

**Einfluss der ACE-Inhibitoren Quinaprilat und Enalaprilat auf
die Funktion neutrophiler Granulozyten und Monozyten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Humanmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von **Christian Reyher** aus Pforzheim

Gießen 2008

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie
Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. M. A. Weigand

Gutachter:
Prof. Dr. med. I. D. Welters

Gutachter:
PD Dr. med. H. Lehmann

Tag der Disputation:
17.02.2010

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

1	EINLEITUNG	1
1.1	Darstellung der Thematik	1
1.1.1	Granulozyten und Monozyten	1
1.1.2	ACE-Hemmer	7
1.1.3	Durchflusszytometrisches Verfahren	10
1.2	Zielsetzung der Studie	11
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Probenmaterial	12
2.1.1	Probanden	12
2.1.2	Ausschlusskriterien	12
2.1.3	Probengewinnung und Aufarbeitung	13
2.1.4	Isolierung von Granulozyten aus dem Vollblut	13
2.1.5	Vitalitätsprüfung	13
2.1.6	Inkubation mit ACE-Inhibitoren	14
2.2	Bestimmung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-κB	14
2.2.1	Testprinzip	14
2.2.2	Durchführung	15
2.3	Bestimmung des Komplementrezeptors CD11b und des LPS-Rezeptors CD14	16
2.3.1	Testprinzip	16
2.3.2	Rezeptormarkierung	16
2.4	Der Phagozytose-Test	17
2.4.1	Testprinzip	17
2.4.2	Bakterien	17
2.4.3	Fluoreszenzmarkierung der Bakterien	18
2.4.4	Durchführung	18
2.5	Der Oxidative-Burst-Test	19
2.5.1	Testprinzip	19
2.5.2	Durchführung	20
2.6	Bestimmung der Interleukin-8-Konzentration mittels ELISA	21
2.6.1	Testprinzip	21
2.6.2	Durchführung	21
2.7	Die Durchflusszytometrie	22
2.7.1	Optisches System	22
2.7.2	Flüssigkeitssystem	24
2.7.3	Signalverarbeitung	25
2.8	Darstellung der Ergebnisse	25
2.9	Statistische Auswertung	29

3	ERGEBNISSE	30
3.1	Auswirkung der ACE-Hemmer auf PMN	30
3.1.1	CR3 (CD11b/CD18)-Expression	30
3.1.2	Intranukleäre AP-1-Konzentration	32
3.1.3	Intranukleäre NF- κ B-Konzentration	33
3.1.4	Interleukin-8-Konzentration	35
3.1.5	Phagozytoseaktivität	36
3.1.6	Oxidativer Burst	38
3.2	Auswirkung der ACE-Hemmer auf Monozyten	39
3.2.1	CR3 (CD11b/CD18)-Expression	39
3.2.2	CD14-Expression	40
3.2.3	Intranukleäre AP-1-Konzentration	42
3.2.4	Intranukleäre NF- κ B-Konzentration	43
4	DISKUSSION	45
4.1	Diskussion der Methodik	45
4.1.1	Probenaufarbeitung für durchflusszytometrische Messungen	45
4.1.2	Durchflusszytometrie	49
4.1.3	Durchflusszytometrische Bestimmung von Transkriptionsfaktoren	50
4.1.4	ELISA	52
4.2	Diskussion der Ergebnisse	53
4.2.1	ACE-Hemmer-induzierte Veränderungen des Komplementrezeptors CR3 (CD11b/CD18) und des LPS-Rezeptors CD14	54
4.2.2	ACE-Hemmer-induzierte Veränderung der Phagozytose und des oxidativen Burst	58
4.2.3	ACE-Hemmer-induzierte Veränderungen der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1	60
4.2.4	ACE-Hemmer-induzierte Veränderungen der Interleukin-8-Synthese	63
4.2.5	Mögliche klinische Relevanz und Ausblick	65
5	ZUSAMMENFASSUNG	70
6	SUMMARY	71
7	LITERATURVERZEICHNIS	72
8	ANHANG	93
8.1	Abbildungsverzeichnis	93
8.2	Abkürzungen	95
8.3	Verwendete Materialien und Reagenzien	99
9	SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG	100
10	DANKSAGUNG	101
11	LEBENS LAUF	102
12	VERÖFFENTLICHUNG DER STUDIENERGEBNISSE	103

1 Einleitung

1.1 Darstellung der Thematik

1.1.1 Granulozyten und Monozyten

Alle zellulären Bestandteile des Blutes leiten sich von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Durch Teilung entstehen daraus zwei spezialisierte Typen von Vorläuferzellen: Zum einen lymphatische Zellen, die sich zu B- und T-Lymphozyten differenzieren, und zum anderen myeloide Zellen, aus denen Leukozyten, Erythrozyten und die Vorläuferzellen der Thrombozyten hervorgehen. Bei den Leukozyten wird auf Grund ihrer typischen Morphologie zwischen Monozyten und Granulozyten unterschieden. Aus den Monozyten entwickeln sich die gewebständigen Makrophagen, denen eine wichtige Aufgabe in der lokalen Immunität zukommt [113]. Die Granulozyten enthalten deutlich anfärbbare Granula im Zytoplasma und werden wegen ihres unregelmäßig geformten Zellkerns auch als polymorphkernig bezeichnet. Es gibt drei Arten von Granulozyten: Eosinophile Granulozyten, deren Aufgabe vornehmlich in der Abwehr parasitärer Infektionen liegt, basophile Granulozyten, die zum Schutz der Schleimhäute beitragen und neutrophile Granulozyten [113]. Die neutrophilen Granulozyten stellen mit einem relativen Anteil von ca. 60% die umfangreichste und zugleich wichtigste zelluläre Komponente der angeborenen unspezifischen Immunität dar [65]. Das Knochenmark produziert täglich etwa $5 \cdot 10^{10}$ neutrophile Granulozyten, was einer absoluten Konzentration von $3 \cdot 5 \times 10^6$ Zellen/ml Blut entspricht. Ihre Verweildauer variiert von ca. 8 h im Blut bis zu einigen Tagen im Gewebe.

Die Phagozyten stellen auf Grund ihrer Fähigkeit, mikrobielle Krankheitserreger aufzunehmen und zu vernichten, eine wesentliche Komponente der primären, unspezifischen Immunreaktion des menschlichen Körpers dar [67;152]. Der Prozess der Phagozytose wird auf verschiedenen Stufen reguliert [152]. Am Anfang steht die Opsonisierung, also die Klassifizierung des eingedrungenen Mikroorganismus als Pathogen. Mit Hilfe sogenannter Opsonine wie Komplementrezeptoren, Antikörper,

Akut-Phase-Proteine und Fibronectin werden die eingedrungenen Bakterien als fremd erkannt, aufgenommen und in den sogenannten Phagosomen gespeichert [65]. Durch Verschmelzung intrazellulärer Granula und der Freisetzung der darin enthaltenen bakteriziden und proteolytischen Substanzen entsteht das Phagolysosom [65]. Die nachfolgend gesteigerte Stoffwechsellleistung geht mit einer erhöhten Produktion reaktiver, zytotoxischer Sauerstoffmetabolite, vor allem Superoxidanionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), sowie freier Radikale (OH) einher. Dies wird auf Grund der damit verbundenen massiven Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs [78] als „Oxidativer Burst“ bezeichnet [149;199].

Bei der Aktivierung neutrophiler Granulozyten werden aus intrazellulären Pools präformierte Komplementrezeptoren (CR) ausgeschüttet und auf der Oberfläche präsentiert [177]. Einer der wichtigsten Oberflächenrezeptoren ist dabei der CR3 (CD11b/CD18)-Rezeptor [18;99;124;150]. Dieser Rezeptor erleichtert nicht nur die Adhäsion von Phagozyten an Endothelien mit nachfolgender Migration ins Gewebe sondern besitzt auch eine Brückenfunktion zwischen extrazellulären Vorgängen und intrazellulären Aktivierungsprozessen. Seine Expression ist bei Zellaktivierung signifikant erhöht [146]. Einen weiteren wichtigen Oberflächenrezeptor stellt der CR1 (CD35)-Rezeptor dar. Beide Rezeptoren erkennen Spaltprodukte des aktiven Komplementsystems. Dabei können die Komplementproteine in löslicher Form vorliegen (C3a, C5a) und die Chemotaxis stimulieren, oder als Opsonine zur Förderung von Adhäsion und Phagozytose dienen (C3b, iC3b). Die Bindung von nur wenigen iC3b-opsonisierten Partikeln, die beim autokatalytischem Zerfall von C3b entstehen, an CR3 (CD11b/CD18), führt zu einer signifikanten Steigerung der Phagozytose und des oxidativen Burst. C3b stellt den wesentlichen Liganden für den CR1 (CD35)-Rezeptor dar [59;199]. Weitere, zur Gruppe der CD11b/CD18-Adhäsionsmoleküle zählenden Rezeptoren, sind der LFA-1 (CD11a/CD18)-Rezeptor, der an der Vermittlung der Adhäsion zytotoxischer T-Zellen und Chemotaxis neutrophiler Granulozyten beteiligt ist, und der p150,95 (CD11c/CD18)-Rezeptor, der die Bindung von Granulozyten und Makrophagen ans Endothel unterstützt [64].

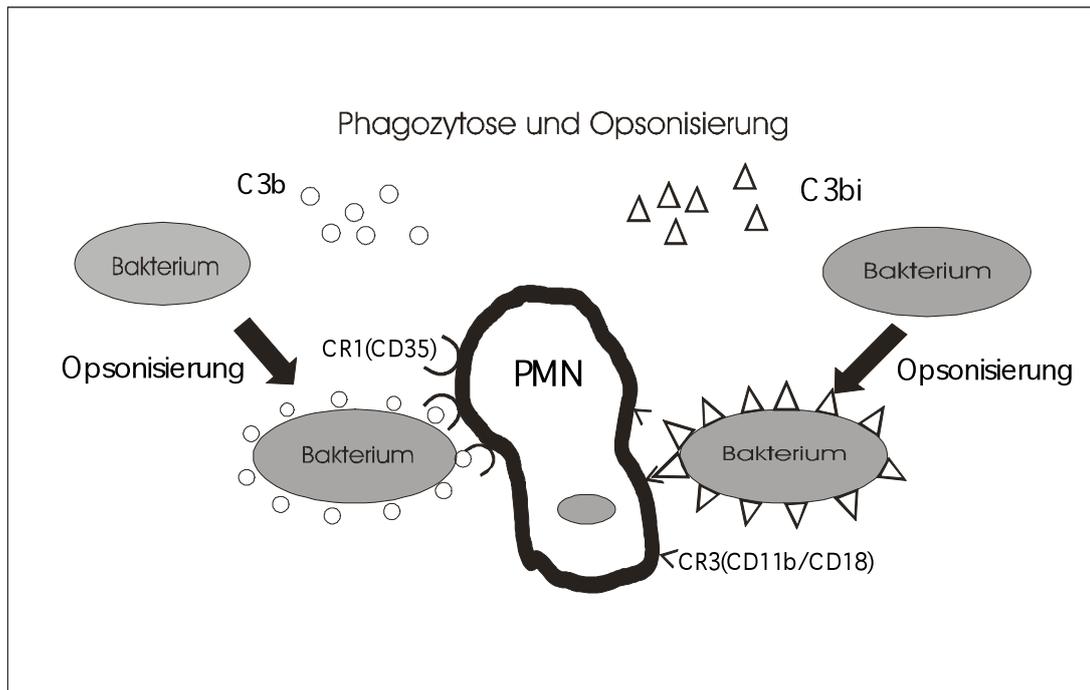


Abbildung 1: Die Komplementrezeptoren CR1 (CD35) und CR3 (CD11b/CD18) vermitteln die Erkennung opsonierter Partikel durch Phagozyten. Modifiziert nach [252].

