

**Durchflußzytometrische  
Untersuchungen zur Funktion  
polymorphkerniger  
Granulozyten und Monozyten  
bei dem Krankheitsbild des  
Diabetes mellitus Typ II**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von: Tanja Wiebke Langefeld  
aus: Wattenscheid

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
Medizinische Klinik III und Poliklinik  
Leiter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Federlin  
Stellv. Komm. Leiter: Prof. Dr. med. R. G. Bretzel  
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität

Gutachter: Prof. Dr. Federlin

Gutachter: Prof. Dr. Gardemann

Tag der Disputation: 07. Mai 2001

*Meinen Eltern  
in Dankbarkeit*

<b>Inhaltsverzeichnis</b>		<b>Seite</b>
<b>1.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
2.1.	Der historische Kontext des Krankheitsbildes des Diabetes mellitus und die Rolle dieser Erkrankung in unserer Gesellschaft	9
2.2.	Wesentliche Komponenten des Immunsystems	11
2.3.	Der Einfluß des Diabetes mellitus auf das Immunsystem	14
2.4.	Überblick über die verschiedenen Methodiken zur Bestimmung der Phagozytosefunktion	14
2.5.	Zielsetzung dieser Dissertation	15
2.5.1.	Vorstellung des Phagozytoseassays	16
2.5.2.	Vorstellung des Tiermodells Ratte	16
2.5.3.	Vorstellung der klinischen Studie mit Typ II Diabetikern	17
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1	Phagozytostest	19
3.1.1.	Testprinzip	19
3.1.2.	Bakterienansatz	21
3.1.2.1.	Durchführung	21
3.1.2.2.	Verwendete Materialien	22
3.1.3.	Phagozytoseansatz	25
3.1.3.1.	Durchführung	25
3.1.3.2.	Verwendete Materialien	26
3.1.4.	Messung am Fluoreszenzdurchflußzytometer	27
3.1.4.1.	Prinzip der Messung am Fluoreszenzdurchflußzytometer	27
3.1.4.2.	Bakterienmessung	32
3.1.4.3.	Messung der Phagozytoseansätze	33
3.1.4.4.	Verwendete Materialien	35
3.1.5.	Datenanalyse	35
3.1.5.1.	Analyse der Bakterienmessung	35
3.1.5.2.	Analyse der Phagozytoseansätze	37

3.1.5.3.	Kontrolle der am FacScan gemessenen Bakterien und Phagozyten mittels Fluoreszenzmikroskop	39
<b>3.1.6.</b>	<b>Versuchsdurchführungen zur Etablierung des Phagozytoseassays</b>	40
3.1.6.1.	Versuche zur Ermittlung der geeigneten Bakterienart	40
3.1.6.2.	Versuche zur Inkubationszeit von Vollblut und Bakterien	40
3.1.6.3.	Kontrollversuche zur Überprüfung der am Durchflußzytometer gemessenen Ergebnisse	41
3.1.6.4.	Versuche zur Reproduktionssicherheit des Phagozytoseassays	41
<b>3.2.</b>	<b>Tiermodell</b>	42
<b>3.2.1.</b>	<b>Versuchstiere</b>	42
<b>3.2.2.</b>	<b>Blutentnahme bei der Cohen-Ratte</b>	42
<b>3.2.3.</b>	<b>Kontrolle der Stoffwechselfparameter bei der Cohen-Ratte</b>	43
3.2.3.1.	Bestimmung des Körpergewichtes der Ratten	43
3.2.3.2.	Bestimmung der Blutglucose	43
3.2.3.3.	Oraler Glucosetoleranztest	43
3.2.3.4.	Bestimmung des glycolisierten Hämoglobins (HbA 1c)	44
3.2.3.4.1.	Prinzip der Messung des HbA 1c	44
3.2.3.4.2.	Durchführung	44
3.2.3.4.3.	Verwendete Materialien	45
<b>3.2.4.</b>	<b>Die Rezeptur der Spezialdiät für die Auslösung des Diabetes mellitus Typ II bei der Cohen-Ratte</b>	46
3.2.4.1	Herstellung des Rattenfutters	46
3.2.4.2.	Verwendete Materialien	47
<b>3.2.5.</b>	<b>Versuchsdurchführung</b>	48
<b>3.3.</b>	<b>Klinische Studie mit Typ II-Diabetikern</b>	49
<b>3.3.1.</b>	<b>Probanden</b>	49
<b>3.3.1.</b>	<b>Versuchsdurchführung</b>	49
<b>4.</b>	<b>Statistische Methodik</b>	50
<b>4.1.</b>	<b>Vergleich unabhängiger Stichproben</b>	50
<b>4.2.</b>	<b>Methodik der bi- und multivarianten Statistik</b>	51
<b>4.2.1.</b>	<b>Überprüfung von Zusammenhängen</b>	51
<b>4.2.2.</b>	<b>Meßwiederholungsanalyse – Multivariate Varianzanalyse</b>	52

<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	53
<b>5.1.</b>	<b>Mittelwertunterschiede bei unabhängigen Stichproben</b>	53
5.1.1.	Geschlechtsmerkmale	53
5.1.2.	Typ II Diabetiker (Gruppeneinteilung anhand des C-Peptidgehalts)	55
<b>5.2.</b>	<b>Mittelwertunterschiede bei abhängigen Stichproben</b>	57
5.2.1.	Unterschiede der Bakterienarten	57
5.2.2.	Unterschiede der Auswertung (Mikroskop vs. apperative Auswertung)	57
5.2.3.	Reproduktionstest zur Überprüfung des Phagozytoseassays	58
5.2.3.1.	Reproduktionstest bei Granulozyten	58
5.2.3.2.	Reproduktionstest bei Monozyten	59
<b>5.3.</b>	<b>Ergebnisse der multivarianten Analyse</b>	61
5.3.1.	Korrelationsprüfung der Geschlechtsmerkmale	61
5.3.2.	Meßwiederholungsanalyse	62
<b>6.</b>	<b>Graphische Darstellung der Ergebnisse</b>	70
<b>6.1.</b>	<b>Phagozytosestest</b>	70
6.1.1.	Ermittlung der geeigneten Bakterienart	70
6.1.1.1.	Granulozyten	70
6.1.1.2.	Monozyten	72
6.1.2.	Ermittlung der geeigneten Inkubationszeit	74
6.1.2.1.	Granulozyten	74
6.1.2.2.	Monozyten	76
6.1.3.	Kontrollversuche zur Verifizierung der am Durchflußzytometer gemessenen Ergebnisse	77
6.1.4.	Versuche zur Reproduktionssicherheit des Phagozytoseassays	78
6.1.4.1.	Granulozyten	80
6.1.4.2.	Monozyten	81
<b>6.2.</b>	<b>Tiermodell: Die Cohen-Ratte</b>	82
6.2.1.	Glucoseparameter	82
6.2.2.	Phagozytoseparameter	87
<b>6.3.</b>	<b>Klinische Studie: Typ II-Diabetiker</b>	89

<b>7.</b>	<b>Diskussion</b>	92
7.1.	Diabetes mellitus und Infektionen	92
7.2.	Diabetes mellitus und Immunsystem	92
7.3.	Versuche zur Etablierung des Phagozytoseansatzes	93
7.4	Die Cohen-Ratte	96
7.5	Phagozytoseansätze bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II	98
<b>8.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	102
8.1.	Versuche zum Phagozytoseansatz	102
8.1.1.	Ermittlung der geeigneten Bakterienart	102
8.1.2.	Ermittlung der optimalen Inkubationszeit	103
8.1.2.1.	Ermittlung der Inkubationszeit bei Granulozyten	103
8.1.2.2.	Ermittlung der Inkubationszeit bei Monozyten	103
8.1.3.	Kontrollversuche zur Verifizierung der am Durchflußzytometer gemessenen Ergebnisse	103
8.1.4.	Versuche zur Reproduktionssicherheit des Mikroassays	104
8.2.	Tiermodell	104
8.3.	Klinische Studie: Typ II-Diabetiker	105
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	106
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	115
<b>11.</b>	<b>Curriculum vitae</b>	116

## 1. Abkürzungsverzeichnis

---

- AK** = Antikörper
- E. coli** = Escherichia coli DSM 1103 ATCC 25922
- FACS** = Fluoreszenzdurchflußzytometer
- FACScan** = Fluoreszenzdurchflußzytometer der Firma Becton & Dickinson
- FITC** = Fluoresceinisothiocyanat (grüner Fluoreszenzfarbstoff)
- FL1** = Fluoreszenz 1
- FL2** = Fluoreszenz 2
- FL3** = Fluoreszenz 3
- FSC** = Forward Scatter
- IDDM** = Insulinabhängiger Diabetes mellitus
- IL** = Interleukin
- NIDDM** = Nicht insulinabhängiger Diabetes mellitus
- oGTT** = Oraler Glucosetoleranztest
- Pbs** = Phosphate buffered saline
- PE** = Phycoerythrocin (oranger Fluoreszenzfarbstoff)
- PI** = Propidium Jodid (roter Fluoreszenzfarbstoff)
- PMN** = Polymorphkernige Neutrophile
- SSC** = Side Scatter
- Staph. aureus** = Staphylococcus aureus K807
- Strep** =  $\beta$ -hämolisierende Streptokokken der Gruppe A
- TNF** = Tumornekrosefaktor



## 2. Einleitung

---

### 2.1. Der historische Kontext des Krankheitsbildes des Diabetes mellitus und die Rolle dieser Erkrankung in unserer Gesellschaft

Der Begriff „Diabetes mellitus“ bezeichnet eine heterogene Gruppe von Störungen des Kohlehydratstoffwechsels, die zu einer Hyperglycämie im Nüchternzustand und in der postprandialen Phase führen. Das einheitliche Kennzeichen dieser unterschiedlichen Störungen ist ein absoluter oder relativer Insulinmangel (Herold G [Hrsg.], 1996).

In der Geschichte der Menschheit ist die Symptomatik des Diabetes mellitus seit Jahrtausenden bekannt. Bereits 1500 v. Chr. wird im *Ebers-Papyrus*, einem ägyptischen Handbuch mit Rezeptsammlung, ein Krankheitsbild mit übermäßigem Zuckerharnfluß beschrieben. Aus der brahmanischen Periode (800 v. Chr. bis 1000 n. Chr.) des Alten Indien stammt der Begriff des Honigurins bzw. des honigsüßen Durchflusses zur Beschreibung der, den Diabetes mellitus begleitenden, typischen Glucosurie. Avicenna (980 - 1037 n. Chr.) notierte zwei weitere Symptome im Zusammenhang mit der Erkrankung Diabetes mellitus:

- seelische, körperliche und sexuelle Schwäche
- Karbunkel und Gangrän (Avicenna, 1556\*).

Sprachlich stammt der Begriff Diabetes von dem griechischen Wort „diabainein“ ab, das „Hindurchlaufen“ bedeutet. Die erste Erwähnung wurde bei Demetrios von Apamaia (200 v. Chr.) gefunden (Schuhmacher H, 1961; Orth H, 1964). Mellitus leitet sich von dem lateinischen Wort „mel“ ab, das „mit Honig versüßt“ bedeutet. Mellitus ist im Zusammenhang mit Diabetes erstmals gegen Ende des 18. Jahrhunderts von J. P. Franck (Franck, 1794) gebraucht worden.

Obwohl die Symptome des Diabetes mellitus seit dem Altertum bekannt waren, konnte erst gegen Ende des 19. Jahrhunderts eine wissenschaftliche Erkenntnis der grundlegenden Prinzipien dieses Krankheitsbildes gewonnen und damit die Entwicklung effektiver Therapien möglich gemacht werden. Im Jahre 1890 wurde durch Pankreatektomie an Hunden von Mering und Minkowski eine Erkrankung des Pankreas' als Ursache des Diabetes mellitus nachgewiesen (von Mering J, Minkowski O, 1890). Die erste Insulinextraktion gelang 1922 Banting und Best (Banting FG, Best CH, 1922). Noch im selben Jahr konnte die erste erfolgreiche Behandlung mit exogenem Insulin bei dem 13jährigen Diabetiker Leonard Thomson durchgeführt werden. Innerhalb eines Tages fiel sein Blutzucker von 520 mg/dl auf 120 mg/dl und in den ersten 4 Monaten der Therapie nahm er 8 kg an Körpergewicht zu (Santiago JV, 1986). Damit war die Wirksamkeit der Insulintherapie bewiesen. Sie kam innerhalb kurzer Zeit weltweit zur Anwendung.

\* [Avicenna schrieb den „Liber cananis“ ab ca. 1000 n.Chr., der erste Buchdruck entstand 1556]

Der Diabetes mellitus ist ein global auftretendes Krankheitsbild. Die Bevölkerung der Industrienationen besitzt im Vergleich zu anderen Nationen das höchste Erkrankungsrisiko. Aber auch bei Fehl- bzw. Unterernährung der asiatischen und afrikanischen Populationen wird eine Häufigkeitszunahme des Diabetes mellitus beobachtet. In Deutschland beträgt die Prävalenz ca. 4% (Herold G [Hrsg.], 1996).

Im Jahr 1985 wurde eine einheitliche Klassifikation des Diabetes mellitus von der WHO eingeführt (Herold G [Hrsg.], 1996). Demnach unterscheidet man primäre und sekundäre Formen des Diabetes mellitus. Zu den primären Formen gehören der

- **Insulinabhängige Typ I Diabetes mellitus (IDDM)**  
und der
- **Nicht insulinabhängige Typ II Diabetes mellitus (NIDDM)**

Der Diabetes mellitus Typ I betrifft etwa 10 % aller Diabetiker. Er manifestiert sich vorwiegend im Jugendalter mit einer akut einsetzenden Symptomatik und ist pathophysiologisch durch einen absoluten Insulinmangel gekennzeichnet (IDDM). Pathomorphologisch kommt es zu einer Zerstörung der B-Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas, die durch Autoimmuninsulinitis hervorgerufen wird. Ätiologisch werden beim IDDM eine genetische Disposition, Autoimmunprozesse und verschiedene Manifestationsfaktoren diskutiert (Bretzel RG, 1988; Atkinson MA, MacLaren NK, 1990).

Der Diabetes mellitus Typ II tritt meist nach dem 40. Lebensjahr auf. Man unterscheidet den normalgewichtigen Typ IIa und den übergewichtigen Typ IIb. Diese Form der Erkrankung ist in ihrer Ätiopathogenese bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Als mögliche Ursachen gelten in erster Linie Adipositas, aber auch Schwangerschaft, Lebererkrankungen und die Vermehrung kontrainsulinärer Hormone, z.B. Steroide (Kortison), Glucagon und Somatostatin.

Der Erkrankungsbeginn des Diabetes mellitus Typ II verläuft langsamer als bei dem IDDM, wobei eine periphere Insulinresistenz pathophysiologisch relevant ist. Pathogenetisch führt eine Hyperalimentation von Kohlenhydraten zu einer konsekutiven Hyperinsulinämie mit Down-Regulation der peripheren Insulinrezeptoren. Daraus resultiert eine weitere Steigerung der Hyperinsulinämie, die schließlich eine Erschöpfung der B-Zellen des Pankreas verursacht (Gepts W, Veld PA, 1987; Barker CF, Naji A et al., 1982). Es herrscht ein relativer Insulinmangel vor (NIDDM).

Durch die konsequente Weiterentwicklung der Therapieformen, insbesondere der Insulintherapie, konnten die Akutfolgen, vor allem die Mortalität des Coma diabeticum von 75% auf 1% gesenkt werden (Bretzel RG, 1984). Dennoch ist die Lebenserwartung von Typ I Diabetikern um die Hälfte, die von Typ II Diabetikern um ein Drittel verringert. Sie wird

von der Entwicklung und dem Ausmaß der diabetischen Spätfolgen bestimmt (Federlin K, 1986a). So versterben 75% der Diabetiker durch Folgeschäden an Herz, Niere, zerebralem und peripherem Gefäßsystem (Deckert T, Poulson DE et al., 1978). Neben der relativ unspezifischen Makroangiopathie mit Früharteriosklerose und deren Folgeschäden, wie arterieller Hypertonus, Angina pectoris, Herzinfarkt, zerebralen Insulten und periphere AVK, kommt der diabetesspezifischen Mikroangiopathie mit ihren Manifestationen der Retinopathie, Nephropathie und der Neuropathie eine große Bedeutung zu (Federlin K, 1986a). Die Entwicklung der Spätfolgen gründet sich pathogenetisch auf der fehlenden Blutglucosehomöostase und hängt im Wesentlichen von der Stoffwechseleinstellung ab (Federlin K, Bretzel RG, 1984).

Diabetische Patienten zeigen darüberhinaus eine gehäufte Infektanfälligkeit (Wheat LJ, 1980), sodaß nach dem Einfluß des Krankheitsbildes Diabetes mellitus auf das Immunsystem gefragt werden muß.

Auf eine detaillierte Klassifizierung der sekundären Formen des Diabetes mellitus soll an dieser Stelle verzichtet werden, da sie für die weitere Betrachtung der vorliegenden Studie nicht relevant ist.

## **2.2. Wesentliche Komponenten des Immunsystems**

Das Immunsystem ist für seine Auseinandersetzung gegen eine mikrobiell besiedelte Außenwelt hervorragend ausgestattet. Zunächst stellt ein intaktes Haut- und Schleimhautmilieu eine wichtige Barriere dar. Ist diese überwunden, treten unspezifische humorale und zelluläre Abwehrmechanismen in Aktion (Kress, 1992).

Die unspezifische Abwehr ist zum Einen gegen Fremdstoffe, wie z.B. Bakterien, Viren und anorganische Partikel gerichtet. Zum Anderen können unter Umständen mit ihrer Hilfe körpereigene Stoffe, wie z.B. Erythrozytenrümmmer abgebaut werden.

Die unspezifische Abwehr gliedert sich in zwei Gruppen:

- die humorale Abwehr mit gelösten Stoffen, z.B. Proteinen (Lysozyme und Komplementfaktoren), Signalstoffen (Interleukine) und aggressiven Sauerstoffradikalen
- die unspezifische, zelluläre Abwehr mit Phagozyten (Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten) (Kress H, Eberlein T, 1992).

Neutrophile Granulozyten gehören zu den Leukozyten und werden im Knochenmark gebildet. Ihr Anteil an der Gesamtleukozytenzahl beträgt 60-70%. Ihre mittlere Lebensdauer beträgt etwa einen Tag und sie üben ihre Funktion nicht nur in Blut und Gewebe, sondern auch auf den Schleimhäuten des Körpers aus (Roitt IV, Brostoff J et al., 1991).

Die Neutrophilen enthalten einen hohen Anteil an Granula, die in azurophile und spezifische Komponenten unterteilt werden. Diese Granula enthalten, zur Abwehr von Mikroorganismen,

eine große Anzahl von Enzymen und Proteinen in unterschiedlicher Verteilung. Dazu gehören Myeloperoxidasen, Lysozyme, neutrale Proteinase, saure Hydrolasen und vieles mehr. Dringen z. B. Bakterien in Körpergewebe ein, werden die PMN durch chemische Fremdstoffe oder körpereigene Komplementfaktoren (C5a) angezogen (Chemotaxis). Im Blut zirkulierende Neutrophile heften sich an das Endothel der Gefäßwand (Margination) und durchwandern diese (Diapedese). Sie bewegen sich auf den geschädigten Bezirk im Gewebe zu (Migration), umschließen dort die Erreger und nehmen diese endozytotisch auf (Phagozytose) (Roitt IV, Brostoff J et al., 1991).

Obwohl die Bakterien direkt von den PMN gebunden werden können, kann der „Appetit“ der Neutrophilen bedeutend gesteigert werden, wenn die Erregeroberfläche mit dem Komplementfaktor C3b (unspezifisch), mit antigenspezifischen Immunglobulinen oder mit beiden „markiert“ wird (Opsonisierung). Aus diesen Vorgängen resultiert, zusammen mit einer erhöhten Durchblutung und einer vermehrten Kapillarpermeabilität für Proteine, die Entzündungsreaktion.

Die Abtötung der Bakterien bzw. deren Abbau in den Neutrophilen beruht sowohl auf sauerstoffabhängigen, als auch auf sauerstoffunabhängigen Mechanismen. Bei dem sauerstoffunabhängigen Abbau der Bakterien bilden Lysosomen (= Granula mit Lysozymen) zusammen mit den Phagosomen (= Vakuolen mit inkorporierten Mikroorganismen) die sogenannten Phagolysosomen. In diesen sinkt der pH-Wert in den sauren Bereich. Dieses Absinken hat zum Einen eine direkte schädigende Wirkung auf die Bakterien, zum Anderen stellt der saure pH-Wert ein Optimum für viele lysosomale Enzyme dar (Roitt IV, Brostoff J et al., 1991).

Bei dem sauerstoffabhängigen Abbau entstehen reaktive Sauerstoffdrivate, wie Sauerstoffoxidantien, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale. Diese Metabolite wirken mikrobizid (Roitt IV, Brostoff J et al., 1991). Normalerweise wird die Konzentration der Oxidantien durch reduzierende Enzyme, wie Katalasen und Superoxiddismutasen, auf niedrigem Niveau gehalten, um eine Eigenschädigung der Granulozyten und des umliegenden Gewebes zu verhindern. Bei einer Invasion von Erregern wird dieser Schutz aufgegeben, um die bakterizide Wirkung der Sauerstoffverbindungen voll zur Entfaltung zu bringen (oxidativer Burst). Bei diesem Vorgang können die PMN und die Zellen des umliegenden Gewebes zerstört werden (Silbernagel S, Despopoulos A, [Hrsg.] 1990).

Unverdauliche Partikel werden auf Dauer im Körper abgelagert.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß die neutrophilen Granulozyten schnell und in einer großen Anzahl zur Verfügung stehen. Ihre chemische Abwehrkraft ist jedoch schnell erschöpft und ihre Lebensdauer kurz. Sie bilden die wichtigste, erste Angriffswelle des Immunsystems in der Akutphase einer Infektion.

In einer zweiten, verzögerten Abwehrwelle phagozytieren dann die Monozyten bzw. Makrophagen die Reste, die von den Granulozyten übriggelassen worden sind, einschließlich

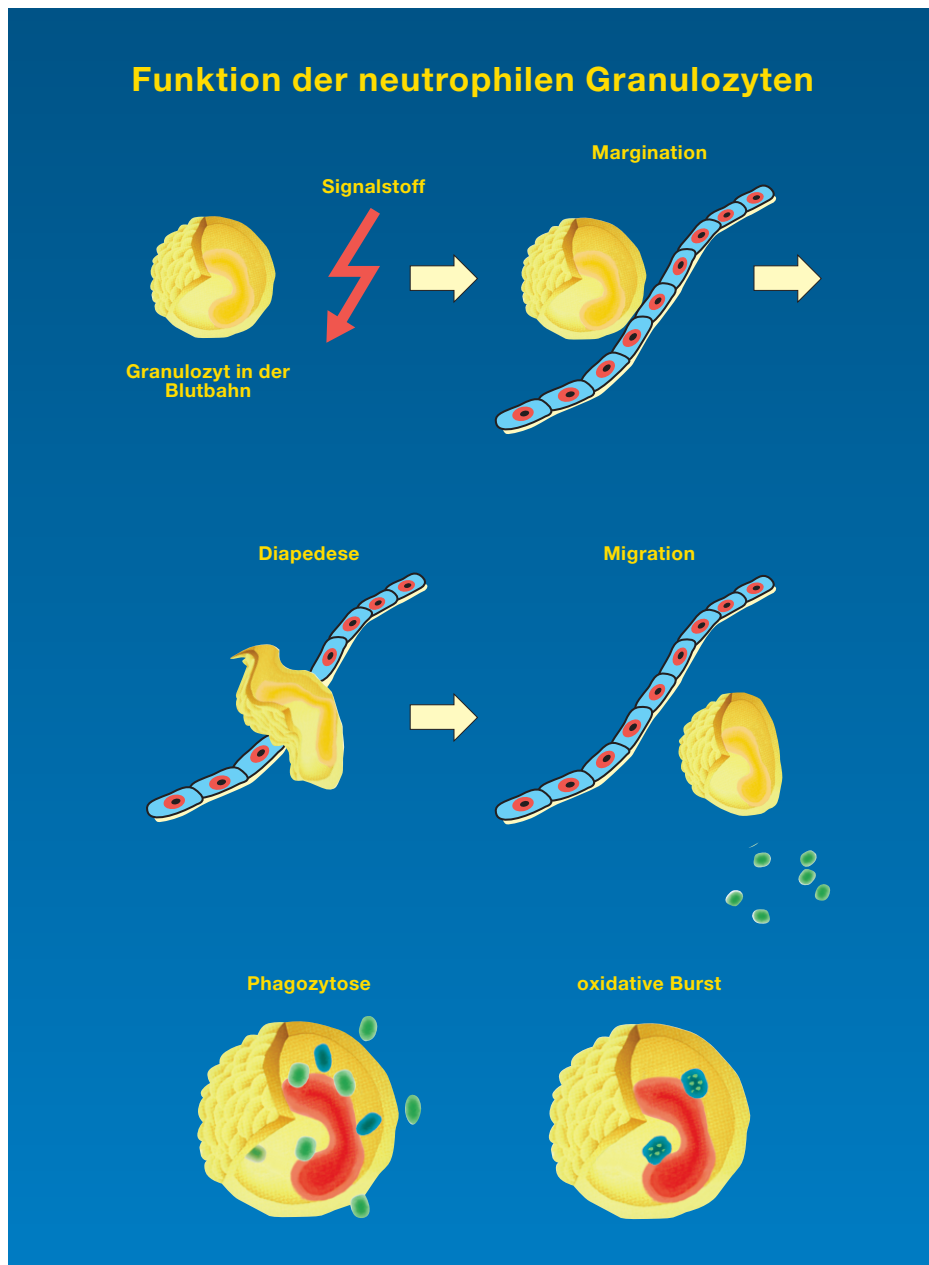


Abb.1  
Funktion der  
neutrophilen  
Granulozyten

zugrunde gegangener PMN. Eine weitere, zentrale Funktion der Makrophagen ist die Aktivierung des antigenspezifischen, lymphozytären Teils des Immunsystems, das sie durch Antigenpräsentation auf ihrer Zelloberfläche stimulieren. Sie stellen die notwendigen Signal- und Botenstoffe selbst durch die Produktion und Freisetzung von Zytokinen bzw. Lymphokinen (z. B. Interleukine, TNF) zur Verfügung (Roitt IV, Brostoff J et al., 1991). Die zelluläre, antigenspezifische Abwehr bilden die T- und B-Lymphozyten. Nach ihrer Aktivierung durch die Makrophagen und gesteuert von T-Helfer- und T-Suppressorzellen agieren sie später, aber dafür infektspezifisch. Ihre Lebensdauer kann Jahre betragen. Die humorale Abwehr besteht in ihrer Gesamtheit aus den Komplementfaktoren und den antigenspezifischen Antikörpern (Kress, 1992).

### **2.3. Der Einfluß des Diabetes mellitus auf das Immunsystem**

Diabetische Patienten zeigen häufig immunologische Auffälligkeiten. Dazu gehören eine gehäufte Infektanfälligkeit (Wheat LJ, 1980) sowie eine verzögerte Wundheilung nach Operationen (Larsen R, 1995). Aufgrund dieser Symptome stellt sich die Frage nach dem Einfluß des Krankheitsbildes des Diabetes mellitus auf das Immunsystem.

Hier zeigt sich, daß neben der Beeinträchtigung des T-Zellsystems und der humoralen Immunkomponenten (Federlin K, 1995), Funktionsstörungen der neutrophilen Granulozyten im Vordergrund stehen (Hostetter MK, 1990; Wilson RM, Galuin AM et al., 1985), welche von der Stoffwechsellage beeinflußt werden (Wilson RM, Galuin AM et al., 1985). Darüberhinaus sind die bakteriziden Fähigkeiten aktivierter Phagozyten durch die Herabsetzung von Opsonisierung, Phagozytose (Wilson RM, Galuin AM et al., 1985) und dem oxidativen Burst (Hostetter MK, 1990) signifikant beeinträchtigt.

### **2.4. Überblick über die verschiedenen Methodiken zur Bestimmung der Phagozytosefunktion**

In der vorhandenen Literatur über die Granulozytenfunktion beim Diabetes mellitus ist festzustellen, daß bei diesem Thema die Ergebnisse verschiedener Studien stark voneinander abweichen. Bei näherer Betrachtung zeigt sich, daß die Resultate dieser Untersuchungen in direktem Zusammenhang mit der verwendeten Methodik stehen. Allerdings ist ebenso anzumerken, daß auch unter Anwendung gleicher Methodiken Schwankungen zwischen den Ergebnissen auftraten. Der Grund hierfür liegt bei anderen, schwer kontrollierbaren Parametern, welche die Funktion der Granulozyten beeinflussen können. In diesem Zusammenhang sind besonders das Alter des Patientenkollektivs sowie die Dauer und der Schweregrad der Erkrankung zu beachten (Horn W, 1988). Ein Beispiel für diese Einflüsse bieten verschiedene Testreihen mit ähnlichen Untersuchungsmethoden bei juvenilen Diabetikern (IDDM), bei denen sowohl eine normale (Miller ME, Baker L et al., 1968) als auch eine stark herabgesetzte, bakterizide Funktion der neutrophilen Granulozyten gefunden wurde (Dziatkowiak H, Kowalska M et al., 1982).

Die bekannten Methoden zur Untersuchung der Funktion von Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut sind technisch aufwendig, schwer zu standardisieren und benötigen viel Zeit und Material. Im Wesentlichen beruhen sie auf einer zellassozierten Radioaktivitätsmessung vor und nach der Phagozytose (Peterson PK, Schmelting D, 1981), und auf der Bestimmung teilungsfähiger Bakterien vor und nach Inkubation mit PMN (Quie PG, Mills EL, 1981). Ein entscheidender Nachteil dabei ist, das nicht zwischen intra-

zellulären und zellwandadhärenten Bakterien unterschieden werden kann. Einerseits wird das Enzym Lysostaphin zur Zerstörung der adhärenierten Bakterien verwendet (Dörner L, Blobel H, 1977), andererseits wurde jedoch festgestellt, daß dieses Enzym auch die Zellwand der neutrophilen Granulozyten passieren kann (van den Broek J, Dehne FAM et al., 1982). Das hat zur Folge, daß es nicht möglich ist, die Bakterizidie derartig vorbehandelter PMN verlässlich zu bestimmen, da die inkorporierten Mikroorganismen sowohl durch die Eigenleistung der Granulozyten als auch durch das eingedrungene Lysostaphin abgetötet werden können (Urbanitz D, Schneider P et al., 1986). Abgesehen davon wurde mit isolierten Zellen gearbeitet (Bassoe, 1984; Peterson PK, Schmeling D, 1981). Das hat zur Folge, daß es zu einer Voraktivierung und Selektion bestimmter Zellpopulationen kommen kann (Perschel WT, Yildiz M et al., 1994). Weiterhin ist nach der Isolierung der Zellen kein physiologisches Medium mehr gegeben und die Funktion der Granulozyten kann aufgrund dieser Faktoren nicht zwangsläufig auf deren Eigenleistung zurückgeführt werden, sondern kann ebenfalls auf Artefakten beruhen.

## **2.5. Zielsetzung dieser Dissertation**

Ziel dieser Dissertation ist die Entwicklung eines standardisierten, in-vitro Testverfahrens gewesen, mit dessen Hilfe die Phagozytosefunktion neutrophiler Granulozyten und Monozyten am Krankheitsbild des Diabetes mellitus Typ II überprüft werden kann.

Nach der Etablierung dieses Testverfahrens sollte desweiteren untersucht werden, ob die unterschiedlichen Ergebnisse der publizierten Studien, hinsichtlich der Phagozytosefunktion von neutrophilen Granulozyten auf einen unterschiedlichen Erkrankungsverlauf bei Typ II-Diabetikern zurückzuführen sind. Die vorliegende Dissertation gliedert sich in drei Themenbereiche:

- Entwicklung eines in-vitro-Testassays zur Überprüfung der Phagozytosefunktion von neutrophilen Granulozyten und Monozyten
- Überprüfung des in-vitro-Testassays an einem standardisierten Tiermodell – der Cohen-Ratte – welche einen, dem Menschen ähnlichen, Diabetes mellitus Typ II entwickelt.
- Verifizierung der bei dem Tiermodell gewonnenen Ergebnisse der Phagozytosefunktion von neutrophilen Granulozyten und Monozyten durch die Untersuchung der Phagozytoseleistung von PMN: Monozyten bei Typ II-Diabetikern in unterschiedlichen Krankheitsstadien des Diabetes mellitus Typ II.



### **2.5.1. Vorstellung des Phagozytoseassays**

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Entwicklung eines Phagozytose-Testverfahrens, bei dem Vollblut eingesetzt werden kann. Der Vorteil dabei ist der Verzicht auf die Isolierung von Zellen, wodurch ein physiologisches Milieu gegeben ist. Es sollte im Mikroliterbereich gearbeitet werden, damit möglichst wenig Ausgangsmaterial benötigt wird. Die verwendeten Bakterien mußten stoffwechselaktiv, d.h. lebend, sein und die Messung sollte fluoreszenzdurchflußzytometrisch erfolgen. Dieses Verfahren ist zum Einen sehr viel schneller als die Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop und liefert zum Anderen ein wesentlich höheres Zellkontingent, das zu einer höheren Aussagekraft des Assays und damit zu einer genaueren Ergebnisermittlung führt.

Ziel der Etablierung eines in-vitro-Testassays: Einfache Überprüfung der Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten und Monozyten in natürlichem Milieu.

### **2.5.2. Vorstellung des Tiermodells Ratte**

Für die vorliegende Dissertation ist die Cohen-Ratte als Tiermodell ausgewählt worden. Bei diesem Tierstamm gibt es zwei unterschiedliche Linien:

- die diabetische Linie (Upward Line), sowie
- die nicht-diabetische Linie (Downward Line).

Dieses Tiermodell wurde erstmals im Jahre 1968 von Cohen beschrieben (Cohen AM, Teitelbaum A, 1968).

Bei der Entwicklung dieses Tiermodells wurde als Elterngeneration eine Albinorattenart der Hebrew University Strain (HUS) verwendet. Das Gewicht der Tiere betrug zwischen 60 g und 70 g. Sie wurden 2 Monate lang mit einer sucrosereichen und kupferarmen Diät gefüttert, die zu 72% aus Saccharose, 18% aus Casein, 5% aus Butter und zu 5% aus Vitaminen und Salzen bestand. Durch die Kupferreduzierung dieser Spezialdiät wird die diabetogene Wirkung des Futters verstärkt (Cohen AM, Teitelbaum A, 1964; 1968), da Kupfer die Insulinantwort auf Glucose verstärkt und die Glucoseresorption in die Zellen begünstigt. Dies läßt sich durch eine Vermehrung der Insulinrezeptoren an Adipozyten nachweisen (Cohen AM et al, 1982).

Nach 2 Monaten wurde bei den Ratten ein oraler Glucosetoleranztest durchgeführt, wobei den Tieren 350 mg Glucose je 100 g Körpergewicht oral appliziert wurde. Ratten mit besonders hohen postprandialen Blutzuckerwerten und Tiere mit normalen postprandialen Blutzuckerwerten (im oGTT nach 60 Minuten) wurden ausgewählt und diese zwei Tiergruppen weiter ingezüchtet. Nach 4 Generationen entwickelten die Tiere mit hohen Blutzuckerwerten nach Fütterung der Spezialdiät einen spontanen Diabetes mellitus mit



den entsprechenden Symptomen, wie z. B. Glucosurie, Mikroangiopathie, Nephropathie und maximale Blutzuckerwerte deutlich über 200 mg/dl im oGTT. Dieser Blutzuckerwert wurde als Grenzwert für eine diabetische Stoffwechsellage definiert (Cohen AM, Rosenmann E, 1990). Eine Tiergruppe, die den Grenzwert überschreitet, wird als Upward line (diabetische Linie) bezeichnet. Bei normalem Rattenlaborfutter bleiben diese Tiere prädiabetisch mit einer verminderten Glucosetoleranz und einer Hyperinsulinämie. Die Hyperinsulinämie bewirkt eine Insulinresistenz mit reduzierter Empfindlichkeit der Insulinrezeptoren (Madar et al. 1984).

Bei der zweiten Rattengruppe mit normalen postprandialen Blutzuckerwerten im oGTT nach 60 Minuten wurde analog verfahren. Nach einigen Generationen entwickelte sich die Downward line (nichtdiabetische Linie) (Cohen AM, Teitelbaum A et.al. 1972). Diese Ratten entwickelten unter Fütterung mit der Spezialdiät keinen Diabetes mellitus und auch keine Spätkomplikationen. Bei diesen Tieren bildete sich im Gegenteil eine Vermehrung der Insulinrezeptoren und eine Steigerung deren Empfindlichkeit aus (Madar, 1984).

Der Diabetes der Upward line bei den Cohen-Ratten ist reversibel, d.h. hat man bei den Tieren durch Fütterung der saccharosereichen und kupferarmen Spezialdiät eine diabetogene Stoffwechsellage ausgelöst, so läßt sich diese durch Fütterung von normalem Laborfutter wieder in eine prädiabetische Stoffwechsellage zurückführen (Cohen AM, Teitelbaum A et.al. 1972).

