämatokrit-Microzentrifuge M1100                          | Compur Electronic GmbH, München                    |
| 2/3“-s/w CCD Kamera AVT-BC 11/GR                          | Sony, Japan; modifiziert von AVT<br>Horn, Aalen    |
| Lichtmikroskop DM-IL                                      | Leica, Bensheim                                    |
| Multipette  | Eppendorf, Hamburg                                 |
| PCM <sup>®</sup> -System                                  | Physikalisch Technische Studien<br>(PTS), Freiburg |
| Pipettboy Accu  | Integra Biosciences, Fernwald                      |
| Spritzenpumpe Harvard Apparatus<br>PHD 2000, programmable | FMI, Seeheim/Ober-Beerbach                         |
| Videorecorder Sony U-matic                                | Sony, Japan  |
| Vortex Multi-Tube-Vortexer                                | Corning, Medfield                                  |
| Vortex Genie 2  | Scientific Industries, Bohemia                     |
| Wasserbad Typ 1083  | Ges. f. Labortechnik, Burgwedel                    |
| Werkbank Lamin Air HB 2472 S                              | Heraeus Instruments, Stuttgart                     |
| Zentrifuge Megafuge 1.0R                                  | Heraeus Instruments, Stuttgart                     |

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Rheologie/Leukozytenadhäsion

Es wurden von n=25 Patienten jeweils eine Vollblut- und eine Transfusatprobe am Flusskammermodell auf ihre rheologischen Eigenschaften hin untersucht. In sämtlichen Versuchsansätzen verglichen wir die Leukozytenadhäsion sowohl auf unstimuliertem als auch auf stimuliertem ( $\text{TNF}\alpha$  25 ng/ml, 4 h) Endothel. Da in den unstimulierten Ansätzen nahezu ausnahmslos keine Adhäsion zu beobachten war, sind im Folgenden nur die Ergebnisse von  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten Endothelzellen dargestellt. Die Blutproben zeigten bei einem eingestellten Standard-Hämatokrit (30) folgende Leukozytenkonzentrationen:

Vollblut: 3941,20  $\pm$ 211,69 Leukozyten/ $\mu$ l

Transfusat: 2162,96  $\pm$ 147,802 Leukozyten/ $\mu$ l

Diesem Verhältnis wurde bei der Bestimmung der Zelladhäsion (siehe 3.1.1.) Rechnung getragen. Durch Multiplikation der Transfusat-Werte mit dem Faktor Vollblut/Transfusat wurde die Leukozytenadhäsion bei jedem Versuch entsprechend des jeweils ermittelten Faktors normiert.

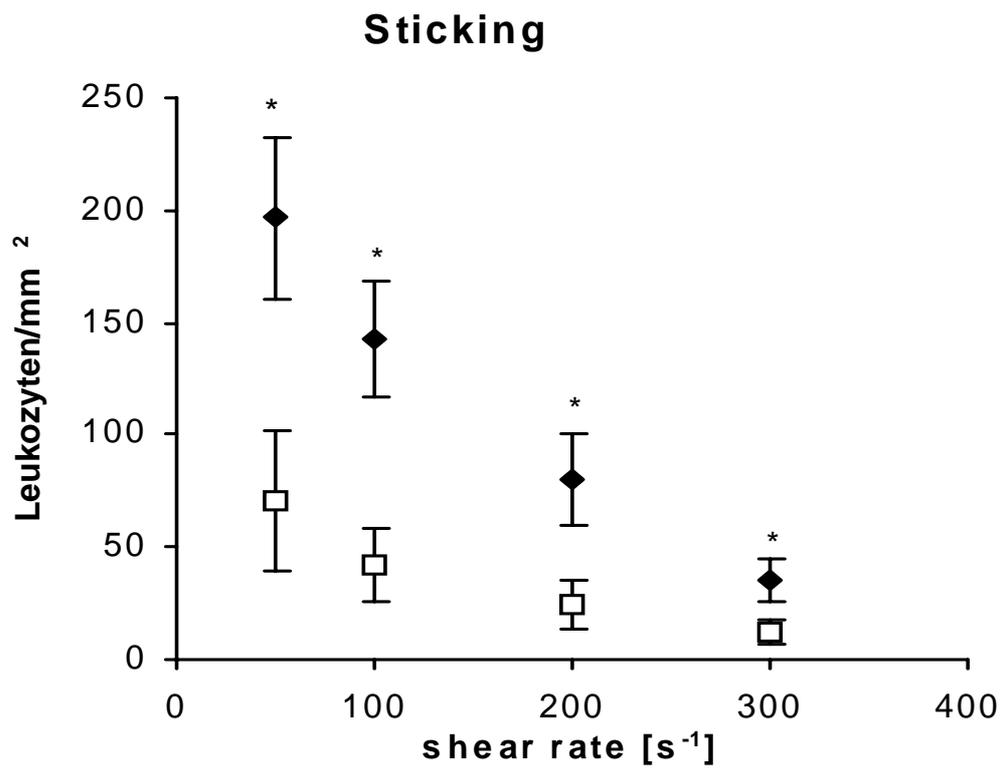
##### 3.1.1. Sticking und Rolling

In der Flusskammer wurden die Blutproben bei abnehmenden shear rates (300–200–100–50  $\text{s}^{-1}$ ; jeweils 5 min) über die Endothelzellen superfundiert. Diese waren zuvor 4 h mit  $\text{TNF}\alpha$  (25 ng/ml) inkubiert worden. Hierbei unterschied sich die Leukozytenadhäsion zwischen Vollblut und Transfusat deutlich. Bei differenzierter Betrachtung (Rolling/ $\text{mm}^2$  vs. Sticking/ $\text{mm}^2$ ) ergaben sich folgende Ergebnisse:

Während das Rolling (siehe Abbildung 5) sich lediglich bei der höchsten shear rate von 300  $\text{s}^{-1}$  signifikant unterschied (Vollblut 41,24  $\pm$ 8,15 Leukozyten/ $\text{mm}^2$ ;

Transfusat  $23,79 \pm 6,21$  Leukozyten/ $\text{mm}^2$ ;  $p \leq 0,01$ ), beobachteten wir beim Sticking (siehe Abbildung 4) signifikante Unterschiede für alle untersuchten shear rates, wobei sich sowohl absolute Zellzahlen als auch die Differenz zwischen Vollblut und Transfusat mit abnehmender shear rate vergrößerten ( $300 \text{ s}^{-1}$ : Vollblut  $35,81 \pm 9,61$  Leukozyten/ $\text{mm}^2$ ; Transfusat  $12,31 \pm 4,95$  Leukozyten/ $\text{mm}^2$ ;  $50 \text{ s}^{-1}$ : Vollblut  $196,74 \pm 36,06$  Leukozyten/ $\text{mm}^2$ ; Transfusat  $70,43 \pm 31,69$  Leukozyten/ $\text{mm}^2$ ; jeweils  $p \leq 0,01$ ).

Ein vergleichbares Resultat ergab sich bei der Analyse der Rolling fraction (siehe Abbildung 6), dem Anteil des Rolling an der Gesamtheit adhärenter Leukozyten. Bei Vollblut wies die Rolling fraction mit zunehmender shear rate einen Anstieg von  $29,6 \pm 4,6 \%$  bei  $50 \text{ s}^{-1}$  bis  $55,9 \pm 5,9 \%$  bei  $300 \text{ s}^{-1}$  auf. Transfusat stieg ebenfalls zunächst von  $60,8 \pm 9,6 \%$  ( $50 \text{ s}^{-1}$ ) auf  $72,5 \pm 8,7 \%$  ( $200 \text{ s}^{-1}$ ) an um bei der höchsten shear rate mit  $69,7 \pm 7,6 \%$  ( $300 \text{ s}^{-1}$ ) annähernd konstant zu bleiben. Auch hier waren die Werte von Vollblut und Transfusat signifikant unterschiedlich ( $p \leq 0,01$ ), die Differenzen nahmen mit abnehmender shear rate zu.



**Abbildung 4:** Sticking; fest adhärenente Leukozyten pro  $mm^2$  bei steigender shear rate.  $\blacklozenge$  Vollblut;  $\square$  Transfusat. Es sind Mittelwerte und 95% - Konfidenzintervalle dargestellt. \*  $p \leq 0,01$  im Vergleich zu Vollblut

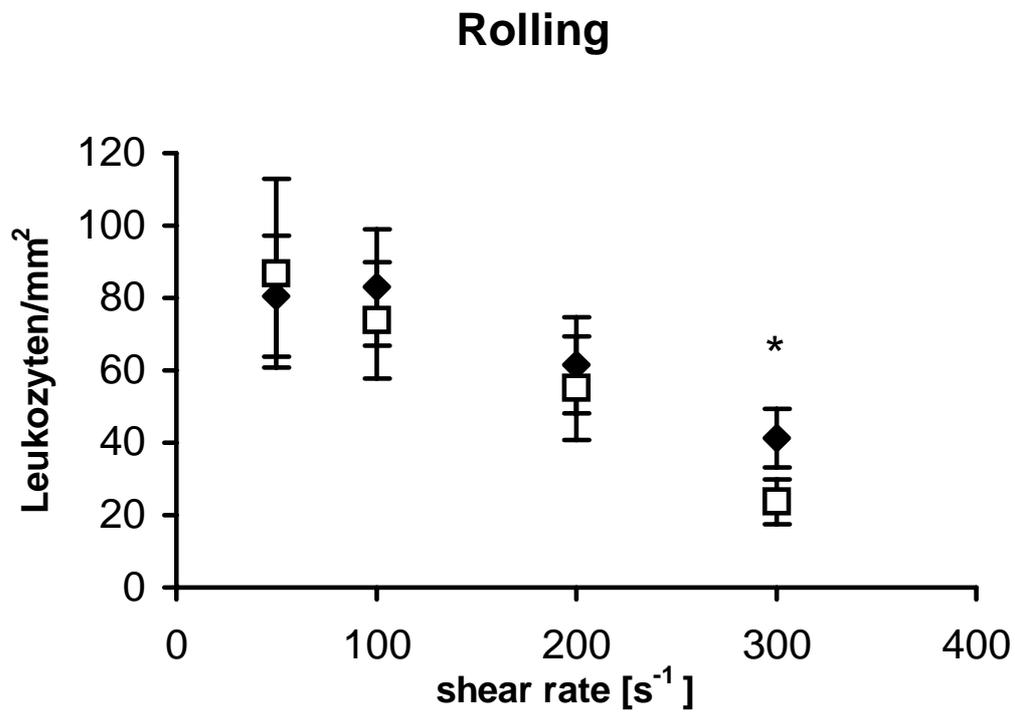
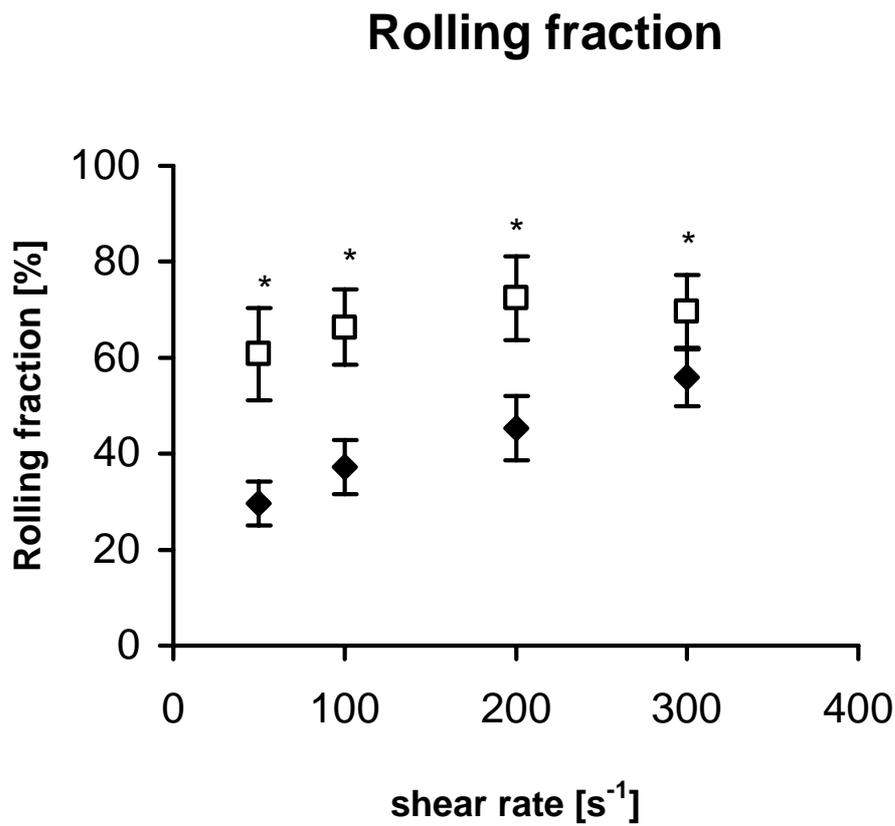