Einen weiteren potenten Faktor bei der Opsonisierung stellt die Antikörperinteraktion mit den Immunglobulinrezeptoren neutrophiler Granulozyten dar [90;158;200;257]. Von den drei exprimierten Fragmentcrystalline γ -Rezeptoren ($Fc\gamma$) ist der $Fc\gamma$ -RIII (CD16)-Rezeptor mit einer Größenordnung von $1-2 \times 10^5$ Rezeptoren/Zelle der häufigste und wichtigste [66]. Gemeinsam mit CD14 induziert er in einer kalziumabhängigen Signaltransduktion die Phagozytose und die Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite [67]. CD14 ist ein wichtiger Rezeptor bei der Interaktion mit Lipopolysaccharid (LPS), einem Membranbestandteil gramnegativer Bakterien [53]. Durch Kopplung mit LPS-bindendem Protein (LBP) [143;268] induziert CD14 die Bildung proinflammatorischer Metabolite [178], erhöht die Produktion von Oberflächenrezeptoren [25] und ist involviert in die Aktivierung von Phagozytose [26] und oxidativem Burst [5]. Synergistisch mit CD14 und LBP erfolgt die intrazelluläre Signalaktivierung via Toll-like-Rezeptoren (TLR). Diese Strukturen des angeborenen Immunsystems gehören zur Gruppe der Pathogen-Recognition-Receptors (PRR) und dienen der Erkennung von PAMP's (Pattern-associated-molecular-Pattern) [236]. Das sind Strukturen, welche ausschließlich auf oder in Krankheitserregern vorkommen. Dies ermöglicht der angeborenen Immunität eine Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremd [236]. Die Erkennung von LPS erfolgt dabei über den TLR4 [190]. LPS gilt als die auslösende Substanz im gramnegativen

systemischen Krankheitsgeschehen und wird als geeigneter Stimulus zur Simulation septischer Verläufe in Vollblut in-vitro Modellen angesehen [154].

Die Freisetzung der Oberflächenrezeptoren aus präformierten, intrazellulären Pools sowie das Abwerfen der Rezeptoren beim sogenannten „Shedding“ [69;97] sind schnelle, unmittelbare Reaktionen auf proinflammatorische Stimuli und ereignen sich innerhalb der ersten 15 min nach Zellaktivierung. Eine weitere wichtige, jedoch länger dauernde Regulation der Rezeptorpräsenz ist deren de-novo Synthese auf transkriptionaler Ebene. Dabei wird durch entsprechende Stimuli der Transkriptionsfaktor Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) aktiviert, der nicht nur die Expression von Oberflächenrezeptoren steigert [263] sondern auch die Transkription zahlreicher Entzündungsmediatoren wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interferon- β (IFN- β), Interleukin- (IL) 8, IL-1 β , IL-2 und IL-6 induziert [47]. Der aus den Untereinheiten p50 (NF- κ B1) und p65 (Rel A) bestehende NF- κ B-Komplex kommt frei im Zytosol vor, wird jedoch durch das inhibierende Protein I κ B α in inaktivem Zustand gehalten [114]. Bei entsprechendem Stimulus wird nach Phosphorylierung I κ B α proteolytisch abgespalten und NF- κ B ins Zytosol freigegeben [32]. Daraufhin wandert I κ B α direkt in den Zellkern und induziert die Transkription der entsprechenden Gene durch Anlagerung an deren Promoterregion [24]. Wichtige Einflussgrößen auf die Aktivität von NF- κ B sind Kalzium (Ca²⁺) [182;183;222], Stickstoffmonoxid (NO) [266] und die second messenger H₂O₂ und O₂- [182].

Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor ist das Activator Protein 1 (AP-1), ein aus Proteinprodukten der Protoonkogene c-jun und c-fos gebildeter Komplex. Er reguliert und potenziert synergistisch mit NF- κ B die Transkription der Entzündungsmediatoren IL-8, IL-1 β , IL-6 und der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) [43;55;169;227]. AP-1 Consensus-Sequenzen wurden in den Promoterregionen von IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, tissue factor und IL-8 nachgewiesen [10;55;112;164;169].

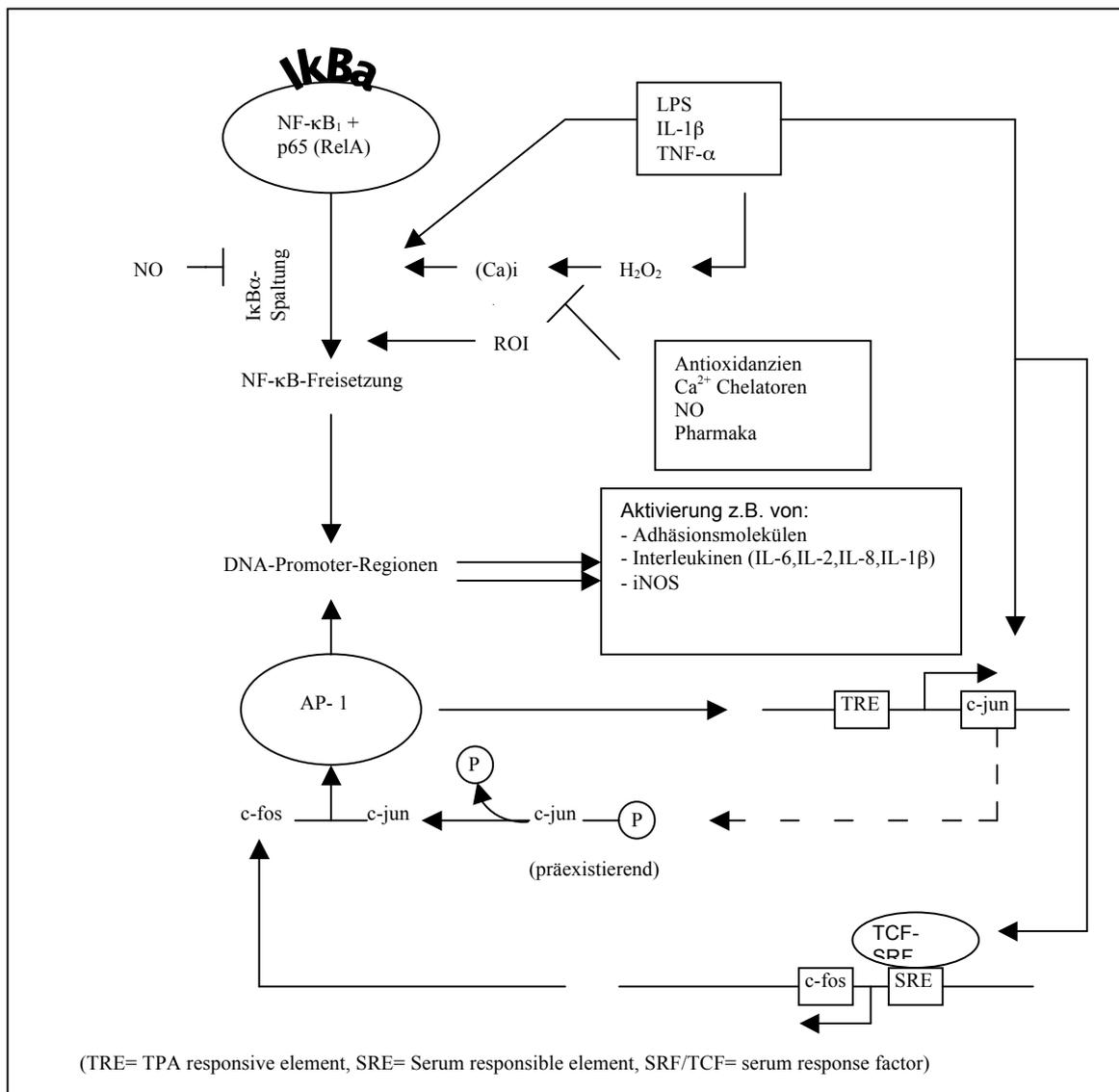


Abbildung 2: Darstellung der NF-κB- und AP-1-Aktivierung. Nach Spaltung des NFκB-Inhibitors IκBα wird NF-κB freigesetzt und induziert die Transkription von proinflammatorischen Mediatoren. Potenziert wird die Transkription dieser Zytokine durch AP-1-Komplexe, bestehend aus den Protoonkogenen c-jun und c-fos, die entweder als c-jun Homodimer oder als c-jun/c-fos Heterodimer vorliegen. Die Aktivierung der de-novo Synthese ist Folge der Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (ROI) und einem intrazellulären Kalziumanstieg. Stickstoffmonoxid, Antioxidanzien und Kalziumchelatoren hemmen die NF-κB- bzw. AP-1-Aktivierung. Modifiziert nach [163] und [253].

Interleukin-8 ist durch seine Funktion bei der Demargination, Aktivierung und Chemotaxis neutrophiler Granulozyten ein spezifischer und potenter Entzündungsmediator [104]. Seine de-novo Synthese wird durch AP-1 und NF-κB induziert [134;166;169;244]. Die Sequestrierung von Granulozyten ins Gewebe läuft im Wesentlichen in vier Stufen ab [63]. Die zunächst schwache Bindung der neutrophilen Granulozyten am Gefäßendothel wird über oberflächlich präsentierte Selektine (CD62) [34;117;226] und ihre korrespondierenden Kohlenhydratliganden vermittelt und erzeugt das sogenannte „rolling“,

also das Rollen der Granulozyten an den Gefäßendothelzellen [81;144]. Im zweiten Schritt verfestigt die Interaktion von CR3 (CD11b/CD18) und LFA-1 (CD11a/CD18) mit bestimmten Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (intracellular-cell-adhesion-molecule) und ICAM-2 diese Bindung und beendet das Rolling [60;61;126]. Via Interleukin-8-induzierter Konformationsänderung steigert sich die Adhäsionskapazität der Granulozyten erneut und führt zu deren Festhaften an der Endothelwand [195;278]. Im Folgenden durchwandern die Phagozyten die Gefäßwand (Diapedese), indem sie sich zwischen die Endothelzellen drängen und die Basalmembran zerstören [173]. Letztlich folgt die zielgerichtete Wanderung via Chemotaxis entlang eines Konzentrationsgradienten zum Entzündungsgeschehen. Als Chemoattraktoren dienen Stoffe wie IL-8, C5a, Fibrin, Peptid B, Thrombin und LTB [62;109;226]. Gleichzeitig ist IL-8 das wichtigste Chemokin, das von Granulozyten selbst gebildet wird und so im Sinne eines positiven autokrinen Regulationsmechanismus die Granulozytenaktivierung aufrechterhalten und verstärken kann [6].

Das Krankheitsbild der Sepsis umfasst die Bildung und Aktivierung von Mediatoren mit anschließender Zellfunktionsstörung als Reaktion auf eine Invasion pathogener Keime und toxischer Keimprodukte [1]. Das Auftreten entsprechender Symptome ohne spezifischen Erregernachweis bezeichnet man als SIRS (Systemic-inflammatory-response-syndrome) [33]. Eine schwere Sepsis wird definiert durch den Nachweis einer Organdysfunktion, Zeichen der generalisierten Minderdurchblutung oder Kreislaufinsuffizienz. Wird trotz adäquater Volumensubstitution keine Kreislaufstabilisierung erreicht spricht man von septischem Schock. Klinisch führt dabei eine Zunahme der Gefäßpermeabilität mit gleichzeitigem Tonusverlust der Arteriolen zu einer Verschiebung von Flüssigkeit ins Interstitium (capillary leak). Zunehmende Vasoplegie mit Abnahme des Perfusionsdrucks, sowie gleichzeitige gerinnungsinduzierte Mikrozirkulationsstörung, führt zu inadäquater Gewebeoxygenierung. Diffuse Zellschädigung und Organminderfunktion sind die Folge [1].