Ein Faktor für die Erkrankung Diabetes mellitus bei dem Tiermodell „Cohen-Ratte“ ist die genetische Prädisposition der Tiere (Falconer DS 1967). Der auslösende Faktor ist die Umstellung der Tiere auf die saccharosereiche und kupferarme Spezialdiät. Damit entspricht der Diabetes mellitus der Cohen-Ratte dem Typ II-Diabetes des Menschen. Bei der Zuckererkrankung der Cohen-Ratte handelt es sich nicht um einen spontanen Diabetes.

Ziel der Rattenstudie: Es sind reproduzierbare Ergebnisse bezüglich der Phagozytoseleistung von Rattengranulozyten erwartet worden, da Faktoren wie Alter, Geschlecht, unterschiedliche Lebens- und Freßgewohnheiten, aufgrund der gewählten Versuchsparameter entfallen.

### **2.5.3. Vorstellung der klinischen Studie mit Typ II-Diabetikern**

In der Literatur sind viele Studien zur Immunlage von Typ II-Diabetikern veröffentlicht worden, ohne das Krankheitsstadium des Diabetes mellitus, die Infektlage der Patienten, eventuelle Allergien sowie Lebens- und Eßgewohnheiten (z.B. Nikotinabusus oder Streß) zu berücksichtigen. Dies ist ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse bei den Veröffentlichungen, hinsichtlich des Immunstatus von Typ II-Diabetikern.

In der vorliegenden Dissertation sollten die untersuchten Patienten in drei Probandengruppen unterteilt werden, welche aufgrund ihres C-Peptidgehaltes im Serum unterschiedlich waren. Die Höhe des C-Peptidspiegels im Serum ist ein Zeichen für das Entwicklungsstadium der Erkrankung. Typ II-Diabetiker, bei denen der Diabetes mellitus erst kürzlich ausgebrochen ist, zeigen erhöhte C-Peptidspiegel im Serum. Schreitet die Erkrankung weiter fort, sinken die C-Peptidspiegel in den Normalbereich zurück, während im späten Stadium der Erkrankung der C-Peptidspiegel erniedrigt ist. Somit kann die Höhe des C-Peptidspiegels als Parameter für das Krankheitsstadium eines Typ II-Diabetikers gesehen werden. Anhand des C-Peptidspiegels kann ein Einblick in den zeitlichen Verlauf der Erkrankung genommen werden. Aufgrund dessen sind zur Überprüfung der Phagozytoseleistung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten als ein Parameter des Immunstatus von Typ II-Diabetikern, die Probanden anhand ihres C-Peptidspiegels differenziert worden.

Ziel der Klinischen Studie mit Typ II-Diabetikern:

Es werden unterschiedliche Resultate der Phagozytoseleistung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei Typ II-Diabetikern erwartet. Weiterhin ist angenommen worden, daß diese unterschiedlichen Ergebnisse mit den verschiedenen Erkrankungsstadien der Patienten korrelieren.

## 3. Material und Methoden

---

### 3.1. Phagozytostest

#### 3.1.1. Testprinzip

Der entwickelte Phagozytostest ermöglicht eine quantitative Analyse der Phagozytosefunktion von neutrophilen Granulozyten und Monozyten im Vollblut mittels Fluoreszenzdurchflußzytometrie. Anhand dieses Assays werden zwei Aussagen getroffen:

- Die Größe des prozentualen Anteils der phagozytose-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl.
- Die Anzahl der aufgenommenen Bakterien pro Zelle.

Vollblut wird mit einer definierten, speziell aufbereiteten und fluoreszenzmarkierten Bakterienmenge (100 Bakterien pro Granulozyt) unter standardisierten Bedingungen inkubiert. Die eigentliche Probe inkubiert 10 Minuten bei 37 °C und ein Kontrollansatz 10 Minuten bei 0 °C. Die Granulozyten und Monozyten können während dieser Zeit die Bakterien phagozytieren. Die Reaktion wird nach der definierten Zeitspanne durch Unterkühlung (Eis) gestoppt und der Testansatz gereinigt. Die an der Zellenwand gebundenen, farbmarkierten Bakterien werden mit Hilfe einer sogenannten „Quenching“-Lösung in ihrer Fluoreszenz unterdrückt. Anschließend werden die Erythrozyten lysiert, die Leukozyten fixiert und ihre Nuclei mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Zum Abschluß erfolgt die Messung und Auswertung am Fluoreszenzdurchflußzytometer (FACS).

## Prinzip des Phagozytostests

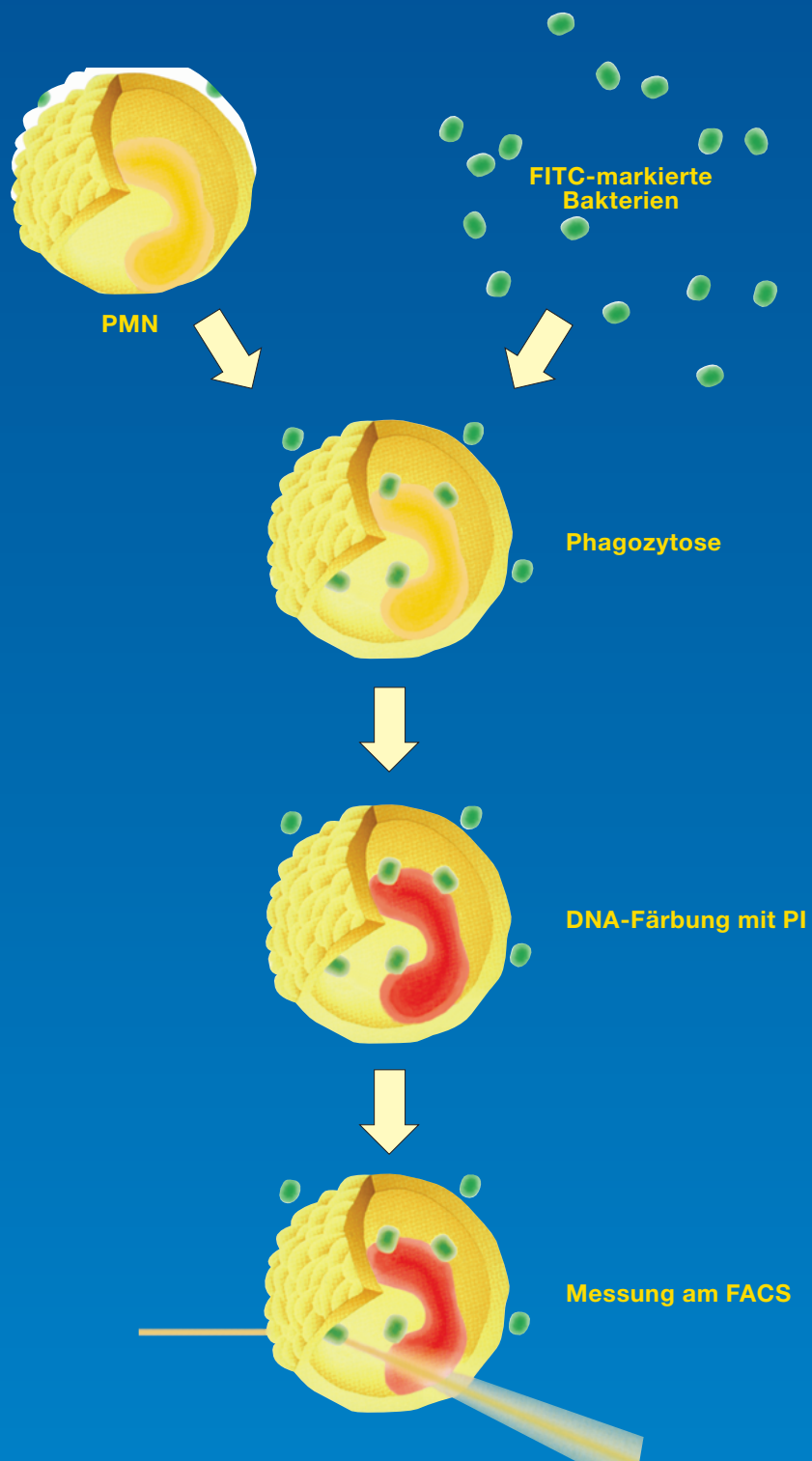


Abb.2

Prinzip des Phagozytostests

### 3.1.2. Bakterienansatz

#### 3.1.2.1. Durchführung

Für die verwendeten Bakterien erfolgte die Anzüchtung und Reinigung nach einer Modifikation der Methode von Greene und Lämmler (Greene RT, Lämmler C, 1993).

Verwendet wurden folgende Keime:

- Staphylococcus aureus
- Escherichia coli
- $\beta$ -hämolyzierender Streptococcus

Die Bakterien wurden uns von Herrn Dr. Lämmler aus dem Institut für Mikrobiologie in Giessen, Abteilung Bakteriologie, zur Verfügung gestellt.

Die Durchführung des Bakterienansatzes umfaßt folgende Einzelschritte:

1. Die Stammlösung der entsprechenden Keime wird bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Eisschrank aufbewahrt. Alle 14 Tage wird eine Blutagarplatte mit dem gewünschten Bakterienstamm im Verdünnungsausstrich beimpft und 24 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird die Platte für die folgenden zwei Wochen im Kühlschrank aufbewahrt.
2. Von den auf der Blutplatte gewachsenen Keimen wird eine Platinöse in 200 ml BHI-Bouillon überimpft. Diese Lösung wird 24 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank unter leichtem Schütteln ( $150\text{ min}^{-1}$ ) inkubiert.
3. Die Bakterienlösung wird mit 20 ml FITC (1 mg/1 ml 96%igem, vergälltem Ethanol) versetzt, der Erlenmeyerkolben mit Alufolie umhüllt und 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und unter leichtem Schütteln ( $150\text{ min}^{-1}$ ) weiter inkubiert.
4. Die mit FITC-markierten Bakterien werden auf Plastikreaktionsgefäße, Fassungsvermögen 50 ml, verteilt und bei  $1.500\text{ g/min}$  10 min lang zentrifugiert.
5. Der Überstand wird abgegossen und verworfen, das Sediment mit einer Pipette gut aufgemischt und mit Pbs-Puffer aufgefüllt. Anschließend wird auch diese Lösung bei  $1.500\text{ g/min}$  10 min lang zentrifugiert.
6. Der Überstand wird wiederum abgegossen und verworfen, das Pellet mit der Pipette gut aufgemischt und mit Pbs-Puffer aufgefüllt. Danach wird die Lösung bei  $1.500\text{ g/min}$  10 min lang zentrifugiert.

7. Der Überstand wird ein drittes Mal abgegossen und verworfen, das Bakteriensediment mit der Pipette gut aufgemischt und mit Pbs-Puffer aufgefüllt. Anschließend wird diese Lösung bei 1.500 g/min 10 min lang abzentrifugiert.
8. Der Überstand wird wie zuvor abgegossen und verworfen, das gewonnene Pellet mit 10 ml Pbs-Puffer gelöst.
9. Von der Bakterienlösung werden 30 µl in ein Eppendorfreaktionsgefäß mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml pipettiert. Dazu werden 30 µl Türks-Lösung – zur Anfärbung der Bakterien – und 940 µl Pbs-Puffer gegeben, auf dem Vortex gemischt und von diesem Gemisch 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert.
10. Danach werden bei einer 400fachen Gesamtvergrößerung (40er Objektiv) vier Gruppenquadrate ausgezählt und die Bakterienzahl in 1 ml der Ausgangslösung mit folgender Formel berechnet:

$$\text{«ausgezählte Bakterienzahl»} \times 4 \times 33,4 \times 10^4 = \text{«Anzahl der Bakterien/ml»}$$

Um auf das Volumen in der Zählkammer zu kommen, multipliziert man die ausgezählte Bakterienzahl mit dem Faktor „4“. Der Faktor „33,4“ steht für die Verdünnung der Bakterienlösung mit der türkschen Lösung und dem Pbs-Puffer im Eppendorfreaktionsgefäß und mit  $10^4$  wird multipliziert, um auf 1 ml Ausgangslösung zu kommen.

11. Die Ausgangsbakterienlösung wird durch Verdünnung mit Pbs-Puffer auf  $1 \times 10^9$  Bakterien/ml eingestellt.
12. Diese Lösung wird in 1 ml-Einheiten in Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert, in völliger Dunkelheit bei  $-20\text{ °C}$  im Eisschrank eingefroren und dort aufbewahrt.

### 3.1.2.2. Verwendete Materialien

1. Staphylococcus aureus K 807  
Dr. Lämmeler, Mikrobiologie, Giessen
2. Escherichia coli DSM 1103 ATCC 25922  
Dr. Lämmeler, Mikrobiologie, Giessen
3.  $\beta$ -hämolyzierender Streptococcus der Gruppe A 8198  
Dr. Lämmeler, Mikrobiologie, Giessen

4. Hammelblutagar  
Dr. Lämmli, Mikrobiologie, Giessen
5. BHI-Bouillon, in Erlenmeyerkolben Fassungsvermögen 500 ml abgefüllt  
Dr. Lämmli, Mikrobiologie, Giessen
6. Platinöse und Ösenhalter
7. Brutschrank; bestehend aus Inkubationshaube TH 10 Typnr.: 3315000 und  
Schüttelmaschine KS 10 Typnr.: 3311000  
Fa. Edmund Bühler
8. FITC (= Fluoresceinisothiocyanat); 1 mg/1 ml 96%igem, vergälltem Ethanol  
im Kühlschrank bei völliger Dunkelheit aufbewahren  
Fa. Sigma-Chemie, Deisenhofen, 1 g, Best.-Nr.: F-7250
9. 96%iges, mit Petroläther vergälltes, Ethanol  
Apotheke des Klinikums der Justus-Liebig-Universität, Giessen
10. Alufolie
11. Plastikreagiergefäße 50 ml  
Fa. Greiner, Solingen, Best.-Nr.: 210261
12. Laborzentrifuge  
Fa. Beckmann Instruments GmbH, München, Typnr.: CEN - J6B
13. Auslaufpipette 10 ml  
Sarstedt, Nümbrecht, Best.-Nr.: 89.1254.001
14. Pbs-Puffer (= Phosphate buffered saline); 500 ml Pbs-Puffer mit 4500 ml Aqua dest.  
in einem 5 l Erlenmeyerkolben mit einem Magnetfisch auf einem elektrischen Mixer  
so lange rühren, bis keine Schlieren mehr vorhanden sind, bei Raumtemperatur  
aufbewahren  
Fa. BAG, Lich/500ml, Best.-Nr.: 3613
15. Mono-Mixer  
Fa. Heidolph, Typ REAX 2000

16. Reagiergefäße 1,5 ml aus PP mit PP-Stopfen  
Fa. Sarstedt, Nürmbrecht, Best.-Nr.: 72.690
  
17. Türkslösung; unverdünnt, bei Raumtemperatur lagern  
Fa. Merck, Darmstadt, 100 ml, Best.-Nr.: 9277.0100
  
18. Neubauer-Zählkammer  
Fa. Kalensee, Giessen, Best.-Nr.: 191832411
  
19. Variable Mikroliterpipette 10-100 µl  
Fa. Eppendorf, Hamburg
  
20. Variable Mikroliterpipette 100-1000 µl  
Fa. Eppendorf, Hamburg
  
21. Spitzen für Mikroliterpipetten gelb 10-100 µl  
Fa. Sarstedt, Nürmbrecht, Best.-Nr.: 70.760
  
22. Spitzen für Mikroliterpipetten blau 100-1000 µl  
Fa. Sarstedt, Nürmbrecht, Best.-Nr.: 70.762



### **3.1.3. Phagozytoseansatz**

#### **3.1.3.1. Durchführung**

Zur Vorbereitung des Phagozytosestests werden alle Reagenzien, die benötigten Bakterien, das heparinisierte Vollblut sowie die Probenreagiergefäße – mit Ausnahme der Facs-Lysing-Solution – zunächst 15 min auf Eis abgekühlt. Der gesamte Ansatz – außer dem Lysieren der Erythrozyten – wird auf Eis durchgeführt. Das Wasserbad muß auf 37 °C vorgewärmt sein.

Die Durchführung des Phagozytosestestes umfaßt folgende Einzelschritte:

1. Von einer Probe werden jeweils 100 µl Vollblut in zwei Facs-Röhrchen pipettiert – ein Kontroll- und ein Phagozytoseansatz
2. Die zuvor angefärbten Bakterien (s. Bakterienansatz) werden gemischt und zu dem heparinisierten Blut gegeben. Die zu pipettierende Menge an Bakterienlösung richtet sich nach der Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Vollblut. Pro Granulozyt werden 100 Bakterien dem Ansatz hinzupipettiert.
3. Die Inhalte aller Röhrchen werden gemischt. Während die Kontrollansätze zunächst auf Eis stehenblieben, werden die Phagozytoseansätze 10 min bei 37 °C im Wasserbad unter starkem Schütteln (80%) inkubiert.
4. Exakt zum Ende der Inkubationszeit (Stoppuhr) werden alle Phagozytoseansätze aus dem Wasserbad genommen und zum Abstoppen der Reaktion auf Eis gestellt. Zu jedem Ansatz wird 100 µl Trypanblau hinzupipettiert und die Proben gemischt.
5. Den Ansätzen werden 3 ml Pbs-Puffer als Waschlösung zugegeben und für die Dauer von 5 min mit 250 g bei einer Temperatur von 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird abpipetiert.
6. Erneut werden pro Ansatz 3 ml Pbs-Puffer zugegeben und für die Dauer von 5 min mit 250 g bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abpipetiert.
7. Anschließend wird das Vollblut mit 3 ml Lysing-Solution bei Raumtemperatur lysiert, fixiert und nach Ablauf von 10 Minuten mit 250 g, 5 min lang bei 4 °C zentrifugiert.

8. Pro Ansatz werden 3 ml Pbs-Puffer zugegeben und mit 250 g für die Dauer von 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum abpipetiert.
9. Zuletzt werden den Ansätzen 100 µl PI zugegeben, die Ansätze gemischt und 10 min lichtgeschützt inkubiert. Die Messung muß anschließend innerhalb von 30 min erfolgen.

### **3.1.3.2. Verwendete Materialien**

1. Styroporbehälter mit Eis gefüllt und mit Alufolie abgedeckt
2. Frisch entnommenes, heparinisiertes Vollblut
3. Aufbereitete Bakterien aus dem Bakterienansatz mit Alufolie lichtgeschützt umhüllt
4. FACScan-Röhrchen; Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg, Falcon 2054
5. Mono-Mixer  
Fa. Heidolph, Typ REAX 2000
6. Variable Mikroliterpipette 10-100 µl  
Fa. Eppendorf, Hamburg
7. Variable Mikroliterpipette 100-1000 µl  
Fa. Eppendorf, Hamburg
8. Spitzen für Mikroliterpipetten gelb 10-100 µl  
Fa. Sarstedt, Nürmbrecht, Best.-Nr.: 70.760
9. Spitzen für Mikroliterpipetten blau 100-1000 µl  
Fa. Sarstedt, Nürmbrecht, Best.-Nr.: 70.762
- 10 Schüttelwasserbad  
Fa. GFL, M8Z 3081
11. Quecksilberthermometer
12. Stoppuhr, Fa. Elias

13. Trypanblau; 0,16 mg/1 ml NaCl 0.9 %, bei Raumtemperatur aufbewahren  
Fa. Merck, Darmstadt, 25 g
14. Handdispenser  
Fa. Eppendorf, Typ 4780
15. Combitips für den Handdispenser, 1.25 ml  
Fa. Eppendorf
16. Dosiergerät 10 ml, Fa. Hirschmann
17. Pbs-Puffer (= Phosphate buffered saline); 500 ml mit 4500 ml Aqua dest. in einem 5 l Erlenmeyerkolben mit einem Magnetschiffchen auf einem elektrischen Mixer solange rühren, bis keine Schlieren mehr vorhanden sind, bei Zimmertemperatur aufbewahren  
Fa. BAG, Lich/500ml, Best.-Nr.: 3613
18. Laborzentrifuge  
Fa. Beckmann Instruments GmbH, München, Typnr.: CEN - J6B
19. Facs-Lysing-Solution; 1: 10 mit Aqua dest. verdünnen, im Glas bei Zimmertemperatur aufbewahren  
Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 92-0002
20. PI = Propidium Jodid; 0,05 mg/1 ml Pbs, im Kühlschrank bei völliger Dunkelheit aufbewahren  
Fa. Sigma Chemie, Deisenhofen, Best.-Nr. P-4170

### **3.1.4. Messung am Fluoreszenzdurchflußzytometer**

#### **3.1.4.1. Prinzip der Messung am Fluoreszenzdurchflußzytometer**

Die Messung der Bakterien- und der Phagozytoseansätze ist an dem Fluoreszenzdurchflußzytometer „FACScan“ der Fa. Becton & Dickinson erfolgt. Die Abkürzung „FACS“ steht für „fluorescent activated cell sorter“.

Grundvoraussetzung für die Messung mit dem FACS ist, daß die zu messende Probe in Form einer Einzelsuspension mit einer Konzentration von 0,5 bis 20 Millionen Zellen pro



Abb.3  
FACScan der  
Firma Becton &  
Dickinson

Milliliter vorliegt. Das Prinzip der durchflußzytometrischen Messung besteht darin, daß ein Laserlicht auf eine Meßkapillare gerichtet wird, durch die die Zellsuspension fließt. Hinter dieser Kapillare sind Photometerzellen installiert, welche die Lichtintensität bei bestimmten Wellenlängen (= Fluoreszenzintensität) und bei definierten Ablenkungsgraden (= Streulicht) messen. Jede Störung des geradlinig laufenden Laserlichts wird als „Event“ bezeichnet.

Beim FACScan werden die Events anhand der Höhe des Analogpulses (in Volt) erfasst. Wenn man annimmt, daß diese Pulshöhe zwischen 0,00 und 10,24 Volt liegt und die Unterteilung zur Messung in 0,01-Schritten erfolgt, so errechnet man einen Bereich von 1025 Intensitätsstufen. Die einzelnen Teilungen können als Kanäle bezeichnet werden. Wird ein Event mit einer bestimmten Voltzahl gemessen, fällt ein Wert in den entsprechenden Kanal (Abb. 4).

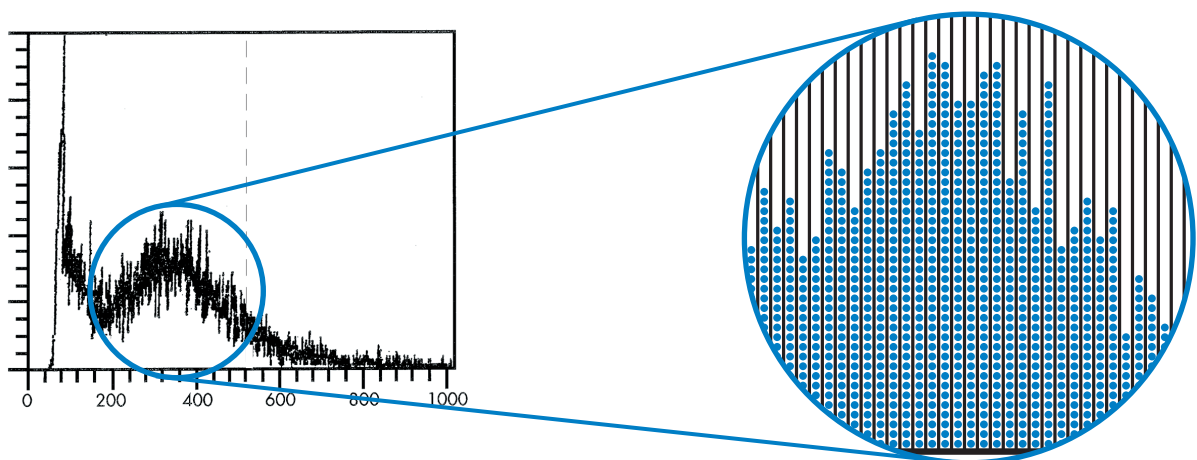


Abb. 4  
Prinzip der Kurvenerstellung von gemessenen Events

## Prinzip der Fluoreszenzdurchflußzytometrie

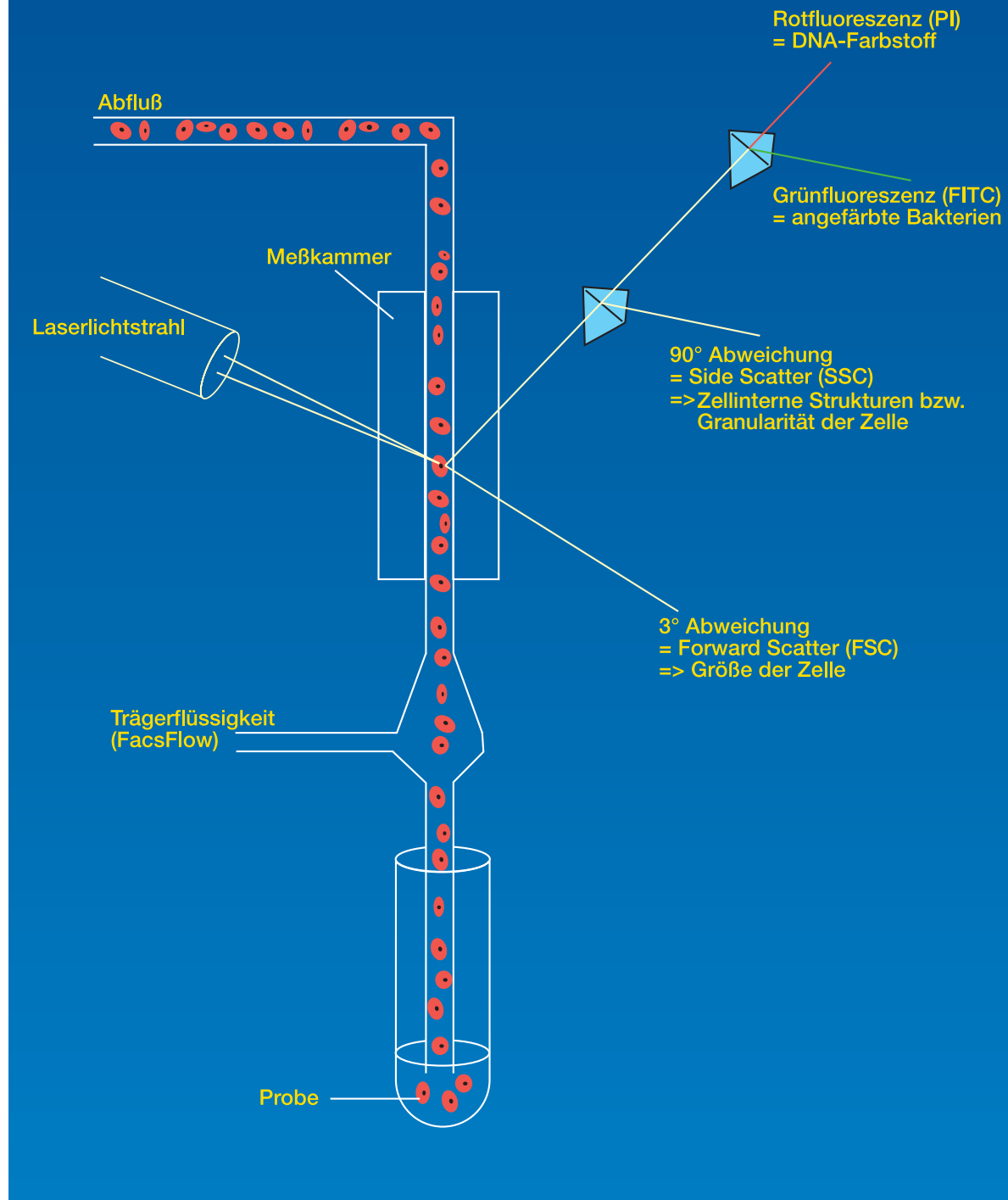


Abb.5

Meßprinzip der Fluoreszenzdurchflußzytometrie

Von jedem Event werden fünf Parameter (Zelleigenschaften) gemessen und während des Meßvorgangs von einem angeschlossenen Rechner analysiert. Bei diesen Parametern handelt es sich um die Zellgröße, die innerhalb der Zelle liegenden Strukturen und die Möglichkeit, drei unterschiedliche Fluoreszenzen mit denen Zellkerne, inkorporierte Substanzen, AK u.ä. angefärbt werden können, zu messen. Bei dem FACScan sind diese Parameter FSC, SSC, FL1, FL2 und FL3.

**FSC** (= Forward scatter) wird das Vorwärtsstreulicht bezeichnet. Es ist Licht, welches gestreut wird, wenn ein Partikel senkrecht zum Laserlicht die Meßkammer durchquert. Das Event lenkt das Laserlicht nur minimal (um  $3^\circ$ ) von seiner normalen Richtung ab. FSC ist das Maß für die *Zellgröße*.

**SSC** (= Side scatter) bezeichnet die Lichtbrechung, welche durch ein Event um  $90^\circ$  von seiner geraden Lichtrichtung hervorgerufen wird. Diese Brechung erlaubt Aussagen zu den zellinternen Strukturen. Es ist somit ein Maß für die *Granularität* bzw. *Dichte der einzelnen Zelle*.

**FL1** (= Fluoreszenz 1) bezeichnet in der vorliegenden Studie die *Wellenlänge des FITC's*, eines grünen Fluoreszenzfarbstoffes. Dieser Farbstoff wird von einem Event durch Anregung seitens des Laserlichts als Fluoreszenz ausgesendet. Die Wellenlängenmaxima des FITC liegen bei 515 und 620 nm.

**FL2** (= Fluoreszenz 2) ist die *Wellenlänge des Propidiumiodids (=PI)* (Wellenlängenmaximum 620 nm).

**FL3** (= Fluoreszenz 3) steht für die *Wellenlänge des Phycoerythrocins (= PE)*. PE wurde in der vorliegenden Studie nicht benötigt.

Für die Messung der drei Fluoreszenzen können selbstverständlich auch andere Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden. Das FACS kann nicht zwischen Zellen, Zelltrümmern, Kristallen oder anderen Verunreinigungen unterscheiden. Erst das Analysieren der Parameter ermöglicht eine Identifizierung von Zellen. Daher die Bezeichnung Event als Meßeinheit. Aus apparativen Gegebenheiten kann nur eine begrenzte Anzahl an Events pro Zeiteinheit analysiert werden. Diese liegt bei etwa 5000 Events pro Sekunde.

Vor der Messung der Bakterien und der Phagozytoseansätze müssen am FACS verschiedene Geräteeinstellungen modifiziert werden – der **Detector**, der **Threshold** und die **Compensation**.

Zuerst stellt man mit einer Kontrolllösung den **Detector** ein. Der Detector ist die Verstärkereinstellung mit der ein elektronisches Signal so verstärkt wird, daß eine optimale Messung möglich ist. Anschließend wird der **Threshold** optimiert. Der Threshold ist ein Triggersignal, das auf elektronischem Weg ungewollte Signale, z. B. Debris oder Zelltrümmer herausfiltert, so daß diese nicht mitgemessen werden. Zuletzt muß noch die **Compensation** korrigiert

werden. Wenn man Proben mit unterschiedlichen Fluoreszenzen mißt, können sich die Emissionen überlappen (spectral overlap). Die Compensation ist der Prozeß, mit dem die ungewollte Fluoreszenz in der Reichweite der Wellenlänge einer anderen Fluoreszenz reduziert wird.

Die Messung am Durchflußzytometer gliedert sich in zwei Abschnitte:

- Bakterienmessung
- Messung der Phagozytoseansätze

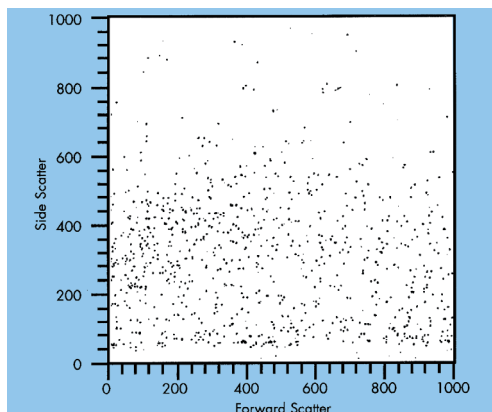
### 3.1.4.2. Bakterienmessung

Die Bakterienmessung umfaßt drei Schritte:

1. Messung von Pbs
2. Messung von ungefärbten, in Pbs gelösten Bakterien
3. Messung von FITC-markierten, in Pbs gelösten Bakterien

Die Messung von reinem Pbs und ungefärbten Bakterien dient zur richtigen Geräteeinstellung für die Messung der FITC-markierten Bakterien. Außerdem wird so die Möglichkeit ausgeschlossen, Kristalle, Verunreinigungen mit Spontanfluoreszenz oder Zelltrümmer als Bakterien zu messen. Die Bakterien werden bei einer Verstärkereinstellung von 360 gemessen und Verunreinigungen durch Hochdrehen des Thresholds ausgeblendet und dadurch nicht mehr erfaßt. Das Meßprogramm der FACScan-Software bietet verschiedene graphische Darstellungen an. Für die Bakterienmessung sind drei Graphiken entscheidend:

#### 1. Das **FSC/SSC dot plot**.

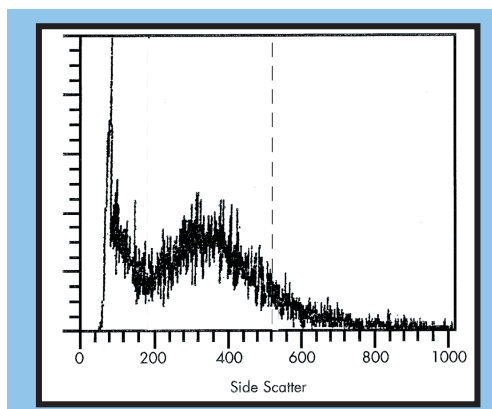


In dieser Darstellung wird die Größe der zu messenden Partikel (FSC) gegen ihre Granularität (SSC) aufgetragen und die Bakterien aufgrund dieser beiden Parameter identifiziert.

*Abb. 6  
FSC/SSC dot plot mit gemessenen  
FITC-markierten Bakterien*

#### 2. Das **SSC-Histogramm**.

In dieser Abbildung wird die Granularität gegen die Meßzeit aufgetragen und man differenziert hier zwischen einzeln liegenden Bakterien und in Haufen liegenden Bakterien.

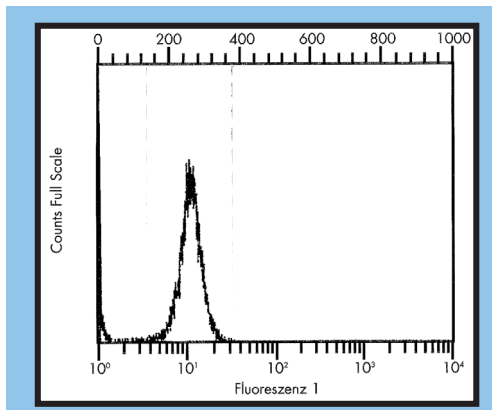


Es ist wichtig den Granulozyten im Phagozytoseansatz einzelne Bakterien anzubieten und nicht Bakterienklumpen, da diese bei der Inkubation nicht gut phagozytiert werden und es fälschlicherweise zu niedrigen Phagozytoseraten kommen kann.

*Abb. 7  
SSC-Histogramm von gemessenen  
FITC-markierten Bakterien*



### 3. Das FL1-Histogramm.



In dieser Graphik wird die gemessene Grünfluoreszenz gegen die Meßzeit aufgetragen. Die Grünfluoreszenz ist das Maß für die Anzahl der Bakterien.

Abb. 8  
FL1-Histogramm von FITC-markierten Bakterien

Bei einer Verstärkereinstellung von 360 liegt der Peak der gemessenen Bakterienkurve ungefähr bei 10<sup>1</sup> auf der Grünfluoreszenzskala.

#### 3.1.4.3. Messung der Phagozytoseansätze

Die Messung der Phagozytoseansätze umfaßt mehrere Einzelschritte. Zuerst wird die Kontrolle\* des ersten Ansatzes gemessen. Mit ihr läßt sich der Rotfluoreszenzpeak der Leukozyten bei 10<sup>3</sup> lokalisieren. Um diesen Peak wird ein Gate gesetzt, um ausschließlich Zellen mit Rotfluoreszenz zu messen. Die Rotfluoreszenz stammt von dem Propidium Jodid, das an die DNA der kernhaltigen Zellen gebunden hat. Nach der Kontrollmessung mißt man, ausgehend von den festgelegten Gates die Probe des ersten Ansatzes, dann die des zweiten u.s.w.. Die Verstärker- und Fluoreszenzeinstellungen werden während des gesamten Meßvorgangs nicht mehr verändert.