Abbildung 5: Rolling; rollende Leukozyten pro mm<sup>2</sup> in Abhängigkeit der shear rate. ◆ Vollblut; □ Transfusat. Es sind Mittelwerte und 95% -Konfidenzintervalle dargestellt. \*  $p \leq 0,01$  im Vergleich zu Vollblut

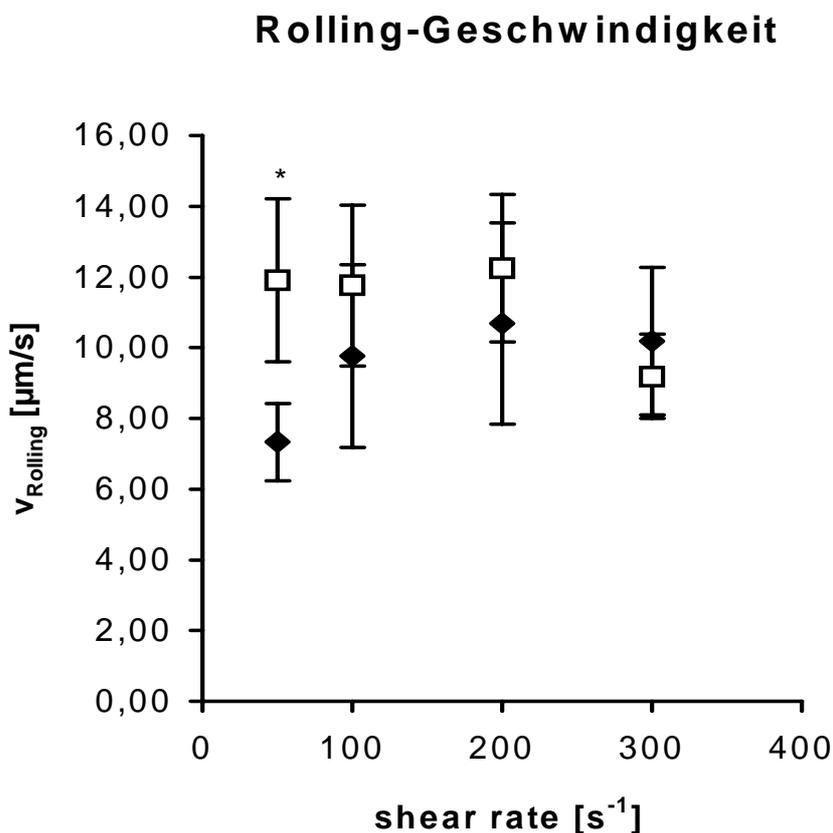


**Abbildung 6:** Rolling fraction; Anteil der rollenden Leukozyten an allen adhärennten Leukozyten. ♦ Vollblut; □ Transfusat. Es sind Mittelwerte und 95%-Konfidenzintervalle angegeben. \*  $p \leq 0,01$  im Vergleich zu Vollblut

### 3.1.2. Geschwindigkeit des Rolling

In  $n=25$  Versuchen wurde mit Hilfe der Software CellTracker die Geschwindigkeit rollender Leukozyten bei den shear rates 300–200–100–50  $s^{-1}$  (jeweils 5 min) bestimmt.

Es resultierte folgendes Geschwindigkeitsprofil (siehe Abbildung 7): Bei niedrigster shear rate (50  $s^{-1}$ ) bewegten sich die rollenden Leukozyten im Transfusat mit  $11,91 \pm 2,30 \mu\text{m/s}$  signifikant schneller als im Vollblutansatz mit  $7,34 \pm 1,09 \mu\text{m/s}$  ( $p \leq 0,01$ ). Bei shear rates von 100 bis 300  $s^{-1}$  beobachteten wir Geschwindigkeiten auf vergleichbarem Niveau ohne signifikante Unterschiede zwischen den beiden Blutproben.



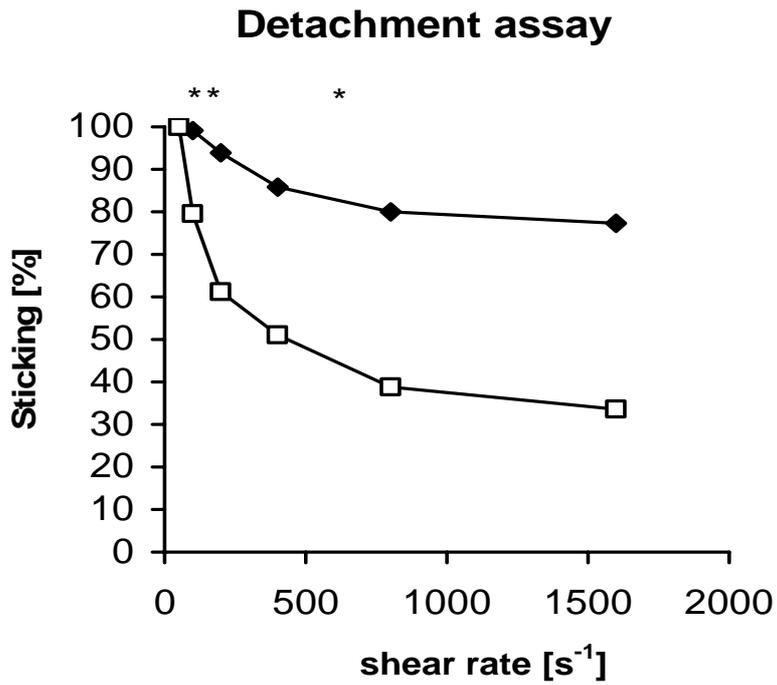
**Abbildung 7:** Geschwindigkeit des Rolling in Abhängigkeit der shear rate.

◆ Vollblut; □ Transfusat. Es sind Mittelwerte und 95% - Konfidenzintervalle angegeben. \*  $p \leq 0,01$  im Vergleich zu Vollblut

### 3.1.3. Detachment assay

Zum Abschluß jedes Versuchsansatzes an der Flusskammer untersuchten wir im Detachment assay die Bindungsfestigkeit des Sticking bei ansteigenden shear rates von  $50 \text{ s}^{-1}$  bis  $1600 \text{ s}^{-1}$ . Es fanden nur Versuche mit einem minimalen Ausgangswert von 3 Stickern Eingang in die statistische Bewertung. Daraus resultierte die Grundgesamtheit von  $n=11$  Probenpaaren.

Die Bindung Leukozyt-Endothelzelle erwies sich bei den Transfusatversuchen als weniger stabil (siehe Abbildung 8). Bei den shear rates 100, 200 und  $800 \text{ s}^{-1}$  stellten wir eine signifikant ( $p \leq 0,05$ ) erhöhte Rate an abgelösten Zellen im Vergleich zum Vollblutansatz fest. Bei den shear rates 400 und  $1600 \text{ s}^{-1}$  zeigte der Vergleich keine signifikanten Unterschiede, was bei der folgenden Abbildung an den bei diesen Werten parallel verlaufenden Kurven (gleicher Wert für die Kurvensteigung) nachzuvollziehen ist. Die Verlaufskurven veranschaulichen den Anteil fest adhären verbliebener Zellen



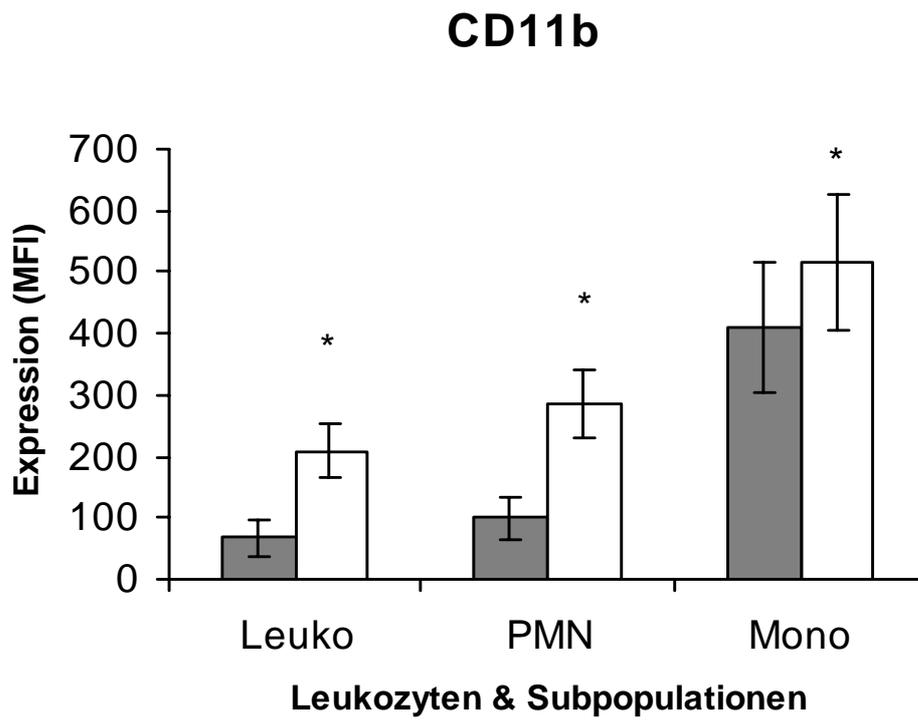
**Abbildung 8:** Detachment assay; Rate der verbliebenen Sticker von 100 % bei 50  $s^{-1}$ .  $\blacklozenge$  Vollblut;  $\square$  Transfusat. \*  $p \leq 0,01$  im Vergleich zu Vollblut.

## **3.2. Immunologie/Expression der Oberflächenmerkmale**

Die Expression der für die Adhäsion am Endothel relevanten Integrine CD11b und CD18, sowie L-Selektin (CD62L) wurden durch Durchflusszytometrie bestimmt. In den resultierenden dot plots differenzierten wir die Expression auf allen Leukozyten, sowie auf den Subpopulationen PMN (polymorphonuclear leucocytes) und Monozyten. Bei jeder Probe ermittelten wir den Median der Fluoreszenzintensität aus 10000 gemessenen Zellen, die Ergebnisse des Gesamtkollektives sind als Mittelwert mit 95%- Konfidenzintervall angegeben.