In verschiedenen Untersuchungen konnte der Einfluss der angeborenen unspezifischen Immunität in der Pathogenese von Sepsis und SIRS dargestellt werden [33;74;96]. Die Toxizität von zirkulierendem Endotoxin wird über Komplexierung mit LBP und Bindung an CD14 um ein Vielfaches erhöht [12]. Die Aktivierung von Komplement mit konsekutiv gesteigerter Phagozytose und Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite stellt einen wichtigen terminalen Schritt bei der Aktivierung von Mediatoren in der Sepsis und im septischen Schock dar [91;148]. Auch bei zytotoxischen Reaktionen wie z.B.

Ischämie/Reperfusionvorgängen unter extrakorporaler Zirkulation kommt den genannten Faktoren wichtige Bedeutung zu [50;111;159;176;185;247]. Vor allem die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 und die daraus folgende vermehrte Bildung von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Immunproteinen nehmen dabei eine zentrale Position ein [86;162]. Einer Modulation dieser überschießenden Immunaktivität wird große Bedeutung zugemessen und ist Gegenstand aktueller Forschung [24;135;137;270;271].

1.1.2 ACE-Hemmer

Neben dem katecholaminergen System ist das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem (RAAS) das wohl bedeutendste hormonelle System der Blutdruckregulation [85]. In den juxtaglomerulären Zellen des Vas afferens der Glomeruli wird zunächst Renin, eine selbst vasoinactive Protease, gebildet. Renin spaltet aus Angiotensinogen das ebenfalls nicht wesentlich vasoaktive Dekapeptid Angiotensin I ab. Daraus wird, durch das vor allem im Gefäßendothel enthaltene Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), der potente Vasokonstriktor Angiotensin II abgespalten. Durch eine Aminopetidase wird Angiotensin II in Angiotensin III umgewandelt. Angiotensin III wirkt zwar schwächer vasokonstriktorisch, stimuliert aber etwa gleich stark synergistisch mit Angiotensin II die Aldosteronsekretion in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde [202]. Die Wirkung von Angiotensin II wird vornehmlich über den G-Protein gekoppelten AT₁-Rezeptor vermittelt, der zu einer Aktivierung der Phospholipase C führt [202]. Das aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat gebildete Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) erhöht die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration in glatten Muskelzellen. Gleichzeitig wird über 1,2-Diacylglycerol (DAC) die Proteinkinase C aktiviert, die über eine Protoonkogenstimulation vermutlich zur Proliferation glatter Muskelzellen führt. Weitere Signaltransduktionswege von Angiotensin II sind die Hemmung der Adenylatzyklase und die Stimulation der Phospholipase A₂ [85]. ACE-Inhibitoren sind sehr effektive Antihypertensiva und haben heute einen festen Platz in der Behandlung von Hypertonie und myokardialer Insuffizienz [54;274]. Sie vermitteln ihre Wirkung, indem sie als Analoga der C-terminalen Peptidkette des Angiotensin I entweder mittels einer Sulfhydrylgruppe an das Zink oder mittels Carboxylgruppe direkt im aktiven Zentrum des ACE ansetzen und dieses hemmen [202]. Die daraus resultierende verminderte Bildung

von Angiotensin II führt zur Vasodilatation und gemeinsam mit der geringeren Aldosteronsekretion zur Blutdrucksenkung. ACE als Dipeptidylcarboxypeptidase ist jedoch nicht spezifisch für Angiotensin I. Es ist vielmehr identisch mit der Kinase II und spaltet auch Kallidin, Substanz P und das Nonapeptid Bradykinin [202]. ACE-Inhibitoren bewirken somit einen vermehrten Anstieg dieser Substanzen. Dadurch wird deren Wirkung auf endogene Vasodilatoren wie NO und Prostazyklin (PGI₂) bzw. Prostaglandin (PGE₂) vermehrt und die antihypertensive Wirkung potenziert [85]. Die im Blut enthaltene Kinase I ist zusätzlich verantwortlich für die Inaktivierung der Komplementkomponenten C3a, C4a, C5a, d.h. der sogenannten Anaphylatoxine.

Die modulativen Effekte auf das Kallikrein-Kinin-System werden als Ursache für zumindest zwei unerwünschte Nebenwirkungen der ACE-Hemmer diskutiert: Das angioneurotische Ödem und den trockenen Reizhusten [2;22]. Die Anhäufung des Bradykinins führt vermutlich zu einer Reizung afferenter sensorischer C-Fasern in der Bronchialschleimhaut, wodurch der Hustenreiz ausgelöst wird. Das angioneurotische Ödem ist wahrscheinlich auf die histaminähnliche, gefäßpermeabilitätsteigernde Wirkung des Bradykinins zurückzuführen [93].

Seit geraumer Zeit wird neben den hämodynamischen Effekten eine immunmodulatorische Potenz durch ACE-Inhibition diskutiert. Angiotensin II führte in verschiedenen Untersuchungen zu erhöhter Komplement- und LPS-Rezeptorexpression auf immunkompetenten Zellen [229;230], zu gesteigerter Transkriptionsaktivität [212] sowie zu vermehrter Syntheseleistung funktioneller Stoffwechselfparameter wie Phagozytose und oxidativem Burst [250;251;264]. Die Ergebnisse bezüglich der Suppressibilität der entsprechenden Faktoren sind jedoch uneinheitlich [48;86;157;215]. Verschiedene Induktionswege werden dabei diskutiert [102;225;265]: Zum einen eine direkte Vermittlung via AT₁-/AT₂-Rezeptoren [8;231], zum anderen eine gesteigerte intrazelluläre NO-Konzentration durch Bradykinin. Für den Komplementrezeptor CR3 (CD11b/CD18) konnte dieser Zusammenhang mittels NO-Antagonisten bereits nachgewiesen werden [135]. Auch auf transkriptioneller Ebene scheint dieser Mechanismus für NF-κB und AP-1 zumindest teilweise wahrscheinlich [163;253]. Auf Grund widersprüchlicher Ergebnisse bezüglich der rezeptorvermittelten Induktion und der Unkenntnis der genauen Anzahl und Funktion von AT-Rezeptoren konnten die genauen intrazellulären Signaltransduktionswege bisher nicht hinreichend geklärt werden [225;265].

Aus einer immunmodulierenden Wirkung von ACE-Hemmern könnten sich jedoch zahlreiche neue klinische Optionen ergeben. So weisen neuere Untersuchungen darauf hin,

dass die Applikation von ACE-Hemmern bei herzchirurgischen Eingriffen die Inzidenz perioperativer Komplikationen reduzieren kann [137;170]. Während extrakorporaler Zirkulation (EKZ) führen der unphysiologische Blutfluss, der Kontakt mit Fremdoberflächen und die Ischämie/Reperfusion über eine Imbalance von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen zur systemischen Inflammation [276]. Diese Imbalance korreliert mit erhöhter Morbidität bei kardiochirurgischen Eingriffen unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine (HLM) [111]. Sowohl das zirkulierende als auch das lokale Renin-Angiotensin-System sind dabei aktiviert [29;137]. Die Applikation von ACE-Inhibitoren führte in verschiedenen Studien nicht nur zu einer gesteigerten hämodynamischen Stabilität nach EKZ [29;137] sondern im Tiermodell auch zur Reduktion immunologischer Parameter nach myokardialer Ischämie [50]. Vor allem Patienten mit entsprechenden Risikofaktoren könnten von einer ACE-Hemmer-induzierten Immunmodulation profitieren [41;77;108;264;274]. Seit geraumer Zeit werden verschiedene Komorbiditäten wie Atherosklerose [201;209], Nephropathien [4;35;127;128;167;212;214;234;265] oder Diabetes mellitus [123;214] mit inflammatorischen Vorgängen in Verbindung gebracht. Auch die Verbesserung funktioneller Parameter bei kritisch Kranken, z.B. mit septischen Krankheitsbildern, zeigt einen möglichen Nutzen von ACE-Hemmern als supportive Therapie [27;92;260]. So konnte gezeigt werden, dass die kontinuierliche ACE-Hemmermedikation bei 45 Intensivpatienten zu einer Verbesserung makrozirkulatorischer Parameter wie dem pulmonalkapillären Verschlussdruck (PCWP), dem pulmonalarteriellen Druck (PAP) und der rechtsventrikulären Ejektionsfraktion (RVEF) führte. Auch funktionelle Stoffwechselfparameter der Mikrozirkulation wie Sauerstoffangebot (DO_2), Sauerstoffaufnahme (VO_2), Sauerstoffextraktionsrate (O_{2ER}) und Blutlaktatkonzentration wurden positiv beeinflusst [27]. Auf zellulärer Ebene verbesserten sich Parameter der Endothelfunktion und reduzierte sich die Plasmakonzentration von Adhäsinen [28]. In der nachfolgenden Studie soll der Einfluss der ACE-Hemmer Quinaprilat und Enalaprilat auf die verschiedenen Ebenen der zellulären Immunität geklärt werden. Dabei soll via Vollblut-Assay die mögliche Modifizierbarkeit einer induzierten Endotoxinämie in-vitro untersucht werden. Bisher konnte dies an humanen Immunzellen auf den verschiedenen Ebenen zellulärer Immunität nicht einheitlich dargestellt werden. Die Stimulation von Vollblut mit LPS ist als ex-vivo Modell zur Simulation septischer Krankheitsbilder etabliert und ermöglicht die Beurteilung der zellulären Antwort auf proinflammatorische Stimuli [19;140;154;262]. Da die intrazellulären Signalkaskaden, die durch ACE-Hemmer

beeinflusst werden, nicht hinreichend geklärt sind, soll die hier durchgeführte Untersuchung am Beispiel neutrophiler Granulozyten und Monozyten den Einfluss der ACE-Hemmung auf Rezeptor-Turnover und transkriptionelle Regulation darstellen. Die Erarbeitung einer Therapieoption für septische oder ischämisch-hypoxische Krankheitsbilder stellt dabei ein Fernziel dar.

1.1.3 Durchflusszytometrisches Verfahren

In der klassischen Zellanalytik wurden funktionelle und morphologische Fragestellungen zu Vorgängen im Immunsystem überwiegend mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie beantwortet. Wegen ihres begrenzten Anwendungsbereichs, der limitierten Aussagekraft und des hohen Zeitaufwands wurde sie jedoch von der Durchflusszytometrie als Routineverfahren abgelöst. Insbesondere die Option, mit Hilfe der Durchflusszytometrie große Zellzahlen in kurzer Zeit messen zu können, stellt einen wesentlichen Vorteil des Verfahrens dar. Durch das Prinzip der „hydrodynamischen Fokussierung“ und der simultanen Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften einzelner Zellen, wurde es möglich, die Qualität funktioneller Aussagen zu erhöhen.