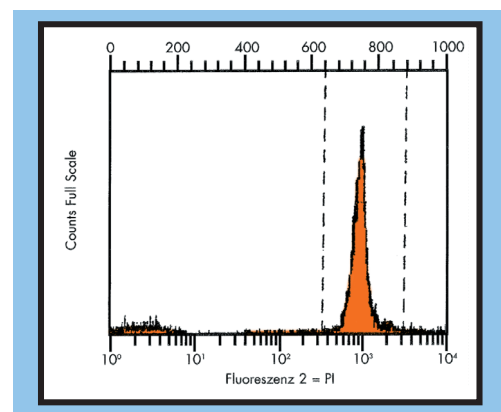
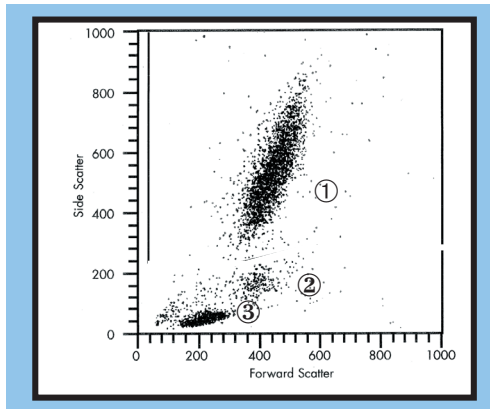


Abb. 9  
Rotfluoreszenz der gemessenen Leukozyten

\*(Kontrolle = Ansätze auf Eis, keine Phagozytose)

Auch hier bietet das Meßprogramm der FACScan-Software verschiedene graphische Darstellungen zur Identifizierung der Zellen und der Grünfluoreszenz:

1. Das **FSC/SSC dot plot**. In diesem Diagramm werden die Leukozyten anhand ihrer Größe in Abhängigkeit von ihrer Granularität identifiziert ①.



- ① Granulozyten
- ② Monozyten
- ③ Lymphozyten

Abb. 10  
Verteilung der gemessenen  
Leukozyten im FSC/SSC dot plot

2. Das **FL1-Histogramm**. Anhand dieser Graphik wird die Anzahl der von den Zellen inkorporierten Bakterien ermittelt, indem die Intensität der Grünfluoreszenz der Bakterien mit der Anzahl der Bakterien korreliert.

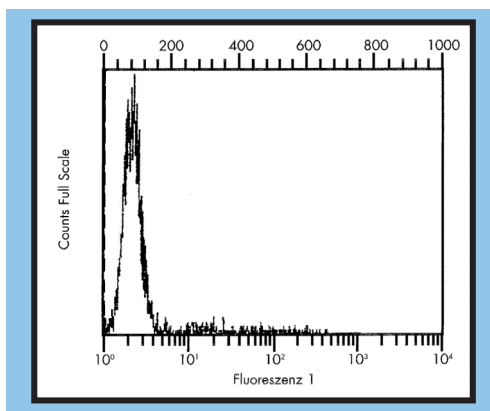


Abb. 11  
FL1-Histogramm der gemessenen  
Kontrolle (Phagozytose negativ;  
Ansatz 10 min auf Eis gelagert)

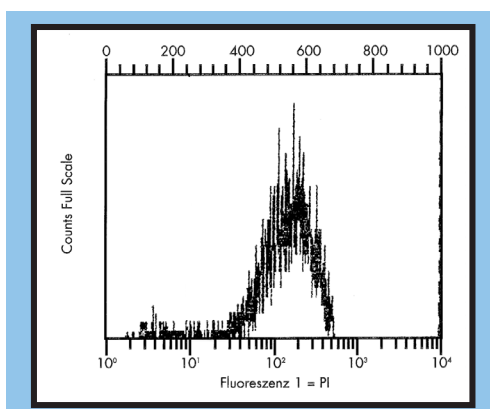


Abb. 12  
FL1-Histogramm der gemessenen  
Probe (Phagozytose positiv;  
Ansatz 10 min bei 37 °C gelagert)

### **3.1.4.4.        Verwendete Materialien**

1. Durchflußzytometer FACScan  
  Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg
  
2. Facs-Flow  
  Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg
  
3. Pbs-Puffer (= Phosphate buffered saline)  
  500 ml mit 4500 ml Aqua dest. in einem 5 l Erlenmeyerkolben mit einem Magnettisch  
  auf einem elektrischen Mixer solange rühren, bis keine Schlieren mehr vorhanden sind,  
  bei Zimmertemperatur aufbewahren  
  Fa. BAG, Lich/500 ml, Best.-Nr.: 3613
  
4. Mono-Mixer  
  Fa. Heidolph, Typ REAX 2000

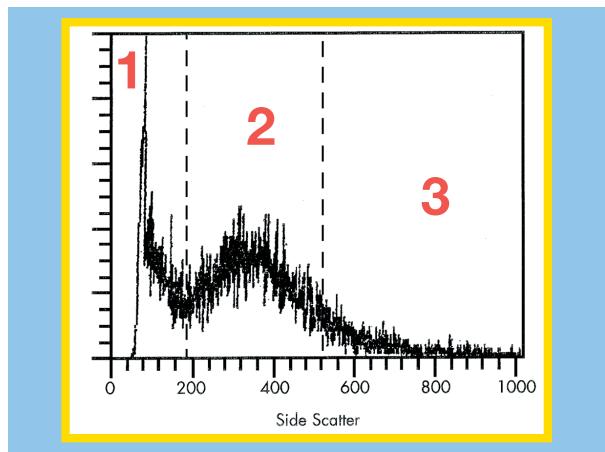
### **3.1.5.        Datenanalyse**

#### **3.1.5.1.    Analyse der Bakterienmessung**

Bei der Analyse der Bakterienmessung wird zunächst deren Grünfluoreszenz ausgewertet. In einem zweiten Schritt können, anhand einer Analyse der Grünfluoreszenz der Phagozytoseansätze, Rückschlüsse auf die inkorporierten Bakterien der neutrophilen Granulozyten und Monozyten gezogen werden. Stellt man diese Ergebnisse in einem Diagramm dar, in welchem die Granularität (X-Koordinate) gegen die Bakteriengröße (Y-Koordinate) aufgetragen wird (s. FSC/SSC dot plot), so erhält man eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien. Zu diesem Zeitpunkt kann noch nicht zwischen kleinen Verunreinigungen, wie z.B. Kristallen, den einzeln liegenden Bakterien und den in Haufen zusammenliegenden Bakterien unterschieden werden. Die Verunreinigungen und die Bakterienklumpen müssen daher ausgeblendet werden (Gating), da sie die auszuwertende Grünfluoreszenz falsch positiv verstärken können. Hierzu wird das SSC-Histogramm verwendet (s. Abb. 7). In diesem Diagramm ist die Bakterienmessung in folgende drei Bereiche (Abb.13) gegliedert:

- Bereich 1 = Zelltrümmer und kleine Kristalle
- Bereich 2 = einzeln liegende Bakterien
- Bereich 3 = Bakterienhaufen, große Kristalle

Die Bereiche 1 und 3 werden ausgeblendet (Gating), so daß die einzeln liegenden

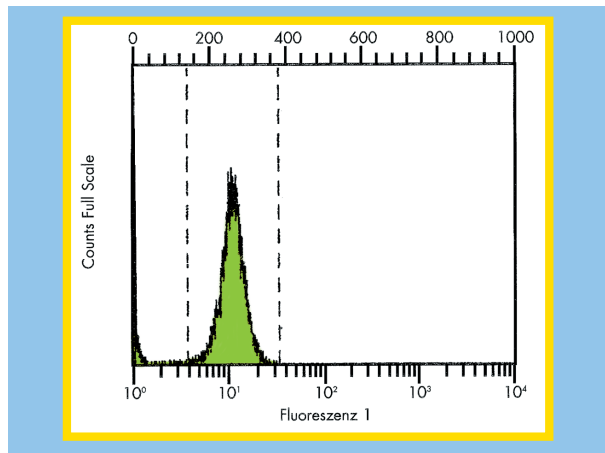


Bakterien isoliert betrachten werden können. Anschließend betrachtet man die Grünfluoreszenz der Bakterien anhand des FL1-Histogramms (Abb. 14).

Abb.13

SSC-Histogramm von FITC-markierten Bakterien – Gating der einzeln liegenden Bakterien

Während der Messung wird der Bakterienpeak mit Hilfe des Detectors auf  $10^1$  eingestellt.

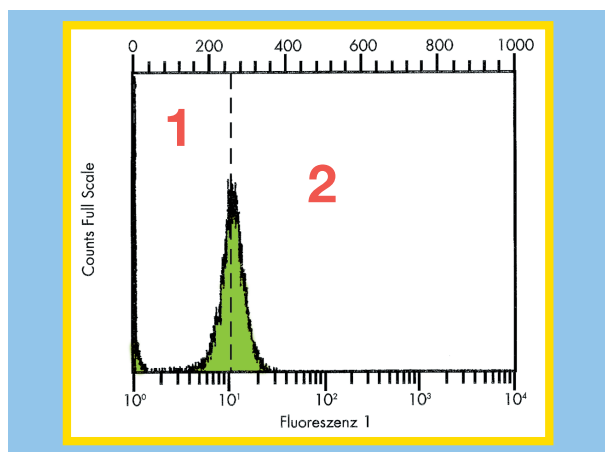


An den Grenzen der Bakterienkurve werden die Randbereiche ausgeblendet (s. Abb. 14), da diese wiederum Verunreinigungen darstellen können.

Abb.14

FL1-Fluoreszenz von FITC-markierten Bakterien – Separieren der einzelnen Bakterien von Verunreinigungen mittels Gating.

Von der so eingegrenzten Kurve wird jetzt der Median ermittelt. Definitionsgemäß ist alles was links des Medians liegt kleiner als ein Bakterium und alles was rechts des Medians liegt größer als ein Bakterium, z.B. zwei oder drei Bakterien. Gemessen wird die Grün-



fluoreszenz auf einer Logarithmusskala. Entlogarithmiert man den Median erhält man den sog. „Bakterienwert“. Dieser liegt in der Regel um den Wert 10.

Abb.15

Einstellen des Medians der Grünfluoreszenz von FITC-markierten Bakterien zur Bestimmung des Bakterienwertes

### 3.1.5.2. Analyse der Phagozytoseansätze

Die Analyse der Phagozytoseansätze vollzieht sich in zwei Schritten:

1. die Bestimmung des prozentualen Anteils von phagozytierenden neutrophilen Granulozyten bzw. Monozyten an der gemessenen Gesamtzellzahl.
2. die Bestimmung der gemessenen Grünfluoreszenz in den PMN bzw. Makrophagen sowie die anschließende Berechnung der inkorporierten Bakterien pro Zelle.

Im ersten Schritt wird der Ansatz im FSC/SSC dot plot dargestellt, indem sich die charakteristische Verteilung der Leukozyten zeigt. Durch Gating (Abb. 16) werden nun die Granulozyten bzw. Monozyten isoliert, um bei der nachfolgender Analyse ausschließlich diese Zellen betrachten zu können.

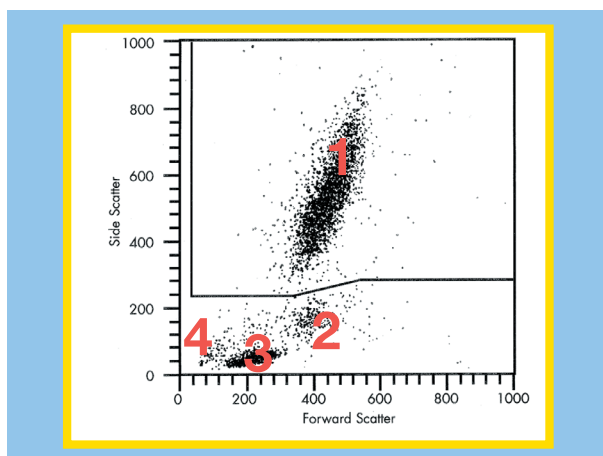


Abb.16

Gating der Granulozyten:

1 = Granulozyten

2 = Monozyten

3 = Lymphozyten

4 = Verunreinigungen

(Die Monozyten lassen sich für eine spezifische Analyse ebenso „gaten“.)

Anhand des FL1-Histogramms wird im zweiten Schritt der Median der gemessenen Grünfluoreszenz der zuvor ausgewerteten Zellen ermittelt, welcher das Maß für die Anzahl der inkorporierten Bakterien ist (Abb. 17).

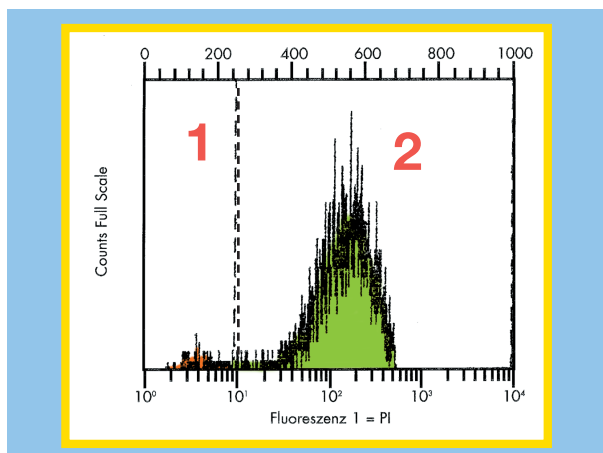


Abb.17

Einteilung der Granulozyten in phagozytose-positive- (2) und phagozytose-negative-Zellen (1)

Definitionsgemäß gilt, alle Werte die oberhalb des Medians liegen, entsprechen Elementen, die größer sind als ein Bakterium, z.B. zwei oder drei Bakterien. Auch bei der Analyse der Phagozytoseansätze wird die Grünfluoreszenz logarithmisch gemessen, wodurch der Phagozytosezwischenwert bestimmt werden kann. Dieser Phagozytosezwischenwert wird durch den in der Bakterienmessung errechneten Bakterienwert dividiert. Das Ergebnis dieser Berechnung ist der Phagozytosewert. Dieser Wert wiederum, gibt die Anzahl der inkorporierten Bakterien pro Granulozyt an. Mit Hilfe der statistischen Berechnungen der FACScan-Software errechnet sich, ausgehend vom Phagozytosewert, der prozentuale Anteil der an der Phagozytose beteiligten Granulozyten.

Die Analyse der Phagozytoseansätze ergibt somit zwei Phagozytoseparameter:

1. Prozentualer Anteil an Granulozyten bzw. Monozyten, die Bakterien inkorporiert haben
2. Phagozytierte Bakterien pro Granulozyt bzw. Monozyt

### 3.1.5.3. Kontrolle der am FACScan gemessenen Bakterien und Phagozyten mittels Fluoreszenzmikroskop

Der am Durchflußzytometer ermittelte prozentuale Anteil an phagozytose-positiven Granulozyten wurde am Fluoreszenzmikroskop verifiziert. Dazu sind einhundert Granulozyten mit Hilfe des Mikroskopes ausgezählt und die phagozytose-positiven Zellen in Prozent ermittelt worden. Auch die FITC-markierte Bakterien wurden kontrolliert, um eine gleichmäßig intensive Markierung zu gewährleisten.

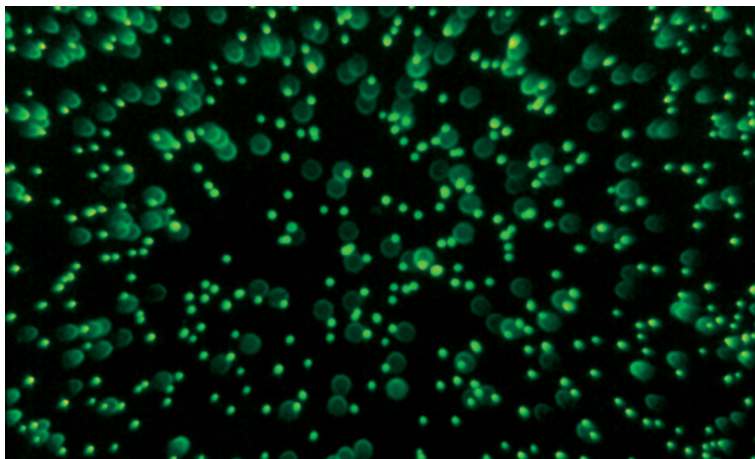


Abb.18  
*FITC-markierter  
Staphylokokkus aureus*

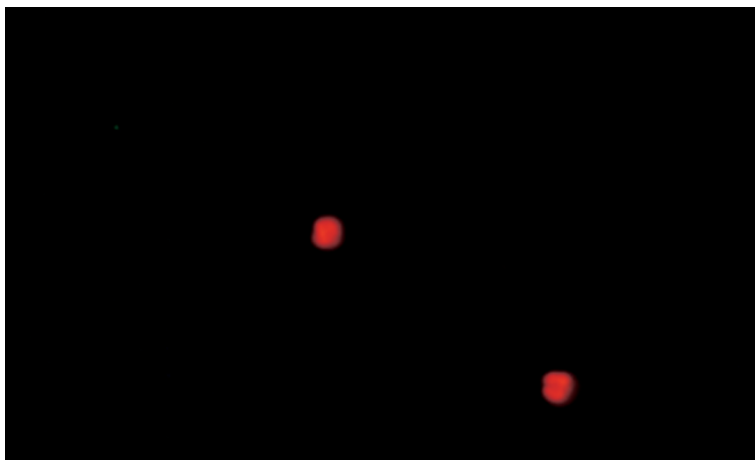


Abb.18.1  
*phagozytose-negative  
Granulozyten (Kontrolle,  
Inkubation auf Eis)*

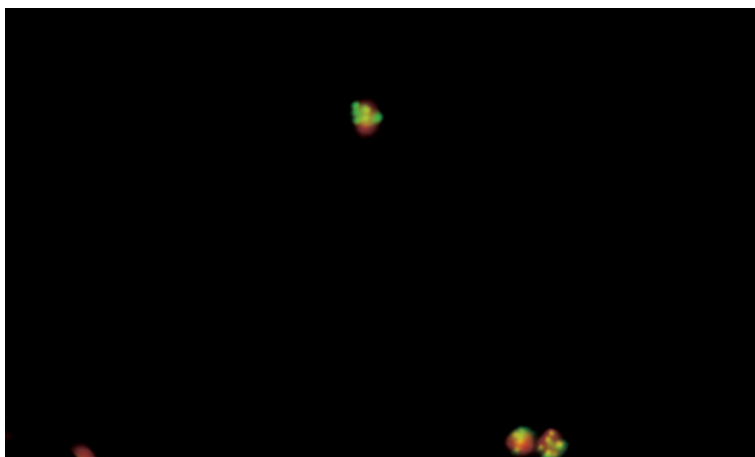


Abb.18.2  
*Staphylokokken inkorporierende  
Granulozyten (Phagozytose-  
ansatz, Inkubation bei 37 °C)*

### **3.1.6. Versuchsdurchführungen zur Etablierung des Mikroassays**

Die Voraussetzung für die Entwicklung eines standardisierten in-vitro-Verfahrens zur Messung der Phagozytosefunktion von Granulozyten und Monozyten sind Pilotversuche. In diesen Versuchen soll die optimale Bakterienart für den Testansatz gefunden werden. Weitere festzulegende Voraussetzungen sind die korrekte Inkubationszeit der Bakterien sowie die Reproduzierbarkeit des Testverfahrens. Schließlich muß mittels Kontrolle am Mikroskop der Beweis erbracht werden, daß die mit dem Fluoreszenzdurchflußzytometer gewonnenen Meßergebnisse definitiv auf die Messung von Granulozyten und Monozyten zurückzuführen und Falschmessungen durch Verunreinigungen oder sonstige Artefakte ausgeschlossen sind.

#### **3.1.6.1 Versuche zur Ermittlung der geeigneten Bakterienart**

Die gewonnenen, unterschiedlichen Ergebnisse der Phagozytosefunktion von Neutrophilen und Monozyten bei dem Krankheitsbild des Diabetes mellitus Typ II können auf verschiedenen, bei dem jeweiligen Test eingesetzten Erregern beruhen.

Daher ist einer Stichprobe von 10 Normalpersonen heparinisertes Vollblut entnommen worden. Aus diesem Vollblut sind drei verschiedene Testansätze hergestellt worden. Dem ersten Ansatz ist FITC-markierter Staph. aureus zugesetzt worden. Beim zweiten Ansatz ist E.coli zu dem Vollblut gemischt worden, während der dritte Ansatz Streptococccen enthielt.

Das Ziel der Untersuchung war hierbei:

Die Ermittlung des für unseren Testansatz geeigneten Bakterienstammes.

Dazu sind folgende Parameter überprüft worden:

- Die Anzahl an phagozytose-positiven Zellen
- Die Anzahl an inkorporierten Bakterien

Zusätzlich stellt sich die Frage, ob geschlechtsspezifische Unterschiede bei den Phagozytoseparametern vorhanden sind.

#### **3.1.6.2 Versuche zur Inkubationszeit von Vollblut und Bakterien**

Bei dem zu entwickelnden Testansatz ist die korrekte Inkubationszeit der Phagozyten mit den Bakterien wichtig, da bei einer zu kurzen Inkubationszeit falsch niedrige Zahlen an phagozytose-positiven Zellen und an inkorporierten Bakterien pro Phagozyt ermittelt wer-



den. Bei einer zu langen Inkubationszeit kann es auch zu falsch niedrigen Ergebnissen des Parameters „inkorporierte Bakterien pro Phagozyt“ kommen, da es durch den oxidativen Burst in den Zellen und dem damit verbundenen Abbau von Bakterien zu falsch niedrigen Grünfluoreszenzen kommen kann.

In der vorliegenden Dissertation wurde der Stichprobe von 10 Normalpersonen heparinisiertes Vollblut entnommen. Pro Proband sind 11 Phagozytoseansätze hergestellt worden. Der erste Ansatz ist mit Staph. aureus gemischt und sofort weiterbearbeitet worden. Die Inkubationszeit war hier 0 min. Beim zweiten Ansatz sind die Zellen mit Staph.aureus für 0,5 min inkubiert worden. Weitere Inkubationszeiten waren 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 und 20 min.

Das Ziel der Untersuchung war hierbei:

Die Ermittlung der für unseren Testansatz geeigneten Inkubationszeit.

Dazu sind folgende Parameter überprüft worden:

- Die Anzahl an phagozytose-positiven Zellen
- Die Anzahl an inkorporierten Bakterien

### **3.1.6.3** Kontrollversuche zur Überprüfung der am Durchflußzytometer gemessenen Ergebnisse

Von den mit Bakterien inkubierten Phagozytoseansätzen sind Präparate hergestellt worden. Unter einem Fluoreszenzmikroskop sind 100 Granulozyten bzw. Monozyten ausgezählt und der prozentuale Anteil an phagozytierenden Zellen ermittelt worden. Dieses Ergebnis ist mit dem Meßresultat des Durchflußzytometers verglichen worden.

Das Ziel der Kontrollversuche war es, eine hohe Übereinstimmung zwischen den am Mikroskop und am Durchflußzytometer ermittelten Ergebnissen zu zeigen, um zu beweisen, daß am FACS ausschließlich Zellen und Bakterien gemessen werden.

### **3.1.6.4** Versuche zur Reproduktionssicherheit des Phagozytoseassays

Der Stichprobe von 10 Normalpersonen ist wiederum heparinisiertes Vollblut entnommen worden. Für jeden Probanden sind 9 Phagozytoseansätze hergestellt worden. Der erste Ansatz ist sofort aufbereitet und gemessen worden. Der zweite stand 0,5 h bei Raumtemperatur, bevor Bakterien zugesetzt wurden. Der dritte ist erst 1 h nach Blutentnahme aufbereitet worden. Weitere „Lagerungszeiten“ sind 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 sowie 4 h gewesen.

Ziel dieser Versuchsreihe war:

Die Verifizierung der Reproduktionsicherheit unseres Testansatzes mit Hilfe von verschiedenen Meßverfahren.

Dazu sind folgende Parameter überprüft worden:

- Die Anzahl an phagozytose-positiven Zellen
- Die Anzahl an inkorporierten Bakterien

## **3.2. Tiermodell**

### **3.2.1. Versuchstiere**

Bei dem in der vorliegenden Studie verwendeten Rattenmodell, handelt es sich um die Cohen-Ratte. Dieser Tiertyp entwickelt einen nicht-spontanen Diabetes mellitus, der durch das Zusammenwirken endogener und exogener Faktoren ausgelöst wird und zu den typischen diabetischen Spätkomplikationen führt. Damit entspricht er dem Typ II-Diabetes des Menschen (Madar, 1984).

### **3.2.2. Blutentnahme bei der Cohen-Ratte**

Zur Blutentnahme bei der Cohen-Ratte wird der Schwanz des Tieres für eine Minute in warmes Wasser getaucht und anschließend abgetrocknet. Dann wird mit einer Kanüle die Schwanzvene punktiert und von dem austretenden Blut 50 µl für den Phagozytostest abpipettiert. Ein weiterer Tropfen Blut wird für die Blutglucosebestimmung und nochmals 25 µl für den HbA 1c-Test benötigt. Das Blut für den Phagozytostest wird in mit Vetren® 200 präparierte FACS-Röhrchen appliziert. Die Präparation der Röhrchen erfolgt, indem man 1 ml Vetren® 200 in ein FACS-Röhrchen pipettiert, das Röhrchen verschließt und dieses schüttelt. Anschließend wird das Vetren® abgegossen. Damit sind die Wände des Röhrchens mit Vetren® benetzt, um die Blutgerinnung zu verhindern. Der Phagozytostest wurde in einem wöchentlichen Zyklus bei den Cohen-Ratten durchgeführt.

### **3.2.3. Kontrolle der Stoffwechsellageparameter bei der Cohen-Ratte**

Die Stoffwechsellage der Cohen-Ratten wird anhand des Körpergewichts, der Blutglucose, des glycolisierten Hämoglobins und des oralen Glucosetoleranztests ermittelt. Zum Einen ist dadurch nachweisbar, daß die diabetische Linie der Cohen-Ratten bei Umstellung der Nahrung auf die Spezialdiät einen Diabetes ausbildet, zum Anderen kann überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen den in vivo erhobenen Stoffwechsellageparametern und den in vitro durchgeführten Phagozytoseleistungen von neutrophilen Granulozyten existiert.

#### **3.2.3.1. Bestimmung des Körpergewichtes der Ratten**

Das Körpergewicht aller Tiere ist direkt nach der Ankunft und anschließend wöchentlich mit einer Federwaage ermittelt worden.

#### **3.2.3.2. Bestimmung der Blutglucose**

Der Blutzucker der Ratten ist direkt nach der Ankunft und anschließend wöchentlich mit der Glucoseoxidase/Peroxidase-Methode bestimmt worden.

Die quantitative Bestimmung des Blutzuckers wird anschließend mit dem Blutzuckermeßgerät Glucometer Elite der Firma Bayer Diagnostics durchgeführt. Ein Tropfen Rattenblut von der Schwanzspitze wird hierbei mit einem Glucometer Elite Sensor in Kontakt gebracht, worauf dieser sich, aufgrund der Kapillarwirkung, automatisch füllt. Das Blut wird so in eine Reaktionskammer gesogen. Innerhalb der Reaktionskammer werden, durch eine chemische Reaktion der Blutglucose auf die Glucoseoxidase, Elektronen generiert, die daraufhin einen elektrischen Strom erzeugen. Dieser ist proportional zum Glucosegehalt im Blut. Das Glucometer mißt den produzierten Strom und zeigt am Display des Meßgerätes den ermittelten Wert an. Das Glucometer mißt den Blutzuckergehalt in dem Bereich von 40 mg/dl bis 500 mg/dl (2,2 – 27,8 mmol/l) zuverlässig.

#### **3.2.3.3. Oraler Glucosetoleranztest**

Der orale Glucosetoleranztest ist alle vier Wochen durchgeführt worden. Nach einer Fastenzeit von mindestens 12 Stunden wird zunächst der Nüchternblutzuckerwert der Versuchstiere bestimmt. Anschließend wird den Ratten über eine Knopfsonde 350 mg einer 35%igen, wässrigen Zuckerlösung je 100 g Körpergewicht in den Ösophagus appliziert. Der Blutglucosegehalt wird nach 30, 60 und 120 Minuten bestimmt.

### **3.2.3.4. Bestimmung des glycolisierten Hämoglobins (HbA 1c)**

#### **3.2.3.4.1. Prinzip der Messung des HbA 1c**

Der Gehalt an HbA 1c im Kapillarblut der Cohen-Ratte ist mit Hilfe des Testkits „Glyc-Affin GHb“ von der Firma Isolab Inc. aus Ohio/USA ermittelt worden. Dieser Kit basiert auf dem Prinzip der säulenchromatographischen Separation des Hämolysats der Rattenerthrozyten in zwei Fraktionen. Es handelt sich hierbei um das glycosylierte und das nicht glycosylierte Hämoglobin.

Das Harz in den Säulen ist ein Medium, das sich aus an Agarose gebundenen, borhaltigen Gruppen zusammensetzt. Glycosylierte Proteine binden an diese Gruppen, wenn das Hämolysat durch die Säulen wandert. Diese Bindung basiert auf der spezifischen Affinität der borhaltigen Gruppen zu Cis-Diolen, einer strukturellen Eigenschaft, die allen glycosylierten Proteinen gemeinsam ist. Die nicht glycosylierten Proteine werden nicht gebunden und bilden somit die erste Fraktion. Das glycosylierte Hämoglobin wird mit einem zweiten Puffer aus der Säule gewaschen. Die Adsorption der beiden Fraktionen mit Hilfe eines Spektrallinienphotometers gemessen. Durch eine anschließende Berechnung, mittels einer vom Hersteller vorgegebenen Umrechnungsformel (s. 3.2.3.4.2), wird der Prozentgehalt an glycosyliertem Hämoglobin ermittelt (Abraham EC, Perry Re et al., 1983; Vonesch HJ, 1987).

#### **3.2.3.4.2. Durchführung**

Die Bestimmung des HbA 1c umfaßt folgende Einzelschritte:

1. 200 µl Lösung 1 (= sample preparation reagent) werden in Reagiergefäße mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml vorgelegt.
2. 25 µl Rattenblut werden dazupipettiert. Das Hämolysat wird vorsichtig geschüttelt und anschließend mindestens 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wird das Hämolysat leicht geschüttelt.  
Das Hämolysat ist bei +4 °C bis zu 7 Tagen haltbar.
3. Die Probensäulen werden auf den Kopf gestellt bis sich das Säulenmaterial vollständig nach unten verlagert hat. 5 bis 10 min vor dem Bestimmungsbeginn werden die Säulen wieder umgedreht, in ein HbA 1c-Säulenrack gestellt und nach der erneuten Verlagerung des Säulenmaterials zuerst der obere und dann der untere Verschluß entfernt. Anschließend wird mit dem stumpfen Ende einer Pasteurpipette die Fritte der Säulen vorsichtig auf das Harzbett gedrückt und der Säulenpuffer dekantiert.

4. In jede Säule werden 2,0 ml Lösung 2 (= column preparation solution) gegeben, das Eluat wird verworfen.
5. 50 µl des Hämolyrates werden durch die Probensäule laufen gelassen, das Eluat wird verworfen. Wichtig ist hierbei, daß das Hämolyrat nicht antrocknet.
6. 100 µl Lösung 3 (= first fraction elution reagent) werden in jede Säule pipettiert, das Eluat wird verworfen und es wird exakt 10 min gewartet.
7. Reagenzröhrchen (12 x 75 mm) werden unter die Säulen gehängt und 3,0 ml Lösung 3 (= first fraction elution reagent) in die Säulen pipettiert. Das Eluat wird in den Reaktionsröhrchen gesammelt und beinhaltet das nicht glycosylierte Hämoglobin. Das Eluat wird mit 2,0 ml Aqua dest. versetzt und gut gemischt.
8. Unter die Säulen werden erneut Reaktionsgefäße (12 x 75 mm) gehängt und 2,0 ml Lösung 4 (= second fraction elution reagent) in die Säulen pipettiert. Das Eluat wird gesammelt und beinhaltet das glycosylierte Hämoglobin.
9. Die HbA 1c-Messung muß innerhalb einer Stunde an einem Spektrallinienphotometer mit dem Filter 405 nm gemessen werden. Als Leerwert benutzt man Aqua dest. zur Kalibrierung des Gerätes.

10. Berechnung:

$$\% \text{ HbA 1c} = \frac{100 \times \text{»glycosyliertes Hämoglobin«}}{(\text{»glyc. Hb«} + 2,5 \times \text{»nicht glyc. Hb«})}$$

#### 3.2.3.4.3. Verwendete Materialien

1. Glyc-Affin GHb  
Fa. Isolab Inc, Ohio/USA 44321, Best.-Nr.: SG - 6200
2. Reagiergefäße 1,5 ml aus PP mit PP-Stopfen  
Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Best.-Nr.: 72.690
3. Transfer-Pipetten  
Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Best.-Nr.: 86.1171.001

4. HbA 1c-Säulenracks  
Fa. Boehringer, Mannheim, Best.-Nr.: 611948
5. Spitzen für Mikroliterpipette 10-100 µl  
Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Best.-Nr.: 70.760
6. Variable Mikroliterpipette 10-100 µl  
Fa. Eppendorf, Hamburg
7. Multipipette  
Fa. Eppendorf, Hamburg
8. Combitips 2,5 ml  
Fa. Eppendorf, Hamburg, Best.-Nr.: 0030.048.415
9. Reagiergefäße 12 x 75 mm  
Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Best.-Nr.: 62.476.178 PS
10. Stoppuhr  
Fa. Elias, Freiburg
11. Aqua dest.  
Fa. Braun, Melsungen, Best.-Nr.: 03395197
12. Spektrallinienphotometer  
Fa. Eppendorf, Hamburg

### **3.2.4. Die Rezeptur der Spezialdiät für die Auslösung des Diabetes mellitus bei der Cohen-Ratte**

#### **3.2.4.1. Herstellung des Rattenfutters**

720 g Saccharose  
180 g Casein  
50 g Vitamine und Salze  
45 g Butter  
5 ml Öl

Die raffinierte Saccharose, das Casein sowie die Vitamine und Salze werden sorgfältig miteinander vermischt. Anschließend wird die Butter zusammen mit dem Öl erhitzt und unter die Mischung gerührt. Das fertige Spezialfutter wird in Plastikeimern bei +4 °C gelagert und den Ratten im Überfluß angeboten.

Diese Spezialdiät enthält nur 1,2 ppm Kupfer während handelsübliches Laborfutter für Ratten 1,8 ppm Kupfer enthält.

### 3.2.4.2. Verwendete Materialien

1. weißer Köllnzucker
2. Casein, Fa. ICN Biomedicals GmbH, Best.nr.: 90452005
3. Vitamine und Salze für ca. 4 kg Vorrat

Vitamine	Firma	Best.-Nr.	verwend. Menge
Pyridoxine	Sigma	P5669	0,48 g
Panthenic acid	Sigma	P2250	0,57 g
d-Biotin	Sigma	B4501	0,06 g
Vitamin B12	Sigma	V2876	0,04 g
Retinol	Sigma	R7632	0,57 g
Tocophenol Acetate	Sigma	T3376	3,87 g
Ergocalciferol	Sigma	E5750	0,04 g
Choline chloride	Sigma	C1879	95,0 g
p-Aminobenzoic Acid	Sigma	A0129	95,0 g
Thiaminehydrochloride	Merck	5009.230100	0,57 g
Riboflavin	Merck	7609.0010	0,57 g
Folio acid	Merck	3984.0005	0,57 g
Nicotinamide	Merk	500005.1000	9,50 g
<b>Salze</b>			
USP XIII No.2 Salt mixture	ICN	902845	3800 g

4. Butter
5. Sonnenblumenöl

### **3.2.5. Versuchsdurchführung**

Die Versuchsdurchführung beim Rattenansatz sah folgendermaßen aus:

Die diabetische und die nicht-diabetische Linie der Cohen-Ratte sind über einen Zeitraum von vier Wochen mit normalen Labor-Rattenfutter gefüttert worden. Anschließend ist für beide Linien das Futter, auf die rohrzuckerreiche und kupferarme Spezialdiät, umgestellt worden. Diese Diät wurde während der Versuchsreihe über 38 Wochen weitergefüttert. Den Tieren ist einmal wöchentlich aus der Schwanzspitze Blut entnommen worden, um den Glucosegehalt im Blut sowie die Phagozytosefähigkeit der Granulozyten zu bestimmen. Die Rattengranulozyten wurden 10 Minuten mit Staph. aureus inkubiert, d.h. der Phagozytoseansatz der Ratten entspricht dem beim Menschen durchgeführten Mikroassay. Darüberhinaus ist einmal wöchentlich das Gewicht der Ratten ermittelt worden. In einem Rhythmus von vier Wochen wurde zusätzlich ein oraler Glucosetoleranztest durchgeführt und alle sechs Wochen das HbA 1c im Blut der Ratten bestimmt.

Das Ziel dieser Studie am Tiermodell war der Nachweis einer Veränderung der Phagozytose der Granulozyten durch das Auftreten eines Diabetes mellitus. Diese Veränderungen sollen ausschließlich auf das Krankheitsbild des Diabetes und nicht auf andere Faktoren, wie z.B. Alter, Geschlecht, Krankheitsstadium zurückzuführen sein.



### **3.3. Klinische Studie mit Typ II-Diabetikern**

#### **3.3.1. Probanden**

In unserer Studie sind 35 Typ II-diabetische Patienten der Diabetesambulanz der Medizinischen Poliklinik, Giessen, aufgrund der Höhe ihres C-Peptidspiegels in 3 Gruppen eingeteilt worden:

- Gruppe 1 = Patienten mit einem C-Peptidspiegel  $\leq 1,5$  ng/dl (10 Personen)
- Gruppe 2 = Patienten mit einem C-Peptidspiegel  $\geq 1,6 \leq 3,5$  ng/dl (15 Personen)
- Gruppe 3 = Patienten mit einem C-Peptidspiegel  $\geq 3,6$  ng/dl (10 Personen)

Durch diese Gruppeneinteilung kann man das Krankheitsbild des Diabetes mellitus Typ II in seinem Längsverlauf beobachten. Bei Ausbruch der Erkrankung zeigen die Patienten eine Hyperinsulinämie mit erhöhten C-Peptid-Spiegeln im Serum (Gruppe 3). Im Verlauf der Erkrankung normalisieren sich die C-Peptid-Spiegel wieder (Gruppe 2), während im Endstadium herabgesetzte C-Peptid-Spiegel zu beobachten sind (Gruppe 1).