### **3.2.1. CD11b**

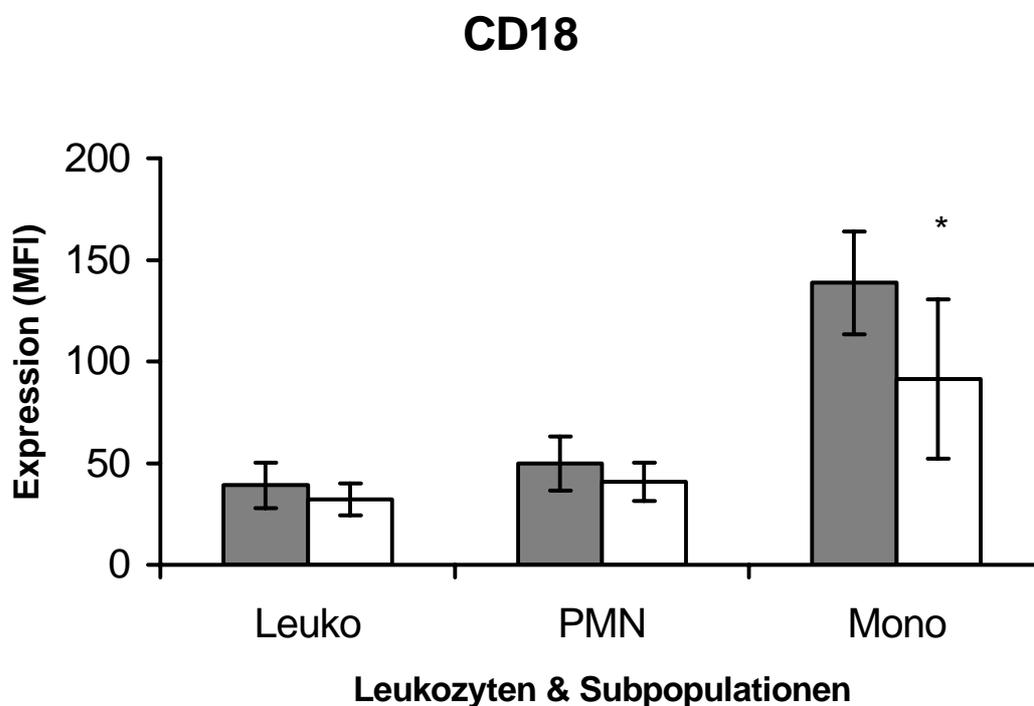
Zur Ermittlung der Oberflächenexpression von CD11b wurden n=24 Probenpaare herangezogen. Dabei war von Vollblut zu Transfusat ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten (siehe Abbildung 9). Gesamtleukozyten (+210%) sowie PMN (+189%) zeigten im Transfusat etwa eine Verdreifachung gegenüber Vollblut ( $p \leq 0,01$ ), während die Expression auf Monozyten um 26 % stieg ( $p \leq 0,05$ ).



**Abbildung 9:** CD11b; Median der Fluoreszenzintensität (MFI) als Maß für die Oberflächenexpression auf Leukozyten und Subpopulationen. ■ Vollblut; □ Transfusat. \*  $p \leq 0,01$  im Vergleich zu Vollblut (Monozyten  $p \leq 0,05$ ).

### 3.2.2. CD18

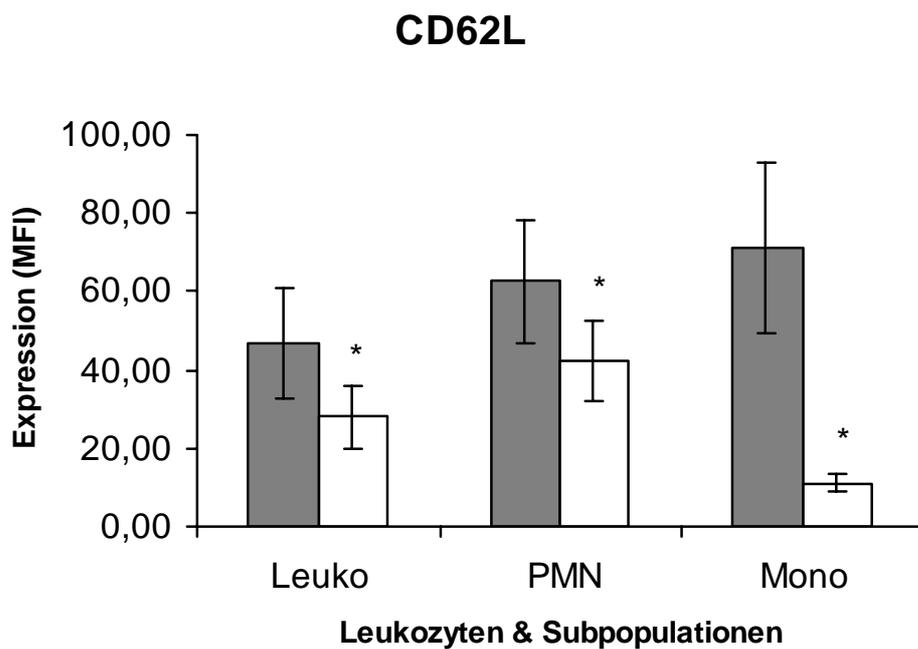
Die Werte beim untersuchten Integrin CD18 ergaben bei Leukozyten und PMN im Transfusat ein leichtes Absinken der Expression (keine statistische Signifikanz). Auf der Monozyten-Subpopulation im Transfusat stellten wir einen Abfall um 34 % fest ( $p \leq 0,05$ ) (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10:** CD18; Median der Fluoreszenzintensität (MFI) als Maß für die Oberflächenexpression auf Leukozyten und Subpopulationen. ■ Vollblut; □ Transfusat. \*  $p \leq 0,05$  im Vergleich zu Vollblut.

### 3.2.3. CD62L

Die Oberflächenexpression von L-Selektin sank bei den Leukozyten im Transfusat um 40% signifikant ab ( $p \leq 0,01$ ), PMN zeigten um 33% reduzierte Werte. Bei Monozyten war die Veränderung hier mit -84% am deutlichsten ausgeprägt (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11:** CD62L; Median der Fluoreszenzintensität (MFI) als Maß für die Oberflächenexpression auf Leukozyten und Subpopulationen. ■ Vollblut, □ Transfusat. \*  $p \leq 0,01$  im Vergleich zu Vollblut.

## 4. Diskussion

### 4.1. Methodik

Ziel unserer Untersuchung war es, den Einfluß der maschinellen Autotransfusion mit Cellsaver 5<sup>®</sup> auf die im Transfusat enthaltenen Leukozyten zu bestimmen. Neben der Oberflächenexpression leukozytärer Adhäsionsmoleküle auf verschiedenen Subpopulationen der enthaltenen Leukozyten untersuchten wir erstmals auch die rheologischen Konsequenzen der Aufbereitung von Wundblut in einer Flusskammer. Mithilfe dieses *in-vitro*-Modells bestimmten wir im Vollblutansatz qualitativ und quantitativ die Adhäsionseigenschaften der enthaltenen Leukozyten auf TNF $\alpha$ -stimulierten HUVEC.

Unsere Zielgrößen der Messreihe am Durchflusszytometer waren aus der Familie der  $\beta_2$ -Integrine die Oberflächenmerkmale CD11b und CD18, außerdem L-Selektin (CD62L). Sämtlichen Parametern wurden in vorangegangenen Untersuchungen herausragende Bedeutung für die Zelladhäsion als Immunantwort auf inflammatorische Reize zugeschrieben [11;19;21;22;27;32;41;61;66]. Im rheologischen Teil der Studie verglichen wir Rolling-Geschwindigkeit, Rolling fraction und die Zahl interagierender Leukozyten pro Fläche zur Beschreibung der Qualität und Effizienz der Leukozyten-Endothel-Bindungen. Deren Stabilität wurde durch steigende Scherkräfte im Detachment assay überprüft.

Die Infektabwehr als originäre Aufgabe der im Blutkreislauf befindlichen Leukozyten setzt die Fähigkeit zum Verlassen des Gefäßlumens voraus. Dies wird zunächst von den im Blutstrom existenten Scherkräften verhindert. Als Reaktion auf inflammatorische Reize gehen Endothelzellen und Leukozyten zum Teil anhaltende Bindungen ein, welche durch die Expression von Antigenen an ihren Zelloberflächen vermittelt wird [11;21;43;44;66]. Durch diese zur Zelladhäsion führenden Interaktion von Leukozyten mit der Gefäßwand wird

die wichtige immunologische Funktion der beteiligten Leukozyten und deren Subpopulationen gewährleistet [72;74]. Den beschriebenen Mechanismen werden auch erhebliche Einflüsse auf Mikro- und Makrozirkulation bei Sepsis und Schock bei kritisch Kranken beigemessen, wobei gewebsschädigende Effekte der Leukozytenakkumulation nachgewiesen wurden [31;33;34;61;79]. So führen Endotoxinämie und Sepsis zu einer gesteigerten Expression von CD11b, was im Zusammenhang mit den erwähnten Gewebeschäden den Ansatz einer „antiadhäsiven Therapie“ aufkommen ließ [66;67]. Auch bei Ischämie /Reperfusion zeigen sich endothelial-leukozytäre Interaktionen auf molekularer und zellulärer Ebene, die entscheidende Bedeutung für den späteren Reperfusionsschaden des Gewebes besitzen [22;73;83].

Stellvertretend für die vielfältigen proinflammatorischen Stimuli, die zu einer Aktivierung des Endothels und einer Induktion endothelialer Adhäsionsmoleküle führen, setzten wir  $\text{TNF}\alpha$  ein. Nach Bindung an den endothelialen Rezeptor führt  $\text{TNF}\alpha$  zu einer Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf der Endothelzelle, was eine vermehrt einsetzende Zelladhäsion zur Folge hat [7].  $\text{TNF}\alpha$  wurde in unserer Versuchsreihe 4 h vor Beginn der Perfusion in der Flusskammer zur Aktivierung der HUVEC-Monolayer eingesetzt. In anderen Untersuchungen bereits mehrfach in ähnlichen Versuchsaufbauten verwendet [46;49;62], erwies sich das Zytokin in unseren Experimenten als essentiell für die Leukozytenadhäsion. Auf unstimulierten Endothelzellen konnten wir keine nennenswerte Adhäsion der Leukozyten beobachten.

Unser Flusskammermodell sollte die reproduzierbare Simulation der im Kreislauf gegebenen rheologischen Verhältnisse, wie laminare Strömung, physiologische Scherkraftdimensionen sowie eine standardisierte Viskosität der eingesetzten Blutproben gewährleisten. Das vorgegebene Verhältnis von Kammerbreite zu Kammerhöhe gestattete die reproduzierbare Simulation der gewählten shear rate unter laminaren Strömungsbedingungen (Reynoldszahl des Systems  $\leq 1$ ) [39]. Da die Viskosität des Vollbluts in enger Beziehung zum Gehalt an korpuskulären Teilchen und zum gemessenen Hämatokrit steht

[23;36], stellten wir den Hämatokrit in unseren Versuchen auf den Standardwert 30% ein (Verdünnung mit PBS<sup>+</sup>). Der shear stress als Größe, welche die Adhäsion determiniert, setzt sich aus shear rate und Viskosität zusammen. Der shear stress ( $\tau$ ) ergibt sich aus der Formel

$$\tau = \gamma \times \eta,$$

wobei  $\eta$  [P] die Viskosität und  $\gamma$  [s<sup>-1</sup>] die shear rate bezeichnet. Die Gleichung setzt neben einer laminaren Strömung jedoch eine Newtonsche Flüssigkeit (konstante Viskosität bei variierenden shear rates) voraus. Diese Voraussetzung trifft für Blut nicht zu, da hierin eine abnehmende Viskosität bei steigender shear rate beobachtet werden kann [26]. Darüber hinaus tendieren Erythrozyten dazu sich in der Flussmitte zu konzentrieren, woraus wiederum für die Flüssigkeit nahe der Gefäßwand ein geringerer Hämatokrit und damit auch ein geringerer shear stress resultiert [26]. Da der shear stress an der Gefäßwand daher nur näherungsweise zu bestimmen ist, haben wir die Viskosität standardisiert (siehe oben) und geben die Flusskammer-Ergebnisse für definierte shear rates an. Mit dieser Einschränkung versehen wählten wir shear rates von 50 bis 300/s, was den Gegebenheiten in postkapillären Venolen entspricht [63;65].