1.2 Zielsetzung der Studie

In der vorliegenden Studie sollte der Einfluss von ACE-Hemmern auf die LPS-induzierte granulozytäre und monozytäre Entzündungsreaktion untersucht werden. Dabei sollten anhand einer durchflusszytometrischen Vollblutmethode an einem gesunden Probandenkollektiv folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Welchen Einfluss besitzen die ACE-Inhibitoren Quinaprilat und Enalaprilat in-vitro auf die transkriptionelle Regulation, insbesondere auf die LPS-induzierte Aktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B, in neutrophilen Granulozyten und Monozyten?
2. Welchen Einfluss haben die genannten Substanzen auf die LPS-induzierte Expression des Komplementrezeptors CR3 (CD11b/CD18) und des LPS-Rezeptors CD14 auf Granulozyten und Monozyten?
3. Wie beeinflussen die Substanzen die Phagozytose und den oxidativen Burst dieser Zellen nach Stimulation?
4. Verändern die genannten ACE-Inhibitoren die spontane und LPS-induzierte Produktion von Interleukin-8 im Vollblut?

2 Material und Methoden

Die Experimente wurden mittels einer Vollblutmethodik an Granulozyten und Monozyten durchgeführt. Nur die Vitalitätsbestimmung der Granulozyten erfolgte an isolierten Zellen. Durchflusszytometrisch wurden Phagozytoseaktivität, oxidativer Burst, die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B sowie die Expression der Oberflächenrezeptoren CD11b und CD14 bestimmt. Die Bestimmung der Interleukin-8-Konzentration im LPS-stimulierten Vollblut wurde mittels ELISA durchgeführt.

2.1 *Probenmaterial*

2.1.1 Probanden

Die Studie wurde durch die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin genehmigt (Nr.:94/04). Untersucht wurde Blut gesunder Männer im Alter zwischen 20 und 40 Jahren. Die Probanden wurden über Inhalt, Vorgehensweise und Untersuchungsziel der Studie aufgeklärt und nach schriftlicher Einverständniserklärung in die Studie aufgenommen.

2.1.2 Ausschlusskriterien

Als Ausschlusskriterien für die Studie galten:

- Rauchen
- Allergien
- Akute und chronische Infektionen
- Immunsuppressive Therapie

2.1.3 Probengewinnung und Aufarbeitung

Die Probenentnahme war bei allen Probanden identisch. Sie erfolgte einmalig morgens zwischen 8 und 11 Uhr. Mittels einer Butterflykanüle wurde aus einer peripheren Vene der Ellenbeuge 10 ml mit EDTA antikoaguliertes Blut entnommen sowie 10 ml Blut, bei dem Lithium-Heparinat als Antikoagulanzen verwendet wurde. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Proben sorgfältig durchgemischt und sofort aufgearbeitet.

2.1.4 Isolierung von Granulozyten aus dem Vollblut

Zur Isolierung der Granulozyten aus dem Vollblut wurden 4 ml EDTA antikoaguliertes Blut auf einen 55%igen bzw. 70%igen Percoll Gradienten aufgelegt und zentrifugiert (4°C, 300 x g, 10 min, ungebremst). Dies führte zur Absetzung der Granulozyten in einer entsprechenden Bande, während die Erythrozyten sich am Reagenzglasboden pelletiert ablagerten. Die Granulozyten wurden mit einer Spritze aus ihrer Phase entnommen, in 7 ml PBS-Puffer diluiert und zentrifugiert (4°C, 300 x g, 10 min, ungebremst). Danach wurden die restlichen Erythrozyten mittels 4 ml Aqua dest lysiert. Dieser Vorgang wurde nach 40 Sekunden durch die Zugabe von 2 ml NaCl 2,7% abgestoppt und die Proben erneut zentrifugiert (4°C, 300 x g, 10 min, ungebremst). Nach Dekantieren des Überstandes konnten die Granulozyten in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt werden und mittels PBS-Puffer zu einer Lösung mit 10^6 Granulozyten/ml verdünnt werden. Anschließend wurden die Zellen mit Trypanblau-Lösung angefärbt und erneut ausgezählt, um das Verhältnis von vitalen zu nekrotischen Zellen zu ermitteln.

2.1.5 Vitalitätsprüfung

Um auszuschließen, dass eine ACE-Hemmer-induzierte Nekrose der Granulozyten die Ursache für deren Immunmodulation ist, wurde nach Inkubation (Kapitel 2.1.6) und Isolierung (Kapitel 2.1.4) eine Vitalitätsprüfung durchgeführt. Nach Trypanblau-Färbung der isolierten Granulozyten zeigte sich ein Anteil von 95-98% vitaler Zellen. Das entspricht einer Vorinkubation mit NaCl 0,9%. Die durchflusszytometrische Untersuchung zeigte nach Färbung mit Propidiumiodid einen Anteil von 3-6% nekrotischer Zellen. Daraus

ergibt sich, dass die immunmodulierende Wirkung der ACE-Hemmer nicht auf eine Vitalitätsminderung der Granulozyten zurückzuführen ist

2.1.6 Inkubation mit ACE-Inhibitoren

Das Vollblut wurde mit folgenden Substanzen bei 37°C und 4% CO₂ im Brutschrank inkubiert:

- Enalaprilat 10 ng/ml und 100 ng/ml
- Quinaprilat 10 ng/ml und 100 ng/ml

Um zwischen sofort und verzögert einsetzenden Effekten unterscheiden zu können, wurden als Standardinkubationszeiten 15 und 180 min gewählt.

2.2 *Bestimmung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-κB*

2.2.1 Testprinzip

Mit einem in-vitro Assay wurde die Spontanexpression sowie die Induzierung der de-novo Synthese der Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 am Modell einer simulierten Endotoxinämie nachgewiesen. Nach Zerstörung der Zellmembranen diente ein primärer, polyklonaler Antikörper gegen die p65 Untereinheit des NF-κB bzw. gegen die c-jun Untereinheit des AP-1 als Marker. An deren freies Fc-Ende wurde ein sekundärer, Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierter anti-IgG Antikörper angelagert, dessen Grünfluoreszenz durchflusszytometrisch bestimmt wurde. Als Negativkontrolle dienten Proben, bei denen der primäre Antikörper weggelassen wurde. Der sekundäre, FITC-markierte anti-IgG wurde jedoch zugegeben, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Mit diesen Proben erfolgte die optimale Einstellung des Durchflusszytometers. Als Stimulus zur Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktionskaskaden diente Lipopolysaccharid (LPS) (Fa. Sigma, E.Coli Serotyp 026:B6), ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien.

2.2.2 Durchführung

Vor Beginn des Tests wurde die Zentrifuge auf 4°C abgekühlt und alle Reagenzien mit Ausnahme der FACS®-Brand-Lysing-Solution sowie Solution A und B vorab für 15 min auf Eis abgekühlt. Der komplette Testansatz verblieb auf Eis, nur das Lysieren der Erythrozyten fand bei Zimmertemperatur statt. 100 µl des mit EDTA antikoagulierten Vollblutes wurden in ein Probenröhrchen pipettiert und wie in Kapitel (2.1.4) erläutert mit ACE-Inhibitoren inkubiert. Zur Aktivierung der Signalkaskade wurden die entsprechenden Proben mit 10 ng/ml LPS versehen und für 30 min bei 37°C und 4 % CO₂ im Brutschrank stimuliert. Um eine Stimulation der Proben durch die bloße Inkubation mit ACE-Inhibitoren auszuschließen, wurden parallel Proben mit 100 ng/ml des entsprechenden Medikaments inkubiert und nicht mit LPS stimuliert. Zwecks Lyse und Fixierung wurden jedem Röhrchen 2 ml FACS®-Brand-Lysing-Solution zugegeben, gemischt und für 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 400 x g) und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 2 ml PBS-Puffer (Fa. BAG, Lich) wurde erneut zentrifugiert (5 min, 400 x g) und der Überstand dekantiert. Zur Isolation und Anfärbung der Zellkerne wurde ein DNA-staining-Kit (Cycletest Plus DNA Reagent Kit; Becton Dickinson) verwendet. Die Ansätze wurden entsprechend der Arbeitsanleitung mit 3 ml Citratpuffer versehen und für 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde erneut zentrifugiert (5 min, 400 x g) und der Überstand möglichst vollständig abgesaugt. Im nächsten Schritt wurden 250 µl Solution A (Trypsin in einem Spermintetrahydrochlorid Puffer) hinzu pipettiert und für 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10 min wurde 200 µl Solution B (Trypsininhibitor und Ribonuclease A in Zitrat-stabilisiertem Puffer mit Spermintetrahydrochlorid) zugegeben und erneut 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Diesem Gemisch wurden 5 µl anti-NF-κB (p65) polyklonaler rabbit Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) bzw. 5 µl anti-Ap-1 (c-jun) polyklonaler rabbit Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) als primärer Antikörper zugegeben und für 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Als Sekundäntikörper wurden 2,5 µl FITC-markierter, monoklonaler, anti-rabbit-IgG zupipettiert und erneut für 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Um überschüssige, ungebundene Antikörper, welche die Messung beeinflussen könnten auszuwaschen, wurden nochmals 2 ml PBS-Puffer zugegeben, zentrifugiert (5 min, 400 x g) und der Überstand verworfen. Abschließend wurden 200 µl Solution C

(=25 µg Propidiumiodid und Sperminetetrahydrochlorid in Citratpuffer) in den Ansatz pipettiert, gemischt und die Proben innerhalb von 3 h gemessen.

2.3 Bestimmung des Komplementrezeptors CR3 (CD11b/CD18) und des LPS-Rezeptors CD14

2.3.1 Testprinzip

Mit einem in-vitro Assay wurde die spontane und die LPS-induzierte Expression der Oberflächenantigene CR3 (CD11b/CD18) auf Leukozyten und CD14 auf Monozyten im Vollblut quantitativ nachgewiesen. FITC-markierte monoklonale Antikörper gegen diese Rezeptoren dienten als Marker, deren Grünfluoreszenz durchflusszytometrisch bestimmt wurde. Als Negativkontrolle wurden unmarkierte Antikörper gegen die Oberflächenantigene verwendet. Als spezifischer Stimulus, zur Simulation einer systemischen Entzündungsreaktion, diente LPS (Fa. Sigma, E.Coli Serotyp 026:B6).

2.3.2 Rezeptormarkierung

Jeweils 100 µl EDTA-antikoaguliertes Vollblut wurde in Probenröhrchen gegeben und wie in Kapitel (2.1.4) beschrieben mit ACE-Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde einem Teil der Proben 10 ng/ml LPS zugegeben und für 30 min bei 37°C und 4% CO₂ im Brutschrank stimuliert. Exakt nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit wurde den Proben jeweils 5 µl FITC-markierte Antikörper zugegeben und in die als Negativkontrolle dienenden Röhrchen 5 µl nichtmarkierte Antikörper pipettiert. Diese Markierung der Oberflächenantigene fand bei Zimmertemperatur statt. Die Negativkontrolle diente zur optimalen Einstellung des Durchflusszytometers. Eine LPS-Inkubation mit Zugabe eines nichtmarkierten Antikörpers diente dabei als interne Qualitätskontrolle zum Nullabgleich. Um fehlerhafte Messergebnisse durch unspezifische Bindungen auszuschließen, wurde parallel jeweils eine Probe mit unspezifischem anti-Human-IgG Antikörper inkubiert. Hier ergaben sich im Vergleich zur Bindung mit nichtmarkiertem Antikörper keine nennenswerten Differenzen bezüglich der granulozytären bzw. monozytären

Autofluoreszenz. Die Ansätze wurden gemischt und für 15 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Zu jedem Röhrchen wurden 2 ml FACS®-Brand-Lysing-Solution zur Fixierung und Lyse der Erythrozyten gegeben, gemischt und für 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (2 min, 300 x g) und der Überstand dekantiert. Zu jedem Röhrchen wurde 3 ml PBS-Puffer gegeben, erneut gemischt, zentrifugiert (2 min, 300 x g) und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 500 µl PBS-Puffer konnte die Fluoreszenzintensität der Ansätze durchflusszytometrisch bestimmt werden. Lichtgeschützt und eisgekühlt sind die Proben 24 h haltbar. Der beschriebene Arbeitsablauf galt für alle verwendeten Antikörper gleichermaßen.