#### **3.3.2. Versuchsdurchführung**

Bei den Typ II-Diabetikern wird die Nüchtern-glucose, das HbA 1c, das C-Peptid im Serum sowie die Phagozytose von Granulozyten und Monozyten bestimmt. Aufgrund der Höhe des C-Peptid-Spiegels werden die Patienten in die drei Gruppen eingeteilt. Als Immunparameter werden der prozentuale Anteil an phagozytierenden Zellen und die inkorporierten Bakterien pro Zelle von Granulozyten bzw. Monozyten gemessen.

Ziel der klinischen Studie war der Nachweis der Unterschiede in der Phagozytosefunktion von Granulozyten und Monozyten in Abhängigkeit des Krankheitsstadiums des Diabetes mellitus Typ II.

## 4. Statistische Methodik

---

Die statistische Auswertung ist unter Beratung und Anleitung des Institutes für medizinische Statistik und Dokumentation der Justus Liebig Universität, Giessen erfolgt. Um wissenschaftliche Untersuchungen zu verifizieren, werden statistische Hypothesen aufgestellt. Sie sind bei Gruppenvergleichen meist so formuliert, daß das Ziel des Anwenders das Ablehnen der Hypothese ist. Als Signifikanzniveau  $p$  (Fehler 1. Art, Fehlerwahrscheinlichkeit oder  $p$ -Wert) wird diejenige Wahrscheinlichkeit bezeichnet, mit der man irrtümlich eine richtige Hypothese ablehnt. Will man einen geringen Fehler beim Ablehnen der Hypothese machen, so sollte diese Wahrscheinlichkeit klein sein, übliche Schranken sind dabei  $p=0,05$  und  $p=0,01$ . In der vorliegenden Studie wurde mit einem Signifikanzniveau von 5% ( $p=0,05$ ) gearbeitet.

Da die meisten Testverfahren von normalverteilten Daten ausgehen, wird diese Voraussetzung zunächst mit dem von Lilliefors modifizierten Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft. Ausgehend vom Ergebnis dieses Tests, schließen sich parametrische (bei normalverteilten Daten) oder nicht-parametrische (Rang-) Tests an.

### 4.1 Vergleich unabhängiger Stichproben

Für die Untersuchung des Materials auf geschlechts- und andere gruppenspezifische Merkmale ist die Varianzanalyse als statistische Auswertungstechnik angewandt worden. Für den Fall, daß ein lediglich zweistufiger Faktor vorliegt (wie z.B. beim Geschlecht), wird zur Prüfung der Nullhypothese ein  $t$ -Test verwendet. Werden hingegen mehrstufige Faktoren und deren Wirkung auf eine Beobachtungsvariable untersucht (wie z.B. bei den Typ II-Diabetikern: 3-fach Gruppierung nach C-Peptidspiegel), benutzt man eine Varianzanalyse. Erstes Ziel der Auswertung ist es festzustellen, ob die verschiedenen Stufen der Einflußfaktoren eine statistisch signifikante Wirkung auf die Beobachtungsvariable haben. Im Anschluß werden multiple Mittelwertvergleiche zwischen jeweils zwei Faktorstufen des mehrstufigen Faktors «C-Peptidspiegel» durchgeführt. Hier soll die Frage geklärt werden, zwischen welchen Stufen signifikante Unterschiede bestehen, wobei die Fragestellung durch paarweise Mittelwertvergleiche beantwortet werden kann. Dazu wird in diesem Fall der SCHEFFÉ-Test verwendet, da ein unbalanciertes Datenmaterial, d.h. ein unterschiedlicher Stichprobenumfang in den Faktorstufen, vorliegt. Zunächst ist das Datenmaterial jedoch hinsichtlich seiner Voraussetzungen für die o.g. Methoden zu überprüfen. So werden vor Anwendung eines parametrischen Verfahrens wie

dem t-Test oder der Varianzanalyse, die Stichproben auf Varianzhomogenität mit dem LEVENE-Test sowie auf Normalverteiltheit mit dem LILLIEFORS-Anpassungstest geprüft. Ist eine dieser Voraussetzungen zur Anwendung eines parametrischen Verfahrens nicht erfüllt, wird ein alternatives, nichtparametrisches Verfahren angewendet. Das nichtparametrische Pendant zur Varianzanalyse ist der KRUSKAL-WALLIS-Test, sowie der MANN-WHITNEY-U-Test, der die nichtparametrische Alternative zum t-Test darstellt. Im allgemeinen besitzt die Varianzanalyse eine bessere Trennschärfe als die soeben angeführten nichtparametrischen Tests (Rang-Tests). Dies wird durch die vorausgesetzte Normalverteilung und die Varianzhomogenität innerhalb der Gruppen in Bezug auf die abhängigen Variablen erkauft (Sachs L, 1992).

## **4.2 Methodik der bi- und multivariaten Statistik**

### **4.2.1 Überprüfung von Zusammenhängen**

Als Untersuchungsmethode zur Stärke des (linearen) Zusammenhangs bzw. von Je-Desto-Hypothesen zwischen den Phagozytoseparametern mit dem C-Peptid, dem HbA 1c und der Glucose diente die Korrelationsanalyse, deren Kennzeichnungsmaßzahl der „Korrelationskoeffizient“ ( $r$ ) für gleichskalierte metrische oder ordinale Variablen ist. Er liefert die Informationen über den Grad des Zusammenhangs. Da alle Kennzahlen in den zu untersuchenden Gruppen metrisch skaliert sind, wurde der Korrelationskoeffizient nach PEARSON-BRAVAIS bestimmt. Er ist standardisiert und eine dimensionslose Größe, die Werte zwischen -1 und +1 annehmen kann, wobei -1 einen perfekten umgekehrten Zusammenhang bedeutet, wenn hohe Werte der einen Variablen mit niedrigen Werten der anderen einhergehen.

Man spricht dann von einer negativen Korrelation. Umgekehrt verhält es sich bei einer positiven Korrelation. Fehlt dieser Zusammenhang, ist der Koeffizient nahe 0. Die so erhaltenen Korrelationen können folgenden Niveaus zugeordnet werden:  $r < 0,3$  drückt einen schwachen und  $r > 0,5$  einen starken Zusammenhang aus. Dazwischen liegt der mittlere oder moderate Zusammenhang. Jeder Korrelationskoeffizient wurde einem Test unterzogen, welcher die Nullhypothese ( $r = 0$ ) prüft. Die tabellarische Darstellung erfolgt mit einer sogenannten Korrelationstafel bzw. -matrix (Sachs L, 1992).

#### 4.2.2 Meßwiederholungsanalyse – Multivariate Varianzanalyse

Bei der Meßwiederholungsanalyse werden Einflüsse der Gruppen auf den zeitlichen Durchschnitt der untersuchten Parameter analysiert. Weiterhin wird geprüft, wie sich die Werte der zu analysierenden Parameter im zeitlichen Verlauf verändern. Dazu ist es gegebenenfalls notwendig unterschiedliche Meßzeitpunkte zusammenzufassen, da die Anzahl der Individuen innerhalb einer Gruppe größer sein muß als die Anzahl der Meßzeitpunkte. Zur Analyse solcher Meßwiederholungsdesigns kann sowohl ein univariater, als auch ein multivariater Ansatz verwendet werden (Kirk RE, 1982). Welches der beiden Verfahren zur Analyse herangezogen wurde, basiert auf einer Empfehlung von Maxwell & Denlaney (Maxwell S, Denlaney H, 1990): Der multivariate Ansatz sollte demnach bei einer Stichprobenanzahl von  $n < k + 10$  vermieden werden ( $k$  = Anzahl der Meßwiederholungsstufen). In diesem Fall ist der univariate Ansatz trennschärfer. In dieser Arbeit fand somit das univariate Verfahren Anwendung. Dazu wurden im Hinblick auf die eben gemachten Bemerkungen die notwendigen Voraussetzungen zur Anwendung des univariaten Verfahrens überprüft. Zunächst ist es notwendig, die Sphärizität zu prüfen. Diesem Zweck dient der Test von Mauchly. War die Voraussetzung der Sphärizität nicht gewährleistet, wurde alternativ eine modifizierte Form des univariaten Ansatzes verwendet, die auf der Multiplikation der Zähler und Nennerfreiheitsgrade mit Korrekturfaktoren (Epsilons) basiert. Dabei tendiert das Greenhouse-Geisser-Epsilon das «wahre»  $\epsilon$  zu «unterschätzen» (konservativ), und das Huynh-Feldt-Epsilon  $\epsilon$  zu «überschätzen» (Maxwell S, Denlaney H, 1990). Für den Fall, daß die Voraussetzung der Sphärizität nicht erfüllt war, wurde die Greenhouse-Geisser-Korrektur verwandt. Sind wie in dieser Studie mehrere Gruppen involviert, kommt eine weitere Voraussetzung zur Durchführung des univariaten Verfahrens hinzu. Diese verlangt die Gleichheit aller Varianz-Kovarianz-Matrizen der Gruppen. Diese Voraussetzung wurde mit dem Box-M Test überprüft. Handelt es sich um balancierte Daten, ist die Verletzung gleicher Varianz-Kovarianz-Matrizen nicht schwerwiegend, d.h. die verwendete univariate Teststatistik ist robust (Stevens, 1992).

## 5. Ergebnisse (präsentiert nach statistischer Methodik)

### 5.1 Mittelwertunterschiede bei unabhängigen Stichproben

#### 5.1.1 Geschlechtsmerkmale

Die Ergebnisse der Mittelwertanalyse zwischen den Gruppen, welche mit dem t-Test und dem MANN-WHITNEY-U-Test herausgearbeitet wurden, sind im folgenden tabellarisch dargestellt. Es ergaben sich folgende Resultate:

Geschlechtsunterschiede

Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) / Standardabweichung (SD)

Granulozyten	Männer		Frauen		Signifikanzniveau
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	p
<b>Prozentualer Anteil an Granulozyten, die Bakterien inkorporiert haben</b>					
E. coli	98,72	0,68	99,18	0,62	0.29 (n.s.)
Staph. aureus	97,42	1,94	99,09	0,52	0.09 (n.s.)
Streptokokken	77,86	13,11	94,86	3,37	0.03
<b>Phagozytierte Bakterien pro Granulozyt</b>					
E. coli	27,54	7,87	37,78	2,30	0.15 (n.s.)
Staph. aureus	9,92	2,41	18,12	4,86	0.01
Streptokokken	4,36	2,35	12,82	4,76	0.02

Abb. 19

Vergleich der verschiedenen Geschlechter in Bezug auf die Phagozytose von neutrophilen Granulozyten bei den untersuchten Bakterienstämmen *E. coli*, *Staph. aureus* und *Streptokokkus* der Gruppe A

#### Anmerkung:

Die mit n.s. bezeichneten Signifikanzniveaus kennzeichnen nicht signifikante Ergebnisse. In diesen Fällen ergab sich kein Widerspruch zur Hypothese gleicher Mittelwerte bei den Geschlechtern.

## Geschlechtsunterschiede

Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) / Standardabweichung (SD)

Monozyten	Männer		Frauen		Signifikanzniveau p
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	

### Prozentualer Anteil an Monozyten, die Bakterien inkorporiert haben

E. coli	83,02	8,42	90,34	6,60	0.17 (n.s.)
Staph. aureus	81,64	10,50	88,70	4,03	0.20 (n.s.)
Streptokokken	79,22	10,66	90,12	3,76	0.08 (n.s.)

### Phagozytierte Bakterien pro Monozyt

E. coli	12,84	5,42	19,04	1,29	0.06 (n.s.)
Staph. aureus	10,60	2,27	17,38	4,78	0.02
Streptokokken	5,86	1,79	14,12	9,16	0.08 (n.s.)

## Abb. 20

Vergleich der verschiedenen Geschlechter in Bezug auf die Phagozytose von neutrophilen Monozyten bei den untersuchten Bakterienstämmen *E. coli*, *Staph. aureus* und *Streptokokkus* der Gruppe A

### Anmerkung:

Die unterschiedlichen, publizierten Ergebnisse der Phagozytosefunktion von Neutrophilen und Monozyten bei dem Krankheitsbild des Diabetes mellitus Typ II, können auf verschiedene, bei dem jeweiligen Test eingesetzte Erreger beruhen. Daher ist einer Stichprobe von 10 Normalpersonen (5 Männer, 5 Frauen) heparinisiertes Vollblut entnommen worden. Aus diesem Vollblut sind drei verschiedene Testansätze hergestellt worden. Dem ersten Ansatz ist FITC-markierter *Staph. aureus* zugesetzt worden. Beim zweiten Ansatz ist *E.coli* zu dem Vollblut gemischt worden, während der dritte Ansatz Streptokokken enthielt.

Dazu sind folgende Parameter überprüft worden:

- Die Anzahl an phagozytose-positiven Zellen
- Die Anzahl an inkorporierten Bakterien
- Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den Phagozytoseparametern

### 5.1.2 Typ II-Diabetiker (Gruppeneinteilung anhand des C-Peptidgehalts)

Die Ergebnisse der Mittelwertanalyse bei den Typ II-Diabetikern wurden mittels Varianzanalyse (F-Test) herausgearbeitet und sind im folgenden tabellarisch dargestellt. Es wurde jeweils die Hypothese gleicher Mittelwerte der Gruppen untersucht. Im Falle eines signifikanten Unterschiedes mußte der Scheffé-Test aufgrund der ungleichen Anzahl von Fällen innerhalb der untersuchten Gruppen zur Durchführung von paarweisen Mittelwertvergleichen verwendet werden. Es ergaben sich folgende Merkmale:

Granulozyten	Mittelwert / Standardabweichung			
	% - Anteil an Granulozyten die Staph. aureus inkorporiert haben		Staph. aureus-Aufnahme pro Granulozyt	
Gruppe 1 (erniedrigter C-Peptidspiegel)	96,5	± 3,59	27,9	± 15,66
Gruppe 2 (normaler C-Peptidspiegel)	92,5	± 10,98	24,5	± 19,04
Gruppe 3 (erhöhter C-Peptidspiegel)	94,6	± 7,99	17,3	± 5,89

Monozyten	Mittelwert / Standardabweichung			
	% - Anteil an Granulozyten die Staph. aureus inkorporiert haben		Staph. aureus-Aufnahme pro Granulozyt	
Gruppe 1 (erniedrigter C-Peptidspiegel)	93,3	± 5,69	25,8	± 21,90
Gruppe 2 (normaler C-Peptidspiegel)	93,0	± 6,60	58,2	± 14,10
Gruppe 3 (erhöhter C-Peptidspiegel)	90,5	± 8,91	18,7	± 8,61

Abb. 21

Die Höhe des C-Peptid-Serumspiegels in Abhängigkeit von der Phagozytose der Granulozyten (oben) und Monozyten (unten)

**Anmerkung:**

In der vorliegenden Dissertation sind 35 Typ II-diabetische Patienten aufgrund der Höhe ihres C-Peptidspiegels in 3 Gruppen eingeteilt worden:

- Gruppe 1 = Patienten mit einem C-Peptidspiegel  $\leq 1,5$  ng/dl (10 Personen)
- Gruppe 2 = Patienten mit einem C-Peptidspiegel  $\geq 1,6 \leq 3,5$  ng/dl (15 Personen)
- Gruppe 3 = Patienten mit einem C-Peptidspiegel  $\geq 3,6$  ng/dl (10 Personen)

Durch diese Gruppeneinteilung kann man das Krankheitsbild des Diabetes mellitus Typ II in seinem Längsverlauf beobachten. Bei Ausbruch der Erkrankung zeigen die Patienten eine Hyperinsulinämie mit erhöhten C-Peptid-Spiegeln im Serum (Gruppe 3). Im Verlauf der Erkrankung normalisieren sich die C-Peptid-Spiegel wieder (Gruppe 2), während im Endstadium herabgesetzte C-Peptid-Spiegel zu beobachten sind (Gruppe 1).

	SCHEFFÉ - Test Gruppenunterschiede	Varianzanalyse F-Wert (= Prüfgröße)	p Signifikanzniveau
<b>Granulozyten</b>			
%-Anteil mit inkorporierten Staph.aureus	entfällt	0,81	0.45 (n.s.)
Staph-Aufnahme pro Granulozyt	entfällt	1,23	0.29 (n.s.)
<b>Monozyten</b>			
%-Anteil mit inkorporierten Staph.aureus	entfällt	0,57	0.57 (n.s.)
Staph-Aufnahme pro Monozyt	entfällt	0,67	0.51 (n.s.)

Abb. 22

Ergebnistabelle der signifikanten Gruppenunterschiede bei Typ II-Diabetikern

**Charakteristika:** Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede bzgl. der drei Gruppen im Hinblick auf die untersuchten Parameter. Somit entfällt die Durchführung der Anschlußtests.

**Bemerkung:** Die nichtparametrische Alternative der einfaktoriellen Varianzanalyse, der Kruskal-Wallis-Test, liefert die gleichen Ergebnisse.



## 5.2 Mittelwertunterschiede bei abhängigen Stichproben

### 5.2.1 Unterschiede der Bakterienarten

Die Ergebnisse der Analyse zwischen den Bakterienarten werden im folgenden tabellarisch dargestellt. Es wurde jeweils die Hypothese gleicher Anzahlen an der Phagozytose beteiligter Zellen sowie der aufgenommenen Bakterienzahl pro Zelle mit dem nichtparametrischen Friedmann-Test für verbundene Stichproben überprüft.

Es ergaben sich folgende Resultate:

	Mittelwerte mit Standardabweichungen			Signifikanzniveau (p)
	Staph. aureus	E. coli	Streptokokken	
<b>Granulozyten</b>				
%-Anteil mit inkorporierten Bakterien	98,26% ± 1,6	98,95% ± 0,7	89,36% ± 12,7	0.01
Bakterienaufnahme pro Granulozyt	14,12% ± 5,6	31,52% ± 8,1	9,59% ± 5,2	0.01
<b>Monozyten</b>				
%-Anteil mit inkorporierten Bakterien	85,17% ± 8,4	86,68% ± 8,1	84,67% ± 9,5	0.28 (n.s.)
Bakterienaufnahme pro Monozyt	13,99% ± 5,0	15,94% ± 5,0	9,99% ± 7,6	0.06 (n.s.)

Abb. 23

*Vergleich der Phagozytoseleistung von Granulozyten und Monozyten hinsichtlich der untersuchten Bakterienstämme E. coli, Staph. aureus und Streptokokkus der Gruppe A.*

*Bei den Granulozyten erkennt man einen signifikanten Unterschied, welches Bakterium aufgenommen wird, sowohl bezüglich des prozentualen Anteils als auch bei der Bakterienaufnahme pro Granulozyt. Bei den Monozyten sind diese Unterschiede nicht erkennbar.*

### 5.2.2 Unterschiede der Auswertung (Mikroskop vs. apparative Auswertung)

Es wurde jeweils die Hypothese der Übereinstimmung der Auswertungsmethoden mit dem nichtparametrischen Friedmann-Test für verbundene Stichproben überprüft.

Es ergaben sich folgende Resultate:

	Mittelwerte mit Standardabweichungen		p Signifikanzniveau
	Facscan	Mikroskop	
Staph. aureus	97,60% ± 1,6	98,26% ± 1,9	0,26
E. Coli	98,95% ± 0,7	99,00% ± 1,2	0,79
Streptokokken A	86,36% ± 12,7	86,50% ± 12,6	0,88

Abb. 24

Vergleich zwischen der durchflußzytometrischen Messung und der manuellen Auswertung mit dem Mikroskop hinsichtlich des prozentualen Anteils von Granulozyten, die Bakterien phagozytiert haben

**Anmerkung:**

*Der am Durchflußzytometer ermittelte prozentuale Anteil an phagozytose-positiven Granulozyten wurde am Fluoreszenzmikroskop verifiziert. Dazu sind einhundert Granulozyten mit Hilfe des Mikroskopes ausgezählt und die phagozytose-positiven Zellen in Prozent ermittelt worden.*

**Schlußfolgerung:** Es existiert kein signifikanter Unterschied zwischen der maschinellen Auswertung durch das Fluoreszenzdurchflußzytometer und dem manuellen Auszählen der Zellen am Fluoreszenzmikroskop in Bezug auf den prozentualen Anteil phagozytose-positiver Granulozyten im Vollblut.

### 5.2.3 Reproduktionstest zur Überprüfung des Phagozytoseassays

#### 5.2.3.1 Reproduktionstest bei Granulozyten

Es wurde jeweils die Hypothese der Übereinstimmung der Parameter „prozentualer Anteil an Granulozyten, die Staph. aureus phagozytiert haben“, „Anzahl an Granulozyten im Mittel, die Staph. aureus phagozytiert haben“ und „Anzahl an phagozytierten Staph. aureus pro Granulozyt“ mit dem nichtparametrischen Friedman-Test für verbundene Stichproben überprüft. Zunächst erfolgt eine deskriptive Darstellung der Mittelwerte der Parameter zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Tabelle der Signifikanzniveaus bzgl. des Geschlechts finden sich unter 5.3.2 „Meßwiederholungsanalyse“, da die Daten im zeitlichen Durchschnitt untersucht werden. Es ergaben sich folgende Resultate:

	Zeitpunkt (h nach Blutentnahme)								
	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4
Männer	97,9±1,2	99,1±0,6	98,9±0,9	97,6±2,8	96,8±1,3	95,7±3,7	95,2±3,0	93,8±3,5	92,4±3,7
Frauen	97,9±1,4	98,1±1,9	98,7±1,8	96,9±2,7	94,9±4,6	94,8±4,1	94,4±4,7	91,5±6,8	92,4±6,5
Gesamt	97,9±1,2	98,6±1,4	98,8±1,3	97,3±2,6	95,8±3,3	95,2±3,7	94,8±3,7	92,7±5,3	92,4±5,0

Abb. 25.1

Mittelwerte mit Standardabweichungen des prozentualen Anteils an Granulozyten, die *Staph. aureus* inkorporiert haben. Die Blutproben wurden für unterschiedliche Zeiträume auf Eis gelagert.

**Anmerkung:**

Einer Stichprobe von 10 Normalpersonen ist heparinisieretes Vollblut entnommen worden. Für jeden Probanden sind 9 Phagozytoseansätze hergestellt worden. Der erste Ansatz ist sofort aufbereitet und gemessen worden. Der zweite stand 0,5 h bei Raumtemperatur bevor Bakterien zugesetzt wurden. Der dritte ist erst 1 h nach Blutentnahme aufbereitet worden. Weitere „Lagerungszeiten“ sind 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 sowie 4 h gewesen.

	Zeitpunkt (h nach Blutentnahme)								
	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4
Männer	13,7±11,5	15,7±9,2	15,3±9,7	13,9±8,2	12,3±7,4	12,9±6,7	11,6±5,7	11,6±4,9	12,0±4,2
Frauen	15,8±7,7	16,4±8,2	17,3±5,7	16,6±7,4	16,2±7,5	15,9±7,3	14,5±8,6	14,9±8,3	12,2±5,4
Gesamt	14,7±9,2	16,1±8,2	16,3±7,5	15,3±7,5	14,2±7,3	14,5±6,8	13,0±7,0	13,2±6,6	12,1±4,6

Abb. 25.2

Mittelwerte mit Standardabweichungen der Anzahl an inkorporierten *Staph. aureus* pro Granulozyt. Die Blutproben wurden für unterschiedliche Zeiträume auf Eis gelagert.

Ziel dieser Versuchsreihe war:

Die Übereinstimmung der Messungen zu den verschiedenen aufbereiteten Proben zu zeigen. Damit wäre die Reproduktionsicherheit unseres Testansatzes gezeigt.

Dazu sind folgende Parameter überprüft worden:

- Die Anzahl an phagozytose-positiven Zellen
- Die Anzahl an inkorporierten Bakterien

Der anschließende Friedmann-Test ergab für beide Parameter signifikante Veränderungen im zeitlichen Verlauf. Anhand der deskriptiven Darstellung ist ein «Abwärtstrend» erkennbar. Die Tabellen zeigen, daß ab einem Zeitraum von 1,5 h signifikant weniger Zellen Bakterien aufgenommen haben und darüber hinaus die Anzahl der aufgenommenen Bakterien pro Zelle signifikant abnimmt. Ein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen existiert in dieser Versuchsreihe jedoch nicht (siehe 5.3.2 Meßwiederholungsanalyse).

### 5.2.3.2 Reproduktionstest bei Monozyten

Das Vorgehen entspricht dem unter 5.2.3.1 „Reproduktionstest bei Granulozyten“.

Es ergaben sich folgende Resultate:

	Zeitpunkt (h nach Blutentnahme)									
	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	
Männer	75,5±6,6	78,5±6,0	85,6±5,0	83,0±7,7	80,0±11,5	87,2±9,3	85,0±7,9	83,9±9,1	82,2±9,4	
Frauen	86,9±9,7	79,8±9,5	89,5±9,0	81,5±11,6	82,0±10,2	85,3±10,9	85,6±10,3	84,5±9,3	80,2±11,0	
Gesamt	81,2±9,8	79,1±7,5	87,6±7,2	82,3±9,3	81,0±10,3	86,3±9,6	85,3±8,6	84,2±8,7	81,2±9,7	

Abb. 26.1

Mittelwerte mit Standardabweichungen des prozentualen Anteils an Monozyten, die *Staph. aureus* inkorporiert haben. Die Blutproben wurden für unterschiedliche Zeiträume auf Eis gelagert.

#### Anmerkung:

Einer Stichprobe von 10 Normalpersonen ist heparinisiertes Vollblut entnommen worden. Für jeden Probanden sind 9 Phagozytoseansätze hergestellt worden. Der erste Ansatz ist sofort aufbereitet und gemessen worden. Der zweite stand 0,5 h bei Raumtemperatur bevor Bakterien zugesetzt wurden. Der dritte ist erst 1 h nach Blutentnahme aufbereitet worden. Weitere „Lagerungszeiten“ sind 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 sowie 4 h gewesen.

	Zeitpunkt (h nach Blutentnahme)									
	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	
Männer	9,7±1,9	10,2±4,0	10,2±3,6	11,3±2,5	11,8±8,8	16,7±11,2	13,6±11,6	13,9±7,7	17,7±9,3	
Frauen	17,6±8,5	9,6±2,6	19,2±6,4	16,1±7,0	16,0±3,7	13,5±4,5	15,9±3,8	15,1±4,3	16,1±4,9	
Gesamt	13,7±7,1	9,9±3,2	14,7±6,8	13,7±5,5	13,9±6,7	15,1±8,2	14,8±8,2	14,5±5,9	16,9±7,1	

Abb. 26.2

Mittelwerte mit Standardabweichungen der Anzahl an inkorporierten *Staph. aureus* pro Monozyt. Die Blutproben wurden für unterschiedliche Zeiträume auf Eis gelagert.

Der anschließende Friedmann-Test ergab für den Parameter „prozentualer Anteil an Monozyten, die *Staph. aureus* phagozytiert haben“ signifikante Veränderungen im zeitlichen Verlauf, nicht aber für den Parameter „Anzahl an phagozytierten *Staph. aureus* pro Monozyt“.

Im zeitlichen Durchschnitt ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern (siehe 5.3.2 „Meßwiederholungsanalyse“).

### 5.3 Ergebnisse der multivarianten Analyse

#### 5.3.1 Korrelationsprüfung der Geschlechtsmerkmale

Zur Analyse von möglichen Zusammenhängen zwischen den Parametern dient die Korrelationsanalyse. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist von folgendem Grundsatz auszugehen: Je stärker die Kennzahl im positiven wie im negativen Bereich dem Wert 1 zustrebt, desto mehr besteht hier ein (direkter oder umgekehrter) linearer Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern.

Gleichzeitig wird stets die Hypothese geprüft, daß der jeweilige Korrelationskoeffizient gleich null ist, was bedeuten würde, daß kein Zusammenhang zwischen den korrelierten Parametern vorhanden ist.

<b>Granulozyten</b>	C-Peptid [ng/dl]	HBA 1c [%]	Glucose [mg/dl]
prozentualer Anteil an Granulozyten die Staph. aureus phagozytiert haben	-0,12	-0,16	-0,01
phagozytierte Staph. aureus pro Granulozyt	-0,09	-0,26	-0,22
<b>Monozyten</b>	C-Peptid [ng/dl]	HbA 1c [%]	Glucose [mg/dl]
prozentualer Anteil an Monozyten die Staph. aureus phagozytiert haben	-0,17	-0,15	-0,29
phagozytierte Staph. aureus pro Monozyt	-0,04	0,08	0,06

Abb. 28:

*Korrelationskoeffizienten der untersuchten Parameter von Granulozyten und Monozyten bei Typ II-Diabetikern*

**Anmerkung:**

Bei der Typ II-Diabetiker Studie sind als Diabetes-Parameter das C-Peptid im Serum, das HbA 1c und die Glucose bestimmt worden. Diese Parameter sind mit den Immunparametern (prozentualer Anteil phagozytose-positiver Zellen, Anzahl der inkorporierten Bakterien pro Zelle) korreliert worden.

**Schlußfolgerung:**

Keiner der aufgeführten Korrelationskoeffizienten weist auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern hin. Weder bei den Granulozyten, noch bei den Monozyten existiert eine Korrelation zwischen der Höhe des C-Peptidspiegels im Serum, dem HbA 1c und dem Glucosespiegel einerseits und den Phagozytoseparametern „prozentualer Anteil an phagozytose-positiven Zellen“ und „Bakterienaufnahme pro Zelle“ andererseits.

**5.3.2 Meßwiederholungsanalyse**

Da die Anzahl der Meßzeitpunkte mit neun wesentlich größer ist als die Anzahl der Personen innerhalb einer Gruppe (fünf) (siehe statistische Methoden), kann lediglich überprüft werden, ob signifikante Unterschiede im zeitlichen Mittel vorliegen. Die Ergebnisse werden im folgenden dargestellt:

Inkubation im zeitlichen Durchschnitt	Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD)				Signifikanzniveau
	Männer		Frauen		
<b>Granulozyten</b>	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	p
%-Anteil phagozytierter Staph. aureus	73,10	5,5	81,18	3,9	0.03
phagozytierte Staph. aureus pro Granulozyt	8,39	2,4	13,46	2,7	0.01
<b>Monozyten</b>	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	p
%-Anteil phagozytierter Staph. aureus	74,24	7,6	85,34	1,0	0.03
phagozytierte Staph. aureus pro Monozyt	20,62	25,6	13,22	3,4	0.55 (n.s.)

Abb. 29:

Geschlechtsspezifische Unterschiede beim Inkubationsverhalten von Granulozyten und Monozyten

**Anmerkung:**

*In der vorliegenden Dissertation wurde der Stichprobe von 10 Normalpersonen heparinisiertes Vollblut entnommen. Pro Proband sind 11 Phagozytoseansätze hergestellt worden. Der erste Ansatz ist mit Staph. aureus gemischt und sofort weiterbearbeitet worden. Die Inkubationszeit war hier 0 min. Beim zweiten Ansatz sind die Zellen mit Staph.aureus für 0,5 min inkubiert worden. Weitere Inkubationszeiten waren 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 und 20 min.*

**Schlußfolgerung:**

*Im zeitlichen Mittel sind, bis auf den Parameter der aufgenommenen Bakterien pro Zelle bei Monozyten, die Geschlechtsunterschiede signifikant.*

<b>Reproduktion</b>	<b>Männer</b>		<b>Frauen</b>		<b>p</b>
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	
<b>Granulozyten</b>					
%-Anteil phagozytierter Staph. aureus	96,37	1,8	95,51	3,4	0.64 (n.s.)
phagozytierte Staph. aureus pro Granulozyt	13,22	7,2	15,51	6,7	0.62 (n.s.)
<b>Monozyten</b>	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	<b>p</b>
%-Anteil phagozytierter Staph. aureus	82,32	4,4	83,92	9,3	0.74 (n.s.)
phagozytierte Staph. aureus pro Granulozyt	12,80	6,5	15,45	4,2	0.47 (n.s.)

**Abb. 30:**

*Reproduktion der geschlechtsspezifischen Unterschiede beim Inkubationsverhalten von Granulozyten und Monozyten*

**Schlußfolgerung:**

*Im zeitlichen Mittel sind die Phagozytoseparameter weder bei den Granulozyten, noch bei den Monozyten bezüglich der Geschlechtsunterschiede signifikant.*

## Diabetische und nichtdiabetische Ratten:

Im folgenden sind die Signifikanzniveaus der Parameter unserer Rattenmodelle bzgl. der gemessenen Parameter im zeitlichen Durchschnitt wie auch im zeitlichen Verlauf tabellarisch aufgelistet.

Die wöchentlich erhobenen Daten wurden in Klassen zu jeweils vier Wochen zusammengefasst.

Parameter	Signifikanzniveau des zeitlichen Durchschnitts	Signifikanzniveau des zeitlichen Verlaufs
Körpergewicht	0,10 (n.s.)	0,42 (n.s.)
Blutglucose	0,01	0,01
HbA1	0,01	0,01
Oraler Glucosetoleranztest		
- nüchtern	0,01	0,01
- nach 30 Minuten	0,01	0,01
- nach 60 Minuten	0,01	0,01
- nach 120 Minuten	0,01	0,01
Prozentualer Anteil an von Granulozyten inkorporierten Bakterien	0,01	0,053 (n.s.)
Bakterienaufnahme pro Granulozyt	0,17 (n.s.)	0,01

Abb. 31:

*Signifikanzniveaus der Rattenversuche in Bezug auf den zeitlichen Verlauf und Durchschnitt*

In den nachfolgenden Tabellen sind die Parameter Körpergewicht, Blutglucose, HbA 1c, oraler Glucosetoleranzwert (zu verschiedenen Zeitpunkten), der prozentuale Anteil inkorporierter Bakterien sowie die Anzahl der aufgenommenen Bakterien pro Granulozyt detailliert aufgeführt.