Während der Großteil bisheriger Untersuchungen unter Einsatz von Zellisolaten durchgeführt wurde, konnten wir mit der Anwendung von Vollblut bzw. Transfusat Zellinteraktion in einem Milieu unter Anwesenheit aller Zellpopulationen und plasmatischer Bestandteile des Blutes erzeugen. Der Verzicht auf die Leukozytenisolation ermöglichte erst die Beurteilung der Effekte maschineller Autotransfusionsgeräte, da die mit einer Isolation verbundenen Artefakte die Auswirkungen der Blutauflbereitung hätten maskieren können [60;68]. Die Anwesenheit von Erythrozyten beeinflusst darüber hinaus die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel [49;50] und führt zu einer Reduktion der Geschwindigkeit des Rolling [55].

Zur Antikoagulation versetzten wir die Proben mit Heparin 30 U/ml. Diese Konzentration unfraktionierten Heparins hat allenfalls geringfügige Auswirkungen auf Leukozyten-Endothel-Interaktionen und gewährleistet eine Vergleichbarkeit von heparinisierem Transfusat mit der Vollblut-Kontrolle. Die Perfusion mit Vollblut in der mikroskopierbaren Flusskammer erfolgte nach Anfärbung mit dem fluoreszierenden Farbstoff Calcein AM (10 µg/ml). Abbitt et al. konnten in einer vergleichenden Studie für diese Konzentration von Calcein AM einen Einfluß auf die Leukozytenadhäsion ausschließen [2]. Die Vorteile des Verfahrens liegen in der Visualisierung der Leukozyten sowie der Flussqualität und der Adhäsionsvorgänge, die im Anschluß mit der bildverarbeitenden Software bewertet werden konnten.

*In vitro* Untersuchungen zur Leukozytenadhäsion mit Vollblut unter Flussbedingungen wurden in jüngster Vergangenheit vermehrt durchgeführt [1;2;51;62;65]. Zum Teil wurde über mit Adhäsionsmolekülen beschichtete Membranen oder wie bei uns über kultivierte Endothelzellen perfundiert. Der Versuchsablauf allerdings variierte auch im zeitlichen Ablauf, sowie in der Verwendung von Antikoagulantien, Fluoreszenz-Farbstoffen sowie den blutassoziierten Parametern Hämatokrit und Leukozytenkonzentration. Dies macht den exakten Vergleich der Zielgrößen Adhäsion/Fläche und Geschwindigkeit des Rolling problematisch. Allen Studien gemeinsam ist die Forderung nach der Verarbeitung des Blutes "so schnell wie möglich" nach Probengewinn. Eine verzögerte Lagerung kann die artifizielle Aktivierung von Oberflächenmolekülen in heparinisierem Blut und damit falsch positive Ergebnisse in der Durchflusszytometrie wie auch Modifikationen der Adhäsionsvorgänge in der Flußkammer zur Folge haben [1]. Trotz einer schnellstmöglichen Probenverarbeitung war auch in unserer Studie ein Intervall von 2 Stunden bis zum Versuchsbeginn unumgänglich. Diese Verzögerung betraf allerdings Transfusat und Vollblutkontrolle in gleichem Maße und dürfte somit die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht beeinträchtigt haben.

Die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen zeigt einen kaskadenartigen Ablauf [27;46]. In einem ersten Schritt führen die schnell aufbaubaren Bindungen der Selektine zu einer Annäherung der vorher frei strömenden Leukozyten an die Gefäßwand. Die Leukozyten werden abgebremst und zeigen eine intermittierende Adhäsion die als Rolling bezeichnet wird. Verantwortlich hierfür sind Bindungen von E- und P-Selektin auf aktiviertem Endothel und L-Selektin, das von nicht aktivierten Leukozyten exprimiert wird. Die Leukozyten binden mit hohen Bindungsgeschwindigkeiten an ihre Liganden auf dem jeweiligen Reaktionspartner Endothelzelle. Die Bindungen werden jedoch schnell wieder gelöst, so dass zwar eine initiale Bindung bei hoher shear rate möglich wird, die irreversible, feste Adhäsion (Sticking) jedoch weitere Bindungen erfordert [19;27;32;43;44;72;75].

Diese erfolgen durch Reaktionen zwischen leukozytären Integrinen (CD11b/CD18) mit den endothelialen Liganden wie ICAM-1/2 und VCAM-1 [72;78]. Jene integrin-abhängigen Bindungen sind zwar fest, weisen allerdings langsame Reaktionszeiten auf, so dass das Selektin-vermittelte Rolling bei physiologisch hohen shear rates eine essentielle Vorstufe des Sticking darstellt [57;75;85]. Dunne et al wiesen im Tierversuch *in vivo* den Integrinen CD11b und CD18 eine herausragende Rolle im niedrigen shear-Bereich nach [19]. Nach erfolgtem Sticking werden die Leukozyten unter Deformation in die Lage versetzt die Gefäßwand zu durchwandern um ihren Wirkort im Sinne der Immunabwehr zu erreichen. Dieser abschließende Prozess wird als Transmigration bezeichnet und von Integrinen und PECAM-1 induziert [52;53;74].

Lawrence et al wiesen in ersten Studien auf die Relevanz physikalischer Parameter wie Flussrate, shear rate und shear stress für leukozytäre Adhäsionsvorgänge hin. Sie verwendeten unstimulierte PMN auf unstimulierten und IL-1-aktivierten HUVEC. Sie beobachteten unter allen Stimulationsbedingungen eine Zunahme der Adhäsion mit sinkenden Scherkräften [39-42]. Neben dem Wirkungsprofil von Selektinen und Integrinen

zeigt auch die Expression ihrer Liganden und die Stabilität der entstehenden Bindungen Unterschiede bei spezifischen Scherkraftverhältnissen [32;69].

In unseren Vollblutversuchen konnten wir Leukozytenadhäsion bei allen shear rates beobachten, im Kurvenverlauf von 50 bis 300/s vergleichbar mit den Ergebnissen von Abbitt & Nash [1]. Unsere höheren absoluten Zellzahlen könnten auf die unterschiedliche Anzahl perfundierter Leukozyten oder die bei uns erfolgte  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation der Endothelzellen zurückzuführen sein. Reinhardt & Kubes. beschrieben eine nahezu fehlende Adhäsion im höheren shear rate-Bereich [65]. Während Abbitt & Nash für heparinisieretes Blut eine Rolling fraction von ca. 50% (Adhäsion auf P-Selektin) ermittelten [1], variierte die Rolling fraction in unseren Experimenten zwischen 29,6% bei  $50 \text{ s}^{-1}$  bis zu 55,9% bei  $300 \text{ s}^{-1}$ . Diese Varianz muss als Indiz für den vermehrten Einfluß der  $\beta_2$ -Integrine bei niedriger shear rate interpretiert werden [19;32;57], da in den Versuchen von Abbitt und Nash auf P-Selektin keine endothelialen Liganden zur Verfügung standen. Der Vergleich der Rolling Geschwindigkeit bei Abbitt & Nash mit unseren Werten zeigt auffällige Übereinstimmung sowohl in Größenordnung (ca.  $10 \mu\text{m/s}$ ) als auch im von der shear rate unabhängigen Verlauf. Der direkte Vergleich zwischen einzelnen Vollblut-Studien ist immer schwierig, da häufig nicht direkt mikroskopiert wurde, sondern nach erfolgter Vollblutperfusion gespült und erst danach ausgewertet wurde. Desweiteren ist zum Vergleich nur ein Vollblutversuch mit Calcein-Markierung geeignet, da andere Farbstoffe die Adhäsion beeinflussen [2]. Dennoch zeigt sich eine relativ gute Übereinstimmung unserer Werte mit denen von Abbitt & Nash [1]. Berücksichtigt man das unterschiedliche Setting im Versuchsaufbau, verglichen mit unseren HUVEC, fällt das nahezu identische Geschwindigkeitsprofil auf.

Die Differenzierung eines rollenden von einem frei fließenden Leukozyten wird nach Bestimmung der kritischen Geschwindigkeit ( $v_{\text{krit}}$ ) durchgeführt [40]. Das parabolische Geschwindigkeitsprofil in einer parallel plate flow chamber wird durch die Kammergeometrie, die Flussrate sowie die Entfernung eines Partikels von der Gefäßwand bestimmt. Lawrence et al setzten die kritische Geschwindigkeit

für das Rolling auf 70% der Geschwindigkeit eines nahe der Gefäßwand frei fließenden Leukozyten fest [39;42]. Bei diesem Wert kann von Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothel ausgegangen werden. Unsere tatsächlich beobachteten Geschwindigkeiten lagen jedoch bedeutend niedriger, da die tatsächliche Rolling-Geschwindigkeit unterhalb des kritischen Grenzwertes von der spezifischen Dissoziationskonstante des Adhäsionsmoleküls und nicht mehr von der Hydrodynamik bestimmt wird [42;43]. Infolge dessen setzten wir in unserer computergestützten Auswertung diesen Wert auf 50% der kritischen Geschwindigkeit fest, was bei einer shear rate von  $50\text{s}^{-1}$  und einem angenommenen Zellradius von  $5\mu\text{m}$  einer Geschwindigkeit von annähernd  $100\mu\text{m/s}$  entspricht. Dieser Wert wurde jedoch auch von sehr kurz adhärenen Zellen nicht erreicht. Da  $v_{\text{krit}}$  linear mit Erhöhung von Flußrate bzw. shear rate ansteigt, änderten wir das Limit entsprechend, obwohl nach wie vor sämtliche beobachteten Zellen mit Geschwindigkeiten  $< 100\mu\text{m/s}$  gemessen wurden. Auch dies deckt sich mit den Angaben von Abbitt & Nash für eine shear rate von  $70\text{s}^{-1}$  [1].

Das Modell parallel plate flow chamber wurde bereits verbreitet zur Beschreibung der Leukozyten-Endothel-Interaktion eingesetzt [54;69]. Durch gezielte Modifikation der Parameter Kammergeometrie, Scherkraft und der eingesetzten Medien und Proben ist es gelungen Adhäsionsprozesse unter Simulation physiologischer Rahmenbedingungen zu reproduzieren und zu mikroskopieren. Ansätze mit Vollblut erlauben eine weitere Annäherung an die physiologischen Rahmenbedingungen *in vivo* und werden nach weiterer Optimierung der Versuchsdurchführung zukünftig auch vermehrt von klinischem Interesse bei der Analyse rheologischer Vorgänge bei kritisch Kranken sein.

## 4.2. Ergebnisse zur maschinellen Autotransfusion

Als Folge der Risiken von allogenen Bluttransfusionen und der beschränkten Verfügbarkeit von Blut und Blutderivaten wurden fremdblutsparende Maßnahmen entwickelt, unter denen die autologe Bluttransfusion eine

wesentliche Rolle spielt. Da Spender und Empfänger identisch sind, werden viele Risiken einer Fremdblutspende vermieden und der Bedarf an homologen Blutkomponenten deutlich vermindert [9].