2.4 Der Phagozytose-Test

2.4.1 Testprinzip

In einem in-vitro Assay wurde die Phagozytose neutrophiler Granulozyten quantifiziert. Vitale, teilungsfähige Bakterien der Gattung *Staphylococcus aureus* K 807, die mit FITC gefärbt wurden, dienten als Stimulus für die Phagozyten. Durch Inkubation von Vollblut verblieben die neutrophilen Granulozyten in ihrem physiologischen Umfeld und wurden nicht in ihrer Interaktion mit Plasmakomponenten und Blutzellen beeinträchtigt. Zur Kontrolle diente ein identischer Ansatz, der während der Inkubationszeit auf Eis verblieb, während die restlichen Proben bei 37°C und 4% CO₂ inkubiert wurden. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten der Proben am Durchflusszytometer gemessen und die Phagozytoserate berechnet.

2.4.2 Bakterien

Als Ingestionspartikel wurde *Staphylococcus aureus* verwendet. Der standardisierte Subtyp K 807 wurde freundlicherweise vom Institut für Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Prof. Lämmler) zur Verfügung gestellt und aliquotiert bei -70°C eingefroren.

2.4.3 Fluoreszenzmarkierung der Bakterien

Ein aufgetautes Aliquot wurde auf Blutagar ausgestrichen und für 24 h bei 37°C inkubiert. Dies garantierte, dass der Keim makroskopisch keine Kontamination aufweist. Von dieser Platte wurden Bakterien in 50 ml BHI-Nährlösung überimpft. Der Ansatz wurde für 24 h bei 37°C unter ständiger Bewegung inkubiert. Anschließend wurde 1 mg/ml FITC zugegeben. Äthanol 96% diente als Lösungsvermittler, dem 20 mg FITC pro ml zugegeben wurde. Die entstandene 5%ige Lösung hatte nach unseren Untersuchungen keinen negativen Einfluss auf die Vitalität und Teilungsfähigkeit der Bakterien. In drei Waschvorgängen mit Phosphat-buffered-saline (PBS) wurde das Äthanol, das nichtgebundenes FITC und Reste der BHI-Lösung entfernt. Die Bakterien wurden mikroskopisch in einer Neubauer-Kammer ausgezählt, auf eine Konzentration von 10^9 Bakterien/ml verdünnt und abschließend fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert.

2.4.4 Durchführung

Vor Beginn des Tests wurde die Zentrifuge auf 4°C abgekühlt und alle Reagenzien, mit Ausnahme der FACS®-Brand-Lysing-Solution, vorab für 15 min auf Eis abgekühlt. Der komplette Testansatz verblieb auf Eis. Nur das Lysieren der Erythrozyten fand bei Zimmertemperatur statt. Die Bakterienaliquots wurden unmittelbar vor dem Testbeginn der Tiefkühltruhe entnommen und sofort mit Alufolie umwickelt. Damit sollte gewährleistet werden, dass die FITC-Fluoreszenz nicht beeinträchtigt wurde. Jeweils 100 µl gekühltes, heparinisiertes Vollblut wurde in ein Probenröhrchen pipettiert. Das Vollblut wurde wie in Kapitel (2.1.4) beschrieben mit ACE-Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt. Die aufgetauten Bakterien wurden geschüttelt, 10 µl der Bakterienlösung wurden dem Vollblut zupipettiert, und der Ansatz wurde gemischt. Danach inkubierten die Phagozytoseansätze für 10 min bei 37°C und 4% CO₂ im Brutschrank. Die Kontrollansätze verblieben auf Eis. Sie dienten später zur optimalen Einstellung des Durchflusszytometers. Exakt zum Ende der Inkubationszeit wurden die Röhrchen aus dem Brutschrank genommen und zum Abstoppen der Phagozytose auf Eis zu den Kontrollen gestellt. Zu jedem Ansatz wurden 100 µl Trypanblau-Lösung (0,16 mg/ml in NaCl 0,9 %) pipettiert und die Proben gemischt. Trypanblau diente als „Quenching“-Lösung, um Bakterienkonglomerate und andere Anheftungen von der

Phagozytenoberfläche zu entfernen und damit die Fluoreszenz außenliegender, nicht phagozytierter Bakterien zu unterdrücken. Pro Ansatz wurden 3 ml PBS-Puffer zugegeben. Die Proben wurden gemischt und für 5 min bei 250 x g zentrifugiert. Der sichtbare Überstand wurde verworfen und der Waschvorgang wiederholt. Nach Zugabe von 3 ml Lysing-Solution wurden die Proben für 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Lysing-Solution wurden die Erythrozyten zerstört und die im Aliquot enthaltenen Leukozyten fixiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 250 x g), der Überstand abgesaugt und 3 ml PBS-Puffer zugegeben. Dieser Waschvorgang wurde zweimal durchgeführt. Die Ansätze wurden mit 100 µl Propidiumiodid (PI) versetzt, gemischt, und für weitere 10 min lichtgeschützt inkubiert. Die Messung am Durchflusszytometer erfolgte innerhalb von 60 min.

2.5 Der Oxidative-Burst-Test

2.5.1 Testprinzip

Dieser in-vitro-Assay erlaubt die quantitative Bestimmung des oxidativen Burst von Leukozyten in heparinisiertem Vollblut. Als Stimulus der Phagozytose und damit zur Stimulation der Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite, die das inkorporierte Bakterium innerhalb des Phagolysosoms zerstören, dienen nicht fluoreszenzmarkierte Bakterien der Gattung *Staphylococcus aureus* K 807. Die Bildung dieser Sauerstoffmetabolite kann durch Zugabe und Oxidation von Dihydrorhodamin 123 verfolgt werden. Eine unstimulierte Probe diente auch hier als Negativkontrolle zur Justierung des Zytometers. Die Konversion von Dihydrorhodamin 123 zu Rhodamin 123 verändert die Fluoreszenzeigenschaften dieses Stoffes. Das entstandene Rhodamin 123 besitzt eine Grünfluoreszenz, die sich durchflusszytometrisch bestimmen lässt.

2.5.2 Durchführung

Die Durchführung des Tests basiert auf der Arbeitsanleitung des Phagoburst®-Testkits (Fa.Orpegen Pharma, Heidelberg). Er wurde jedoch so modifiziert, dass letztlich nur noch die Dihydrorhodamin 123-Substratscheiben des Kits Verwendung fanden. Zu Beginn des Tests wurde die Zentrifuge auf 4°C temperiert und alle Reagenzien mit Ausnahme der FACS®-Brand-Lysing-Solution für 15 min auf Eis gekühlt. Die Dihydrorhodamin 123 Substratscheibe wurde in 1 ml PBS-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. 100 µl heparinisertes Vollblut wurde in Probenröhrchen pipettiert und wie in Kapitel (2.1.4) beschrieben mit ACE-Inhibitoren behandelt. Nach Mischung des Bakterienliquots wurden 10 µl der Bakterienlösung dem Blut zugegeben, gemischt und für 10 min im Brutschrank bei 37°C und 4% CO₂ inkubiert. Jeweils eine Probe diente nach Zugabe von 10 µl PBS als Kontrolle ohne Stimulus. Diese Kontrolle diente später der optimalen Messeinstellung des Durchflusszytometers. Nach Inkubation wurde jeder Probe 20 µl der frisch zubereiteten Substratlösung zugegeben, gemischt, und für weitere 10 min bei 37°C und 4% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Exakt am Ende der 10 min wurden die Proben dem Brutschrank entnommen, zwecks Lyse und Fixierung mit 2 ml FACS®-Brand-Lysing-Solution versehen und für 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 5 min bei 250 x g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Zu den Röhrchen wurden 3 ml PBS-Puffer gegeben, zentrifugiert (5 min bei 250 x g) und der Überstand verworfen. Zu jeder Probe wurden 100 µl Propidiumiodid pipettiert, gemischt und für 10 min lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Das Propidiumiodid färbt leukozytäre DNA und dient dem Ausschluss von Bakterienaggregaten, die durchflusszytometrische Messungen beeinflussen könnten. Die Zellsuspension muss innerhalb von 30 min durchflusszytometrisch analysiert werden. Ohne Zugabe von Propidiumiodid sind die Proben auf Eis gekühlt 24 h haltbar.

2.6 Bestimmung der Interleukin-8-Konzentration mittels ELISA

2.6.1 Testprinzip

Die Bestimmung der Interleukin-8-Konzentration im Plasma erfolgte mittels Sandwich-ELISA (oder capture-ELISA) Verfahren. In diesem standardisierten Assay bildet ein an Kunststoff fixierter Antikörper, mit dem in der Probe enthaltenem IL-8, Immunkomplexe. Diese werden dann mittels eines zweiten, gegen eine weitere antigene Determinante des IL-8 gerichteten, enzymmarkierten Antikörpers und anschließender Zugabe eines chromogenen Substrats nachgewiesen. Die Konzentration des IL-8 wird hierbei in pg/ml ausgewiesen.

2.6.2 Durchführung

Zunächst wurde wie in Kapitel (2.1.3) beschrieben Blut entnommen, mit RPMI-Medium 1:5 verdünnt, in Zellkulturplatten pipettiert und mit ACE-Inhibitoren im Brutschrank inkubiert. Danach wurde den Proben zur Zytokinsynthesestimulation je 10 ng/ml LPS zugegeben und für 8 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Unstimulierte Ansätze dienten als Kontrolle. Anschließend wurden die Proben aus den Zellkulturplatten in Eppendorff™-Hütchen pipettiert und 5 min bei 2500 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C eingefroren.

Die Weiterverarbeitung basiert auf der Arbeitsanleitung des OptEIA™ Human IL-8-Sets (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Dazu wurden die Mikrotiterplatten am Vortag mit 100 µl verdünntem monoklonalem anti-Human-IL-8 Capture-Antikörper beschichtet, über Nacht bei +4°C inkubiert und dadurch fixiert. Die Verdünnung des Capture-Antikörpers erfolgte mit Coating-Buffer (0,1 M Carbonat + 8,4 g NaHCO³ + 3,56 Na²CO³ mit Aqua dest auf 1Liter aufgefüllt, pH=9,5). Diese Lösung ist bei 2-8°C gekühlt bis zu 7 Tage haltbar. Am darauf folgenden Tag wurden die Platten zur Entfernung möglicher ungebundener Reste zunächst dreimal mit 300 µl einer Waschlösung (PBS, Fa. BAG, Lich + 0,05% Tween-20) gewaschen und dann mit 200 µl Assay-Diluent (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Standards für die Standarddeichkurve erstellt. Dazu wurden im Sinne einer absteigenden geometrischen Verdünnungsreihe Standards mit Konzentrationen von 200 bis 3,125 pg/ml

und ein Nullstandard erzeugt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten zunächst erneut dreimal mit 300 µl Waschlösung gewaschen, dann je 100 µl der Standards zupipettiert und bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. 15 min vor Ablauf der Inkubationszeit wurde der Working-Detector (Lösung aus Avidin-HRP-Konjugat und biotinyliertem Antikörper gegen eine weitere IL-8-Determinante) angesetzt. Die Platten wurden erneut gewaschen (fünfmal mit 300 µl Waschlösung) und je 100 µl des Working-Detectors aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten siebenmal gewaschen und anschließend mit 100 µl Substratlösung (Tetramethylbenzidin und Hydrogenperoxid) 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Farbentwicklung wurde mit je 50 µl Stopplösung (2N H₂SO₄) abgestoppt, und mit einem ELISA-Reader (Bio-Rad, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen den Verdünnungsstandard gemessen. Die Erstellung der Standardeichkurve sowie die Berechnung der Konzentrationen erfolgten automatisch durch die Software des Plattenphotometers. Alle Bestimmungen wurden in Doppelansätzen durchgeführt und die jeweiligen Standards für jede Platte separat erstellt.