\*1 Downward Line = Blutzucker  $\leq$  200 mg/dl im oGTT

\*2 Upward Line = Blutzucker  $>$  200 mg/dl im oGTT



Woche	Downward Line* <sup>1</sup>		Upward Line* <sup>2</sup>	
	$\bar{x}$ (in g)	SD	$\bar{x}$ (in g)	SD
1.	301,3	27,8	279,6	26,5
5.	296,7	21,6	297,5	16,9
9.	295,2	21,6	290,8	15,2
13.	305,6	26,3	299,1	18,7
17.	310,7	19,6	303,8	22,7
21.	314,7	24,7	306,6	23,4
25.	315,4	18,3	311,8	19,8
29.	332,5	49,6	310,3	16,4
33.	346,6	55,2	324,3	37,3
37.	360,6	50,5	342,8	29,2

Abb. 32:

Entwicklung des Körpergewichts (in g)

Woche	Downward Line* <sup>1</sup>		Upward Line* <sup>2</sup>	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
1.	83,1	4,3	86,2	6,3
5.	80,9	3,2	81,7	3,8
9.	81,1	4,8	83,5	3,3
13.	81,7	3,7	178,0	35,8
17.	82,1	5,9	213,8	23,4
21.	83,5	5,6	202,4	15,3
25.	83,3	3,5	208,9	23,3
29.	82,2	4,4	206,4	12,1
33.	82,5	3,8	207,4	14,7
37.	81,6	6,8	213,1	28,6

Abb. 33:

Entwicklung der Blutglucose (mg/dl)

\*<sup>1</sup> Downward Line = Blutzucker  $\leq$  200 mg/dl im oGTT

\*<sup>2</sup> Upward Line = Blutzucker  $>$  200 mg/dl im oGTT

Woche	Downward Line		Upward Line	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
1.	4,9	0,6	5,3	0,9
7.	5,1	0,6	6,5	1,3
13.	5,0	0,3	8,1	0,8
19.	4,9	0,3	11,0	1,0
25.	5,0	0,4	11,3	1,1
31.	5,2	0,5	11,4	1,1
38.	5,2	0,5	11,1	1,0
42.	5,1	0,3	11,3	0,8

Abb. 34:  
Entwicklung des HbA 1c (in %)

Woche	Downward Line* <sup>1</sup>		Upward Line* <sup>2</sup>	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
1.	54,9	24,3	97,6	12,1
5.	85,0	8,3	88,4	8,6
9.	84,6	7,2	84,8	5,7
13.	84,1	6,4	193,3	46,5
17.	86,0	7,7	236,2	52,9
21.	89,0	9,6	198,0	24,5
25.	89,7	7,9	190,8	52,5
29.	89,4	6,7	205,5	20,2
33.	87,2	6,9	202,7	27,0
37.	84,3	8,3	212,6	29,1
41.	86,4	7,7	219,4	48,9

Abb. 35:  
Entwicklung des oralen Glucosetoleranztestes (Nüchternwert) (mg/dl)

\*<sup>1</sup> Downward Line = Blutzucker  $\leq$  200 mg/dl im oGTT

\*<sup>2</sup> Upward Line = Blutzucker  $>$  200 mg/dl im oGTT

Woche	Downward Line* <sup>1</sup>		Upward Line* <sup>2</sup>	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
1.	94,0	6,5	105,0	17,1
5.	89,1	10,9	105,7	7,5
9.	94,3	16,9	147,0	17,1
13.	97,6	21,7	299,5	59,1
17.	95,6	18,1	316,3	60,1
21.	89,9	15,5	286,0	36,0
25.	88,8	13,3	296,1	63,4
29.	90,6	17,8	300,8	61,8
33.	91,3	22,6	274,7	32,6
37.	93,3	19,8	271,8	37,4
41.	88,9	20,3	290,2	46,7

Abb. 36:  
Entwicklung des oralen Glucosetoleranztestes (nach 30 Minuten) (mg/dl)

Woche	Downward Line* <sup>1</sup>		Upward Line* <sup>2</sup>	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
1.	101,1	5,7	117,9	17,0
5.	113,3	12,6	123,5	12,2
9.	124,2	12,1	234,1	25,6
13.	127,0	17,7	381,0	59,5
17.	129,1	24,2	407,5	34,2
21.	122,6	12,1	413,2	78,2
25.	119,2	8,9	402,3	40,2
29.	128,7	13,4	397,2	39,7
33.	130,3	17,3	362,1	23,8
37.	126,5	12,0	361,3	26,0
41.	128,6	12,0	373,4	41,0

Abb. 37:  
Entwicklung des oralen Glucosetoleranztestes (nach 60 Minuten) (mg/dl)

\*<sup>1</sup> Downward Line = Blutzucker  $\leq$  200 mg/dl im oGTT

\*<sup>2</sup> Upward Line = Blutzucker  $>$  200 mg/dl im oGTT

Woche	Downward Line* <sup>1</sup>		Upward Line* <sup>2</sup>	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
1.	99,4	13,9	95,5	18,0
5.	107,8	17,2	89,6	6,7
9.	126,2	34,6	93,9	7,8
13.	121,1	30,7	145,5	74,0
17.	123,5	26,0	252,2	56,6
21.	133,6	28,3	230,3	30,9
25.	129,9	27,8	223,0	42,7
29.	133,4	26,0	216,3	23,5
33.	133,2	28,6	212,6	29,1
37.	132,0	25,2	223,3	30,9
41.	132,6	27,3	232,7	49,1

Abb. 38:  
Entwicklung des oralen Glucosetoleranztestes (nach 120 Minuten) (mg/dl)

Woche	Downward Line* <sup>1</sup>		Upward Line* <sup>2</sup>	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
1.	72,8	5,9	71,6	6,8
5.	72,1	9,7	81,6	7,6
9.	59,5	17,6	75,4	10,4
13.	73,5	16,9	85,5	4,9
17.	74,5	15,9	84,1	10,6
21.	68,7	22,6	86,5	3,8
25.	84,4	11,3	89,8	6,0
29.	75,3	16,2	91,5	3,9
33.	76,2	13,2	84,5	5,6
37.	78,2	14,9	94,0	1,9

Abb. 39:  
Entwicklung des prozentualen Anteils an phagozytierten Bakterien

\*<sup>1</sup> Downward Line = Blutzucker  $\leq$  200 mg/dl im oGTT

\*<sup>2</sup> Upward Line = Blutzucker  $>$  200 mg/dl im oGTT

Woche	Downward Line* <sup>1</sup>		Upward Line* <sup>2</sup>	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
1.	8,5	2,7	10,3	3,8
5.	11,0	3,5	10,3	1,4
9.	13,1	6,3	9,3	1,8
13.	14,9	4,6	12,1	4,6
17.	17,1	6,4	14,4	6,4
21.	19,3	7,5	12,7	3,7
25.	20,2	9,8	16,8	5,2
29.	14,6	4,9	18,8	4,2
33.	18,6	4,6	19,2	5,6
37.	22,6	7,4	14,3	4,5

Abb. 40:

*Entwicklung der Bakterienaufnahme pro Granulozyt*

Bei den Parametern Körpergewicht, Blutglucose, HbA 1c, oraler Glucosetoleranzwert (zu verschiedenen Zeitpunkten) sind im Verlauf der Versuchszeit signifikante Unterschiede erkennbar.

\*<sup>1</sup> Downward Line = Blutzucker  $\leq$  200 mg/dl im oGTT

\*<sup>2</sup> Upward Line = Blutzucker  $>$  200 mg/dl im oGTT

## 6. Graphische Darstellung der Ergebnisse

---

### 6.1. Phagozytostest

#### 6.1.1. Ermittlung der geeigneten Bakterienart

In der vorliegenden Studie wurde zur Ermittlung der geeigneten Bakterienart heparinisieretes Vollblut von 10 Normalpersonen mit drei verschiedenen Bakterienstämmen (Staph. aureus, E. coli, Streptokokken Gruppe A) inkubiert. Anschließend wurde die Aufnahme der Bakterien pro Granulozyt und der prozentuale Anteil an phagozytierenden Granulozyten ermittelt. Diese Untersuchungen sind ebenfalls in Bezug auf Monozyten durchgeführt worden.

##### 6.1.1.1. Granulozyten

Wie die nachfolgende Abbildung zeigt, ergaben sich bei der Analyse der Granulozyten signifikante Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Bakterienstämmen (E. coli, Staph. aureus, Streptokokken Gruppe A) bezüglich des prozentualen Anteils an phagozytierenden Granulozyten und der Bakterienaufnahme pro Granulozyt.

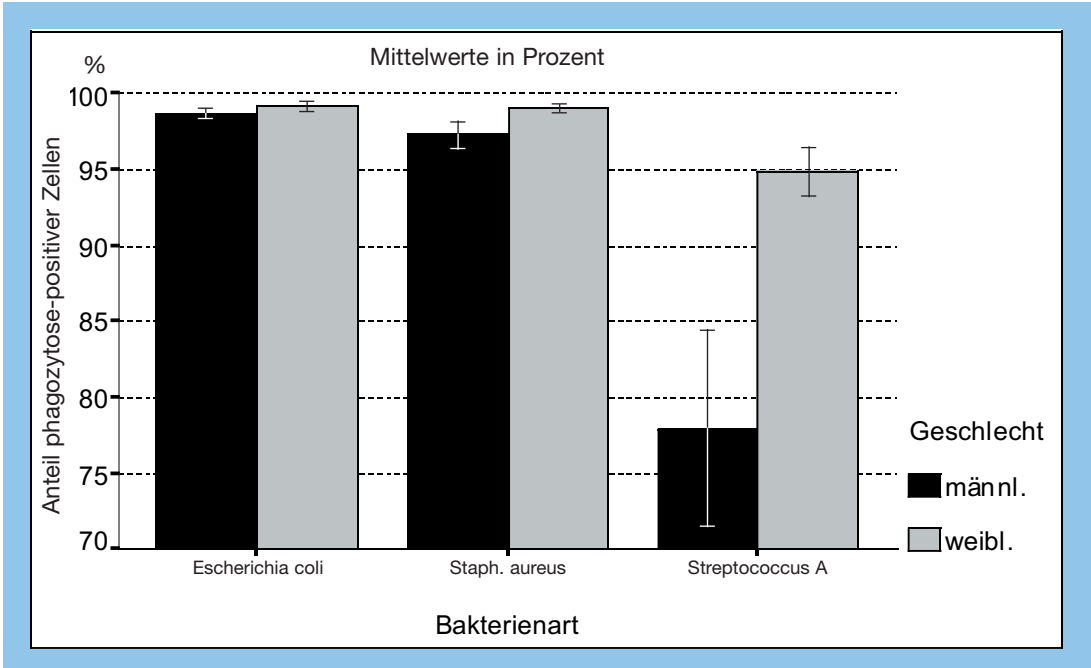


Abb. 41: **Prozentualer Anteil an Granulozyten, die Bakterien inkorporiert haben**  
 Die Granulozyten unterscheiden sich signifikant in Bezug auf den prozentualen Anteil an phagozytose-positiven Zellen ( $p = 0,01$ ). Die E.coli wurden in der vorliegenden Untersuchung am häufigsten aufgenommen, die Streptokokken dagegen am wenigsten.

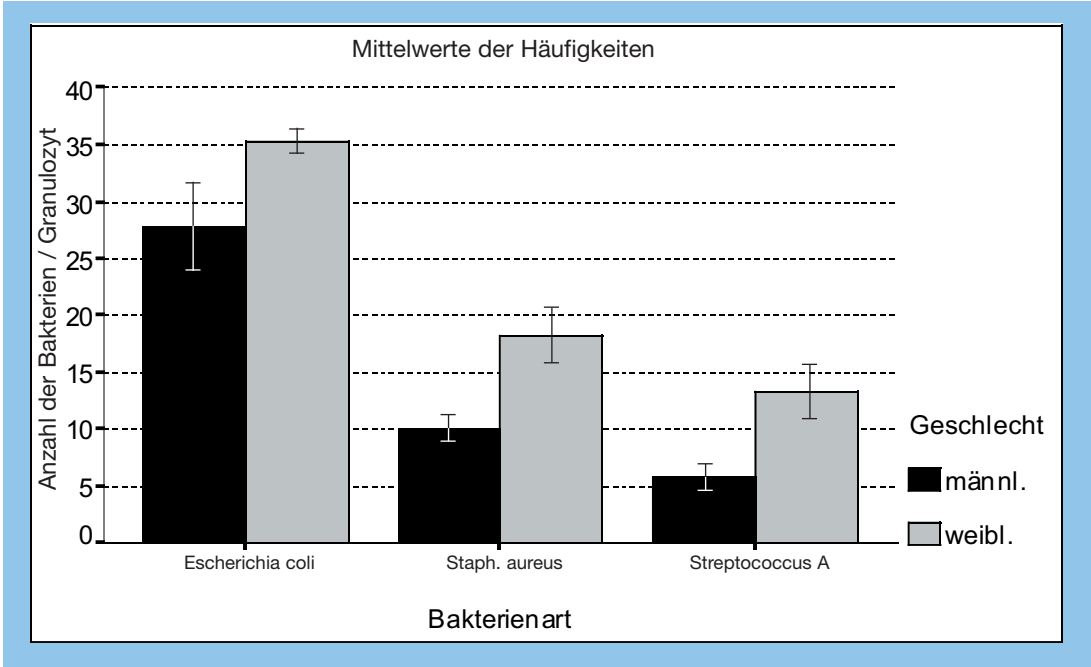


Abb. 42: **Anzahl der phagozytierten Bakterien pro Granulozyt**  
 Die Aufnahme der unterschiedlichen Bakterienstämme ist bei Granulozyten signifikant verschieden ( $p = 0,01$ ). Auch hier wurden die E.coli am häufigsten aufgenommen, die Streptokokken dagegen wurden am wenigsten inkorporiert.

### 6.1.1.2. Monozyten

Anders als bei den Granulozyten sind bei den Monozyten die Unterschiede des prozentualen Anteils an phagozytierenden Monozyten und der aufgenommenen Bakterien pro Monozyt nicht signifikant.

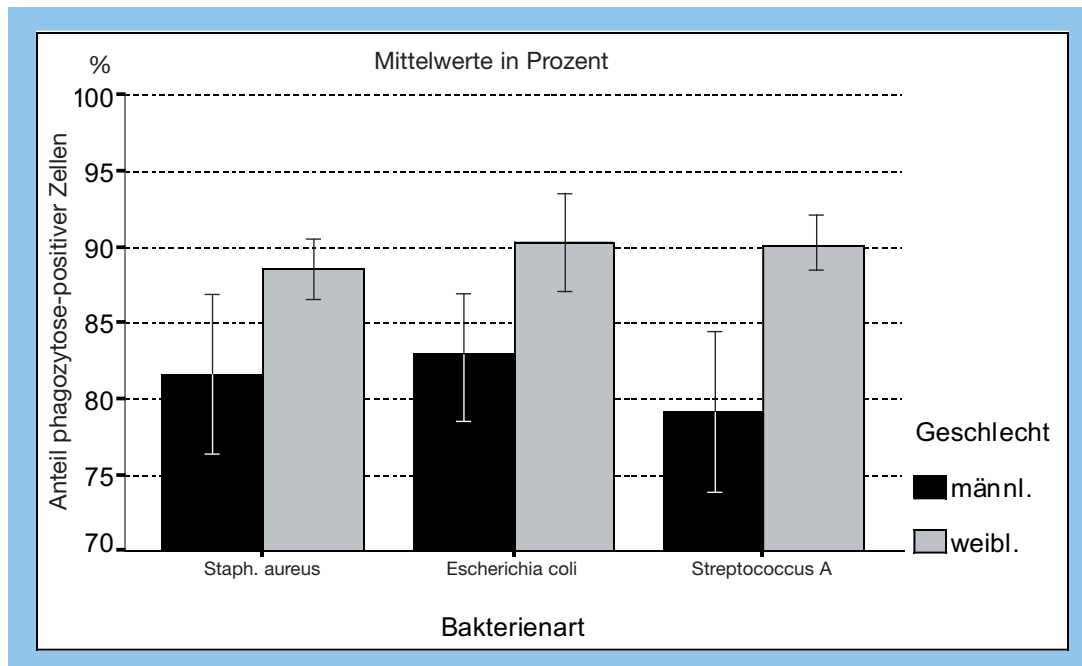
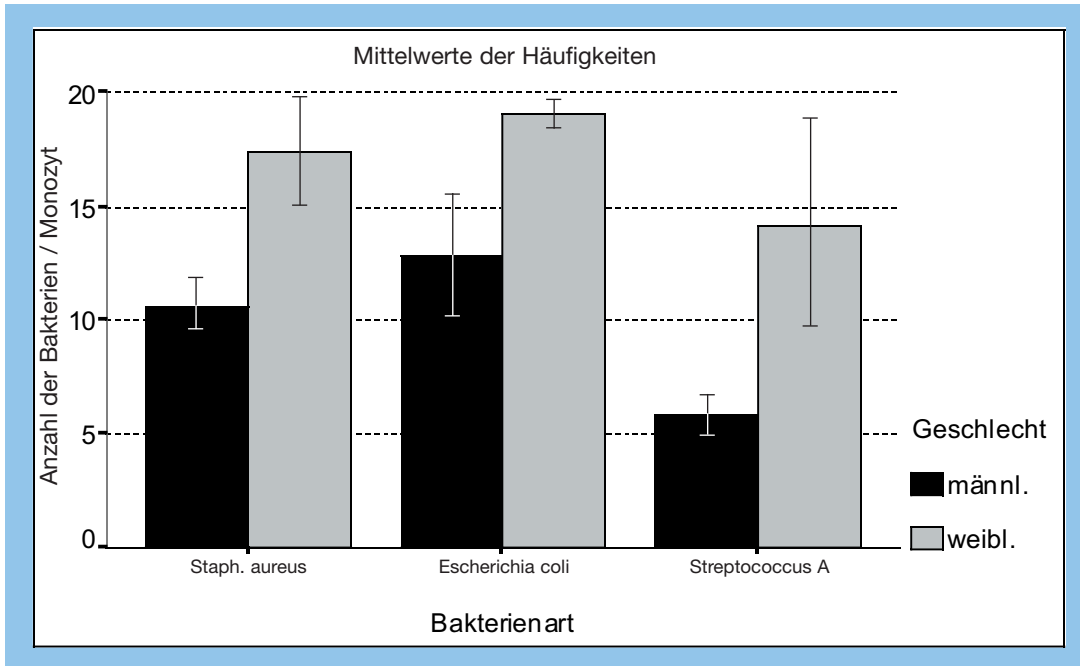


Abb. 43: **Prozentualer Anteil an Monozyten, die Bakterien phagozytiert haben**  
Im Gegensatz zu den Granulozyten unterscheiden sich die Monozyten nicht signifikant in Bezug auf den prozentualen Anteil an phagozytose-positiven Zellen ( $p = 0,28$ ). Allerdings werden auch bei den Monozyten die *E.coli* am häufigsten aufgenommen.





**Abb. 44: Anzahl der phagozytierten Bakterien pro Monozyt**  
 Die Aufnahme der unterschiedlichen Bakterienstämme ist bei Monozyten nicht signifikant verschieden ( $p = 0,06$ ). Wie zuvor werden die *E.coli* am häufigsten aufgenommen, die Streptokokken dagegen werden am wenigsten inkorporiert.

### 6.1.2. Ermittlung der geeigneten Inkubationszeit

Granulozyten und Monozyten von 10 Normalpersonen phagozytierten das Bakterium *Staph. aureus* bei unterschiedlichen Inkubationszeiten (0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 min) zur Ermittlung der am besten geeigneten Inkubationszeit. Die geeignete Inkubationszeit lag bei 10 Minuten, da zu diesem Zeitpunkt die Sättigung der Phagozytosekurve erreicht wurde.

#### 6.1.2.1. Granulozyten

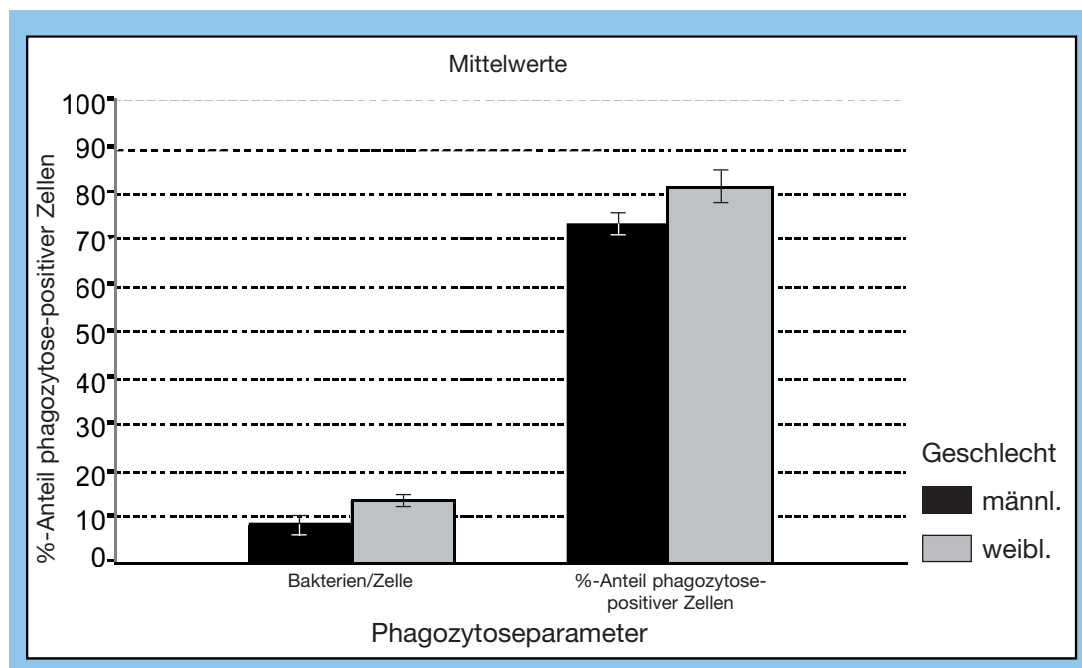
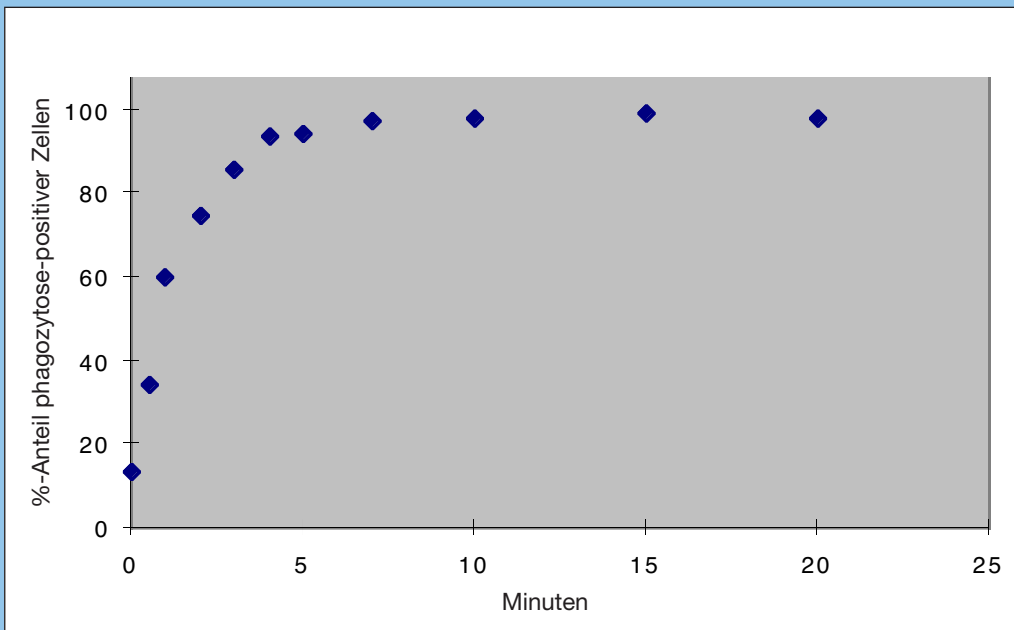
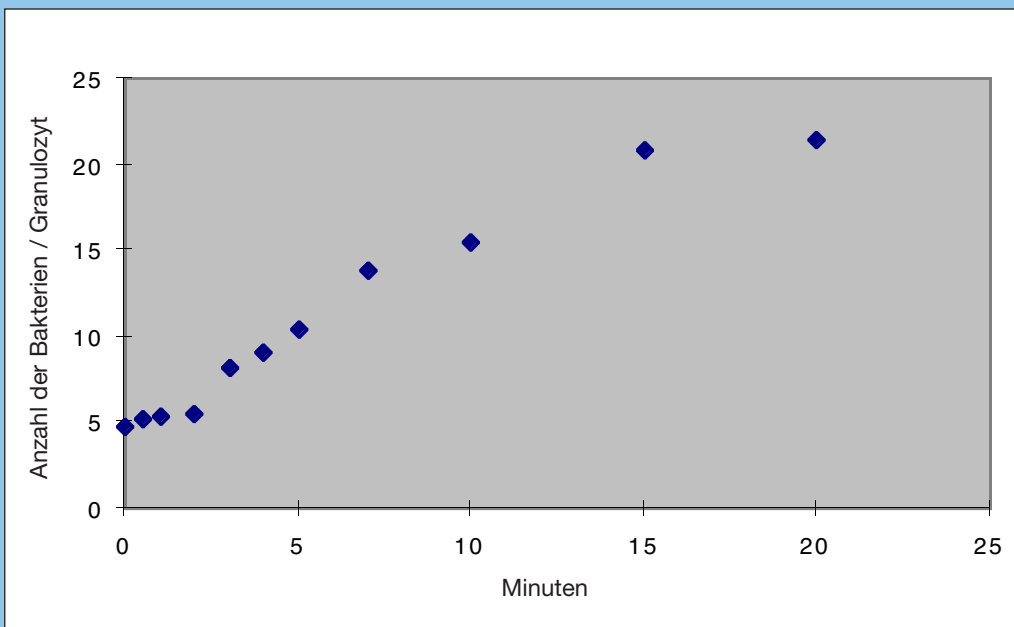


Abb. 45: Granulozyten: zeitlicher Durchschnitt

Wie die Abbildung zeigt, ergaben sich im zeitlichen Mittel bei den Granulozyten signifikante Unterschiede bezüglich beider Versuchsparameter: des prozentualen Anteils an phagozytierenden Granulozyten ( $p=0,01$ ) und der Bakterienaufnahme pro Granulozyt ( $p=0,01$ ). Darüberhinaus gibt es ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern in Bezug auf die untersuchten Parameter (prozentualer Anteil an phagozytierenden Granulozyten,  $p=0,03$ ; Bakterienaufnahme pro Granulozyt,  $p=0,01$ ).



**Abb. 46: Zeitliche Entwicklung der Bakterienaufnahme in Prozent bei Granulozyten**  
 Man sieht deutlich den parabelförmigen Verlauf der Punkte, die eine Sättigung nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten anzeigen und danach stagnieren.



**Abb. 47: Zeitliche Entwicklung der Bakterienaufnahme pro Granulozyt**  
 Man sieht hier, daß eine Sättigung nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten erreicht wird.

### 6.1.2.2. Monozyten

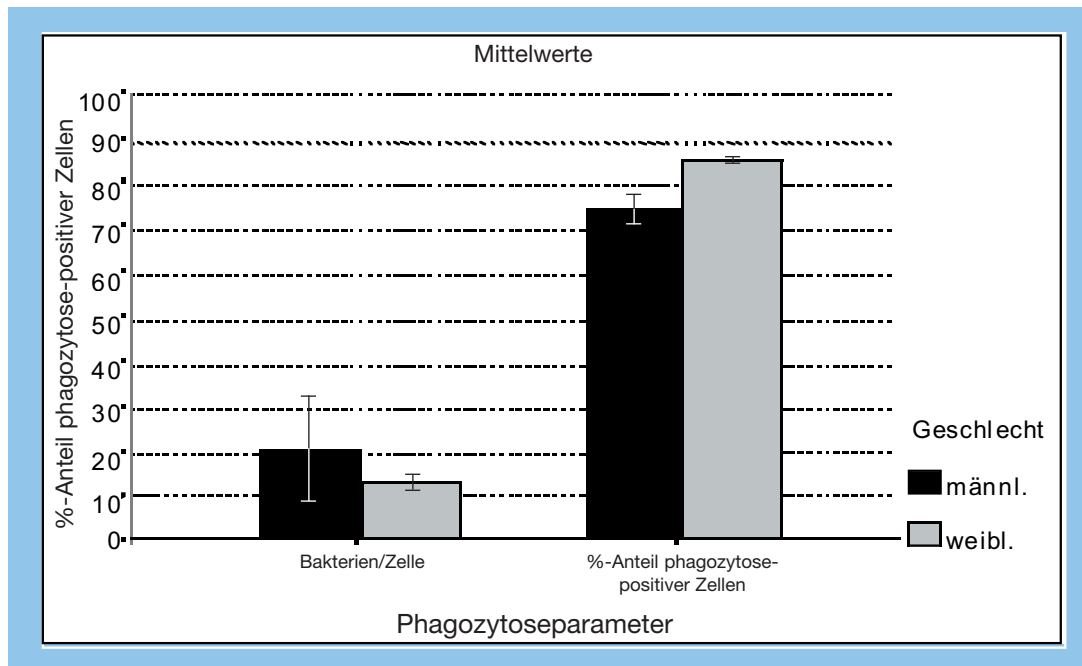


Abb. 48: Monozyten: zeitlicher Durchschnitt

Im zeitlichen Mittel ergaben sich signifikante Unterschiede bei den Versuchsparametern des prozentualen Anteils phagozytischer Monozyten ( $p=0,01$ ) sowie der Bakterienaufnahme pro Monozyt ( $p=0,01$ ). Desweiteren gibt es ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern bezüglich des prozentualen Anteils an phagozytischen Monozyten ( $p=0,03$ ). Die Anzahl der aufgenommenen Bakterien pro Monozyt ist geschlechtsspezifisch nicht signifikant verschieden ( $p=0,55$ ).

### 6.1.3. Kontrollversuche zur Verifizierung der am Durchflußzytometer gemessenen Ergebnisse

Bei den Kontrollversuchen zur Verifizierung der Resultate des Mikroassays bei Normalpersonen wurde der prozentuale Anteil an Granulozyten, die Bakterien phagozytieren, sowohl durchflußzytometrisch als auch mittels einer mikroskopischen Beurteilung der Zellen ermittelt. Bei der mikroskopischen Auswertung wurden 100 Granulozyten ausgezählt und die Zahl der phagozytose-positiven Zellen errechnet.

Für diese Versuchsreihe wurden die Zellen mit Staph. aureus, E. coli und Streptokokken inkubiert, um die Phagozytoseleistung anzuregen.

Die zur Verifizierung durchgeführten Untersuchungen ergaben in der vorliegenden Studie keinen Widerspruch zu der Annahme der Übereinstimmung beider Auswertungsmethoden.

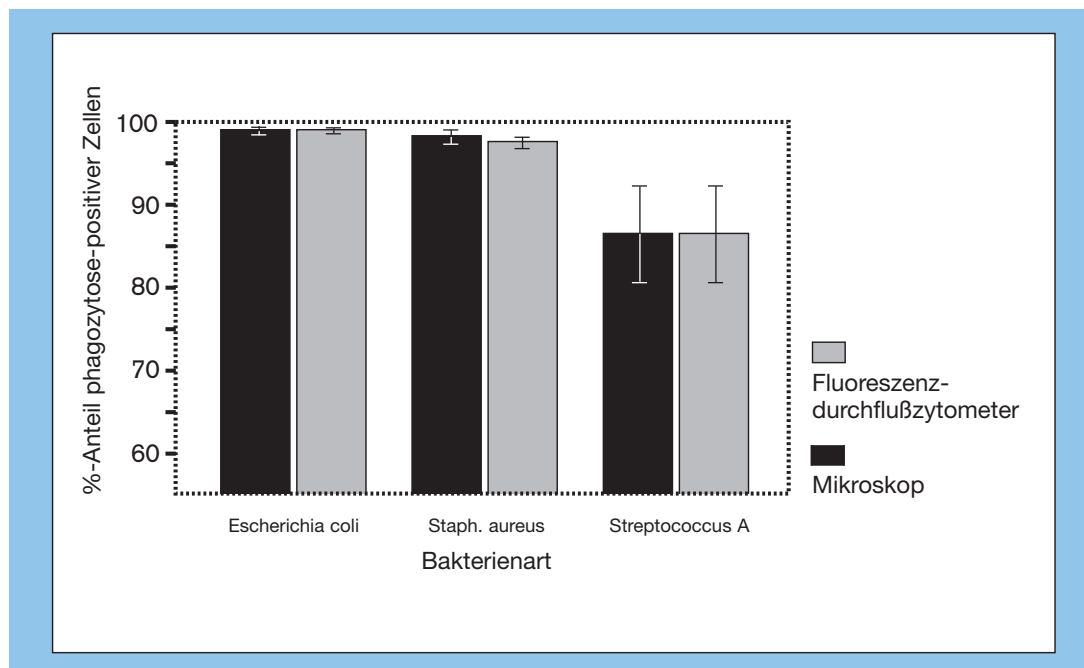


Abb. 49: Meßergebnisse am Durchflußzytometer und am Mikroskop

#### 6.1.4. Versuche zur Reproduktionssicherheit des Phagozytoseassays

Anhand eines Phagozytoseansatzes für Granulozyten und Monozyten, der bei 10 Normalpersonen zu unterschiedlichen Zeiten (nach 0, 0,5, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4 h) nach Blutentnahme durchgeführt wurde, wurde die Reproduktionssicherheit des Mikroassays überprüft. Im zeitlichen Mittel zeigten sich signifikante Veränderungen für die zwei untersuchten Parameter „Anzahl der inkorporierten Bakterien“ und „prozentualer Anteil der phagozytose-positiven Zellen“. Es ergaben sich im zeitlichen Mittel jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern, weder für Granulozyten noch für Monozyten. Darüberhinaus traten im zeitlichen Mittel ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bezüglich der drei Versuchsparameter bei Granulozyten und Monozyten auf. Die Analyse der Phagozytoseansätze beweist somit die erforderliche Reproduktionssicherheit des Mikroassays.

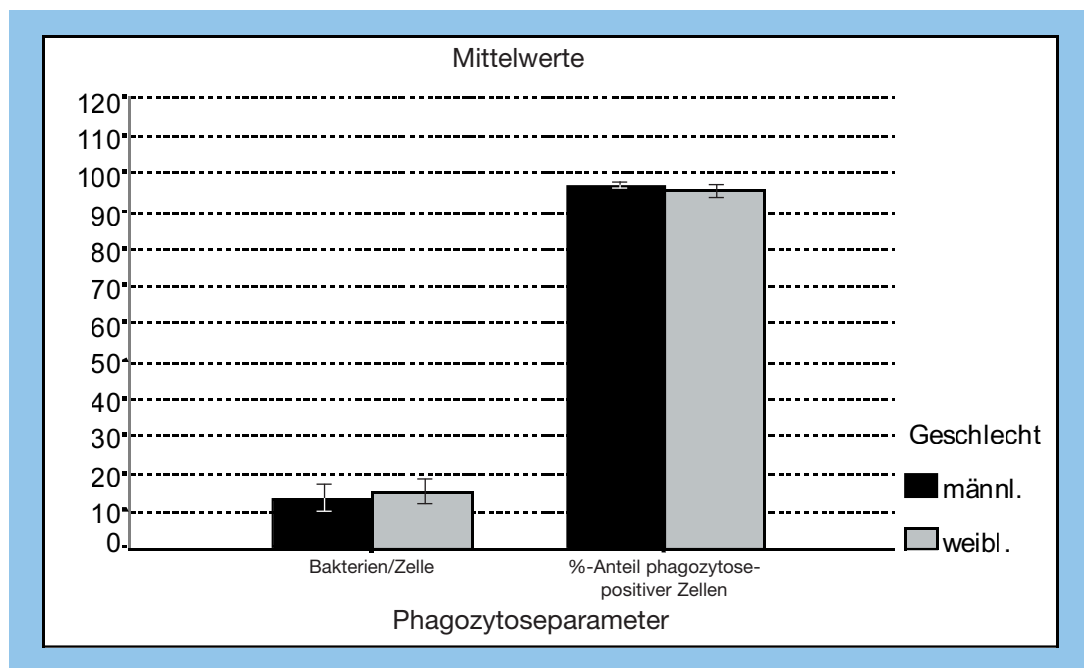


Abb. 50: **Granulozyten:**  
Die Reproduzierbarkeit des Phagozytose-Assays im zeitlichen Durchschnitt

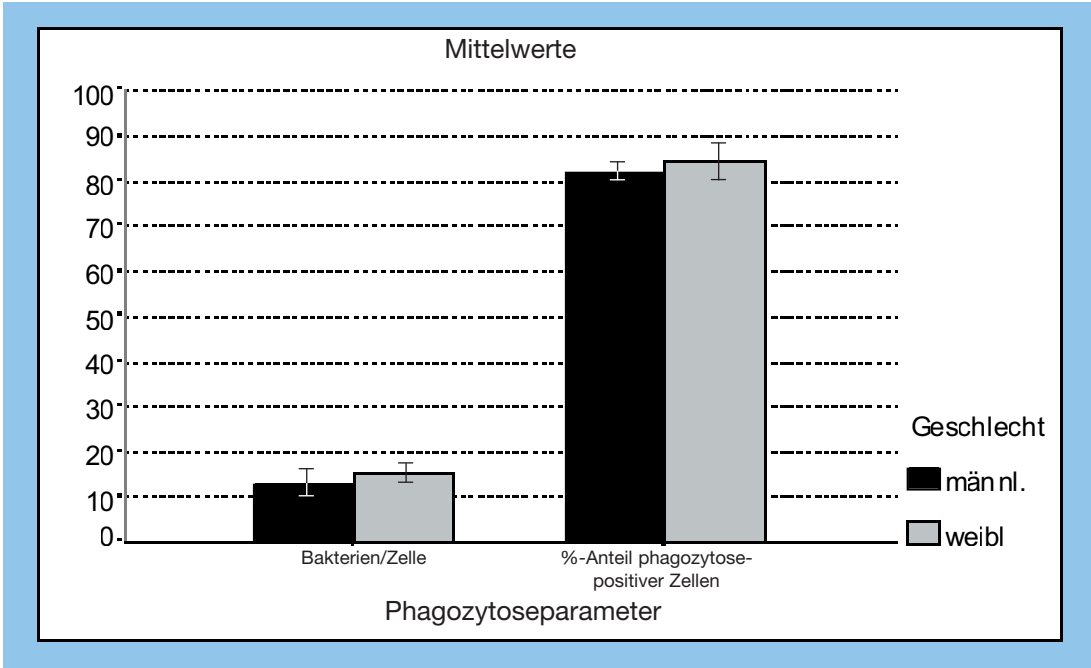


Abb. 51: **Monozyten:**  
*Die Reproduzierbarkeit des Phagozytose-Assays im zeitlichen Durchschnitt*