Neben der präoperativen Eigenspende hat sich zunehmend auch die intra- und postoperative maschinelle Autotransfusion etabliert. Hierbei wird Blut aus dem Operationsgebiet abgesaugt, in einer Zentrifuge gewaschen und anschließend retransfundiert. Das Retransfusat unserer Studie wurde intraoperativ durch das System Cellsaver 5<sup>®</sup> der Firma Haemonetics<sup>®</sup> gewonnen. Die meisten unerwünschten Bestandteile wie Heparin, freies Hämoglobin oder Zelldetritus werden durch den Wasch- und Zentrifugationsvorgang größtenteils eliminiert, nicht hingegen Bakterien oder Tumorzellen [82]. Daher gelten Eingriffe in infizierte Wundgebiete und die Tumorchirurgie als Kontraindikation für den Einsatz maschineller Autotransfusion [9].

Wachsende Aufmerksamkeit wird bei extrakorporalen Verfahren wie Autotransfusion, Hämodialyse und Herz-Lungen-Maschine der Entzündungsaktivierung oder der Kontamination des Retransfusates mit Leukozyten zuteil. Nach Korrektur auf einen Hämatokrit von 30% durch Dilution zählten wir relevante Leukozytenzahlen, die annähernd Bereiche des systemischen Blutes erreichten ( $2162,96 \pm 147,802$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$ ). Nach der standardisierten Aufbereitung im Cellsaver und anschließend im Labor entsprachen sie den Werten, die in vergleichbaren Untersuchungen publiziert wurden [10;64]. Mehrere Studien zu den Komplikationen von extrakorporalen Verfahren berichteten über systemische Entzündungsreaktionen, Schock oder pulmonale Funktionsstörungen [14;77] und wiesen im Transfusat auch erhöhte Spiegel der Zytokine  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 und IL-1 nach [5;10;30]. Dieses Indiz für eine inflammatorische Reaktion ist bei autologer stärker als bei allogener Transfusion ausgeprägt [6] und kann am Beispiel Herz-Lungen-Maschine (HLM) durch Leukozyten-Depletion verringert werden [29]. Der Zytokin-Anstieg wird als Ausdruck einer Aktivierung immunkompetenter Zellen als Antwort auf die Reize im Operationsbereich und während des Herstellungsprozesses eines

Zellkonzentrates angesehen [45;47;81]. Bei Thrombozytenkonzentraten ist diese Aktivierung mit einem Anstieg febriler Zwischenfälle assoziiert [56]. Auch bei fresh frozen plasma (FFP) korreliert die Leukozytenkontamination mit dem Spiegel von Entzündungsmediatoren und wird für die Induktion klinisch relevanter Zwischenfälle verantwortlich gemacht [56]. Neuere Studien zeigen eine abgeschwächte Leukozyten-Endothel-Interaktion unter Einfluß von FFP [59]. Der meist klinisch wenig relevante Anstieg der Mediatoren gewinnt bei FFP durch die Lyse der Leukozyten (durch Einfrieren/Tauen) an Bedeutung [58]. Die Aktivierung der im Wundblut enthaltenen Leukozyten wird bei Autotransfusion und HLM durch den Kontakt mit Fremdoberflächen und Zentrifugation ausgelöst [14]. Durch den Waschvorgang des Cellsaver 5 und ähnlicher Geräte werden die ursprünglich hohen Mediatorkonzentrationen jedoch nahezu komplett eliminiert [4;76], so dass sie im Gegensatz zur Autotransfusion von gefiltertem, nicht zentrifugiertem Wundblut keine klinisch relevante Rolle mehr spielen [76]. Demgegenüber können die enthaltenen Leukozyten durch Zentrifugation nur unvollständig eliminiert werden. Dies zeigen unsere Ergebnisse ebenso wie Beobachtungen in früheren Untersuchungen [10].

Obwohl eine Leukozyten-Depletion des mediastinalen Wundblutes bei Operationen an der HLM benefizielle Effekte auf die pulmonale Oxygenierung zu haben scheint [8;28], ist bisher unbekannt ob die maschinelle Autotransfusion zu einer veränderten Leukozytenakkumulation im Gewebe führt. Auch die Ergebnisse aus Studien zur HLM können diesbezüglich keine validen Informationen liefern. Zum Einen handelt es sich hierbei um ungewaschenes Wundblut aus der HLM, zum Anderen beinhaltet mediastinales Blut außerordentlich hohe Zytokinkonzentrationen [24;80].

Neben der vermehrten Zytokinfreisetzung beschrieben Connall et al. eine gesteigerte Expression der leukozytären Adhäsionsmoleküle CD11b und CD18 [15]. Ob diese Induktion der  $\beta_2$ -Integrine im aufgearbeiteten Wundblut auch zu einer vermehrten Leukozytenadhäsion führt, wurde in dieser Studie allerdings

nicht untersucht. Aus Untersuchungen zu den Effekten von Endotoxin auf die Leukozytenadhäsion ist vielmehr bekannt, dass die Affinität der  $\beta_2$ -Integrine trotz gesteigerter Expression nach Zellaktivierung vermindert sein kann, so dass die Adhäsion gegenüber nicht aktivierten Leukozyten abnimmt [71]. Darüber hinaus untersuchten Connall et al. nicht die Expression von L-Selektin, das nach Zellaktivierung gewöhnlich von der Zelloberfläche abgespalten wird und eine besondere Bedeutung für die initiale Adhäsion bei hohen Strömungsgeschwindigkeiten und Scherkräften besitzt [21;43;46;75].

Gegenstand unserer Untersuchung war daher die gleichzeitige Untersuchung von Zellaktivierung und ihrer funktionellen Bedeutung für die resultierenden Interaktionen zwischen Leukozyten und Gefäßwand. Die Bedeutung der Adhäsion von Leukozyten an die Endothelzellen wird deutlich wenn man Endotheldysfunktion und konsekutive Organschäden bei Sepsis und Schock oder bei Zuständen nach Reperfusion betrachtet [11;12;31]. Wir entnahmen von 27 Patienten einer orthopädischen Abteilung eine Probe des aufbereiteten Autotransfusats und als Kontrolle eine venöse Blutprobe. Über die Untersuchungen von Connall et al [15] hinaus bestimmten wir die Expression der Integrine CD11b und CD18, ferner die von CD62L (L-Selektin).

Die Adhäsion der Leukozyten wurde im Flusskammermodell mikroskopisch beobachtet und ausgewertet. Hierbei wurden Scherkräfte erzeugt, die einem weiten Bereich der in vivo auftretenden postkapillären Strömungsverhältnisse entsprechen. Während die Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit denen von Connall et al. [15] zu vergleichen sind, gibt es zum funktionellen Einfluß auf die leukozytäre Adhäsion an Endothelzellen bislang keine weiteren Resultate. Eine Studie beschreibt einen positiven Einfluß auf die mikrorheologischen Eigenschaften des Autotransfusats nach Leukozytenfiltration [17]. Als Kriterium wurde in dieser Arbeit allerdings die Passage des untersuchten Blutes durch einen Mikrofilter herangezogen. Beurteilt wurde somit die Entstehung nicht filtrierbarer Zellaggregate und nicht die eigentlich relevante Variable der Leukozytenadhäsion, die Interaktion mit dem Endothel. Die Einzigartigkeit

unserer Arbeit ergibt sich somit aus der Kombination der beiden beschriebenen Versuchsteile, die eine Beurteilung der Leukozytenaktivierung und der relevanten funktionellen Folgen unter physiologischen Strömungsbedingungen zulassen. Von herausragender Bedeutung für die funktionellen Veränderungen der leukozytären Adhäsion ist hierbei der Vollblutansatz im Flusskammerversuch.

Unsere immunologischen Bestimmungen zeigten für CD11b einen Anstieg um +210% für alle Leukozyten ( $p \leq 0,01$ ), die Subpopulationen stiegen um +189% (PMN;  $p \leq 0,01$ ) bzw. +26% (Monozyten;  $p \leq 0,05$ ). Connall et al beschrieben für neutrophile Granulozyten einen 3,3-fachen Anstieg, 3,2-fach für Monozyten ( $p \leq 0,05$ ) [15]. Das von uns zusätzlich bestimmte CD62L wies einen Verlust von -40% für alle Leukozyten, -33% für PMN und -84% für Monozyten ( $p \leq 0,01$ ). Dieses Molekül wurde von Connall et al nicht untersucht, der Verlauf ist jedoch typisch für Einflüsse durch Zentrifugation [15;48].

Die Fluoreszenzwerte unserer Transfusatproben für CD18 sanken bei Gesamtleukozyten und PMN geringfügig ab, ohne statistische Signifikanz. Monozyten zeigten um -34% geringere Expression als venöses Blut ( $p \leq 0,05$ ). Hierzu im Vergleich ermittelten Connall et al einen Anstieg der CD18-Werte um das 3,2-fache bei Neutrophilen, das 2,5-fache bei Lymphozyten (jeweils  $p \leq 0,05$ ). Die Monozyten stiegen um das 4,5-fache ohne statistische Signifikanz [15].

Zusammenfassend ist dies als Ausdruck einer Aktivierung der Moleküle CD11b und CD62L zu bewerten, wie sie nach Aktivierung mit proinflammatorischen Mediatoren, Endotoxin oder nach Zentrifugation wiederholt beschrieben wurden [47;48]. CD18 zeigte keine dieser Tendenz folgende Entwicklung. Eine Begründung für die unterschiedliche Aktivierung der beiden Integrine kann auch nach Studium der einschlägigen Literatur nicht gegeben werden. Während unsere Vergleichskontrolle venöses Blut enthielt, arbeiteten Connall et al mit arteriellem Blut [15].

Im Flusskammermodell wiesen Leukozyten aus Retransfusat modifizierte Adhäsionseigenschaften auf. Während bei niedrigen shear rates alle gemessenen Parameter wie Adhäsion pro Fläche, Rolling Geschwindigkeit und Rolling fraction für ein beeinträchtigtes Leukozyten-Recruitment durch Reduktion des Sticking sprechen, zeigt das ermittelte Rolling pro Fläche lediglich im hohen Scherkraftbereich eine signifikant niedrigere Ausbeute. Das verminderte Sticking zeigt, dass die Adhäsion der aufgearbeiteten Leukozyten trotz Zellaktivierung deutlich vermindert ist. Die weitere Analyse des Rolling weist auf die zu Grunde liegenden Mechanismen auf molekularer Ebene hin.

Da L-Selektin nur bei hohen shear rates eine besondere Bedeutung für die Einleitung des Rolling besitzt [75], äußerte sich der Verlust von der Zelloberfläche nur bei einer shear rate von  $300 \text{ s}^{-1}$ . Bei niedrigen shear rates wurde der Verlust durch die Bindungen der endothelialen Selektine E- und P-Selektin kompensiert. Dies spiegelt die in früheren Untersuchungen beschriebene Redundanz der verschiedenen Selektine wider [44].

Die Vermutung, dass dem verminderten Sticking eine beeinträchtigte Effektivität der Integrin-Bindung trotz gesteigerter CD11b-Expression zu Grunde liegen muss, wird durch die Ergebnisse zur Rolling fraction und zur Rolling-Geschwindigkeit unterstützt.