2.7 Die Durchflusszytometrie

2.7.1 Optisches System

Das zur Probenanalyse verwendete Durchflusszytometer (FACS-Calibur[®], Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) benutzt als Lichtquelle einen Argon-Ionenlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und einer Leistung von 15 mW. Als Auswertungssoftware diente das Programm CellQuest[®] (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg), betrieben auf einem Power-Mac[®] Computer der Fa. Apple.

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Detektionssystem, das Streulicht und Fluoreszenzsignale einzelner gelöster Partikel analysiert und die gleichzeitige Messung mehrerer physikalischer und biochemischer Parameter einer Zelle ermöglicht. Dabei werden Fluoreszenz und Lichtstreuung eines Partikels bei dessen Kontakt mit einem Lichtstrahl gemessen. Durch hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen perlschnurartig zu einem Messpunkt geleitet, dort von der Lichtquelle beleuchtet und die Fluoreszenz- und Streulichtemission jeder Zelle durch Detektionssysteme quantifiziert.

Somit steht eine entsprechend große Menge von Einzelmessungen (über 10^4 Zellen/min) für die Analyse zur Verfügung. Prinzipiell erlaubt die Durchflusszytometrie die Untersuchung jeder Art von Zellen, sofern diese in einer Suspension aus Einzelzellen vorliegen.

Das optische System eines Durchflusszytometers basiert auf einem Anregungs- und einem Detektionsteil. Im Anregungsteil wird das Laserlicht durch spezifisch angeordnete prismatische Linsen auf einer bestimmten Ebene verformt. Der so am Messpunkt auftreffende Laserstrahl besitzt einen elliptischen Durchmesser von etwa $20 \times 60 \mu\text{m}$, womit ein Kompromiss zwischen hoher räumlicher Auflösung und ausreichender Signalintensität erreicht wird. Das entstehende Streulicht wird in einem Detektionssystem gemessen, das zum einen das Vorwärtsstreulicht (Forward-light-scatter, FSC) in einem Winkelbereich von $2-20^\circ$, zum anderen das rechtwinklig gemessene Seitwärtsstreulicht (Sideward-light-scatter, SSC) und die Fluoreszenz erfasst. In den Detektionsbereichen trifft das Licht auf Fotozellen und Dioden, welche das Strahlungssignal zur Verarbeitung in elektrische Signale umwandeln. Die spezifische Lichtstreuung, die durch Zellgröße, Zellform, Oberflächenstruktur und Granularität entsteht, ermöglicht eine physikalische und funktionelle Charakterisierung von Zellen. Dabei korreliert das FSC mit der Größe, während das SSC der Dichte bzw. Granularität der Zelle entspricht. Auf Grund ihrer spezifischen Morphologie und der damit verbundenen charakteristischen Lichtstreuung lassen sich somit z.B. unterschiedliche Leukozytenpopulationen wie Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten detektieren.

Zur Differenzierung von Fluoreszenzen wird das als Lichtquelle fungierende Argongas durch elektrische Spannung ionisiert. Die dabei absorbierte Energie wird von den Valenzelektronen des Argons aufgenommen, angeregt und auf ein höheres Energieniveau gebracht. Bei der Emission, also der spontanen Rückkehr in den Urzustand, wird diese Energie als Photon freigesetzt, welche benachbarte Ionen zur Abstrahlung von Ionen gleicher Energie stimuliert. Die entstandene Energie wird über verschiedene Spiegel innerhalb der Glasröhre verstärkt, auf einer bestimmten Ebene polarisiert und ist als überwiegend monochromatisches Laserlicht der Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$ in der Lage, spezifische Fluoreszenzfarbstoffe in einem entsprechenden Wellenlängenspektrum anzuregen. Die dafür notwendige hohe Intensität und konstante Strahlungsleistung ist durch die Verwendung des Argonlasers gegeben. Die in der vorliegenden Studie verwendeten und im Exzitationsbereich des Argonlasers anregbaren Fluorochrome sind das grünfluoreszierende FITC und das rotfluoreszierende Propidiumiodid (PI). Die

resultierende Emission der Fluoreszenz liegt für FITC bei $\lambda = 525$ nm und für PI bei $\lambda = 620$ nm. Die Differenz zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge bezeichnet man als „Stokes’schen Shift“. Sie ermöglicht eine Mehrfarbenfluoreszenzanalyse, die das Anwendungsspektrum des Durchflusszytometers erheblich erweitert. Gemessen und dargestellt werden die Fluoreszenzen des Durchflusszytometers als Fluoreszenz 1 (FL1) für das grünfluoreszierende FITC und als Fluoreszenz 2 (FL2) für das rotfluoreszierende PI.

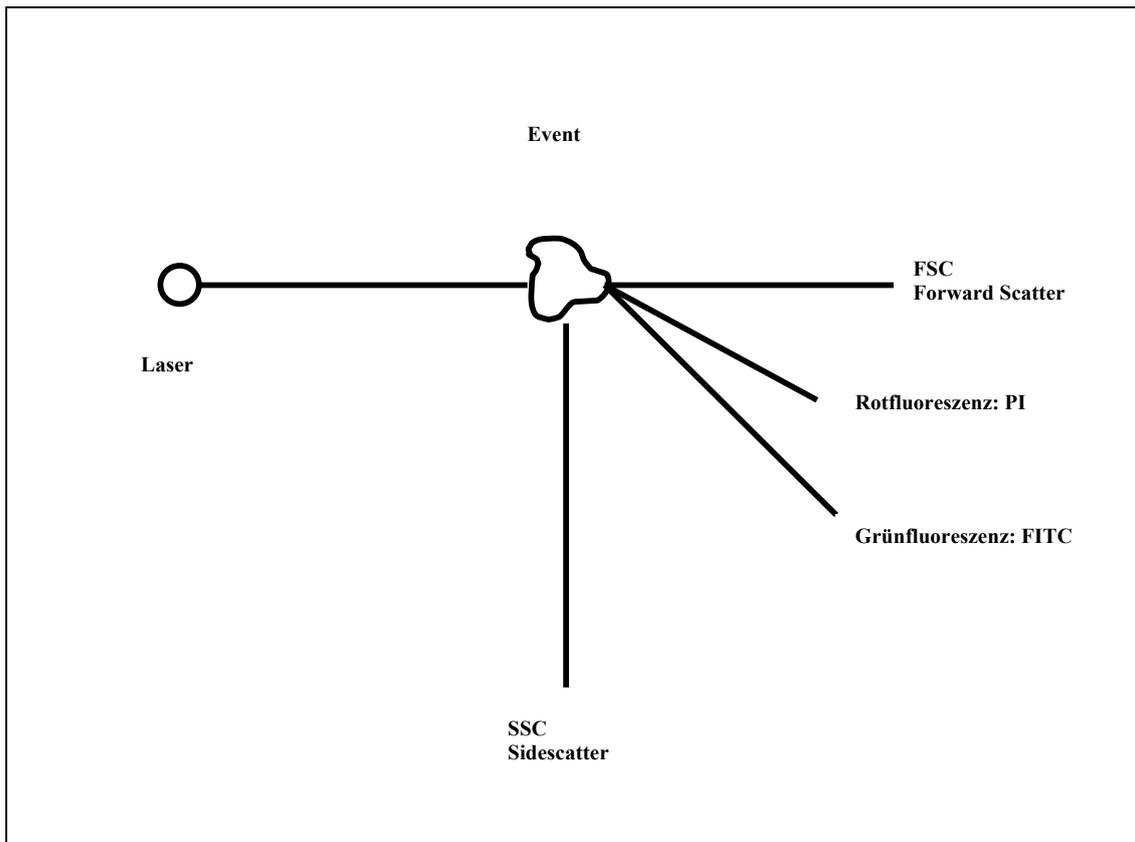


Abbildung 3: Prinzip der Funktionsweise eines Flow-Zytometers. Das Laserlicht wird durch eine Zelle (Event) abgelenkt. Modifiziert nach [186].

2.7.2 Flüssigkeitssystem

In der Messzelle treffen zwei Flüssigkeitsströme aufeinander, der Hüll- und der Probenstrom, die beide den gleichen Brechungsindex haben sollten. Die zellfreie Trägerflüssigkeit (FACS-Flow[®], Fa. Becton Dickinson) des Hüllstroms (sheath) wird kontinuierlich per Zuleitung in die Messzelle gepumpt und anschließend in einen Abfalltank geleitet. Der Probenstrom (Sample) wird durch eine zweite Zuleitung zunächst

über eine Stahlkapillare in der Mitte der Messküvette und dann über eine Quarzküvette in die Messzelle transportiert. Durch den höheren Druck des äußeren laminaren Hüllstroms wird der Probenstrom zu einem dünnen Faden ausgezogen, so dass die Zellen einzeln perlenkettenartig den Laser im rechten Winkel passieren. Außerdem werden sie von einigen Zentimeter pro Sekunde auf etwa 7 Meter pro Sekunde beschleunigt. Dieses Prinzip bezeichnet man als „hydrodynamische Fokussierung“. Neben Aufreihung und Beschleunigung bewirkt dies, gemeinsam mit der Geometrie der Einlässe und des Küvettenhohlraums, eine Ausrichtung asymmetrischer Partikel in Richtung Längsachse.

2.7.3 Signalverarbeitung

Die Photonen werden im Hochspannungsfeld der Photoröhre erst in Ströme, dann in analoge Spannungsimpulse und später in digitale Signale verwandelt und verstärkt. Die Bandbreite der zu verstärkenden Signale ist abhängig von den spektralen Charakteristika und reicht dabei von einigen Autofluoreszenzen bis zu mehreren tausend Frequenzäquivalenten. Dabei stehen zur Darstellung biologischer Verhältnisse prinzipiell zwei Arten von Signalverstärkung zur Verfügung: eine logarithmische und eine lineare. Durch eine elektronische Schwelle (Threshold), die durch einen bestimmten Schrittmacherparameter ausgelöst („getriggert“) wird, ist das Gerät in der Lage, „echte“ Signale von Hintergrundrauschen zu differenzieren. In unserem Fall ist dies die Größe eines Partikels (Forward-scatter, FSC). Prinzipiell ist aber auch jeder andere Parameter möglich. Die registrierten Signale werden von einem Analog-zu-Digital-Konverter von Volt (sinnvoller Betrieb zwischen 200 und 850 Volt) in eine Klassenzahl von 0 bis 1024 (1024-Klassenauflösung) gewandelt und vom Computer auf ein Speichermedium gelegt.