### 6.1.3.1. Granulozyten

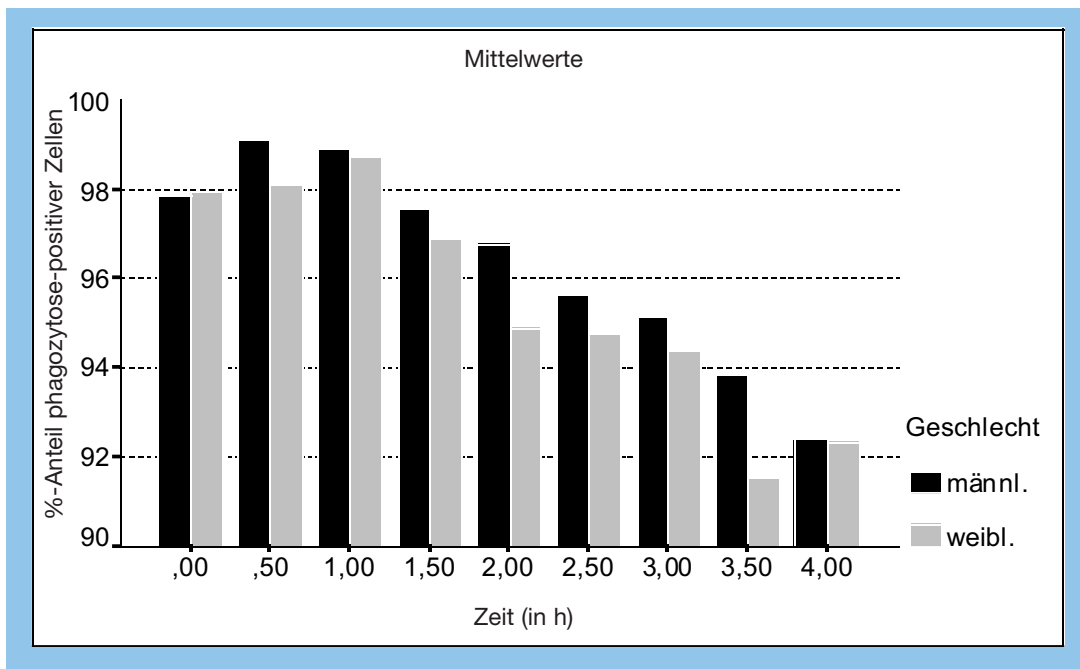


Abb. 52: Prozentualer Anteil phagozytose-positiver Granulozyten von Normalpersonen im zeitlichen Verlauf

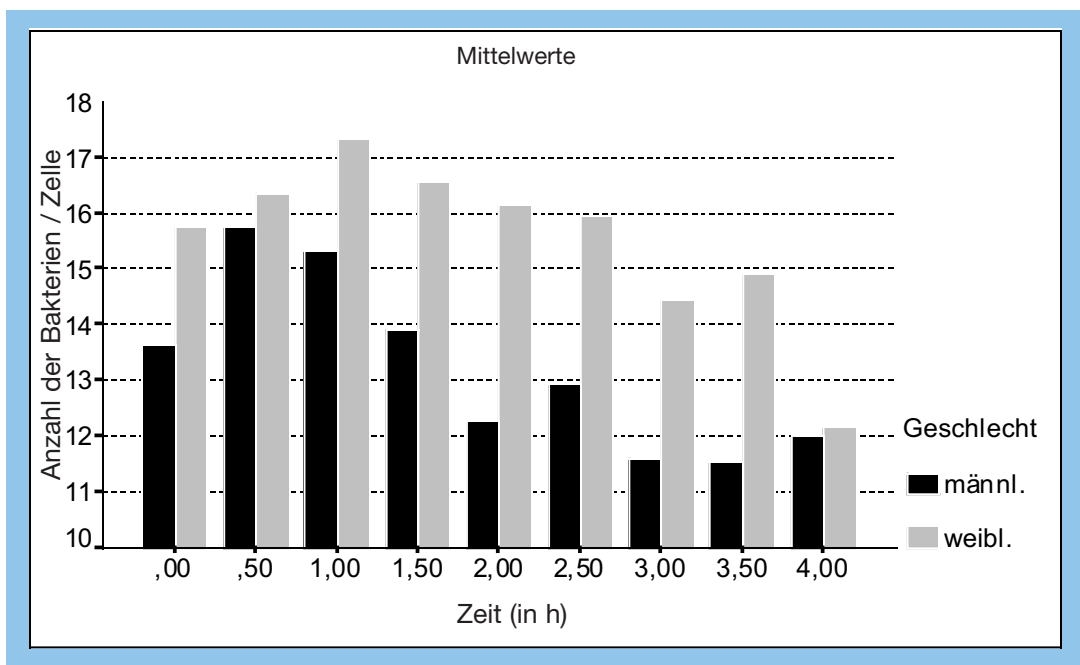


Abb. 53: Aufgenommene Bakterien pro Granulozyt von Normalpersonen im zeitlichen Verlauf



### 6.1.3.2. Monozyten

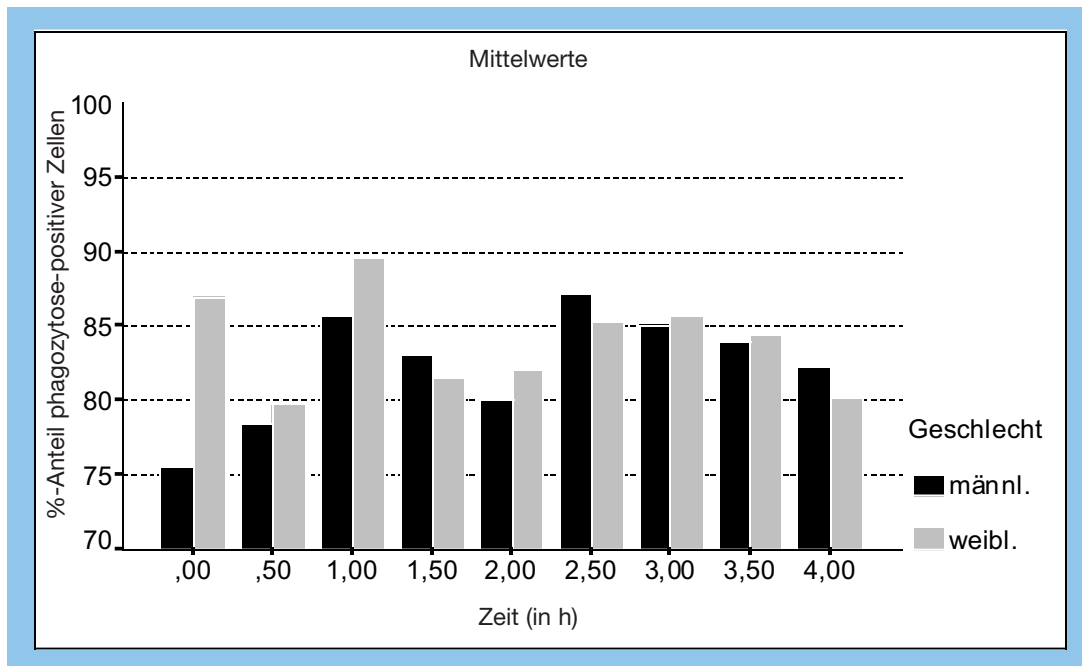


Abb. 54: Prozentualer Anteil phagozytose-positiver Monozyten von Normalpersonen im zeitlichen Verlauf

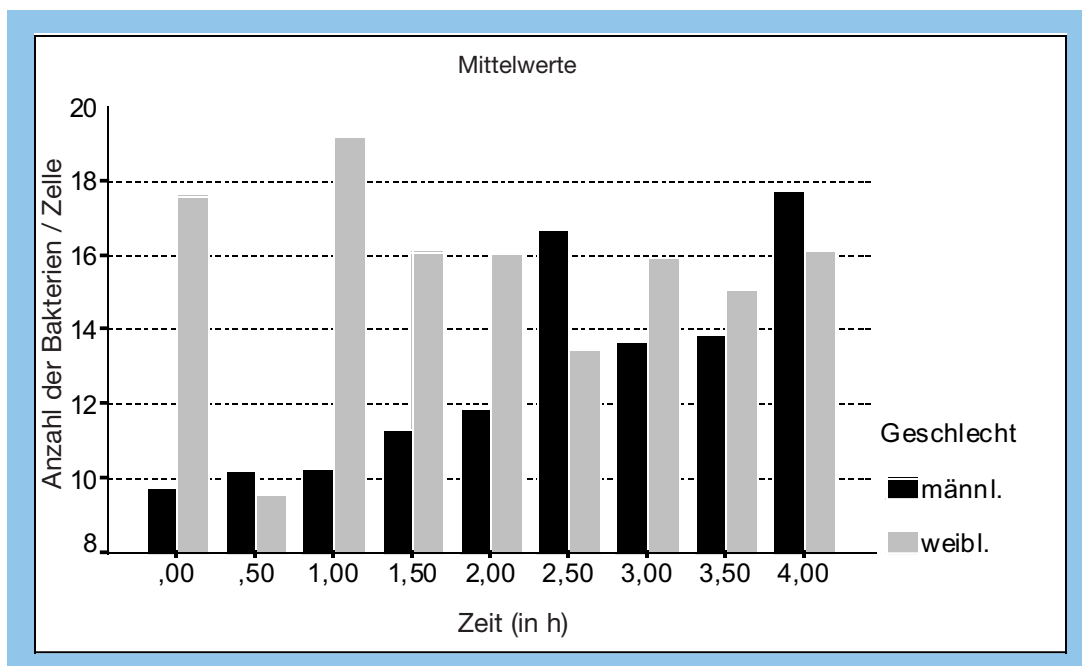


Abb. 55: Aufgenommene Bakterien pro Monozyt von Normalpersonen im zeitlichen Verlauf

Aus den Abbildungen 52–55 geht hervor, daß es im zeitlichen Verlauf signifikante Unterschiede für die weitere Bearbeitung der Proben in Abhängigkeit von der Zeitdifferenz zwischen Entnahme und Analyse der Probe gab.

## 6.2. Tiermodell: Die Cohen-Ratte

Die diabetische und die nicht-diabetische Linie der Cohen-Ratte wurde über einen Zeitraum von vier Wochen mit normalem Labor-Rattenfutter gefüttert. Anschließend wurde für beide Linien das Futter auf die rohrzuckerreiche und kupferarme Spezialdiät umgestellt, um den Diabetes für die Upward line zu induzieren. Diese Spezialdiät wurde über einen Zeitraum von 38 Wochen an die Tiere verfüttert. Anhand von Glucoseparametern ist untersucht worden, wie sich diese Spezialdiät auf die Phagozytoseleistung sowie die physische Verfassung der Versuchstiere auswirkt. Die Glucoseparameter waren in der vorliegenden Studie: das Körpergewicht der Tiere, die Glucose im Vollblut, das HbA 1c und der orale Glucosetoleranztest.

### 6.2.1. Glucoseparameter

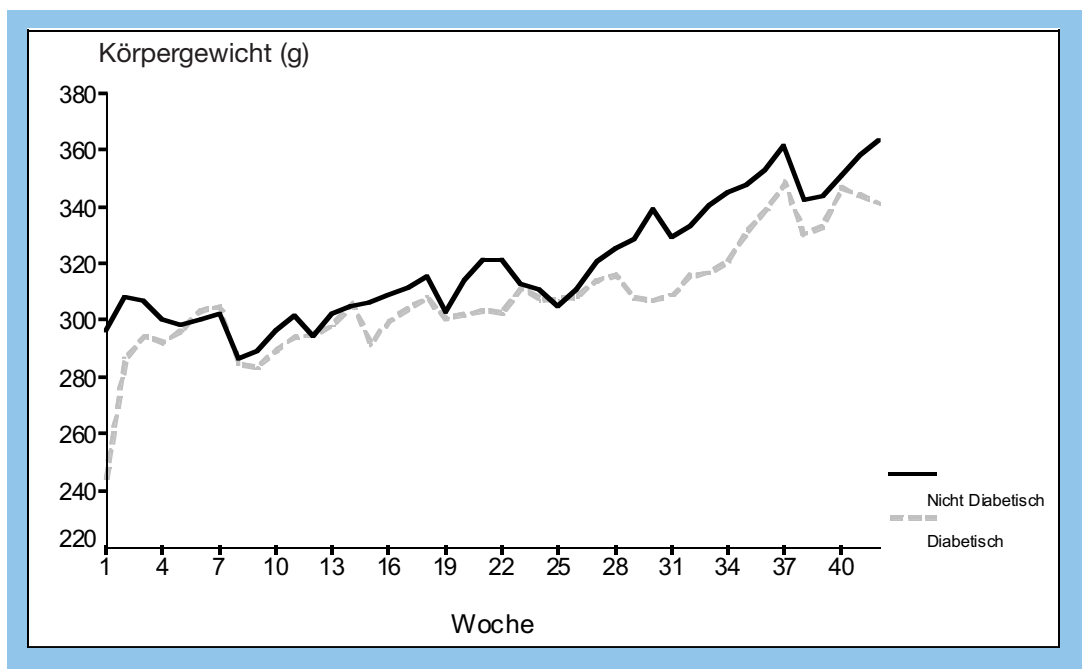


Abb. 56: Körpergewicht der Ratten im zeitlichen Verlauf der Studie

Die Ratten sind einmal wöchentlich gewogen. Anhand der Kurvenverläufe sieht man bei beiden Tierlinien eine Zunahme des Körpergewichtes. Das Körpergewicht der beiden Rattenlinien unterscheidet sich im zeitlichen Verlauf jedoch nicht signifikant voneinander.

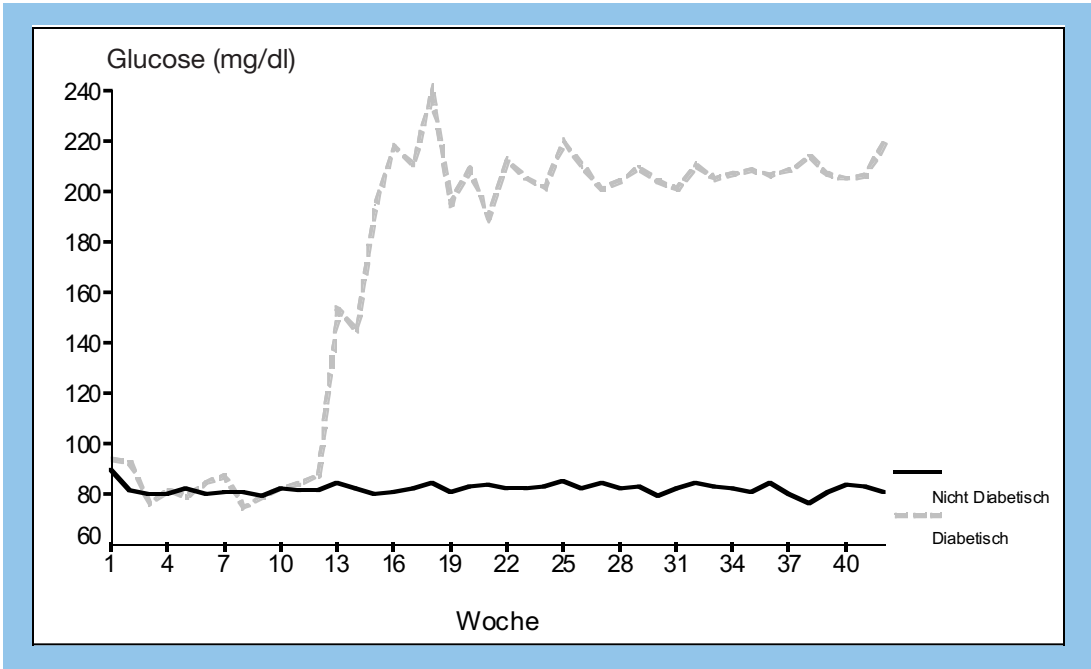


Abb. 57: Blutglucosewert im zeitlichen Verlauf der Studie

Die Bestimmung der Blutglucose ist bei der Upward und der Downward Line einmal wöchentlich erfolgt. Die Glucosemenge im Vollblut ist bei den beiden Rattenlinien signifikant unterschiedlich. Die Tiere wurden nach vier Wochen auf die Spezialdiät umgestellt. Die sogenannte diabetische Linie zeigt ab der 12. Woche erhöhte Blutglucosespiegel, während die nichtdiabetische Linie weiterhin normale Blutglucosewerte aufweist. Die nichtdiabetische Linie zeigt eine Insulinresistenz.

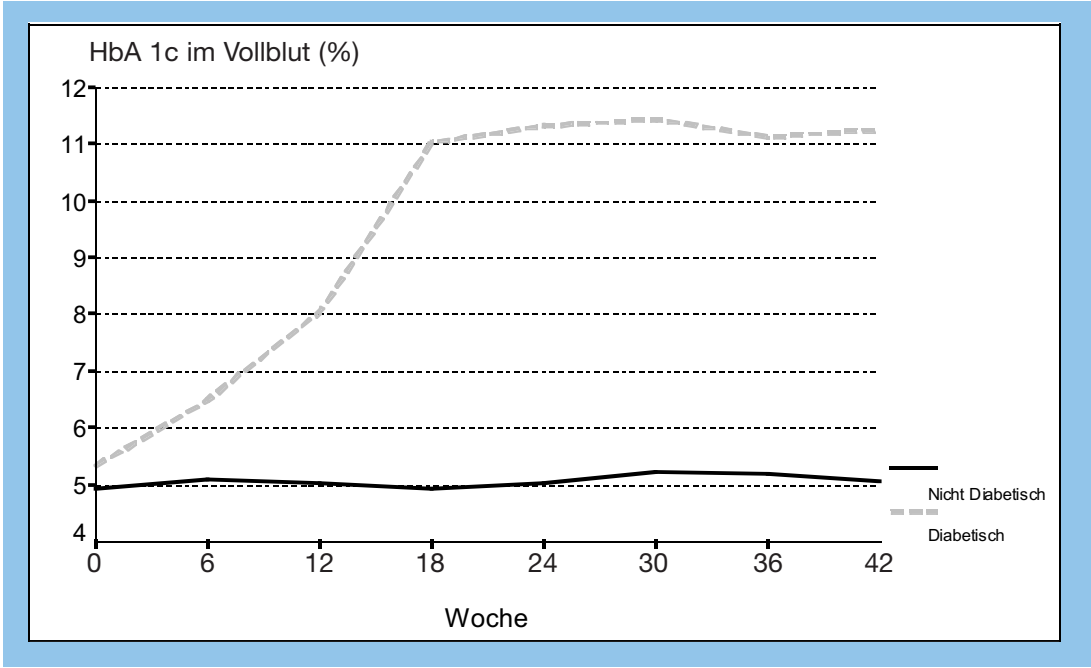


Abb. 58: Prozentualer Anteil des HbA 1c im Vollblut im zeitlichen Verlauf der Studie

Während der Blutglucosespiegel der diabetischen Linie der Cohen Ratte erst acht Wochen nach der Futterumstellung zu steigen beginnt, ergibt die HbA1-Bestimmung von Anfang an leicht erhöhte Werte für die prädiabetischen Tiere gegenüber den nicht-diabetischen Ratten. Nach Futterumstellung steigt der HbA1-Wert bei der Upward Line weiterhin an, während die Downward Line normale HbA1-Werte im Vollblut aufweist. Das HbA1 im Vollblut ist bei diabetischen und nichtdiabetischen Cohen-Ratten signifikant unterschiedlich.

Der orale Glucosetoleranztest ist alle vier Wochen durchgeführt worden. Nach einer Fastenzeit von mindestens 12 Stunden wird zunächst der Nüchternblutzuckerwert der Versuchstiere bestimmt. Anschließend wird den Ratten über eine Knopfsonde 350 mg einer 35%igen, wässrigen Zuckerlösung je 100 g Körpergewicht in den Ösophagus appliziert. Der Blutglucosegehalt wird nach 30, 60 und 120 Minuten bestimmt.

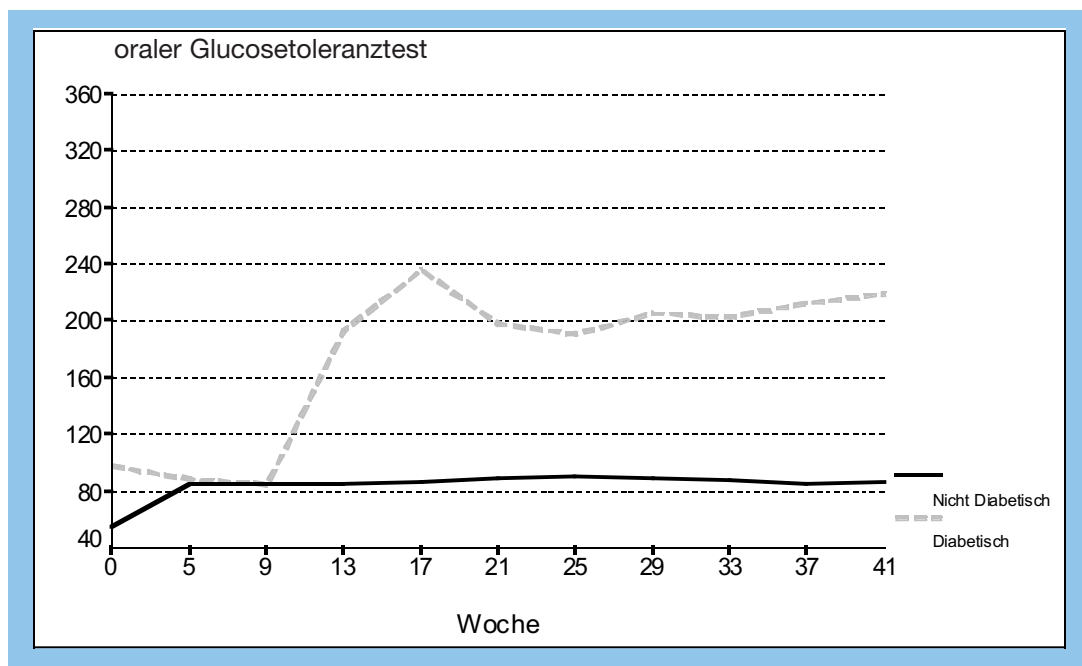


Abb. 59: Orale Glucosetoleranztest (Nüchternwert) im zeitlichen Verlauf der Studie

Beim oralen Glucosetoleranztest unterscheiden sich die diabetischen und nicht-diabetischen Tiere hinsichtlich des Nüchternwertes ab der 9. Woche signifikant voneinander ( $p=0,01$ ).

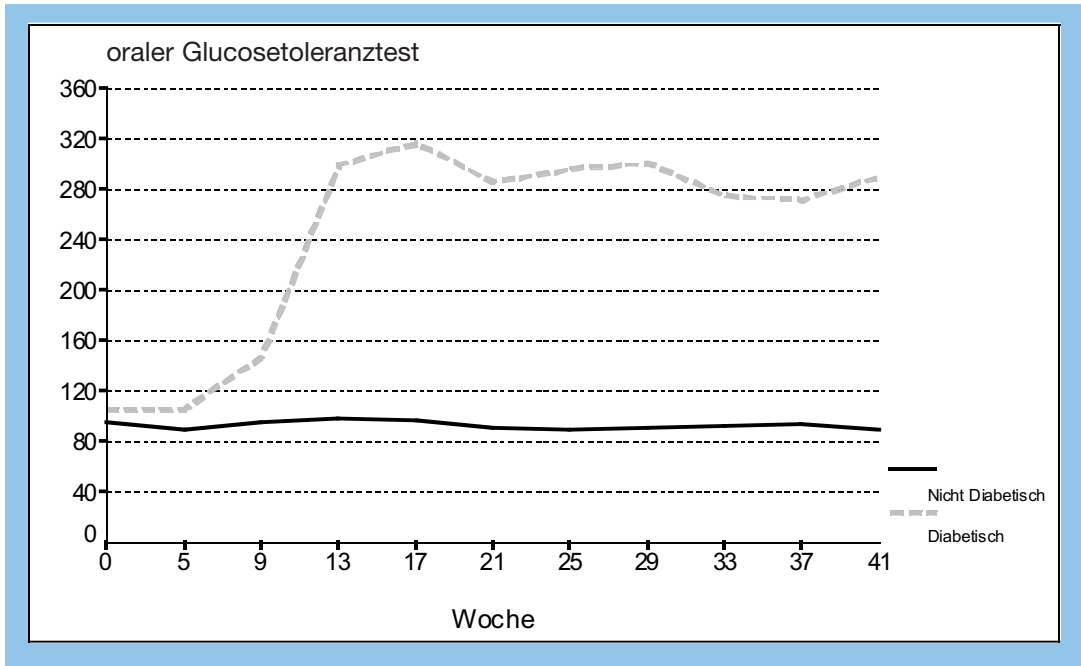


Abb.60: Orale Glucosetoleranztest nach 30 Minuten im zeitlichen Verlauf der Studie

Auch 30 Minuten nach Durchführung des oralen Glucosetoleranztestes unterscheiden sich die Upward- und die Downward-Line signifikant voneinander.

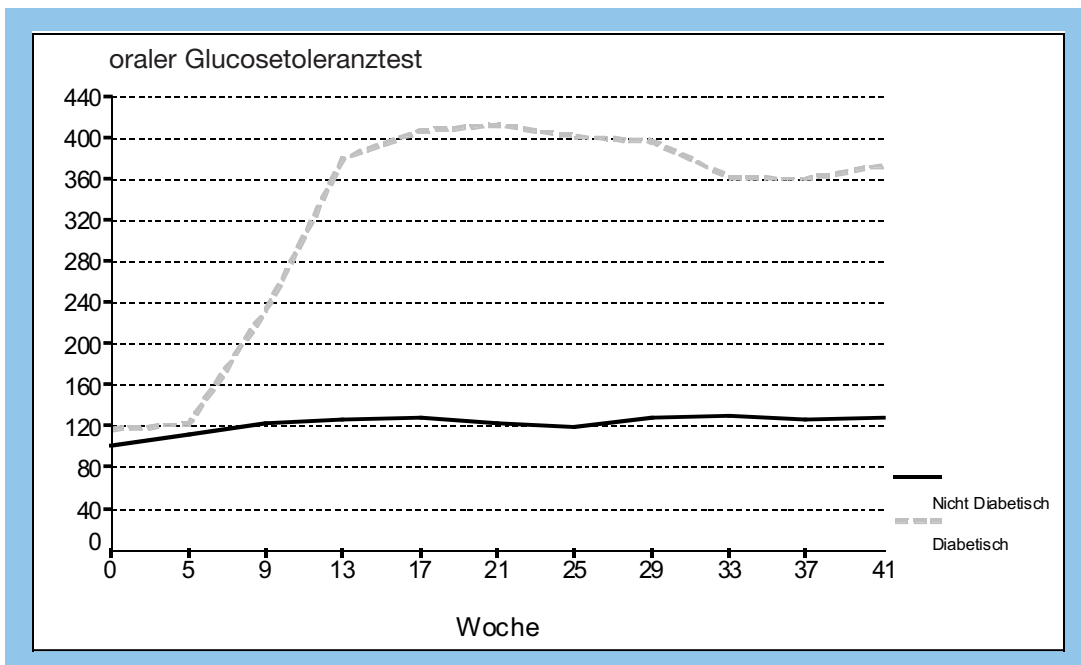


Abb. 61: Orale Glucosetoleranztest nach 60 Minuten im zeitlichen Verlauf der Studie

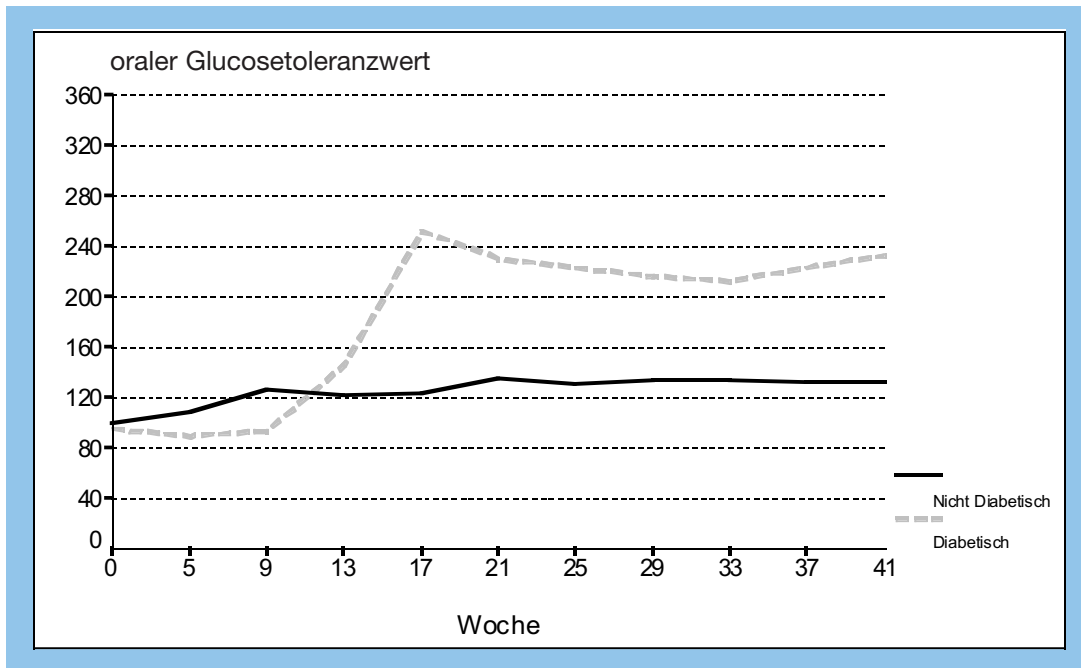


Abb. 62: Orale Glucosetoleranztest nach 120 Minuten im zeitlichen Verlauf der Studie

Das gleiche Ergebnis, wie nach 30 Minuten ist auch nach 60 bzw. 120 Minuten zu beobachten.

### 6.2.2. Phagozytoseparameter

Die Phagozytoseparameter „prozentualer Anteil phagozytose-positiver Zellen“ und „aufgenommene Bakterien pro Zelle“ sind bei der Upward und der Downward Line über insgesamt 42 Wochen untersucht worden. Im zeitlichen Verlauf ist der prozentuale Anteil an Granulozyten, die Bakterien inkorporiert haben, nicht signifikant verändert. Jedoch ist, wie in der nachfolgenden Abbildung gezeigt, eine Tendenz erkennbar, daß die diabetischen Tiere einen höheren Anteil phagozytose-positiver Zellen aufweisen als die nicht-diabetische Linie.

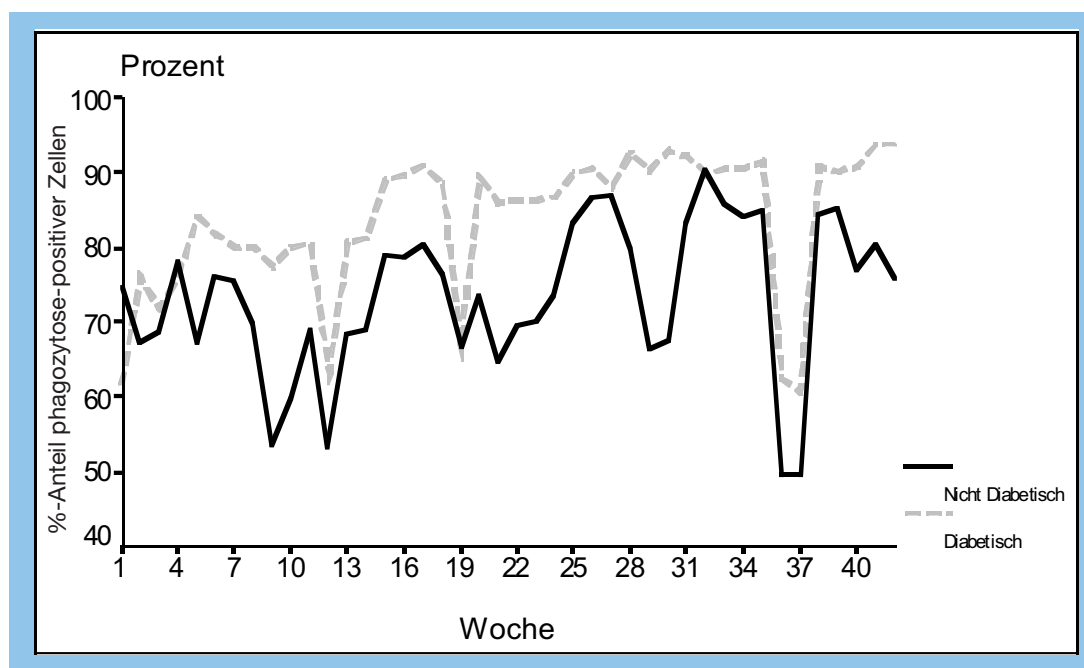


Abb. 63: Prozentualer Anteil an phagozytierenden Granulozyten im zeitlichen Verlauf der Studie. Die Kurvenverläufe zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Beginn der Studie und den Zeitpunkten nach der Futterumstellung der Tiere und somit der Induktion eines Diabetes mellitus bei der Upward Line.

Der Parameter „aufgenommene Bakterien pro Granulozyt“ zeigt signifikante Veränderungen.

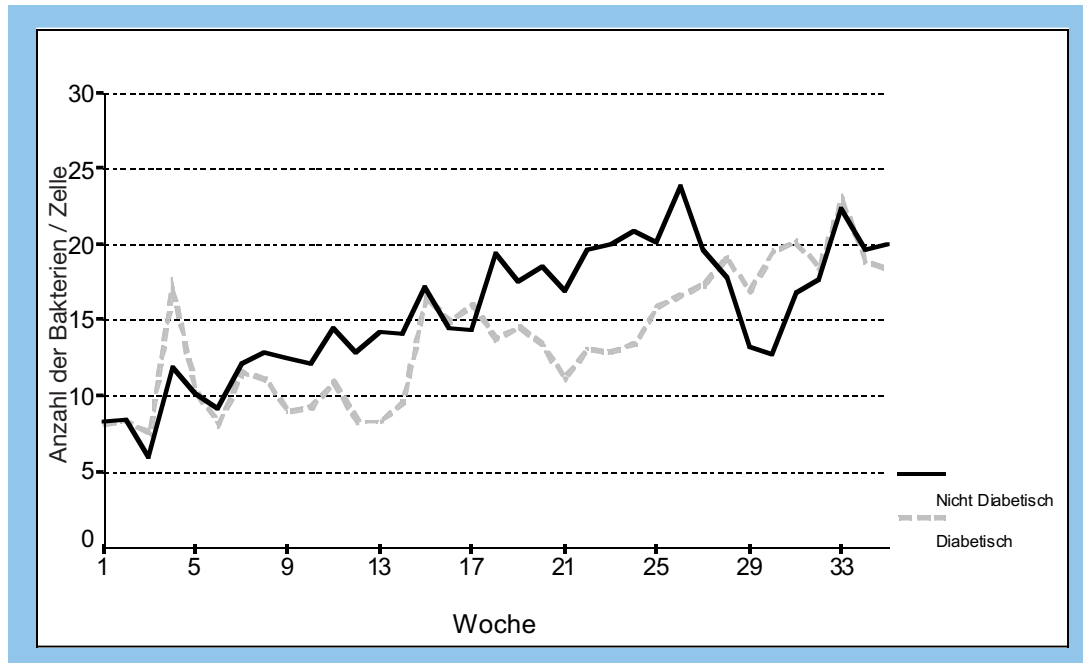


Abb. 64: Aufgenommene Bakterien pro Zelle im zeitlichen Verlauf der Studie

Der Upward Line und der Downward Line ist in den ersten Wochen normales Laborfutter verfüttert worden. Während dieser Zeit zeigen die Parameter Blutglucose und Körpergewicht (in kg) der Tiere keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tierlinien. Bei dem HbA 1c dagegen zeigt die Upward Line gegenüber der Downward Line leicht erhöhte Werte, deshalb kann man in dieser Phase auch von einem Prädiabetes sprechen. Beim oralen Glucosetoleranztest gibt es in diesem Zeitraum ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Rattenlinien.

Ab der vierten Woche ist die Ernährung der Cohenratte auf eine saccharosereiche und kupferarme Diät umgestellt und so der Diabetes der Upward Line induziert worden. Ein Zeichen hierfür waren der Anstieg von Blutglucose, HbA 1c und oGTT gegenüber der Downward Line.

Der Phagozytoseparameter „prozentualer Anteil phagozytose-positiver Granulozyten“ zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Rattenlinien im zeitlichen Verlauf der Studie. Dagegen gibt es im zeitlichen Verlauf signifikante Unterschiede bei der Anzahl der aufgenommenen Bakterien pro Granulozyt. Daraus ist zu folgern, daß sich die Anzahl der an der Phagozytose beteiligten Zellen, im Gegensatz zu deren Aufnahmefähigkeit von Bakterien, nicht ändert.



### 6.3. Klinische Studie: Typ II-Diabetiker

In der vorliegenden Studie sind 35 Typ II-Diabetiker aufgrund ihres C-Peptid-Spiegels in folgende drei Gruppen eingeteilt worden:

Gruppe 1: Patienten mit einem C-Peptidspiegel  $\leq 1,5$  ng/dl

Gruppe 2: Patienten mit einem C-Peptidspiegel  $\geq 1,6 \leq 3,5$  ng/dl

Gruppe 3: Patienten mit einem C-Peptidspiegel  $\geq 3,6$  ng/dl

Bei allen drei Gruppen wurden die Nüchtern-glucosewerte, die HbA 1c-Werte sowie die Phagozytoseleistung von Granulozyten und Monozyten bestimmt. Die Phagozytoseparameter waren: der prozentuale Anteil an phagozytierenden Zellen und die Bakterienaufnahme pro Zelle.