Als Zeichen eines verminderten Übergangs von Selektin-abhängigem Rolling zu Integrin-abhängigem Sticking besteht in der Transfusat-Gruppe bei jeder shear rate eine signifikant höhere Rolling fraction. Diese bleibt in der Transfusat-Gruppe selbst bei deutlich erniedrigter shear rate bei 60 %, wogegen sie in der Vollblut-Kontrolle auf 29 % abnimmt. Ursache einer solchen Reduktion der Rolling fraction ist die zunehmende Dominanz Integrin-abhängiger Bindungen bei niedriger shear rate [19;41;57], die bei den aktivierten Leukozyten der Transfusat-Gruppe nicht beobachtet werden konnte. Eine vermehrte Dominanz Integrin-abhängiger Bindungen äußert sich in einer progredienten Reduktion der Rolling-Geschwindigkeit [19;43], wie auch wir sie in der Vollblut-Kontrolle

mit sinkender shear rate beobachten konnten. Ebenso wie im Falle der Rolling fraction zeigt die Konstanz der Rolling-Geschwindigkeit in der Transfusat-Gruppe, dass der Wechsel von Selektin-vermitteltem Rolling zu effektivem Integrin-vermitteltem Sticking durch die maschinelle Autotransfusion erheblich beeinträchtigt wird.

Die signifikant höhere Ablöserate im Detachment assay weist darauf hin, dass selbst die aufgebauten Integrin-Bindungen in der Transfusat-Gruppe erheblich weniger effektiv sind und einer Steigerung der shear rate nicht wirkungsvoll widerstehen können.

Während bislang lediglich eine Steigerung der Integrin-Expression im Autotransfusat bekannt war [15], konnten wir bei ähnlichem Expressionsmuster nachweisen, dass die Leukozyten in ihrer Abwehrfunktion deutlich reduziert sind. Ein beeinträchtigtes Leukozyten-Recruitment stellt eine schwerwiegende Beeinträchtigung des Immunsystems dar. Dies wird insbesondere durch die Neigung zu schweren Infektionen und die reduzierte Lebenserwartung von Patienten mit angeborenen Defiziten der Integrinsynthese deutlich [20]. Die in unserer Untersuchung beobachtete Reduktion des Sticking um circa 65 % entspricht einer Verminderung des Recruitment, wie sie nach Gabe monoklonaler Antikörper oder in knock-out-Tieren gefunden wird [13].

Die klinische Relevanz dieser Befunde wird von der Menge des umgesetzten Wundblutes abhängen. Bei großem Blutumsatz, wie er beispielsweise bei der thorakoabdominalen Aorten Chirurgie zu erwarten ist, kann jedoch angesichts der vorliegenden Ergebnisse und des Fehlens tierexperimenteller Studien eine klinisch relevante Immunsuppression nicht ausgeschlossen werden.

### **4.3. Schlussfolgerung**

Beim Vergleich der Patienten-Blutproben aus venösem Vollblut und aufbereitetem Transfusat ermittelten wir eine Leukozytenkontamination von ca.

54% des Vollblut-Ausgangswertes im Transfusat. Wie zu erwarten zeigten die verbliebenen Leukozyten veränderte Oberflächeneigenschaften, die sich sowohl in der Adhäsion an TNF $\alpha$ -stimulierten HUVEC als auch in der Expression hierfür benötigter Adhäsionsmoleküle nachweisen ließen. Dies kann als Resultat der mechanischen Einwirkungen auf die Leukozyten während der Aufbereitung des Wundblutes gewertet werden. Wie in den vergleichbaren Beispielen Hämodialyse, Herz-Lungen-Maschine oder Verfahren zur Zellseparation zu beobachten [10;14;70], findet auch während der Herstellung maschinellen Retransfusates eine Aktivierung verbliebener Leukozyten statt [10;30].

Im *in-vitro*-Modell Flusskammer zeigten die Leukozyten des Transfusats erheblich verminderte Fähigkeit zur festen Adhäsion. Im low shear Bereich, von Integrinen vermittelt, zeigten sich erheblich geringere Zellzahlen pro Endothelfläche (Sticker), was auf eine verminderte Affinität der Integrine hinweist. Der besonderen Bedeutung des L-Selektin für die Adhäsion bei hohen shear rates entsprechend, wurde das Rolling in der Transfusat-Gruppe lediglich bei physiologischen shear rates beeinträchtigt. Eine reduzierte Rolling fraction wie auch eine bei niedrigster Flussrate höhere Geschwindigkeit des Rolling weisen wiederum auf die verminderte Affinität und Effizienz der Integrin-Bindungen hin. Die Funktionseinbuße bewirkt einen schlechteren Übergang vom Rolling zum Sticking. Die Differenzen im Adhäsionsverhalten stiegen, je geringer die einwirkenden Scherkräfte waren. Die entstandenen Bindungen zwischen Leukozyten und Endothel erwiesen sich im Ablösungsversuch (Detachment assay) als in ihrer Stabilität beeinträchtigt, was ebenfalls als verminderte Effizienz der für diesen Adhäsionsschritt entscheidenden Integrine interpretiert werden kann.

Die Untersuchung der Oberflächenmerkmale per Durchflusszytometrie ergaben die erwarteten Anzeichen der Zellaktivierung. Während CD18 nahezu unveränderte Werte zwischen Vollblut und Transfusat aufwies, stieg das bei Aktivierung schneller reagierende CD11b bei allen untersuchten Leukozyten-

Subpopulationen signifikant an ( $p \leq 0,01$ ). Ebenfalls konnten bei CD62L (L-Selektin) Anzeichen der Stimulation nachgewiesen werden. Die reduzierte Expression des Moleküls nach Aktivierung wurde bei PMN und Monozyten gemessen und wird in der Literatur als shedding beschrieben [3].

Obwohl die Eigenschaften der Transfusat-Leukozyten im höheren Flussbereich weniger beeinträchtigt wurden, muss das verminderte Sticking trotz hoch reguliertem CD11b als funktionelles Defizit bei geringerer Affinität des Integrins zu seinen endothelialen Liganden interpretiert werden. Als Konsequenz ergibt sich für Empfänger von maschinellm Autotransfusat eine mögliche Beeinträchtigung der Abwehrleistung, die bei größerem Blutumsatz durchaus klinische Relevanz besitzen könnte.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen der Infektabwehr ist die Fähigkeit zum Verlassen des Blutstromes für Leukozyten obligat. Hierbei ist das Zusammenspiel zwischen Leukozyten und den Endothelzellen der Gefäßwand von Bedeutung. Ausgelöst vom Kontakt mit Endotoxinen, exogenen Oberflächenstrukturen und körpereigenen Zytokinen exprimieren die beteiligten Zellen Adhäsionsmoleküle an ihrer Oberfläche [16;21]. Dies führt zu Zellkontakten und zur Ausbildung von interzellulären Bindungen die den im Gefäß vorherrschenden Scherkräften entgegenwirken können. Nach dem Rolling und dem Sticking am Endothel transmigrieren aktivierte Leukozyten aus dem Blutkreislauf .

Ebenso wie inflammatorische Reize durch Bakterien und Zytokine wirken auch mechanische Reize durch Kontakt mit Fremdoberflächen, Filtration und Zentrifugation stimulierend auf Leukozyten und induzieren auf diese Weise die Aktivierung adhäsiver Oberflächenmoleküle. Leukozytenstimulierende Effekte bei anderen Verfahren wie Hämodialyse oder dem extrakorporalen Kreislauf der Herz-Lungen-Maschine können auch bei maschineller Autotransfusion erzeugt werden. Die darauffolgende Interaktion mit dem Endothel der Gefäßwand kann zu Störungen der Mikrozirkulation und zu Gewebeschäden führen [33]. Während erhöhte Zytokinspiegel im aufbereiteten Wundblut mehrfach bestimmt worden waren, wurde den Funktionsstörungen der Leukozyten bisher wenig Aufmerksamkeit geschenkt.

Da Berichte über pulmonale Funktionsstörungen, systemische Entzündungsreaktion, Herz-Kreislauf-Versagen und Schock nach Autotransfusion vorliegen, wollten wir die funktionellen und immunologischen Auswirkungen auf die Leukozyten im Transfusat näher untersuchen. Von Patienten mit orthopädischen Eingriffen, bei denen intraoperativ das Autotransfusionsgerät Cellsaver5 zum Einsatz kam, entnahmen wir eine Probe Transfusatblut und als Referenz vor Einleitung der Narkose die gleiche Menge venösen Blutes. Nachdem die Aufbereitung des Retransfusates unter

standardisierten Bedingungen durchgeführt wurde, erfolgte umgehend die experimentelle Untersuchung im Labor.

Zum Vergleich der Rheologie und der Oberflächenexpression von leukozytären Adhäsionsmolekülen wurden nach Bestimmung von Leukozytengehalt und Hämatokrit jeweils Proben der Durchflusszytometrie und dem Vollblutversuch an der Flusskammer zugeführt. Die Expression der Adhäsionsmoleküle CD62L (L-Selektin) sowie CD11b und CD18 wurden als Zielgrößen zum Nachweis eines aktivierenden Stimulus durchflusszytometrisch bestimmt. Die Bedeutung der aufgeführten Oberflächenmerkmale für die Leukozyten-Endothel-Interaktion ist vielfach nachgewiesen worden [16;38;43].

Zur Untersuchung der Zelladhäsion unter Flussbedingungen die denen im Bereich postkapillärer Venolen nahekommen, perfundierten wir Blut in einer parallel flow chamber über TNF $\alpha$ -stimulierte (4 h; 25 ng/ml) HUVEC. Beginnend mit hohen Flussraten strömten die Blutproben jeweils 5 min bei shear rates von 300, 200, 100 und 50 s<sup>-1</sup> über das Endothel. Die Leukozyten wurden vorher mit Calcein AM angefärbt, so dass die Adhäsion in der mikroskopierbaren Flusskammer unter Fluoreszenz-Licht sichtbar gemacht werden konnten. Im Anschluß an die 5 Versuchsminuten werteten wir von 5 Bildfeldern jeweils 10 Sekunden aus. Abschließend ermittelten wir in einem Ablösungsversuch (Detachment assay) die Stabilität der Bindungen bei steigenden Flussraten. Der gesamte Vorgang wurde über eine Kamera auf Videobändern gespeichert und digitalisiert einer Software zur Bildanalyse zugeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Ein-Stichproben t-Test und Covarianzanalyse. Beim Detachment assay wurden die Ablöseraten der jeweiligen shear rates mittels maximum likelihood bestimmt.

Im Flusskammerversuch zeigten die Leukozyten im Transfusat gegenüber Vollblut-Leukozyten vor allem im Bereich niederer shear rates ein schwächer ausgeprägtes Sticking (feste Adhärenz). Die Unterschiede in Zellzahlen pro Fläche sowie der Rolling fraction waren signifikant und nahmen mit sinkender

Flussrate zu. Dieser Effekt kann durch verminderte Effizienz der in diesem Bereich entscheidenden Integrine erklärt werden. Rollende Zellen pro Fläche wurden im Transfusat lediglich bei der höchsten shear rate signifikant geringer gemessen. Dieser Scherkraftbereich stellt eine Domäne des L-Selektin dar, welches in unserer Untersuchung vermindert exprimiert wurde. Das Geschwindigkeitsprofil der rollenden Leukozyten unterschied sich bei der geringsten shear rate. Hier bewegten sich die im Transfusat verbliebenen Zellen signifikant schneller, was sich anschließend im verminderten Sticking fortsetzt. Die Stabilität der eingegangenen Bindungen zwischen Leukozyten und Endothel zeigte sich bei Transfusat-Leukozyten reduziert. Bei 100, 200 und 800  $s^{-1}$  löste sich jeweils ein signifikant höherer Anteil der vorher adhären Zellen ab was als weiterer Hinweis auf eine verminderte Integrin-Effizienz zu werten ist.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigten beim Transfusat eine verringerte Oberflächenexpression von CD62L. Dieses shedding wurde für Leukozyten bereits mehrfach als Ausdruck erfolgter Aktivierung beschrieben [3;48]. Die Bestimmung der Integrine zeigte eine signifikante Hochregulierung des CD11b bei allen Subpopulationen, während CD18 unverändert blieb bzw. bei den Monozyten sogar absank.