2.8 *Darstellung der Ergebnisse*

Zur Darstellung der Ergebnisse wird die Fluoreszenzintensität in einem Histogramm- bzw. Häufigkeitsdiagramm präsentiert und in verschiedenen Intensitätskanälen, sogenannte Klassen, gegen die absolute Zellzahl aufgetragen dargestellt. Diese ist, wie bereits zuvor erwähnt, abhängig von der gewählten Signalverarbeitung und elektrischen Spannung, in 256 oder 1024 Klassen verteilt. Durch das Setzen von „Gates“ besteht bei der Histogrammanalyse die Möglichkeit zur Selektion bestimmter Messergebnisse. Dies

ermöglicht die Vorauswahl bestimmter Zellen bezüglich ihrer Eigenschaften. Es können somit negative, nicht fluoreszierende und positive, fluoreszierende Zellen voneinander abgegrenzt werden. Die Abgrenzung negativer Zellen als Kontrolle bei anschließender Messung der Proben ermöglicht den Ausschluss unspezifischer Fluoreszenz auf Grund von Spontanfluoreszenz sowie unspezifischer Bindungen FITC-markierter Antikörper. Durch die Möglichkeit der Zweiparameterdarstellung kann sowohl die Korrelation von FSC zu SSC als auch die Gemeinsamkeit von Rot- und Grünfluoreszenz dargestellt werden. Die grafische Umsetzung erfolgt als Punkthistogramm im sogenannten Dot-Plot, in dem jeder Punkt einer definierten Zelle mit ihren Merkmalen entspricht.

Die in Abbildung 4 gezeigte Originalregistrierung einer Probe lysierten Vollblutes zeigt, wie anhand des charakteristischen Musters des Vorwärts- bzw. Seitwärtsstreulichtes, Zellpopulationen wie z.B. Granulozyten und Monozyten voneinander unterschieden werden können.

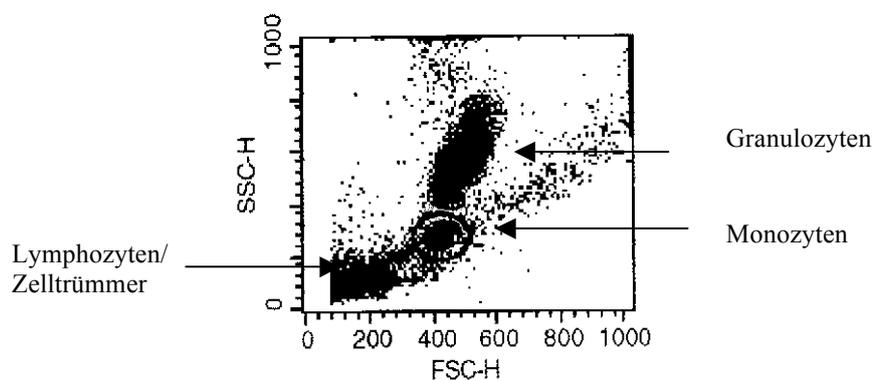


Abbildung 4: FSC/SSC- Diagramm

Bei jeder Messung werden vier Parameter erfasst: FSC, SSC, FL1 und FL2, die in beliebiger Konstellation zweidimensional darstellbar sind. Nach der charakteristischen Verteilung der Zellpopulation im FSC/SSC- Diagramm besteht nun die Möglichkeit, durch das Setzen von Auswertefenstern, dem sogenannten Live-Gating, die zu untersuchenden Zellen abzugrenzen und deren Fluoreszenzintensität als Histogramm (Einfachfluoreszenz) oder als Punktwolke (Mehrfarbenfluoreszenz) zur Darstellung zu bringen.

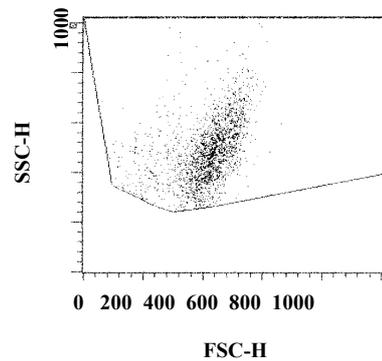


Abbildung 5: „Live-Gating“

Im Fall der vorliegenden Untersuchungen sind dies neutrophile Granulozyten. Dabei wird auf Grund der quantitativen Überlegenheit dieser Subpopulation [18] eine Aussage getroffen, da eine Abgrenzung zu eosinophilen und basophilen Granulozyten nicht möglich ist. Innerhalb des gesetzten „Gates“ lassen sich nun „negative“ Zellen, mit Fluoreszenzintensitäten im Bereich von Autofluoreszenz oder unspezifischer Bindungen, von „positiven“ Zellen durch ihre Lage in der FL1 abgrenzen.

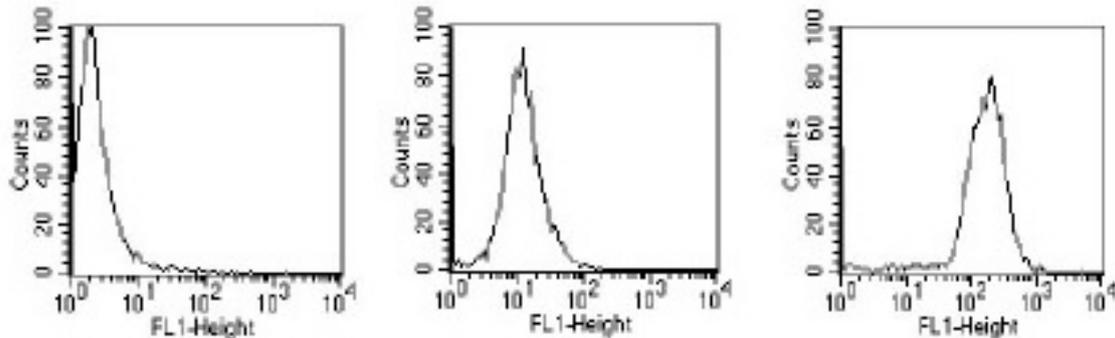


Abbildung 6: Negativ und Positiv-Darstellung der FL1-Heigt

Der Peak der „negativen“ Zellen dient dabei als Kontrolle und wurde in unserer Studie entsprechend der Autofluoreszenz der Zellen auf eine Fluoreszenzintensität von unter 10^1 definiert. Im verwendeten Histogramm wurde die gemessene FL1 gegen die Häufigkeit aufgetragen. Daher erscheinen Zellen, die kein Antigen exprimieren oder nicht phagozytiert haben, auf Grund ihrer geringen Fluoreszenzintensität (geringe FL1) am linken Rand der Darstellung. Antigen-positive Zellen bzw. phagozytierende Zellen hingegen erscheinen durch ihre höhere Fluoreszenzintensität (hohe FL1) weiter rechts. Das erneute Eingrenzen der Peaks mittels „Gates“ (M1, M2, usw.) ermöglicht die

Quantifizierung in einem Histogramm. Die Software CellQuest® (Fa. Becton Dickinson) ist nun in der Lage, die definierten Histogramme und Zweiparameterdarstellungen auszuwerten. Dabei können mehrere Parameter, wie die Anzahl der Ereignisse, die relativen Prozentanteile, der Mittelwert, der Median und der Modus der Signalintensität gezeigt werden. Die Zahl der gemessenen Zellen wurde auf 10000/Probe definiert und deren Signalintensität hinsichtlich des Medians ausgewertet. Der Median als das 50. Perzentil, halbiert bei aufsteigender Sortierung der Messwerte die Messreihe und entspricht somit der Klasse, bei der 50% der Werteverteilung über diesem Wert und 50% darunter liegen. Gegenüber anderen Parametern, wie dem Mittelwert besitzt er den Vorteil, dass er weniger durch „Ausreißer“ (z.B. Zelltrümmer und Artefakte) beeinflusst wird und somit eine gute Aussage über den Signalwert abgibt. Im Vergleich zum Mittelwert ist der Median dadurch allerdings weniger sensitiv bei der Beurteilung kleinerer Veränderungen in der Fluoreszenzintensität.

Zur Auswertung der Phagozytose wird die Phagozytoseaktivität, d.h. die mittlere Anzahl phagozytierter Bakterien pro Granulozyt errechnet. Dazu wird die FL1 der Bakterien jeder Messreihe in Relation zur FL1 der neutrophilen Granulozyten gesetzt und als Phagozytoserate bezeichnet.

Errechnung der Phagozytoserate:

1. Umrechnung des linear gemessenen Medians der Fluoreszenz in eine logarithmische Form als Phagozytenwert:

$$\text{Phagozytenwert} = 10 \exp^{(\text{Median der Fluoreszenzintensität Phagozyt/} \text{Skalierungsfaktor})}$$

2. Berechnung der bakteriellen Fluoreszenzaktivität:

$$\text{Bakterienwert} = 10 \exp^{(\text{Median der Fluoreszenzintensität Bakterium/} \text{Skalierungsfaktor})}$$

3. Berechnung des Skalierungsfaktors:

$$\begin{aligned} \text{Skalierungsfaktor} &= \text{Zahl der Klassen} / \text{Anzahl der logarithmischen Dekaden} \\ &= 1024/4 = 256 \end{aligned}$$

4. Berechnung der Phagozytenaktivität:

$$\text{Phagozytenaktivität} = \text{Phagozytenwert} / \text{Bakterienwert}$$

2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Messergebnisse wurde mit Hilfe der Statistiksoftware BIAS durchgeführt.

Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Da in der Regel die Hypothese der Normalverteilung verworfen werden musste, wurden für die statistische Analyse nichtparametrische Verfahren verwandt.

Bei Vergleichen von mehreren abhängigen Parametern wurde eine Rangvarianzanalyse für verbundene Stichproben mit dem Friedman-Test durchgeführt [88]. Dieses Verfahren prüft die Null-Hypothese: Die verschiedenen abhängigen Parameter sind hinsichtlich der Messergebnisse vergleichbar. Wurde diese Null-Hypothese verworfen, so wurde als multipler Anschlussstest der Wilcoxon-Wilcox-Test durchgeführt [261], um die paarweisen Unterschiede zwischen den Parametern zu untersuchen.

Für Vergleiche zwischen zwei unabhängigen Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Das Signifikanzniveau in dieser Arbeit beträgt $p < 0,05$. Für multiple Vergleiche wurde das Signifikanzniveau mittels Bonferroni-Korrektur angepasst.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkung der ACE-Hemmer auf PMN

3.1.1 CR3 (CD11b/CD18)-Expression

Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen von Quinaprilat bzw. Enalaprilat zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf die LPS-stimulierte CR3 (CD11b/CD18)-Expression von neutrophilen Granulozyten untersucht. Quinaprilat und Enalaprilat supprimierten in gleicher Weise bereits nach 15 min signifikant die Expression des Komplementrezeptors um ca. die Hälfte der Ausgangsfluoreszenz. Die beiden verwendeten Konzentrationen (10 ng/ml bzw. 100 ng/ml) der Medikamente zeigten keinen relevanten Unterschied bezüglich eines dosisabhängigen Effekts. Die Verlängerung der Inkubationszeit auf 180 min führte nicht zu einer weiteren Steigerung sondern zum Rückgang des Effektes um 30% in der niedrigeren (10 ng/ml) und um 20% in der höheren (100 ng/ml) Konzentration. Der Vergleich der unstimulierten Proben zeigt, dass die beiden ACE-Hemmer die Fluoreszenz um jeweils 20% zur unbehandelten Kontrolle reduzierten. Nach Verlängerung der Inkubation auf 180 min kam es ebenfalls zu einem Rückgang um 20%. Beim Vergleich der Zeitpunkte fällt ein signifikanter Rückgang der Stimulierbarkeit durch LPS auf (660 ± 51 nach 15 min und 525 ± 54 nach 180 min). Als Negativkontrolle zur optimalen Justierung des Durchflusszytometers diente die Inkubation einer Probe mit unmarkierten Antikörpern (erste graue Säule in Abbildung 7 und 8).