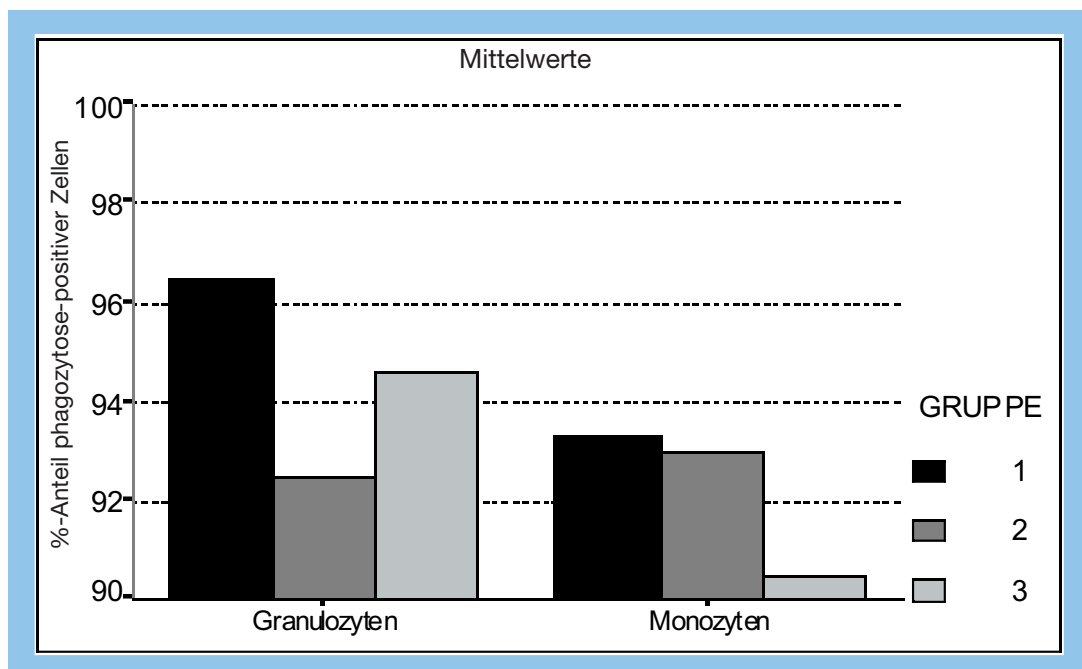


Abb. 65: Prozentualer Anteil phagozytose-positiver Granulozyten und Monozyten in Abhängigkeit vom C-Peptidspiegel

Die drei Gruppen von Typ II-Diabetikern unterscheiden sich hinsichtlich des prozentualen Anteils an phagozytierenden Granulozyten ( $p = 0,45$ ) und Monozyten ( $p=0,57$ ) nicht signifikant.

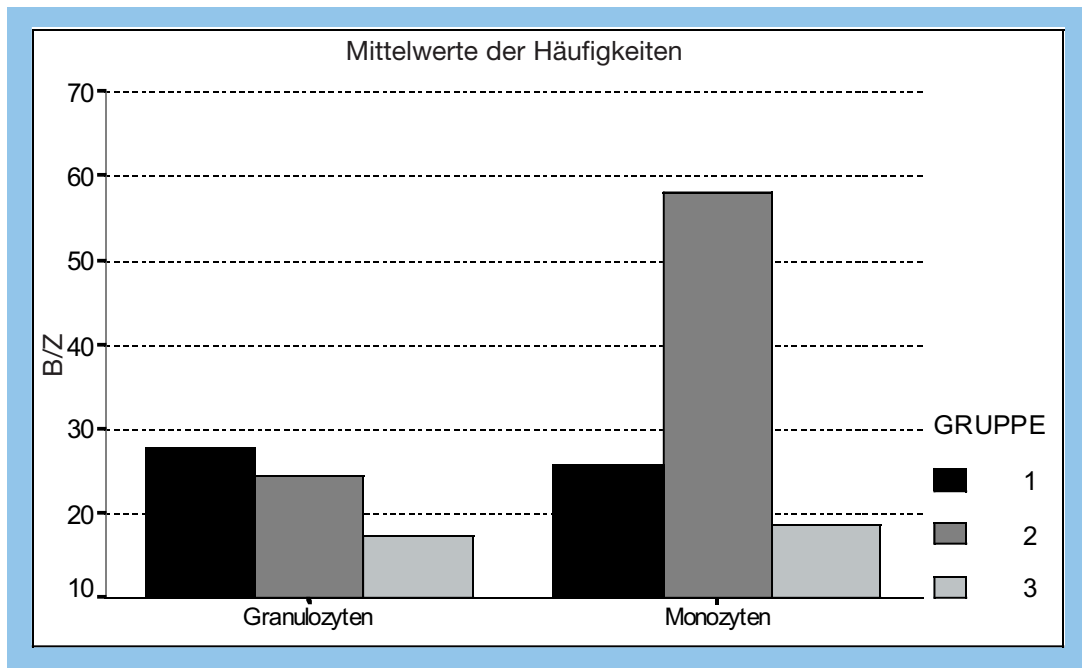


Abb. 66: Bakterienaufnahme pro Zelle von Granulozyten und Monozyten in Abhängigkeit vom C-Peptidspiegel

Auch hinsichtlich des Phagozytoseparameters „aufgenommene Bakterien pro Zelle“ unterscheiden sich die drei Diabetikergruppen nicht signifikant voneinander.

Hinsichtlich der Erwartung unterschiedlicher Resultate der Phagozytoseleistung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei Typ II-Diabetikern und der Annahme, daß diese unterschiedlichen Ergebnisse mit den verschiedenen Erkrankungsstadien der Patienten korrelieren, muß festgestellt werden, daß diese Hypothesen in der vorliegenden Dissertation nicht bestätigt wurden, d.h. daß diese Funktion der Granulozyten und Monozyten auch bei sinkender Insulinreserve noch nicht beeinträchtigt ist. Im folgenden sind die durchschnittlichen HBA 1c-Werte der drei Patientengruppen mit unterschiedlicher Insulinreduktion aufgeführt.

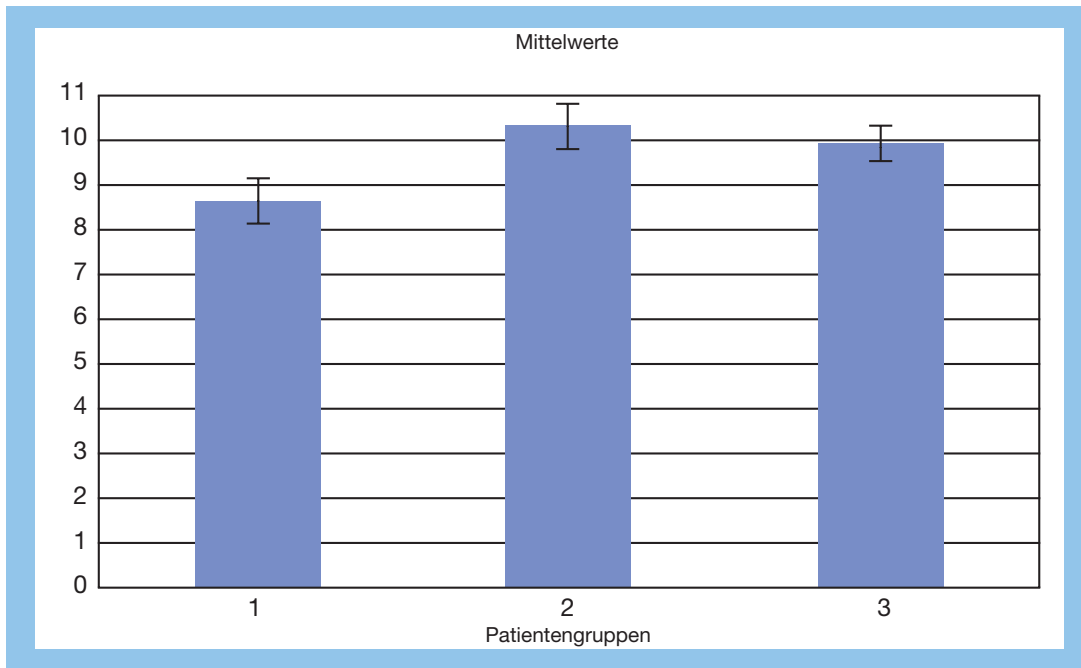


Abb. 67: Mittelwertvergleich der HbA 1c-Werte der drei, bezüglich ihres C-Peptid-Spiegels unterteilten Patientengruppen der Typ II-Diabetiker. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Patientengruppen hinsichtlich des HbA 1c-Wertes aufgetreten.

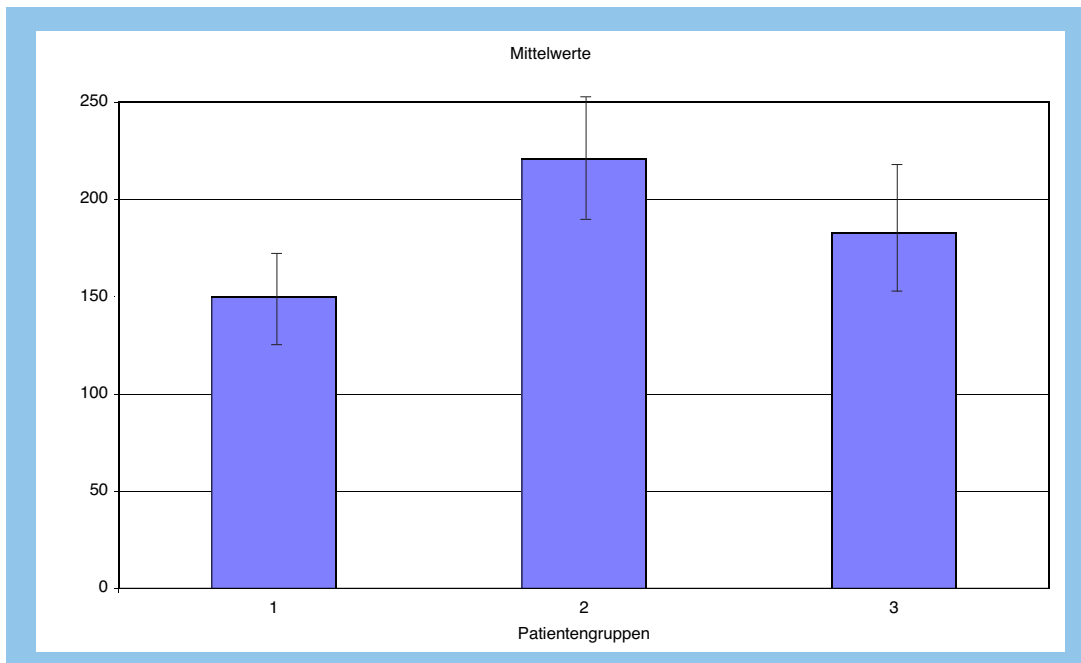


Abb. 68: Mittelwertvergleich der Nüchternglucosewerte der drei, bezüglich ihres C-Peptid-Spiegels unterteilten Patientengruppen der Typ II-Diabetiker. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Patientengruppen hinsichtlich des Glucosewertes aufgetreten.

## 7. Diskussion

---

### 7.1 Diabetes mellitus und Infektionen

Diabetiker leiden gehäuft unter Infekten (Federlin K, 1995; Kutsal, 1989; Wheat LJ, 1980), die sich oftmals als postoperative Wundheilungsstörungen (Slaughter MS, Olson MM et al., 1993) oder als rezidivierende Infektionen der oberen Luftwege sowie des Harnwegsystems (Federlin K, 1995; Balasoiu D, van Kessel KoKC, 1997; Ankel F, Wolfson AB, 1990) manifestieren. Es ist nicht bewiesen, daß das Krankheitsbild des Diabetes mellitus generell mit einem erhöhten Infektrisiko einhergeht, allerdings ergeben sich Korrelationen sowohl der Morbidität als auch der Mortalität durch Infektionen mit der Höhe des Blutglucosespiegels (Rayfield EJ, Ault MJ, 1982; Perschel WT, Langefeld TW et al., 1995)

### 7.2 Diabetes mellitus und Immunsystem

In der Literatur sind beim Krankheitsbild des Diabetes mellitus Beeinträchtigungen sowohl des zellulären als auch des humoralen Immunsystems beschrieben worden. Bei der Analyse der Höhe von Immunglobulinspiegeln im Serum findet sich eine Reduzierung der IgG- und IgA-Spiegel, insbesondere bei Vorhandensein der HLA-Kombination B8-DR-3 (Papadopoulo G, Petersen J et al., 1984; Horita M, Suzuki H, 1982). Als weiterer Mechanismus einer gestörten humoralen Immunabwehr ist die nicht-enzymatische Glycolysierung von Immunglobulinen denkbar. Bei Diabetikern ist ein erhöhter Anteil glykolisierter Antikörper der Klassen IgM, IgG und IgA nachgewiesen. Auch eine Funktionsschwächung der Antikörper ist gezeigt worden (Hammes HP, Kiefel V et al., 1990), wobei dieser Mechanismus von der Höhe des Blutglucosespiegels abhängig ist.

Bezüglich des Komplementsystems bestehen beim Diabetes mellitus Typ I, jedoch nicht beim Diabetes mellitus Typ II, Unterschiede gegenüber gesunden Probanden. Hier kann eher von prädisponierenden Faktoren für den Diabetes mellitus Typ I ausgegangen werden (Hostetter MK, 1990; Loewenson PM, Hostetter MK, 1987). Bei dem zellulären Immunsystem gibt es Beobachtungen, wonach die Gesamtanzahl der T-Zellen im peripheren Blut reduziert oder die T-Zell-Subpopulation beim Diabetes mellitus Typ I verschoben ist (Federlin K, 1985). Bei Typ II-Diabetikern zeigen sich keine Veränderungen der Lymphozyten-Populationen. Die Funktion von Granulozyten und Monozyten scheinen nach Studien verschiedener Autoren durch eine diabetische Stoffwechsellage gestört zu sein (Perschel WT, Langefeld TW et al., 1994; Veta E, Osaki T et al., 1993; Wykretowicz A, Wierusz-Wysocka B et al., 1993).

### 7.3 Versuche zur Etablierung des Phagozytoseansatzes

Studien, die sich mit der Granulozyten- und Monozytenfunktion beim Krankheitsbild des Diabetes mellitus befassen, weichen in ihren Ergebnissen stark voneinander ab (Horn W, 1988). Es sind Untersuchungen zur Chemotaxis, Adhäsion, Phagozytose und zu intrazellulären Bakterienabtötung durchgeführt worden. Dabei ließen sich Störungen der Chemotaxis (Mowat AG, Baum J, 1971), der Phagozytose (Perschel WT, Langefeld TW et al., 1994; Wilson RM, Galuin AM et al., 1984) und der intrazellulären Bakterizidie, (Gin H, Bother E et al., 1984) nachweisen, wobei auch hier Unterschiede in den Ergebnissen von Typ I- und Typ II-Diabetikern auftreten (Perschel WT, Langefeld TW et al., 1994). Diese unterschiedlichen Ergebnisse in den Studien lassen vermuten, daß diese Resultate durch unterschiedliche, nicht standardisierte Untersuchungstechniken zustande gekommen sind. Dazu kommt, daß Untersuchungen zur Funktionsfähigkeit von Granulozyten und Monozyten teilweise an isolierten Zellen\*, d.h. unter unphysiologischen Bedingungen, durchgeführt wurden (Flucs AJ, 1981; Bjerknes R, Bassoe CF, 1983; Marhoffer W, Stein M et al., 1992).

Die Techniken der Zellseparation können jedoch zu einer nicht quantifizierbaren Beeinträchtigung der phagozytären Funktionen führen. Es kann dabei zu einer unspezifischen Zellvoraktivierung kommen, sodaß die zu untersuchenden Zellen im anschließenden Phagozytoseassay „vorgesättigt“ sind und falsch negative Ergebnisse liefern. Diese Voraktivierung kann man gut beobachten, wenn man die leeren Zentrifugationsgefäße nach Gradiententrennung und Entnahme der entsprechenden zellangereicherten Phasen ansieht. Es bilden sich mehr oder weniger deutlich Ringe an der Gefäßwand im Bereich der Granulozyten- bzw. Monozytenphase. Daher sind die Aussagen und Vergleichbarkeiten von Daten, die mit verschiedenen Testsystemen gewonnen wurden, kritisch zu beurteilen (Perschel WT, Langefeld TW et al., 1994).

Physiologische Verhältnisse sind daher die Voraussetzung für eine in-vitro-Methodik zur Messung der granulozytären und monozytären Funktion, um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse auszuschließen. Da es sich bei der Phagozytose um eine Funktion der bakteriellen Abwehr handelt, sollten bei dem Testverfahren auch Bakterien eingesetzt werden und nicht etwa unbelebte Partikel, wie z.B. Latexpartikel (Bjerknes R, Bassoe CF, 1983; Bjerknes, 1984). Die Bakterien müssen darüberhinaus stoffwechselaktiv, d.h. vital sein.

Für die quantitative Analyse der Phagozytose von Zellen werden weitere Bedingungen vorausgesetzt. Die eingesetzten Bakterien müssen gleichmäßig und gleich intensiv markiert werden (Miller JS, Quauler JM, 1990). Diese Markierungsintensität eines einzelnen Bakteriums muß quantifizierbar sein. Die Intensität der Markierung, die die Zellen nach

\*isolierte Zellen = Blut wird mit einem Medium, z.B. Polymorph prep. versetzt und abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation sind die Blutzellen aufgrund ihres unterschiedlichen Dichtegradienten in Ringen in diesem Medium angeordnet und können so in einzelnen Zellpopulationen abpipettiert werden.

der Phagozytose von Bakterien aufweisen, soll mit der Anzahl aufgenommener Bakterien korrelieren (Perschel WT, Langefeld TW et al., 1994).

Ein weiterer Punkt ist die Bakterienart, die bei einem Phagozytostest eingesetzt wird. Bei der vorliegenden Studie wurden Staphylokokken, E. coli und Streptokokken eingesetzt. Pilze, wie *Candida albicans*, die häufig zu Infektionen bei Diabetikern führen (Schubert S, Heesemann J, 1995) wurden nicht verwendet, da diese aufgrund ihrer Größe zu Streulicht bei der durchflußzytometrischen Messung führen und dadurch falsche Ergebnisse provozieren (Hirth, 1995). Staphylokokken induzieren die typischen Weichteilinfektionen, besonders der unteren Extremität bei Diabetikern (Schubert S, Heesemann J, 1995) und sind somit für einen Phagozytostest geeignet. E. coli verursachen Infektionen beim Diabetes am Magen-Darm-Trakt (Perschel WT, Langefeld TW et al., 1995; Schubert S, Heesemann J, 1995). Auch sie erfüllen somit die Voraussetzung für einen Phagozytose-Funktionstest von Granulozyten und Monozyten bei Diabetikern. Nicht geeignet sind dagegen Streptokokken, die bei Zuckerkranken Hautinfektionen induzieren können (Schubert S, Heesemann J, 1995). Sie lagern sich in Ketten zusammen und können daher kaum vereinzelt gemessen werden. Der Phagozyt hat „größere Mühe“ diese Bakterien zu phagozytieren und es kommt zu falsch negativen Ergebnissen. Ein weiteres Kriterium ist der Ausschluß der Markierung von an der Zellwand adhärenen Bakterien. Bei früheren Studien konnte nicht unterschieden werden, ob die gemessene Markierung nur von phagozytierenden Bakterien stammt oder ob es sich um falsch positive Ergebnisse durch an der Zellwand adhärenen Bakterien handelt (Had, 1987).

Zusätzlich müssen weitere Komponenten des Immunsystems (z.B. Lymphozyten, Immunglobuline, Komplementkaskade) in dem in-vitro-System im Augenblick der Auseinandersetzung mit den Bakterien vorhanden sein. Dies ist einer der Gründe für die von uns gewählte Vollblut-Methodik (Perschel WT, Langefeld TW et al., 1994).

Eine wichtige Bedingung ist die optimale Inkubationszeit des Phagozytoseassays. Bei früheren Studien sind Phagozyten häufig bis zu 60 oder 120 min mit Bakterien inkubiert worden (Leijh PCJ, van den Barselaar MT et al., 1979). Hierbei besteht die Gefahr, daß die Bakterien von den Zellen nicht nur phagozytiert, sondern bereits abgetötet und verstoffwechselt worden sind, wobei es zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann (Perschel WT, Langefeld TW et al., 1994). Die Inkubationstemperatur des Testverfahrens muß physiologisch sein (37 °C), da die Aktivität der Granulozyten und Monozyten bei niedrigen Temperaturen herabgesetzt ist und über 42 °C Proteine denaturieren, d.h. die Phagozyten absterben (Leijh PCJ, van den Barselaar MT et al., 1979). Die Konzentration an Bakterien pro Granulozyt bzw. Monozyt muß bei dem in-vitro Test ausreichend und konstant sein, um falsch negative Resultate zu vermeiden (Leijh PCJ, van den Barselaar MT et al., 1979). Für die Analyse und Verallgemeinerung muß der Phagozytostest reproduzierbar sein.

Alle diese Voraussetzungen erfüllt der für die vorliegende Studie entwickelte Phagozytose-test. Bei den eingesetzten Bakterien, *Staphylococcus aureus*, handelt es sich um stoffwechselaktive bzw. vitale Mikroorganismen. In Vorversuchen sind die FITC-markierten, gereinigten und eingestellten Bakterien auf Blutagar überimpft und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert worden. Auf den Blutplatten fanden sich in Kolonien gewachsenen *Staph. aureus*. Auch die Acridinorange-Probe, bei der die aufbereitete Bakterienlösung mit Acridinorange angefärbt wurde, zeigen in Pilotversuchen am Fluoreszenzmikroskop über 90% vitale Bakterien. Die Bakterienanfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange dient der Unterscheidung lebender und abgestorbener Mikroorganismen. Acridinorange besitzt die Eigenschaft, grün zu fluoreszieren, wenn es an einen DNA-Doppelstrang bindet. Es fluoresziert hingegen orange, wenn es an einen DNA-Einzelstrang, also an eine denaturierte DNA oder RNA, bindet (Kapusinski J, Darzynkiewicz Z, 1983). In unseren Pilotversuchen sind die Bakterien immer gleichmäßig durch das FITC markiert worden. Dies ist am Fluoreszenzmikroskop überprüft worden.

Der Phagozytose-test ist eine Vollblutmethode im Mikroliterbereich. Damit wird die Voraktivierung von Leukozyten durch Zellseparation umgangen und nur wenig Ausgangsmaterial benötigt. Bei unserem Test sind die Bakterien nicht mit gepooltem Serum „voropsonisiert“ worden, wie es bei anderen Studien der Fall war (Hirt W, Nebe T et al., 1994), da durch diese künstliche Opsonisierung verbesserte Bedingungen geschaffen und somit falsch positive Ergebnisse erzielt werden. In dem zu untersuchenden Vollblut sind alle Komplementfaktoren vorhanden, die mit Bakterien in Aktion treten können.

In der vorliegenden Studie lag die optimale Inkubationszeit bei 10 Minuten. Nach 15 bis 20 Minuten Inkubationszeit zeigten die von den Granulozyten und Monozyten inkorporierten Bakterien, Fluoreszenzverluste im Mikroskop, die durch den beginnenden oxidativen Burst zu erklären sind. Die Fluoreszenz von an der Zellwand adhärenen Bakterien wird in unserem Ansatz durch eine Trypanblau-Lösung unterdrückt.

Auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist in unserem Verfahren gegeben. Die Überprüfung von am Durchflußzytometer phagozytosepositiven Zellen zeigte am Fluoreszenzmikroskop die gleichen Ergebnisse. Somit ist der von uns entwickelte Mikroassay optimal für die durchflußzytometrische Messung der Phagozytoseleistung von Granulozyten und Monozyten. Allerdings sind auch bei unserem Test einige wichtige Voraussetzungen zu beachten. Das abgenommene Blut muß über 95% vitaler Leukozyten enthalten und vollständig antikoaguliert sein. Ältere oder unvollständig antikoagulierte Blutproben zeigen im Kontrollansatz bei 0 °C phagozytose-positive Zellen und es kann so zu falsch positiven Resultaten kommen. Diese Phänomene können durch Thrombozytenaggregate und abgestorbene Leukozyten mit ausgetretener DNA hervorgerufen werden, die sich unspezifisch an die FITC-markierten Bakterien binden. Bei inkompletter Erythrozytenlyse und Thrombozytenaggregationen sind die Ergebnisse nicht aussagefähig. Verwendet man jedoch frische Blutproben und wird der Ansatz sorgfältig durchgeführt, ist der entwickelte Phagozytose-test sehr zuverlässig.

## 7.4 Die Cohen-Ratte

Bei der vorliegenden Studie wurde das Tiermodell der Cohen-Ratte ausgewählt. Die Cohen-Ratte entstammt einer normalen Albino-Laborrattenlinie, an die eine saccharosereiche und kupferarme Diät verfüttert wurde. Kupfer verstärkt die Insulinantwort auf Glucose (Kono T, 1969; Czech MP, Fain JN, 1970; Cohen AM, Miller E et al., 1985) und begünstigt die Glucoseresorption in die Zellen. Dies läßt sich durch eine Vermehrung der Insulinrezeptoren an Adipozyten nachweisen (Cohen AM, Miller E et al., 1985). In einer Studie von Madar wurde nachgewiesen, daß die diabetischen Cohen-Ratten eine verminderte Anzahl dieser Insulinrezeptoren besitzt und darüberhinaus ihre Insulinaffinität gegenüber der von normalen Tieren erniedrigt war (Madar Z, Teitelbaum A et al., 1984). Nach Züchtungen über mehrere Rattengenerationen hinweg entstanden so, bei konsequenter Fütterung der Spezialdiät, eine diabetische und eine nicht-diabetische Linie dieser Rattenfamilie. Beide Linien sind bei der Fütterung von normalem Laborfutter normoglycämisch. Wird ihnen jedoch die saccharosereiche und kupferarme Diät verfüttert, so entwickelt die diabetische Linie einen Diabetes mellitus, während die normale Linie normoglycämisch bleibt. Die diabetische Linie, auch Upward Line genannt, zeigt bei der Verfütterung von normalem Laborfutter Zeichen eines latenten Diabetes mit verminderter Glucosetoleranz, Insulinresistenz sowie einer Hyperinsulinämie. Unter Verwendung unserer Spezialdiät entwickeln die Tiere eine Hyperglycämie und eine Hyperinsulinämie, die im weiteren Verlauf in eine Normo- und anschließend in eine Hypoinsulinämie übergehen. Weiter kommt es bei den Tieren zu einer Reduzierung der Insulinrezeptoren. Als Spätkomplikationen treten Nephropathie, Retinopathie und Hodenatrophie, sowie bei schwangeren Tieren Embryopathien auf (Cohen AM, Rosenmann E, 1990). Damit entspricht die diabetische Cohen-Ratte in der Pathogenese dem Diabetes mellitus Typ II und stellte sich somit für uns als das geeignete Tiermodell dar, um die Phagozytosefunktion von Granulozyten und Monozyten bei dieser Diabetesform zu untersuchen.

Es wurden Resultate erwartet, die unabhängig von Alter, Geschlecht, Ernährung und Lebensumständen sind und somit aussagekräftiger wären als die bisherigen Studien, die sich mit der Phagozytosefunktion von Granulozyten und Monozyten beim Diabetes befasst haben. Auch wurde vermutet, daß Rückschlüsse von den Tieren auf die des Menschen möglich wären.

Als Parameter für den Diabetes wurden das Körpergewicht, die Blutglucose, das HbA 1c und der orale Glucosetoleranztest bei der Upward Line und der Downward Line der Cohen-Ratte bestimmt. Als Parameter für die Phagozytosefunktion sind der prozentuale Anteil der phagozytierenden Granulozyten und die Bakterienaufnahme pro Granulozyt gemessen worden. Aufgrund von Pilotversuchen wurde die Phagozytoseleistung von Monozyten nicht betrachtet, da im asservierten Rattenblut nur ca. 30-50 Monozyten meß-



bar sind, und diese geringen Anzahlen von Zellen am Durchflußzytometer kaum erfaßbar und somit nicht sinnvoll auszuwerten sind. Die Diabetesparameter zeigen bis auf das Körpergewicht, sowohl im zeitlichen Durchschnitt als auch im zeitlichen Verlauf signifikante Unterschiede. Das bedeutet, daß es bezogen auf die Parameter Blutglucose, HbA 1c und dem oralen Glucosetoleranztest signifikante Unterschiede zwischen der diabetischen und der nicht-diabetischen Linie gibt. Dies war zu erwarten und wurde durch die Studien von Cohen belegt (Cohen AM, 1995).

Der Phagozytoseparameter aufgenommenene Bakterien pro Granulozyt zeigt im zeitlichen Durchschnitt bei der diabetischen und der nicht-diabetischen Cohen-Ratte keine signifikanten Unterschiede. Signifikant unterschiedlich dagegen ist der prozentuale Anteil der phagozytierenden Granulozyten, sowohl bei der Upward Line als auch bei der Downward Line. Im zeitlichen Verlauf sind die Parameter „aufgenommenene Bakterien pro Zelle“ und der „prozentuale Anteil der phagozytierenden Zellen pro Granulozyten“ signifikant unterschiedlich. Das bedeutet, es gibt signifikante Unterschiede zwischen der Upward Line und der Downward Line der Cohen-Ratte, bezogen auf den prozentualen Anteil an Granulozyten, die überhaupt Bakterien phagozytiert haben und der Bakterienaufnahme pro Granulozyt. Bei der diabetischen Linie (Upward line) sind mehr Granulozyten an der Phagozytose beteiligt als bei der nichtdiabetischen. Im Gegenzug werden von den Granulozyten der Upward Line weniger Bakterien aufgenommen als von denen der Downward Line, wobei die Tendenz der aufgenommenen Bakterien pro Zelle bei beiden Linien steigend ist, während der prozentuale Anteil von phagozytierenden Granulozyten nur bei der diabetischen Linie ansteigt und bei der nicht-diabetischen Linie gleichbleibend ist. Anscheinend wird das entstandene Defizit an aufgenommenen Bakterien pro Zelle durch einen erhöhten prozentualen Anteil an der Phagozytose beteiligter Granulozyten bei der diabetischen Linie der Cohen-Ratte ausgeglichen. In einer Studie von Sima aus dem Jahre 1988 ist die bakterielle Phagozytose und das intrazelluläre Abtöten von Staph. aureus durch alveoläre Makrophagen an dem Tiermodell der BB-Ratte untersucht worden. Die Ergebnisse zeigen, daß bei den diabetischen Tieren mit Insulinmangel signifikant weniger alveoläre Makrophagen an der Phagozytose beteiligt sind. Bei Insulingabe an diese Tiere wird die Phagozytoseleistung wieder verbessert. Ferner ist intracelluläre Bakterizidie bei den Ratten mit Insulinmangel herabgesetzt. Auch diese Funktion der alveolären Makrophagen verbessert sich mit Insulingabe (Sima AAF, O'Neill SJ et al., 1988). Dieses Resultat steht im Gegensatz zu unserer Beobachtung, daß der prozentuale Anteil phagozytierender Granulozyten bei diabetischen Tieren signifikant höher ist als bei nicht-diabetischen Tieren der Cohen-Ratte. Allerdings handelt es sich bei der BB-Ratte um ein Diabetesmodell des Typ I. Die Tiere entwickeln dabei einen spontan auftretenden Diabetes durch immunvermittelte Insulinitis, bei der die  $\beta$ -Zellen des Pankreas zerstört werden und ein insulinabhängiger Diabetes mellitus zur Ausprägung kommt. Es ist kritisch anzumerken, daß die Phagozytose von alveolären Makrophagen und Leukozyten unterschiedlich sein kann und die Funktion des Systems der

Granulozyten und Monozyten eines Diabetes mellitus Typ II-Tiermodells nicht mit dem eines Diabetes mellitus Typ I-Tiermodells vergleichbar ist.

Allerdings findet man in der Literatur hauptsächlich Tiermodelle, die einen Diabetes mellitus Typ I entwickeln, wie z.B. die BB-Ratte oder die Streptocotozin-Ratte. Eine Studie von Plotkin et al. aus dem Jahr 1996 befaßt sich mit der Leukozytenfunktion bei der Zuckerratte (fa/fa), einem Diabetes mellitus Typ II-Tiermodell. Die „fette Zuckerratte“ (fa/fa) ist ein Tiermodell für den Adipositas-assoziierten Typ II-Diabetes beim Menschen. Dieses Modell wurde bislang für Studien an endokrinologischen Störungen und metabolischen Entgleisungen verwendet, die mit dem nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus assoziiert werden, wie z.B. Hyperinsulinämie und Insulinresistenz (Bray GA, 1977; Triscari I, Stern JS et al., 1979). Die Studie von Plotkin et al. ergab keine signifikanten Unterschiede bei der Phagozytose von *Candida albicans* durch PMN bei dünnen und adipösen Ratten. Allerdings zeigten die übergewichtigen Zuckerratten eine signifikante Erniedrigung der intracellulären Abtötung der Hefe. Auch hier ist kritisch anzumerken, daß Unterschiede bei der Phagozytose von Bakterien und Pilzen durch Leukozyten bestehen können, da Hefen wesentlich größer sind (Weber R, 1991; Roitt IV, Brostoff et al., 1991) und deshalb per se schlechter und langsamer inkorporiert und abgetötet werden könnten.

## **7.5 Phagozytoseansätze bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II**

Infektionen manifestieren sich bei Diabetikern oft erst im Spätstadium der Erkrankung (Federlin K, 1995; Ankel F, Wolfson AB et al., 1990). Durch Glucoseabbau wird vermindert radikaler Sauerstoff zur Bakterizidie produziert. Neuropathie, Mikroangiopathie und Makroangiopathie begünstigen Wunden als Keimeintrittspforten, welche durch veränderte Innervation und Durchblutungsmangel schlechter heilen (Perschel WT, Langefeld TW et al., 1995). Umgekehrt kann ein Infekt den Diabetes zur Entgleisung bringen. Erhöhter Insulinbedarf, instabile pH-Wert-Regulation, krankheitsbedingte Ernährungsumstellung und reduzierte Behandlungscompliance erschweren die Therapie solcher Störungen (Terranova, 1991). Durch Gewebsazidose wird die Bakterienabwehr negativ beeinflusst, indem Chemotaxis und Phagozytose in dem betroffenen Gebiet behindert werden. Dies fördert die Mischflora und die Pathogenität von fakultativ pathogenen Keimen (Schubert S, Heesemann J, 1995; Rayfield EJ, Ault MJ et al., 1982).

Es wurde für die vorliegende Arbeit angenommen, daß auch der bei den Patienten noch vorhandene Insulinspiegel Einfluß auf die Funktion von Granulozyten und Monozyten haben könnte. Als ein Parameter für den Insulinstatus der Patienten wurde der C-Peptidspiegel bestimmt. Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ II wurden aufgrund ihres C-Peptid-

Spiegels in folgende drei Gruppen eingeteilt:

- Patienten-Gruppe 1 = C-Peptidspiegel  $\leq 1,5$  ng/dl (längerfristige Diabetesdauer)
- Patienten-Gruppe 2 = C-Peptidspiegel  $\geq 1,6 \leq 3,5$  ng/dl (mittelfristige Diabetesdauer)
- Patienten-Gruppe 3 = C-Peptidspiegel  $\geq 3,6$  ng/dl (kurzfristige Diabetesdauer)

Diese Einteilung soll die Krankheitsdauer des Diabetes mellitus Typ II widerspiegeln.

Weitere gemessene Diabetesparameter sind der Nüchtern-Glucosewert und das HbA<sub>1c</sub>. Als Immunparameter sind der prozentuale Anteil phagozytose-positiver Zellen und die inkorporierten Bakterien pro Zelle bei Granulozyten und Monozyten gemessen worden.

Es sollte überprüft werden, ob bei Typ II-Diabetikern im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung, d.h. bei verminderter Insulinsekretion, die Immunabwehr und damit die Granulozytenfunktion geschwächt ist und die Patienten deshalb häufiger unter Infekten und Wundheilungsstörungen leiden.

Die Bestimmung der Granulozytenfunktion bei den drei Versuchsgruppen hat jedoch ergeben, daß es keine signifikanten Unterschiede dieser drei Gruppen bezüglich der untersuchten Immunparameter, d.h. hinsichtlich der Phagozytoseleistung von Granulozyten in Abhängigkeit des C-Peptidspiegels, gibt.

Erkennbar sind allenfalls Tendenzen. Am Anfang der Erkrankung Diabetes mellitus, gekennzeichnet durch eine Hyperinsulinämie, ist die Phagozytoseleistung von Granulozyten und Monozyten am höchsten. Die Phagozytoserate dieser Zellen nimmt beim Absinken des Insulinspiegels ab und ist bei einer Hypoinsulinämie, also bei den Spätstadien des Diabetes mellitus, herabgesetzt. Eine mögliche Ursache für das Fehlen signifikanter Werte könnte die Tatsache sein, daß unser Patientenkollektiv statistisch gesehen zu klein war. Aussagekräftigere Ergebnisse sind unter Umständen mit mehr Patienten, im Rahmen einer Multicenter-Studie zu erwarten. Die Beobachtung, daß bei einer Hyperinsulinämie die Phagozytoseleistung von Granulozyten und Monozyten erhöht und bei einer Hypoinsulinämie dagegen herabgesetzt ist, entspricht aber der klinischen Tatsache, daß Diabetiker gerade im Spätstadium ihrer Erkrankung unter Infektionen leiden.