Abschließend bewertet ergibt sich für die Leukozyten im Transfusat eine ausgeprägte Aktivierung, im Adhäsionsvermögen an Endothelzellen allerdings eine deutliche Funktionseinbuße. Der Aufbau stabiler interzellulärer Bindungen vor allem der leukozytären Integrine mit ihren endothelialen Liganden scheint nachhaltig gestört. Das Ergebnis weist auf eine Beeinträchtigung der Abwehrleistung hin. Die klinische Relevanz wird wahrscheinlich vom umgesetzten Blutvolumen abhängen und sollte in tierexperimentellen Studien weiter untersucht werden. Während die Zytokinkontamination des Transfusates in klinischen Untersuchungen keine relevanten negativen Effekte verursachte, stehen ähnliche Studien zur Bedeutung der gestörten Leukozytenadhäsion bislang aus.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abbitt KB, Nash GB. Characteristics of leucocyte adhesion directly observed in flowing whole blood in vitro. *Br.J.Haematol.* 2001; **112**: 55-63.
2. Abbitt KB, Rainger GE, Nash GB. Effects of fluorescent dyes on selectin and integrin-mediated stages of adhesion and migration of flowing leukocytes. *J.Immunol.Methods* 2000; **239**: 109-19.
3. Allport JR, Ding HT, Ager A, Steeber DA, Tedder TF, Luscinskas FW. L-selectin shedding does not regulate human neutrophil attachment, rolling, or transmigration across human vascular endothelium in vitro. *J.Immunol.* 1997; **158**: 4365-72.
4. Amand T, Pincemail J, Blaffart F, Larbuisson R, Limet R, Defraigne JO. Levels of inflammatory markers in the blood processed by autotransfusion devices during cardiac surgery associated with cardiopulmonary bypass circuit. *Perfusion* 2002; **17**: 117-23.
5. Arnestad JP, Bengtsson A, Bengtson JP, Johansson S, Redl H, Schlag G. Release of cytokines, polymorphonuclear elastase and terminal C5b-9 complement complex by infusion of wound drainage blood. *Acta Orthop.Scand.* 1995; **66**: 334-8.
6. Avall A, Hyllner M, Bengtson JP, Carlsson L, Bengtsson A. Postoperative inflammatory response after autologous and allogenic blood transfusion. *Anesthesiology* 1997; **87**: 511-6.
7. Bahra P, Rainger GE, Wautier JL, Nguyet-Thin L, Nash GB. Each step during transendothelial migration of flowing neutrophils is regulated by the stimulatory concentration of tumour necrosis factor-alpha. *Cell Adhes.Commun.* 1998; **6**: 491-501.
8. Bando K, Pillai R, Cameron DE *et al.* Leukocyte depletion ameliorates free radical-mediated lung injury after cardiopulmonary bypass. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 1990; **99**: 873-7.
9. Bardenheuer M, Frilling A, Massoudy P, Waydhas C, Nast-Kolb D. Blutersatz in der Chirurgie. *Chirurg* 2001; **72**: 1206-21.
10. Bentzien F, Brand JM, Rohrs E, Munkel H, Schmucker P. Mechanical autotransfusion procedures. The effect cytokines and leukocytes on washed erythrocyte concentrate. *Anaesthesist* 2000; **49**: 505-10.
11. Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G, Cecconi O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu.Rev.Med.* 1994; **45**: 361-78.

12. Boldt J, Muller M, Kuhn D, Linke LC, Hempelmann G. Circulating adhesion molecules in the critically ill: a comparison between trauma and sepsis patients. *Intensive Care Med.* 1996; **22**: 122-8.
13. Bullard DC. Knockout mice in inflammatory research. in Ley, K. (Ed): *Physiology of inflammation.* Oxford. Oxford University Press 2001; 381-401.
14. Cheung AK. Clinical phenomena induced by complement and leukocyte interactions with artificial surfaces. *J.Clin.Apheresis.* 1992; **7**: 147-8.
15. Connall TP, Zhang J, Vaziri ND, Kaupke CJ, Wilson SE. Leukocyte CD11b and CD18 expression are increased in blood salvaged for autotransfusion. *Am.Surg.* 1994; **60**: 797-800.
16. Cronstein BN, Weissmann G. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum.* 1993; **36**: 147-57.
17. Dalen T, Engstrom KG. Microrheology of filtered autotransfusion drain blood with and without leukocyte reduction. *Clin.Hemorheol.Microcirc.* 1999; **21**: 113-23.
18. Dalen T, Nilsson KG, Engstrom KG. Fever and autologous blood retransfusion after knee arthroplasty. *Acta Orthop.Scand.* 2002; **73**: 321-5.
19. Dunne JL, Ballantyne CM, Beaudet AL, Ley K. Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood* 2002; **99**: 336-41.
20. Dustin ML. Beta2-Integrins and their ligands in inflammation. in Ley, K. (Ed): *Physiology of inflammation.* Oxford. Oxford University Press 2001; 242-62.
21. Ebnet K, Vestweber D. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem.Cell Biol.* 1999; **112**: 1-23.
22. Eppihimer MJ, Granger DN. Ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelial interactions in postcapillary venules. *Shock* 1997; **8**: 16-25.
23. Fan FC, Chen RY, Schuessler GB, Chien S. Effects of hematocrit variations on regional hemodynamics and oxygen transport in the dog. *Am.J.Physiol* 1980; **238**: H545-22.
24. Flom-Halvorsen HI, Oevrum E, Tangen G, Brosstad F, Ringdal ML, Oeystese R. Autotransfusion in coronary artery bypass grafting: disparity in laboratory tests and clinical performance. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; **118**: 610-7.

25. Goldman AJ, Cox RG, Brenner H. Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall - II. Couette flow. *Chem Eng Sci* 1967; **22**: 653-60.
26. Goldsmith HL, Turitto VT. Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report-- Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb.Haemost.* 1986; **55**: 415-35.
27. Gopalan PK, Smith CW, Lu H, Berg EL, McIntire LV, Simon SI. Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin. *J.Immunol.* 1997; **158**: 367-75.
28. Gu YJ, de Vries AJ, Boonstra PW, van Oeveren W. Leukocyte depletion results in improved lung function and reduced inflammatory response after cardiac surgery. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 1996; **112**: 494-500.
29. Gu YJ, de Vries AJ, Vos P, Boonstra PW, van Oeveren W. Leukocyte depletion during cardiac operation: a new approach through the venous bypass circuit. *Ann.Thorac.Surg.* 1999; **67**: 604-9.
30. Handel M, Winkler J, Hornlein RF *et al.* Increased interleukin-6 in collected drainage blood after total knee arthroplasty: an association with febrile reactions during retransfusion. *Acta Orthop.Scand.* 2001; **72**: 270-2.
31. Harlan JM, Vedder NB, Winn RK, Rice CL. Mechanisms and consequences of leukocyte-endothelial interaction. *West J.Med.* 1991; **155**: 365-9.
32. Hentzen ER, Neelamegham S, Kansas GS *et al.* Sequential binding of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 defines neutrophil capture and stable adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Blood* 2000; **95**: 911-20.
33. Hill GE, Whitten CW. The role of the vascular endothelium in inflammatory syndromes, atherogenesis, and the propagation of disease. *J.Cardiothorac.Vasc.Anesth.* 1997; **11**: 316-21.
34. Ibbotson GC, Doig C, Kaur J *et al.* Functional alpha4-integrin: a newly identified pathway of neutrophil recruitment in critically ill septic patients. *Nat.Med.* 2001; **7**: 465-70.
35. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J.Clin.Invest* 1973; **52**: 2745-56.
36. Kato T. Relation between blood viscosity and hematocrit in rabbits subjected to repeated treatment with endotoxin. *Resuscitation* 1991; **21**: 61-6.

37. Krohn CD, Reikeras O, Aasen AO. Inflammatory cytokines and their receptors in arterial and mixed venous blood before, during and after infusion of drained untreated blood. *Transfusion Medicine* 1999; **9**: 125-130.
38. Kuijpers TW, Hakkert BC, Hoogerwerf M, Leeuwenberg JF, Roos D. Role of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and platelet-activating factor in neutrophil adherence to IL-1-prestimulated endothelial cells. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-mediated CD18 activation. *J.Immunol.* 1991; **147**: 1369-76.
39. Lawrence MB. In vitro flow models of leukocyte adhesion. in Ley,K. (Ed): *Physiology of inflammation*. Oxford. Oxford University Press 2001; 204-21.
40. Lawrence MB, McIntire LV, Eskin SG. Effect of flow on polymorphonuclear leukocyte/endothelial cell adhesion. *Blood* 1987; **70**: 1284-90.
41. Lawrence MB, Smith CW, Eskin SG, McIntire LV. Effect of venous shear stress on CD18-mediated neutrophil adhesion to cultured endothelium. *Blood* 1990; **75**: 227-37.
42. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991; **65**: 859-73.
43. Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc.Res.* 1996; **32**: 733-42.
44. Ley K. Leukocyte recruitment as seen by intravital microscopy. in Ley,K. (Ed): *Physiology of inflammation*. Oxford. Oxford University Press 2001; 303-37.
45. Lundahl J, Hallden G, Hallgren M, Skold CM, Hed J. Altered expression of CD11b/CD18 and CD62L on human monocytes after cell preparation procedures. *J.Immunol.Methods* 1995; **180**: 93-100.
46. Luscinckas FW, Ding H, Tan P, Cumming D, Tedder TF, Gerritsen ME. L- and P-selectins, but not CD49d (VLA-4) integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow in vitro. *J.Immunol.* 1996; **157**: 326-35.
47. Lynam EB, Simon SI, Rochon YP, Sklar LA. Lipopolysaccharide enhances CD11b/CD18 function but inhibits neutrophil aggregation. *Blood* 1994; **83**: 3303-11.
48. Macey MG, McCarthy DA, Vordermeier S, Newland AC, Brown KA. Effects of cell purification methods on CD11b and L-selectin expression as well as the adherence and activation of leucocytes. *J.Immunol.Methods* 1995; **181**: 211-9.

49. Melder RJ, Munn LL, Yamada S, Ohkubo C, Jain RK. Selectin- and integrin-mediated T-lymphocyte rolling and arrest on TNF-alpha-activated endothelium: augmentation by erythrocytes. *Biophys.J.* 1995; **69**: 2131-8.
50. Melder RJ, Yuan J, Munn LL, Jain RK. Erythrocytes enhance lymphocyte rolling and arrest in vivo. *Microvasc.Res.* 2000; **59**: 316-22.
51. Mitchell DJ, Li P, Reinhardt PH, Kubes P. Importance of L-selectin-dependent leukocyte-leukocyte interactions in human whole blood. *Blood* 2000; **95**: 2954-9.
52. Muller WA. The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo. *J.Leukoc.Biol.* 1995; **57**: 523-8.
53. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J.Exp.Med.* 1993; **178**: 449-60.
54. Munn LL, Melder RJ, Jain RK. Analysis of cell flux in the parallel plate flow chamber: implications for cell capture studies. *Biophys.J.* 1994; **67**: 889-95.
55. Munn LL, Melder RJ, Jain RK. Role of erythrocytes in leukocyte-endothelial interactions: mathematical model and experimental validation. *Biophys.J.* 1996; **71**: 466-78.
56. Muylle L, Joos M, Wouters E, De Bock R, Peetermans ME. Increased tumor necrosis factor alpha (TNF alpha), interleukin 1, and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: relationship between TNF alpha and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. *Transfusion* 1993; **33**: 195-9.
57. Neelamegham S, Taylor AD, Burns AR, Smith CW, Simon SI. Hydrodynamic shear shows distinct roles for LFA-1 and Mac-1 in neutrophil adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Blood* 1998; **92**: 1626-38.
58. Nielsen HJ, Reimert C, Pedersen AN *et al.* Leucocyte-derived bioactive substances in fresh frozen plasma. *Br.J.Anaesth.* 1997; **78**: 548-52.
59. Nohe B, Kiefer T, Ploppa A, Häberle H, Schröder T, Dieterich HJ. Effects of fresh frozen plasma on neutrophil-endothelial interactions. *Anesth Analg* 2003, **97**:216-21.
60. Nohe B, Zanke C, Johannes T, Kiefer T, Dieterich HJ. Effects of magnetic cell separation on monocyte adhesion to endothelial cells under flow. *APMIS* 2002; **110**: 299-308.
61. Parent C, Eichacker PQ. Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis. The role of adhesion molecules. *Infect.Dis.Clin.North Am.* 1999; **13**: 427-47, x.

62. Patel KD. Mechanisms of selective leukocyte recruitment from whole blood on cytokine-activated endothelial cells under flow conditions. *J.Immunol.* 1999; **162**: 6209-16.
63. Perry MA, Granger DN. Role of CD11/CD18 in shear rate-dependent leukocyte-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules. *J.Clin.Invest* 1991; **87**: 1798-804.
64. Perttola J, Leino L, Poyhonen M, Salo M. Leucocyte content in blood processed by autotransfusion devices during open-heart surgery. *Acta Anaesthesiol.Scand.* 1995; **39**: 445-8.
65. Reinhardt PH, Kubes P. Differential leukocyte recruitment from whole blood via endothelial adhesion molecules under shear conditions. *Blood* 1998; **92**: 4691-9.
66. Repo H, Harlan JM. Mechanisms and consequences of phagocyte adhesion to endothelium. *Ann.Med.* 1999; **31**: 156-65.
67. Repo H, Jansson SE, Leirisalo-Repo M. Flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo. *J.Immunol.Methods* 1993; **164**: 193-202.
68. Repo H, Jansson SE, Leirisalo-Repo M. Anticoagulant selection influences flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo and ex vivo. *J.Immunol.Methods* 1995; **185**: 65-79.
69. Sampath R, Kukielka GL, Smith CW, Eskin SG, McIntire LV. Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Ann.Biomed.Eng* 1995; **23**: 247-56.
70. Sandoval S, Alrawi S, Samee M *et al.* A cytokine analysis of the effect of cell saver on blood in coronary bypass surgery. *Heart Surg.Forum* 2001; **4**: 113-7.
71. Schmidt V. Wechselwirkungen zwischen Endotoxin und Hydrodynamik bei Leukozyten-Endothel-Interaktionen in vitro. Dissertation (im Druck) 2003.
72. Simon SI, Neelamegham S, Taylor A, Smith CW. The multistep process of homotypic neutrophil aggregation: a review of the molecules and effects of hydrodynamics. *Cell Adhes.Commun.* 1998; **6**: 263-76.
73. Singbartl K, Green SA, Ley K. Blocking P-selectin protects from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure. *FASEB J.* 2000; **14**: 48-54.
74. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; **76**: 301-14.

75. Taylor AD, Neelamegham S, Hellums JD, Smith CW, Simon SI. Molecular dynamics of the transition from L-selectin- to beta 2-integrin-dependent neutrophil adhesion under defined hydrodynamic shear. *Biophys.J.* 1996; **71**: 3488-500.
76. Tylman M, Bengtson JP, Avall A, Hyllner M, Bengtson A. Release of interleukin-10 by reinfusion of salvaged blood after knee arthroplasty. *Intensive Care Med.* 2001; **27**: 1379-84.
77. van de Watering LM, Hermans J, Houbiers JG *et al.* Beneficial effects of leukocyte depletion of transfused blood on postoperative complications in patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical trial. *Circulation* 1998; **97**: 562-8.
78. Vedder NB, Harlan JM. Increased surface expression of CD11b/CD18 (Mac-1) is not required for stimulated neutrophil adherence to cultured endothelium. *J.Clin.Invest* 1988; **81**: 676-82.
79. Vedder NB, Winn RK, Rice CL, Chi EY, Arfors KE, Harlan JM. A monoclonal antibody to the adherence-promoting leukocyte glycoprotein, CD18, reduces organ injury and improves survival from hemorrhagic shock and resuscitation in rabbits. *J.Clin.Invest* 1988; **81**: 939-44.
80. Walpoth BH, Eggensperger N, Hauser SP. Effects of unprocessed and processed cardiopulmonary bypass blood retransfused into patients after cardiac surgery. *Int J Artif Organs* 1999; **22**: 210-216.
81. Wikman A, Lundahl J, Fernvik E, Shanwell A. Altered expression of adhesion molecules (L-selectin and Mac-1) on granulocytes during storage. *Transfusion* 1994; **34**: 167-71.
82. Williamson KR, Taswell HF. Intraoperative blood salvage. A review. *Transfusion* 1991; **317**: 662.
83. Winn RK, Mihelcic D, Vedder NB, Sharar SR, Harlan JM. Monoclonal antibodies to leukocyte and endothelial adhesion molecules attenuate ischemia-reperfusion injury. *Behring Inst.Mitt.* 1993; 229-37.
84. Winn RK, Vedder NB, Mihelcic D, Flaherty LC, Langdale L, Harlan JM. The role of adhesion molecules in reperfusion injury. *Agents Actions Suppl* 1993; **41**: 113-26.
85. Yoshida N, Yoshikawa T, Nakamura Y *et al.* Interactions of neutrophils and endothelial cells under low flow conditions in vitro. *Shock* 1997; **8**: 125-30.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

|              |   |
|--------------|---|
| Calcein AM   | Calcein-acetoxymethylester                      |
| CD           | Cluster of Differentiation                      |
| CRP          | C-reaktives Protein                             |
| DMSO         | Dimethylsulfoxid                                |
| Ery          | Erythrozyten                                    |
| FACS         | Fluorescence Activated Cell Sorting             |
| FBS          | Fetal Bovine Serum                              |
| FFP          | Fresh Frozen Plasma                             |
| FITC         | Fluorescence Iso Thio Cyanat                    |
| FSC          | Forward Scatter                                 |
| Hb           | Hämoglobin                                      |
| HBSS         | Hanks Buffered Saline Solution                  |
| Hkt          | Hämatokrit                                      |
| HLM          | Herz-Lungen-Maschine                            |
| HUVEC        | Human Umbilical Vein Endothelial Cells          |
| ICAM-1       | Inrtercellular Adhesion Molecule-1              |
| Ig           | Immunglobulin                                   |
| IL           | Interleukin                                     |
| Leuko        | Leukozyten                                      |
| MFI          | Mediane der Fluoreszenzintensität               |
| MW           | Mittelwert                                      |
| PBS          | Phosphate Buffered Saline                       |
| PC5          | Tandemkonjugat aus R-Phycoerythrin mit Cyanin-5 |
| PECAM        | Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1   |
| PMN          | Polymorphonuclear Leukocyte                     |
| RT           | Raumtemperatur                                  |
| SSC          | Sideward Scatter                                |
| Thr          | Thrombozyten                                    |
| TNF $\alpha$ | Tumor Nekrose Faktor $\alpha$                   |
| TNS          | Trypsin Neutralizing Solution                   |
| VCAM-1       | Vascular Cell Adhesion Molecule-1               |

## 8. Danksagung

Bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Klaus Unertl, ärztlicher Direktor der Abteilung für Anaesthesiologie und Intensivmedizin am Universitätsklinikum Tübingen möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas bedanken.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Boris Nohé bedanken. Er leitete mich im klinischen und experimentellen Versuchsteil an und begleitete das Entstehen der Dissertation mit größtem Einsatz. Er stand mir jederzeit mit fachlichem und persönlichem Rat zur Seite.

Herrn Christof Zanke gebührt ebenfalls mein besonderer Dank für die stets gewährte Unterstützung im Bereich der Bild- und Datenverarbeitung sowie im technischen Bereich, Herrn Dr. rer. nat. Martin Eichner für die statistische Aufarbeitung. Bei der Patientenauswahl und –aufklärung sowie der Durchführung des klinischen Versuchsteils war mir Frau Dr. med. Annette Ploppa stets mit großem Engagement eine große Hilfe.

Für die freundliche Unterstützung bedanke ich mich ebenfalls bei Herrn Dr. med. Hans-Jürgen Dieterich, Herrn Professor Dr. rer. nat. Jürgen Tomiuk sowie Herrn Klaus Ferstl.

Ich bedanke mich bei allen weiteren Mitarbeitern des anaesthesiologischen Labors, insbesondere für die große Unterstützung von Frau Alice Mager und Frau Michaela Hoch-Gutbrod und das angenehme Arbeitsklima. Mein Dank gilt ebenso allen hier nicht erwähnten Personen, die an der Entstehung der Arbeit beteiligt waren.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

|                     |                                  |
|---------------------|----------------------------------|
| Name                | Reiner Ries                      |
| Geburtstag          | 21. Februar 1965                 |
| Geburtsort          | Schrozberg, Lkr. Schw. Hall, (D) |
| Staatsangehörigkeit | deutsch                          |

### Schulbildung

|           |                           |
|-----------|---------------------------|
| 1971-1975 | Grundschule Blaufelden    |
| 1975-1984 | Gymnasium Gerabronn       |
| 1984      | Allgemeine Hochschulreife |

### Medizinische Ausbildung

|             |   |
|-------------|---|
| 1984-1986   | Medizinstudium (Vorklinik) an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen und Eberhard-Karls-Universität Tübingen                            |
| 1986        | Ärztliche Vorprüfung  |
| 1986-1987   | Zivildienst an der Psychiatrischen Universitätsklinik Tübingen  |
| 1988-1990   | Medizinstudium (Klinik) an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  |
| 1990-2002   | Krankenpflegedienst an der Psychiatrischen Universitätsklinik Tübingen  |
| 1999-2000   | Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Tübingen (Anästhesie/Intensivmedizin) sowie am Kreiskrankenhaus Böblingen (Innere Medizin/Chirurgie) |
| 10/2000     | Ärztliche Prüfung   |
| seit 8/2002 | Arzt im Praktikum am Universitätsklinikum Tübingen (Anaesthesiologie/Intensivmedizin)   |

### Promotion

|              |  |
|--------------|--|
| seit 11/2000 | „Immunologische und rheologische Konsequenzen von Leukozytenkontaminationen bei maschineller Autotransfusion“, Abteilung für Anaesthesiologie und Intensivmedizin am Universitätsklinikum Tübingen |
|--------------|--|

**Famulaturen**

|      |   |
|------|---|
| 1988 | Innere Medizin, Städt. Krankenhaus Stockach |
| 1990 | Chirurgie, Kreiskrankenhaus Herrenberg      |
| 1990 | Anästhesie, Kreiskrankenhaus Herrenberg     |
| 1991 | Anästhesie, Praxis Dr. Markovic, Stuttgart  |

**Wissenschaftliche Tätigkeit, Auslandsaufenthalte**

|           |  |
|-----------|--|
| 1993-1995 | „Populationsgenetische Untersuchungen von Lemuren“, Klinische Genetik des Universitätsklinikums Tübingen<br>Dept. of Ecology and Genetics, University of Aarhus (DK)<br>Deutsches Primatenzentrum Göttingen<br>Forschungscamp bei Morondava (Madagaskar) |
|-----------|--|