Die Phagozytoseleistung von Zellen ist ein multifaktorielles Geschehen. Einer dieser Faktoren ist die Fähigkeit der Zellen, sich mit Hilfe von spezifischen Oberflächenrezeptoren, an in den Organismus eingedrungene Mikroorganismen anzuheften. Beim Diabetes mellitus könnte die Anzahl der Oberflächenrezeptoren vermindert sein. Somit würden bei diesem Krankheitsbild vermindert Bakterien an die Phagozyten gebunden und phagozytiert. Es gibt Studien, die sich mit den Adhäsionsmolekülen beim nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus befassen. Dort werden erhöhte Spiegel von Intracellulär-Adhäsionsmolekülen sowie von Vasculär-Zellen-Adhäsionsmolekülen (EIAM, ICAM, VCAM1) beschrieben

(Cominacini L, Garbin U et al., 1996; Fasching P, Waldhausl W et al., 1996; Steiner M, Reinhardt KM et al., 1996). Diese Resultate weisen auf ein erhöhtes Risiko für Atherosklerose hin. Die herabgesetzte Phagozytoseleistung von Granulozyten hingegen wird damit nicht erklärt. Eindringene Mikroorganismen können erheblich besser an Phagozyten angelagert werden, wenn sie vorher mittels Komplementsystem-Aktivierung durch den C3b-Komplementfaktor opsonisiert worden sind. Es ist denkbar, daß durch eine gestörte Funktion der Komplementkaskade beim Diabetes die Bakterien z.B. unzureichend opsonisiert werden.

Eine andere mögliche Begründung für die veränderte Phagozytoseleistung beim Diabetes mellitus ist, daß die Zellen in der Lage sind Bakterien zu phagozytieren, aber diese nicht abtöten können. Somit könnten die Erreger in den Granulozyten und Monozyten als „intra-zelluläre Parasiten“ überleben, bei der Apoptose der Phagozyten wieder freigesetzt werden und somit erneut zum Entzündungsgeschehen beitragen. Dies führt zu einem Circulus vitiosus und wäre eine Erklärung für die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung. Desweiteren könnte diese Hypothese auch von einer Studie von Marhoffer aus dem Jahre 1993 gestützt werden, dessen Ergebnisse einen herabgesetzten oxidativen Burst in Neutrophilen bei Typ I-Diabetikern zeigen.

Monozyten produzieren Komplement-Komponenten, Prostaglandine, Interferone und Mono-kine, wie z.B. Interleukin 1 und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), sodaß eine vom Diabetes mellitus induzierte Funktionsstörung dieser Zellen die Phagozytose, das Zusammenspiel von zellulären und humoralen Immunkomponenten sowie das eigentliche Entzündungsgeschehen beeinflussen kann. Auch die Bestimmung der Monozytenfunktion bei den drei Versuchsgruppen hat ergeben, daß es keine signifikanten Unterschiede dieser drei Gruppen bezüglich der untersuchten Immunparameter gibt.

Somit gibt es in unserer Arbeit auch keinen Unterschied bei Typ II-Diabetikern hinsichtlich der Phagozytoseleistung von Monozyten in Abhängigkeit des C-Peptidspiegels. Ohno et al. zeigten in einer Untersuchung aus dem Jahr 1993, daß Typ II-Diabetiker im Gegensatz zu Typ I-Diabetikern erhöhte TNF- $\alpha$ -Spiegel aufweisen, während die Produktion von IL1 und IL6 beim nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus normal war.

Die Aufgabe von TNF- $\alpha$  ist die Aktivierung von Makrophagen, Granulozyten und zytotoxischen Zellen. Es erhöht die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel. In einer Studie von Bergomaschini et al. sind keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Plasmaspiegel von C4, C3 und SC 5b-9 beobachtet worden. Auch der Spiegel von C3a, das auch als Opsonin bekannt ist und sich an körperfremde Oberflächen anlagert, blieb normal. Lediglich bei älteren Typ I- und Typ II-Diabetikern ist der C4a-Spiegel erhöht. Das C4a bindet hauptsächlich an Aminogruppen von Proteinen (Roitt IV, Brostoff J et al., 1991) und damit auch an Bakterien. Normalerweise würde man bei älteren Diabetikern einen Mangel

an C3a und C4a erwarten und somit die gehäufte Infektanfälligkeit erklären. Bei normalen oder erhöhten Spiegeln von C3a und C4a könnte man diskutieren, daß die Infektanfälligkeit nicht auf eine Störung des Komplementsystems beruht. Man kann argumentieren, daß erhöhte Spiegel von Komplementfaktoren auf einen erhöhten Verbrauch und damit auf eine erhöhte Produktion im Rahmen eines Infektgeschehens zurückzuführen sind. Auch müßte geklärt werden, ob die aktivierten Komplementfaktoren auch suffizient opsonisieren. Darüberhinaus zeigten Chang und Shaiio 1995 eine signifikant herabgesetzte Produktion von  $H_2O_2$  in Monozyten bei schlecht eingestellten Typ II-Diabetikern und damit eine gestörte intracelluläre Bakterizidie.

Bezüglich der Phagozytose wurde zum Einen über eine normale Neutrophilenfunktion bei Diabetikern berichtet (Bagdade et al., 1972). In seinen Arbeiten wurde zum großen Teil die Funktion von Granulozyten von normalglycämischen Diabetikern überprüft. Andere Studien sprechen für eine verminderte Phagozytose. Bybee und Rogers zeigten schon 1996, daß die Phagozytose der Neutrophilen bei Ketoacidose herabgesetzt ist. Später wurden von Bagdade ähnliche Ergebnisse bei Patienten mit Hyperglycämie jedoch ohne Ketoacidose erzielt. Diese Ergebnisse waren unter Insulintherapie reversibel (Bagdade et al., 1974; 1978). Es ist schwer zu interpretieren, inwieweit die Neutrophilen-Funktionsstörung während akuter bestehender Infekte beeinflusst wird (Solbert CO, Kellum KB 1972). Violler fand keine Korrelation zwischen verschlechterter Bakterizidie, Infekthäufigkeit und Glucosespiegel. Die Fähigkeit des diabetischen Organismus, einen bakteriellen Infekt zu bekämpfen, umfaßt sowohl die unspezielle granulozytäre Funktion, als auch spezielle immunologisch humorale Faktoren. Individuelle Kompensationsmechanismen können auch in Gegenwart eines einzelnen Funktionsdefektes die Infektanfälligkeit des Diabetikers gegenüber Bakterien bestimmen.

## 8. Zusammenfassung

---

Ziel der vorliegenden Studie war die durchflußzytometrische Untersuchung von Granulozyten und Monozyten bei Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ II.

Die Dissertation umfaßt drei Fragenkomplexe:

1. Entwicklung eine geeigneten Phagozytose-tests
2. Die Phagozytoseleistung von Granulozyten bei dem Tiermodell „Cohen-Ratte“
3. Die Phagozytoseleistung von Granulozyten und Monozyten bei Typ II-Diabetikern

### 8.1 Versuche zum Phagozytoseansatz

#### 8.1.1 Ermittlung der geeigneten Bakterienart

In der vorliegenden Studie wurde zur Ermittlung der geeigneten Bakterienart, heparinisiertes Vollblut von 10 Normalpersonen mit drei verschiedenen Bakterienstämmen (Staph. aureus, E. coli, Streptokokken Gruppe A) inkubiert. Anschließend wurde die Aufnahme der Bakterien pro Granulozyt sowie der prozentuale Anteil an phagozytierenden Granulozyten ermittelt. Diese Untersuchungen sind ebenfalls in Bezug auf Monozyten durchgeführt worden.

Bei der Analyse der Granulozyten ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Bakterienstämmen (E. coli, Staph. aureus, Strptokokken Gruppe A) bezüglich des prozentualen Anteils an phagozytierenden Granulozyten sowie der Bakterienaufnahme pro Granulozyt. Bei dem Phagozytoseansatz mit FITC-markierten E. coli konnten die Granulozyten die meisten Bakterien pro Zelle aufnehmen und es war die größte Anzahl an Zellen an der Phagozytose beteiligt. Die Streptokokken sind dagegen am schlechtesten inkorporiert worden und bei ihnen waren auch signifikant weniger Granulozyten an der Phagozytose beteiligt.

Im Gegensatz dazu sind bei den Monozyten die Unterschiede bei dem prozentualen Anteil an phagozytierenden Monozyten und der aufgenommenen Bakterien pro Monozyt nicht signifikant. Es ist allerdings die gleiche Tendenz erkennbar, die auch bei den Granulozyten zu beobachten war. Die Monozyten konnten am besten E. coli-Bakterien aufnehmen und auch bei ihnen waren wieder am meisten Zellen am Phagozytosevorgang der E. coli beteiligt. Am wenigsten wurden auch bei den Monozyten wieder die Streptokokken aufgenommen und es waren bei ihnen auch die wenigsten Zellen phagozytose-positiv.

Als einen weiteren Untersuchungsparameter stellten wir die Hypothese auf, daß Männer und Frauen in unterschiedlichem Maße Bakterien phagozytieren können.

Bei den Granulozyten der weiblichen Probanden waren prozentual betrachtet mehr Zellen an der Phagozytose beteiligt. Diese Unterschiede sind jedoch lediglich in Bezug auf die Aufnahme von Streptokokken signifikant. Auch konnten die Granulozyten der weiblichen Probanden mehr Bakterien pro Zelle inkorporieren, allerdings ist auch hier nur die Aufnahme von E. coli-Bakterien signifikant von den männlichen Probanden verschieden.

Aufgrund dieser Untersuchungen sind für die vorliegende Studie Staph. aureus als geeignetes Bakterium ausgewählt worden, da sie beim Diabetiker typische Weichteilinfektionen hervorrufen und durchflußzytometrisch gut ausgewertet werden können.

### **8.1.2** Ermittlung der optimalen Inkubationszeit

Zur Ermittlung der für die Untersuchungen am besten geeigneten Inkubationszeit phagozytierten Granulozyten und Monozyten von 10 Normalpersonen das Bakterium Staph. aureus bei unterschiedlichen Inkubationszeiten (0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 min). Die geeignete Inkubationszeit lag bei 10 Minuten, da zu diesem Zeitpunkt die Sättigung der Phagozytosekurve erreicht wurde. Nach 10 Minuten Inkubationszeit im Fluoreszenzmikroskop zeigten die von Granulozyten und Monozyten phagozytierten Staph. aureus Fluoreszenzverluste, die durch den beginnenden oxidative burst zu erklären sind.

#### **8.1.2.1.** Ermittlung der Inkubationszeit bei Granulozyten

Im zeitlichen Mittel hat sich ein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen ergeben. Die Granulozyten der weiblichen Probanden inkorporieren eine größere Anzahl Staph. aureus pro Zelle und es sind mehr Granulozyten an der Phagozytose beteiligt als bei den männlichen Probanden. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten erreicht die Phagozytoseleistung der Granulozyten ihre Sättigung und stagniert im weiteren Verlauf (s. Abb. 46, S. 75).

#### **8.1.2.2.** Ermittlung der Inkubationszeit bei Monozyten

Bei dem prozentualen Anteil an phagozytose-positiven Monozyten gab es signifikante Unterschiede zwischen Männern und Frauen. Wie bei den Granulozyten waren auch bei den Monozyten mehr Zellen an der Phagozytose beteiligt und diese Zellen waren darüber-



hinaus auch in der Lage eine größere Anzahl an Bakterien zu inkorporieren. Lediglich bei dem Parameter der inkorporierten Staph. aureus pro Monozyt ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Analog zu den Granulozyten trat bei der Phagozytoseleistung eine Sättigung nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten ein, während die Werte im weiteren Verlauf stagnieren (s. Abb. 47, S. 75).

### **8.1.3** Kontrollversuche zur Verifizierung der am Durchflußzytometer gemessenen Ergebnisse

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde der prozentuale Anteil an Granulozyten, die Bakterien phagozytieren, sowohl durchflußzytometrisch als auch mittels einer mikroskopischen Beurteilung der Zellen ermittelt. Bei der mikroskopischen Auswertung wurden 100 Granulozyten ausgezählt und die Zahl der phagozytosepositiven Zellen ermittelt. Für diese Versuchsreihe wurden die Zellen mit Staph. aureus, E. coli und Streptokokken inkubiert, um die Phagozytose anzuregen.

Die zur Verifizierung durchgeführten Untersuchungen ergaben in der vorliegenden Studie keinen Widerspruch zu der Annahme der Übereinstimmung beider Auswertungsmethoden. Somit ist das Fluoreszenzdurchflußzytometer das geeignete Meßinstrument für den entwickelten Phagozytostest, da mit ihm hohe Zellzahlen zuverlässig ausgewertet werden können

### **8.1.4** Versuche zur Reproduktionssicherheit des Mikroassays

Die Reproduktionssicherheit des Mikroassays wurde mit Hilfe eines Phagozytoseansatzes für Granulozyten und Monozyten, der bei 10 Normalpersonen zu unterschiedlichen Zeiten (nach 0, 0,5, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4 h) nach Blutentnahme durchgeführt wurde, überprüft. Im zeitlichen Verlauf ergaben sich einige signifikante Veränderungen. So ist zu beobachten, daß der prozentuale Anteil an phagozytierten Staph. aureus zu Beginn der Untersuchung (0 h, 0,5 h, 1 h) am höchsten ist und im weiteren Verlauf (3 h, 3,5 h, 4 h) signifikant abfällt. Ebenso ist die Anzahl der inkorporierten Bakterien pro Granulozyt zu Beginn am größten und sinkt im zeitlichen Verlauf ab. Diese signifikanten Veränderungen im zeitlichen Verlauf der Studie wurden bei Monozyten ebenfalls festgestellt.

Daraus folgt, daß in der vorliegenden Studie die Blutproben sofort verarbeitet werden mußten, um ein optimales Ergebnis zu gewährleisten. Während dieser Untersuchungen gab es im zeitlichen Mittel keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern.



## 8.2 Tiermodell

Vierzig Tiere der diabetischen und nicht-diabetischen Linie der Cohen-Ratte wurden über einen Zeitraum von vier Wochen mit normalem Labor-Rattenfutter gefüttert. Anschließend wurde für beide Linien das Futter auf die rohrzuckerreiche und kupferarme Spezialdiät umgestellt. Es wurde untersucht, wie sich diese Spezialdiät auf die Phagozytoseleistung sowie die physische Verfassung der Versuchstiere auswirkt. Bei der Untersuchung verschiedener Parameter sind folgende Ergebnisse zu beobachten:

### *Körpergewicht der Versuchstiere*

Das Körpergewicht der diabetischen und der nicht-diabetischen Cohen-Ratten unterscheidet sich nicht signifikant voneinander.

### *Glucosewert*

Die Glucose im Vollblut ist bei der diabetischen Linie der Cohen-Ratte signifikant höher als bei der nicht-diabetischen Linie.

### *HbA 1c-Wert*

Ebenso wie der Glucosewert ist auch der HbA 1c-Wert in der vorliegenden Studie bei der Upward Line signifikant höher als bei der Downward Line.

### *Oraler Glucosetoleranztest*

Der orale Glucosetoleranztest fällt bei den diabetischen Ratten ebenfalls signifikant höher aus als bei den nicht-diabetischen Tieren.

### *Prozentualer Anteil phagozytose-positiver Zellen*

Bei dem prozentualen Anteil an phagozytose-positiven Granulozyten zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Upward Line und der Downward Line.

### *Inkorporierte Bakterien pro Granulozyt*

Hier zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Rattenlinien. Die diabetische Linie inkorporiert signifikant weniger Bakterien pro Granulozyt als die nicht-diabetische Linie.

### 8.3 Klinische Studie: Typ II-Diabetiker

Die 35 untersuchten Typ II-Diabetiker wurden aufgrund ihres C-Peptid-Spiegels in folgende drei Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1: Patienten mit einem C-Peptidspiegel  $\leq 1,5$  ng/dl

Gruppe 2: Patienten mit einem C-Peptidspiegel  $\geq 1,6 \leq 3,5$  ng/dl

Gruppe 3: Patienten mit einem C-Peptidspiegel  $\geq 3,6$  ng/dl

Bei allen drei Gruppen wurde die Nüchtern-glucose, der HbA 1c sowie die Phagozytoseleistung von Granulozyten und Monozyten bestimmt. Die Phagozytoseparameter sind: der prozentuale Anteil an phagozytierenden Zellen und die Bakterienaufnahme pro Zelle. In der vorliegenden Studie waren keine signifikanten Ergebnisse bezüglich der drei Gruppen im Hinblick auf die Versuchsparameter festzustellen.

Auch die Korrelation der Versuchsparameter mit dem C-Peptidspiegel, dem HbA 1c oder der Nüchtern-glucose ergab weder in Bezug auf Granulozyten noch auf Monozyten signifikante Veränderungen.

Bei den Typ II-Diabetikern sind weder die HbA 1c-Werte noch die Glucose-Werte der drei untersuchten Patientengruppen signifikant unterschiedlich gewesen. Man kann jedoch für beide Parameter eine Tendenz feststellen: Die Patienten mit erniedrigtem C-Peptid-Spiegel weisen auch die niedrigsten HbA 1c- und Glucosewerte auf. Die Patienten mit normalen C-Peptid-Werten dagegen, verzeichnen die höchsten Werte in Bezug auf HbA 1c und Glucose. Daraus folgt, daß die Patienten mit langen Krankheitsverläufen gut eingestellt waren, die Patienten mit kurzen Krankheitsverläufen hingegen weniger gut. Diese Feststellung hat jedoch keine Auswirkung auf die Phagozytoseleistung von Granulozyten und Monozyten. Im Anschluß an die vorliegende Dissertation müßten daher weitere Untersuchungen zur Phagozytosefähigkeit von Neutrophilen und Monozyten bei schlecht eingestelltem Typ II-Diabetes angeschlossen werden, um festzustellen, ob die Phagozytoseleistung bei diesen Patienten herabgesetzt ist.

Die Phagozytosefunktion von Granulozyten und Monozyten ist von vielen Faktoren abhängig. Aus bisher publizierten Studien geht hervor, daß die Phagozytosefunktion beim Krankheitsbild des Diabetes mellitus beeinträchtigt ist. Ob diese Beeinträchtigung vom C-Peptidspiegel abhängt, kann in der vorliegenden Dissertation nicht bewiesen werden. Daher sollten sich Studien anschließen, die sämtliche Schritte der Immunabwehr, welche Einfluß auf die Phagozytose von Granulozyten und Monozyten haben, umfassen und deren Funktion beim Diabetes mellitus untersucht werden.

## 9. Literaturverzeichnis

---

- 1 Abraham EC, Perry RE, Stallings M (1983): Application of affinity chromatography for separation and quantitation of glycosylated hemoglobin  
J Lab Clin Med 102 (2): 187-197
- 2 Ankel F, Wolfson AB, Stapczynski JS (1990) Emphysematous cystitis: a complication of urinary tract infection occurring predominantly in diabetic woman  
Ann. Emerg. Med. 19: 404-406
- 3 Atkinson MA, Maclaren NK (1990) Insulinabhängiger Diabetes:  
Eine Autoimmunkrankheit  
Spektr. Wiss 9: 102-110
- 4 Avicenna (1556) Liber cananis  
Lib. 3 Fen 19 Tract. 2, Cap 17f, fol 684 ff
- 5 Bagdade JD, Nielson KL, Bulger RJ (1972) Reversible abnormalities in phagocytic function in poorly controlled diabetic patients  
Am-J-Med-Sci. 1972 Jun; 263(6): 451-6
- 6 Bagdade JD, Root RK, Bulger RJ (1974) Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes  
Diabetes 1974 Jan; 23(61): 9-15
- 7 Bagdade JD, Stewart M, Walters E (1978) Impaired granulocyte adherence. A reversible defect in host defense in patients with poorly controlled diabetes  
Diabetes 1978 Jun; 27(6): 677-81
- 8 Balasoiu D, van Kessel KoKC, van Kats-Renaud HJ, Collet TJ, Hoepelman AJ (1997) Granulocyte Funktion in Women with Diabetes and Asymptomatic Bacteriuria  
Diabetes care 20: 392-395
- 9 Banting FG, Best CH (1922) The internal secretion of the Pancreas  
J Lab Clin Med 7: 251 - 266

- 10 Barker CF, Naji A, Perloff L, Dafoe DC, Bartlett S (1982) Animal models of diabetes and immunological problems with islet allograft  
Trans AM Soc Artif Intern Organs 28: 338-341
- 11 Basso CF (1984) Flow cytometric studies on phagocyte function in Bacterial infections  
Acta path. microbiol. immunol. scand. Sec. C 92: 167-171
- 12 Bergamaschini L, Gardinali M, Poli M, Lorini R, Bosi E, Agostoni A (1991) Complement activation in diabetes mellitus  
J Clin Lab Immunol 35 (3): 121-127
- 13 Bjerknes R, Basso CF (1983) Human leucocyte phagocytosis of zymosan particles measured by flow cytometry  
Acta path. microbiol. scand. Sect. C91: 341-348
- 14 Bray GA (1977) The Zucker-fatty rat: a review  
Federation Proceed (36): 183-189
- 15 Bretzel RG (1984) Inseltransplantation und Diabetes. Experimentelle Grundlagen und Klinische Versuche  
Habilitationsschrift Plaum, München: 1-644
- 16 Bretzel RG (1988) Grundlagen der Immuntherapie des insulinpflichtigen Diabetes mellitus  
Wiener Klin Wochenschr 100: 435-442
- 17 Broek J van den, Dehne FAM, Leijh PCJ, Barselaar MTH van den, Furth K van (1982) The Use of Lysostaphin in Vitro Assays of Phagocyte Function: Adherence to and Penetration into Granulocytes  
Scand J Immunol 15: 467-473
- 18 Chang FY, Shaiio MF (1995) Respiratory burst activity of monocytes from patients with NIDDM  
Diabetes Res Clin Pract 29 (2): 121-127

- 19 Cohen AM, Teitelbaum A (1964) Effect of dietary sucrose and starch on oral glucose tolerance and insulin-like activity  
Am J Physiol 206: 105-108
- 20 Cohen AM, Teitelbaum A (1968) Effect of glucose, sucrose and starch on lipogenesis in rats  
Life Sci 7: 23-29
- 21 Cohen AM, Teitelbaum A, Saliternic R (1972) Genetics and diet factors in development of diabetes mellitus  
Metabolism 21: 235-240
- 22 Cohen AM, Teitelbaum A, Miller A et al (1982) Effect of copper on carbohydrate metabolism in rats  
Isr J Med Sci 18: 840-844
- 23 Cohen AM, Rosenmann E (1990) The Cohen Diabetic Rat  
Karger
- 24 Cohen AM, Miller E, Madar Z (1985) Is copper effect on glucose incorporation mediated by the insulin receptor in rat adipose tissue  
Acta Diabetol Lat (22): 47-54
- 25 Comancini L, Garbin U, Fratta-Pasini A, Lo-cascio V (1996) Increased levels of Plasma ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 in NIDDM: Possible role of oxidized LDL (letter)  
Diabetologica 39 (10): 1244
- 26 Czech MP, Fain JN (1970) Insulin protection against fat cell receptor inactivation by trypsin  
Endocrinology (87): 191-194
- 27 Deckert T, Poulson DE, Larsen M (1978) Prognosis of diabetics with diabetes onset before the age of thirtyone  
Diabetologica 14: 363-370

- 28 Dörner L, Blobel H, Schräg W (1977) Auswertung der Phagozytose von Staphylokokken unter Verwendung von Lysostaphin  
Zbl Bakt Mikrobakt Hyg, I Abt 237: 141-146
- 29 Dziatkowiak H, Kowalska M, Denys A (1982) Phagocytic and bactericidal activity of granulocytes in diabetic children  
Diabetes 31: 1041-1043
- 30 Federlin K, Bretzel RG (1984) The effect of islet transplantation on complications in experimental diabetes of the rat  
World J Surg 8: 169-178
- 31 Federlin K, (1986a) Zuckerkrankheit – Diabetes mellitus  
Sonderdruck Giessener Univers Blätter Heft 2: 77-87
- 32 Federlin K (1995) Diabetes mellitus und Infektionen  
Immun. Infekt. 23: 195
- 33 Fasching P, Waldhausl W, Wagner OF (1996) Elevated circulating adhesion molecules in NIDDM - potential mediators in diabetic macroangiopathy (letter)  
Diabetologia 89 (10): 1242
- 34 Flucs AJ (1981) Three-step isolation of human blood monocytes using discontinuous density gradients of percoll  
J. Immunol. Med. 41: 225-233
- 35 Franck JP (1796) De curandis hominum morbis Epitome  
Mannheim Bd 5, B 476 S. 78 ff
- 36 Gin H, Bother E, Aubertin JC (1984) Influence of glycemic normalisation by an artificial pancreas on phagocytic and baktericidal functions of granulocytes in insulin-dependent diabetic patients  
J. Chem. Path. 37: 1029-1031
- 37 Gepts W, Veld PA (1987) Islet morphologic changes  
Diab Metabol Rev 3: 859-872

- 38 Greene RT, Lammler C (1993) Staphylococcus intermedius: current knowledge on a pathogen of veterinary importance  
Zentralbl - Veterinarmed-B 40(3): 206-214
- 39 Had J, Hallden G, Johansson S.G.O., Larsson P (1987) The use of fluorescence quenching in flow cytofluorometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation  
J. Immun Met 101: 119-125
- 40 Hammes HP, Kiefel V, Laube H, Federlin K (1990) Impaired agglutination of IgM resulting from non-enzymatic glycation in diabetes mellitus.  
Diabetes Res. Clin. Pract. 9: 37-42
- 41 Herold [Hrsg.] (1996) Innere Medizin  
Köln: 557
- 42 Hirt W, Nebe T, Birr (1994) Phagotest und Bursttest (Phagoburst), Testkits zur Untersuchung von Phagozytenfunktionen  
Wien Klin Wochenschr 106 (8): 2250-252
- 43 Horita M, Suzuki H, Onodera T, Ginsberg-Feller F, Fauci AS, Notkins AL (1982) Abnormalities of immunoregulatory subsets in patients with insulin-dependent diabetes mellitus.  
J Immunol. 129: 1426-1429
- 44 Horn W (1988) Leukozytenfunktion und Insulin  
Med. Welt 39: 1515-1517
- 45 Hostetter MK (1990) Effects of Hyperglycemia on C3 and Candida albicans  
Diabetes Vol. 39: 271-275
- 46 Kapuscinski J, Darzynkiewicz Z (1983) Increased accessibility of bases in DNA upon Binding of Acridinorange  
Nucl Acids Res 11:7555-7568
- 47 Kirk RE (1982) Experimental design. 2nd ed.  
Monterey, Calif.: Brooks/Cole.

- 48 Kono T (1969) Destruction and restoration of insulin effector system of isolated fat cells  
J Biol Chem (244): 5777-5784
- 49 Kress H, Eberlein T (1992) Wirkung von Anästhesie und Operation auf wesentliche Immunfunktionen  
Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 27:
- 50 Larsen R (1995) Anästhesie  
Urban & Schwarzenberg
- 51 Leijh PCJ , van den Barselaar MT, van Zwet TL, Dubbeldeman-Rempt I, van Furth R (1979) Kinetics of phagocytosis of Staphylococcus aureus and Escherichia coli by human granulocytes  
Immunology 37: 453-465
- 52 Loewenson PM, Hostetter MK (1987) Functional implications of site-specific glycosylation of human C3 in hyperglycemia (Abstract)  
Clin Res. 35: 858 A
- 53 Madar Z; Teitelbaum A, Miller E et al (1984) Genetic differences insulin receptors in adipocytes of diabetic rats  
in: Shafrir E, Renold AE (eds) Lesson from Animal Diabetes  
London, Paris, John Libbey: 111-114
- 54 Marhoffer W, Stein M, Schleinkofer L, Federlin K (1992) Eingeschränkte Chemilumineszenzinduktion und Phagozytose polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten bei Diabetes mellitus  
Immun. Infekt 20: 91
- 55 Marhoffer W, Stein M, Schleinkofer L, Federlin K (1993) Evidence of ex vivo and in vitro impaired neutrophil oxidative burst and phagocytic capacity in type 1 diabetes mellitus  
Diabetes Res Clin Pract 19:183-188
- 56 Maxwell S, Delaney H (1990) Designing experiments and analyzing data  
Belmont, CA: Wadsworth: 438-449



- 57 Mering JV, Minkowski O (1890) Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation.  
Arch Exp Pathol Pharmacol 26: 371-374
- 58 Miller JS, Quauler JM (1990) Flow cytometric identifikation of Microorganisms  
by dualstaining with FITC and PI.  
Cytometry 11: 667-675
- 59 Miller ME, Baker L, Kaye R (19968) Leucocyte function in juvenile Diabetes  
mellitus (abstract)  
Diabetes 17: 335
- 60 Mowat AG, Baum J (1971) Chemotaxis of polymorphnuclear leucocytes from  
patients with diabetes mellitus  
N. Engl. J. Med. 284: 621-627
- 61 Nolan CM, Beaty HN, Bagdade JD (1978) Further characterization of the impaired  
bactericidal function of granulocytes in patients with poorly controlled diabetes  
Diabetes 1978 Sep; 27(9):889-94
- 62 Ohno Y, Aoki N, Nishimura A (1993) In-vitro production of IL1, IL6 and TNF-alpha  
in IDDM  
I Clin Endocrinol Metab 77(4): 1072-1077
- 63 Orth H (1964) Die antiken Diabetes-Syndrome und ihre Wortgeschichte  
Janus, Leiden 51: 193-201
- 64 Papadopoulo G, Petersen J, Andersen V, Lernmark A, Marnier B, Nerup J, Binder  
(1984) Spontaneous in vitro immunoglobulin secretion at the diagnosis of  
insulin-dependent diabetes
- 65 Perschel WT, Yildiz M, Federlin K (1994) Granulozytenfunktion im Vergleich  
zwischen Diabetes mellitus Typ I und Typ II  
Immun. Infekt 22: 222-226

- 66 Perschel WT, Langefeld TW, Yildiz M, Federlin K (1994) Beschreibung einer Methode zur Quantifizierung der granulozytären Phagozytose von *Staphylococcus aureus* K 807 mittels Flow-Zytometrie  
Med. Welt 45: 100-105
- 67 Perschel WT, Langefeld TW, Federlin K (1995) Infektanfälligkeit bei Diabetes-Einflüssen auf den Stoffwechsel  
Immun. Infekt 23: 196-200
- 68 Peterson PK, Schmeling D (1981) Bacterial Opsonization and Phagocytosis in: Douglas PS, Quie PG (Eds) Investigation of Phagocytes in disease; Edinburgh, Churchill Livingstone: 38-47
- 69 Plotkin BJ, Paulson D, Chelich A, Jurak D et al. (1996) Immunresponsiveness in a rat model for type II diabetes (Zucker rat, fa/fa): susceptibility to *Candida albicans* infection and leukocyte function  
J Med Microbiol (44):277-283
- 70 Quie PG, Mills EL (1981) Investigation of Phagocytes in Disease  
Edinburgh, Livingstone: 62-65
- 71 Rayfield EJ, Ault MJ, Keusch GT, Brothers MJ, Nechemias C, Smith H (1982) Infection and Diabetes. The case for glucose control.  
Am J Med. 72: 439-450
- 72 Roitt IV, Brostoff J, Male DK (1991) Kurzes Lehrbuch der Immunologie  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- 73 Sachs L (1992) Angewandte Statistik  
Springer-Verlag: 489ff, 612ff
- 74 Santiago JV (1986) Overview of the complications of diabetes  
Clin Chem 1986 Oct; 32 (10 Suppl): B 48-53
- 75 Schubert S, Heesemann J (1995) Infektionen beim Diabetes mellitus  
Immun. Infekt. 23: 200-205

- 76 Schuhmacher H (1961) Index zum Diabetes mellitus  
München-Berlin, Urban & Schwarzenberg
- 77 Silbernagel S, Despopoulos A [Hrsg.] (1990) Taschenatlas der Physiologie  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- 78 Sima AAF, O'Neill SJ, Naimark D, Yogihashi S, Klass D (1988) Bacterial  
Phagocytosis and Intracellular Killing by Alveolar Macrophages in BB-Rat  
Diabetes (37): 544-549
- 79 Slaughter MS, Olson MM, Lee JTjr., Ward HB (1993) A fifteen year wound  
surveillance study after coronary artery bypass  
Ann. Thorac. Surg. 56: 1063-1068
- 80 Solberg CO, Hellum KB (1972) Neutrophil granulocyte function in bacterial  
infections  
Lancet. 1972 Oct 7; 2(7780): 727-30
- 81 Steiner M, Reinhardt KM, Blann AD (1996) Soluble adhesion molecules in NIDDM:  
increased concentration, relation to glycometabolic control and possible  
pathophysiological significance (letter)  
Diabetologia 39 (7): 868-870
- 82 Triscari I, Stern JS, Johnson PR, Sullivan AC (1979) Carbohydrate metabolism  
in lean and obese Zucker rats  
Metabolism (28): 183-189
- 83 Urbanitz D, Schneider P, Meier M, Kamanabrook D, Fegeler W, Loo J van de (1986)  
Lysostaphin-based Assay of Human Granulocyte Functions: A Reevaluation  
Klin Wschr 64: 1029-1035
- 84 Veta E, Osaki T, Yoneda K, Yamamoto T (1993) Prevalence of diabetes mellitus in  
odontogenic infections and oral candidiasis: an analysis of neutrophil suppression  
J. Oral Pathol. Med. 22: 168-174

- 85 Vonesch H.J. (1987) HbA 1/HbA 1c-Bestimmung: Gegenwärtiger Stand und praktische Bedeutung.  
Schweiz. med. Wschr. 117 (2): 39-42
- 86 Weber R (1991) Medizinische Mikrobiologie  
Verlag der Ferber'schen Universitätsbuchhandlung Giessen
- 87 Wheat LJ (1980) Infection and Diabetes mellitus  
Diabetes care 3: 187-197
- 88 Wykretowicz A, Wierusz-Wysocka B, Wysocka J, Szczepanik A (1993) Impairment of the oxygen-dependent mikrobicidal mechanism of polymorphonuclear neutrophils in patients with type 2 diabetes is not associated with increased susceptibility to infection  
Diabetes Clin. Res. Pract. 19:195-201
- 89 Wilson RM, Galuin AM, Robins RA, Reeves WG (1985) A Flow cytometric method of the measurement of phagocytosis of candida by poly nuclear leucocytes  
J. Immunol. Methods 76: 247-253

## 10. Danksagung

---

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Federlin für die Überlassung dieses Themas und die Bereitstellung der Laboratorien. Er ermöglichte mir durch seine Förderung und freundliche Unterstützung die Verwirklichung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. med. W. Th. Perschel danke ich für die freundschaftliche Betreuung. Als hilfsbereiter und stets diskussionsfreudiger Ansprechpartner hat er zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenfalls danken möchte ich allen Mitarbeitern des Immunologischen Labors der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen, die mich in vielfältiger Weise unterstützt und für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben.

Dem Hochschulrechenzentrum gilt mein Dank für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der vorliegenden Arbeit.

## 11. Curriculum vitae

---

<b>Name:</b>	Tanja Wiebke Langefeld
geboren am:	27.03.1968
in:	Wattenscheid jetzt Bochum
Familienstand:	ledig
Vater:	Helmut Langefeld Dipl.-Organisator
Mutter:	Raina Langefeld Krankenschwester
<b>Schulbildung:</b>	
1974 - 1978	Grundschule in Wattenscheid
1978 - 1987	Gymnasium in Bochum
06.1987	Allgemeine Hochschulreife
<b>Beruflicher Werdegang:</b>	
1987 - 1989	Schule für Medizinisch-Technische Assistenten des Hygiene-Institutes in Gelsenkirchen mit erfolgreichem Abschluß
01.1990 - 03.1990	Tätigkeit als Medizinisch-Technische Assistentin im Notfall- und Bereitschaftslabor der Universitätsklinik Essen
<b>Hochschulstudium:</b>	
04.1990	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen
09.1992	Ärztliche Vorprüfung
01.03.1993 - 31.03.1993	Famulatur am Albertinen-Diakoniewerk e.V., Hamburg, in dem Gebiet der Inneren Medizin unter der Leitung von Herrn Dr. med. H. Piesbergen
08.1993	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

01.09.1993 - 30.09.1993	Famulatur in der Praxisgemeinschaft von Frau Dr. med. M. Palleske und Herrn Dr. med. T. Spormann, Hamburg, in dem Gebiet der Inneren Medizin
21.02.1994 - 21.03.1994	Famulatur am Hafenkrankenhaus, Hamburg, in dem Gebiet der Chirurgie unter der Leitung von Herrn Dr. med. Seidel
01.08.94 - 01.09.94	Famulatur am Hospital for Tropical Diseases, London
20.03.1995 - 31.03.1995	Famulatur am Gesundheits- und Bezirksamt Hamburg-Nord, unter der Leitung von Frau Dr. med. Heidbüchel-Braatz
04.1996	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.1996 - 08.1996	PJ in der Abteilung für Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin am Klinikum der Justus-Liebig-Universität, Giessen, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. G. Hempelmann
08.1996 - 12.1996	PJ in der Abteilung für Innere Medizin am Klinikum der Justus-Liebig-Universität, Giessen, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. H. Tillmanns
12.1996 - 04.1997	PJ in dem Departement Chirurgie am Kantonsspital Winterthur, Schweiz, unter der Leitung von Herrn PD Dr. med. M. Decurtins
05.1997	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06.1997 - 11.1998	Ärztin im Praktikum in der Abteilung Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin am Klinikum der Justus-Liebig-Universität, Giessen, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. G. Hempelmann
seit 12.1998	Assistenzärztin in der Abteilung Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin am Klinikum der Justus-Liebig-Universität, Giessen, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. G. Hempelmann