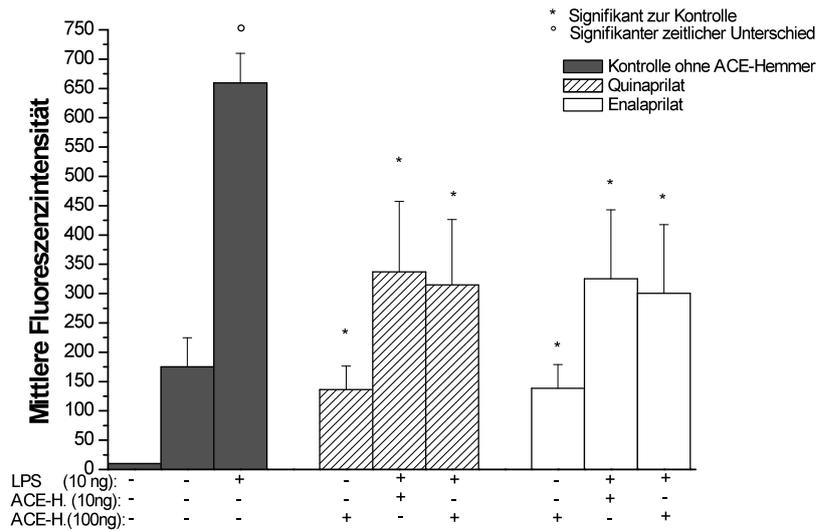


Abbildung 7: Expression des Oberflächenrezeptors CR3 (CD11b/CD18) auf PMN nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung, n=12. Die Justierung des Durchflusszytometers erfolgte mittels unmarkiertem Antikörper (erste Säule).

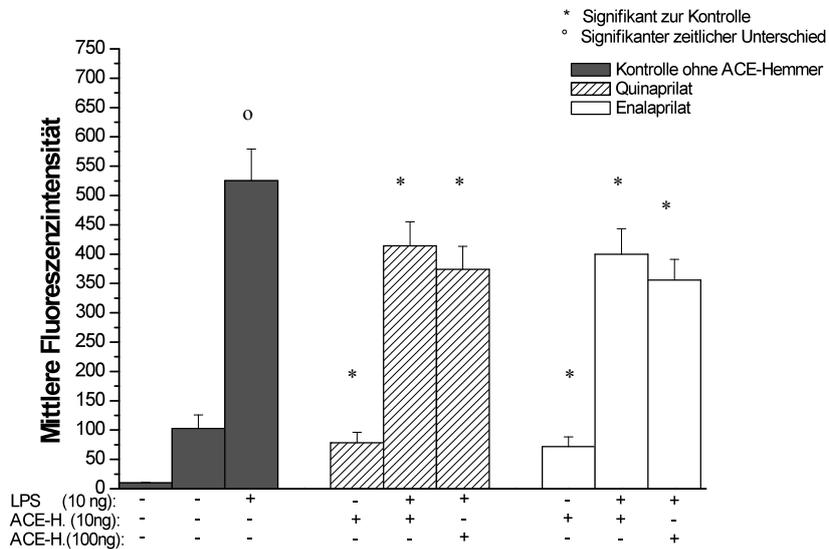


Abbildung 8: Expression des Oberflächenrezeptors CR3 (CD11b/CD18) auf PMN nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung, n=12. Die Justierung des Durchflusszytometers erfolgte mittels unmarkiertem Antikörper (erste Säule).

3.1.2 Intranukleäre AP-1-Konzentration

Die LPS-stimulierte intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors AP-1 wurde durch Inkubation mit Quinaprilat bzw. Enalaprilat bereits in der geringen Konzentration von 10 ng/ml um 25% supprimiert. Nach Verwendung einer höheren (100 ng/ml) Konzentration fand sich eine Steigerung des Effekts um weitere 10%. Die Verlängerung der Inkubationszeit auf 180 min bewirkte keine weitere Supprimierung. Es zeigte sich jedoch auch in dieser Versuchsreihe, dass eine Verlängerung der Inkubationszeit mit einer geringeren maximalen Stimulierbarkeit der Granulozyten einher ging (275 ± 16 nach 15 min und 264 ± 14 nach 180 min). Dieser vergleichsweise geringe Unterschied wurde vor allem auf Grund der geringen Standardabweichung signifikant ($p=0,009$).

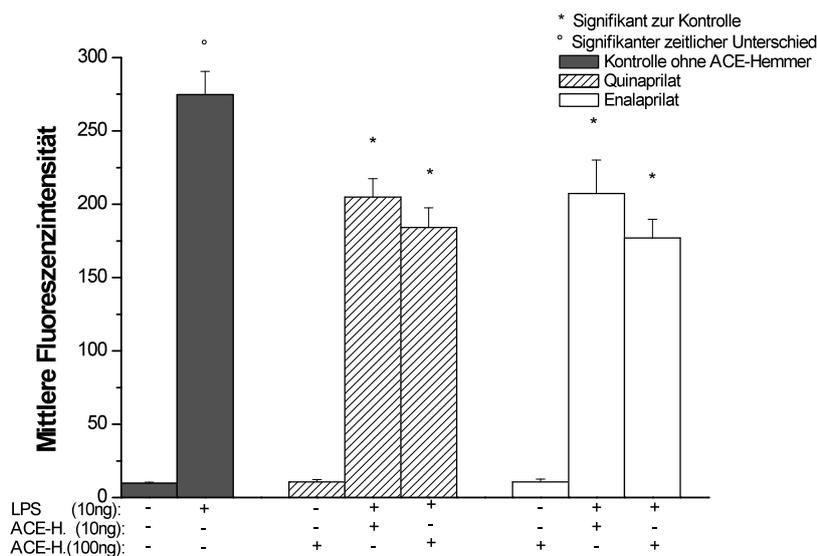


Abbildung 9: Intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors AP-1 in PMN nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=12$.

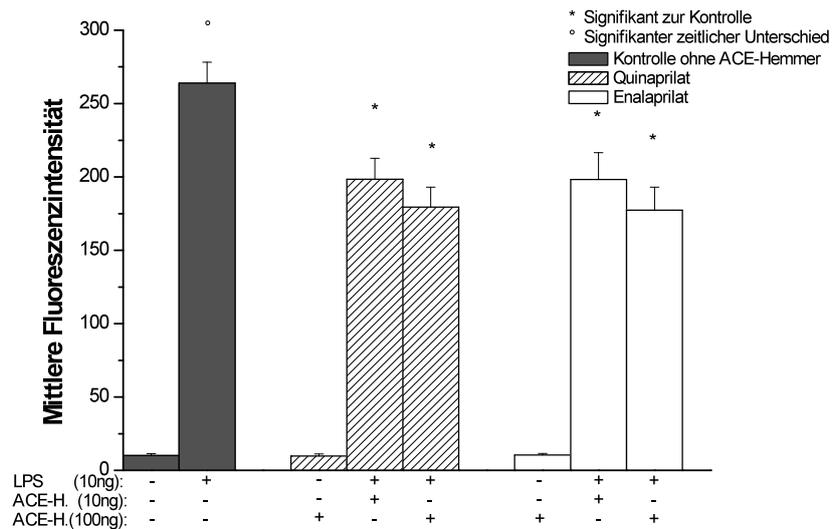


Abbildung 10: Intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors AP-1 in PMN nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.

3.1.3 Intranukleäre NF- κ B-Konzentration

Die intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors NF- κ B zeigte eine mit AP-1 vergleichbare signifikante Supprimierung um 20% nach Inkubation mit 10 ng/ml Quinaprilat bzw. Enalaprilat und um 30% bei Verwendung der hohen (100 ng/ml) Konzentration. Auch hier brachte eine Verlängerung der Inkubationszeit keine Effektsteigerung.

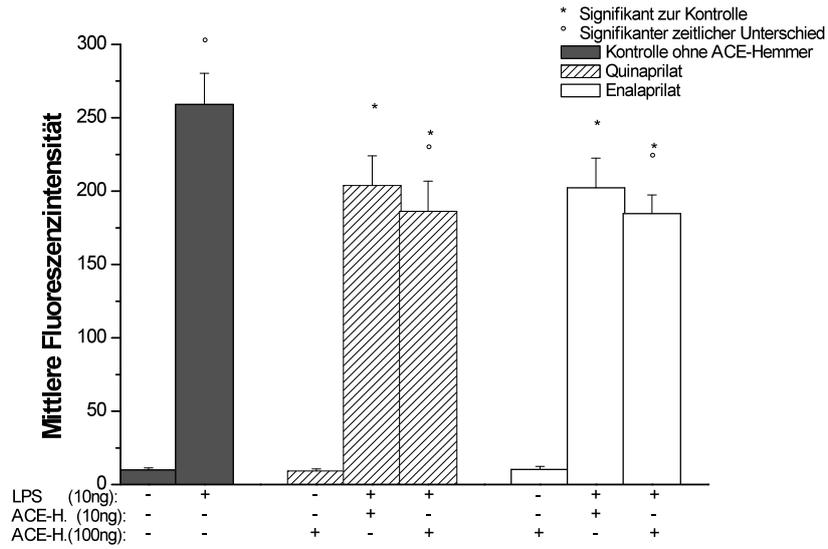


Abbildung 11: Intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors NF-κB in PMN nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung, n=12.

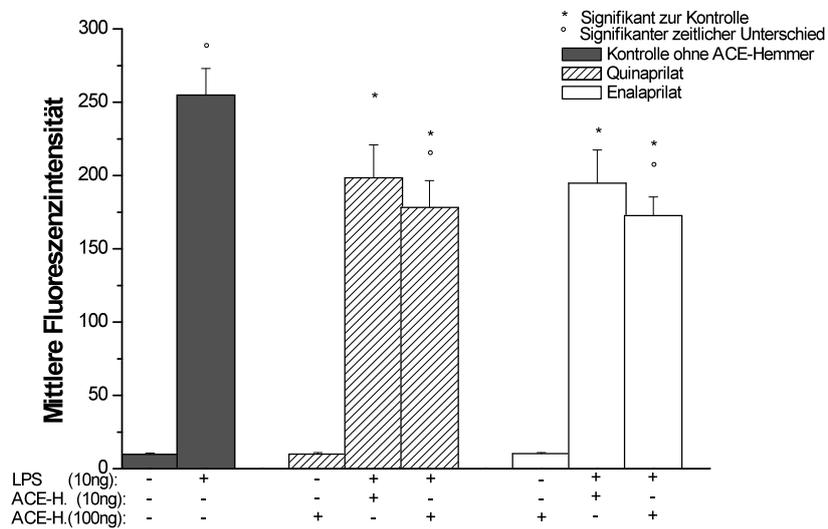


Abbildung 12: Intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors NF-κB in PMN nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung, n=12.

3.1.4 Interleukin-8-Konzentration

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden mittels Sandwich-ELISA Konzentrationsänderungen des Entzündungsmediators Interleukin-8 nach Inkubation mit unterschiedlichen Quinaprilat- und Enalaprilatkonzentrationen und nachfolgender Stimulation mit LPS untersucht. Beide ACE-Hemmer supprimierten bereits nach 15 minütiger Inkubation die Interleukin-8-Konzentration, wobei eine hohe Standardabweichung auffiel. Quinaprilat reduzierte die IL-8-Produktion im Vollblut in einer Konzentration von 10 ng/ml um 30 % und in einer Konzentration von 100 ng/ml um 25%. Enalaprilat hemmte die IL-8-Konzentration um 10% bei einer ACE-Hemmer-Konzentration von 10 ng/ml und um 25% bei 100 ng/ml. Bereits die alleinige Inkubation mit Quinaprilat ohne nachfolgende Stimulation mit LPS führte zu einer Verminderung der IL-8-Ausgangskonzentration um 10% und zeitabhängig zu einer weiteren Reduktion um 20% nach 180 min. Für Enalaprilat konnte kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden.

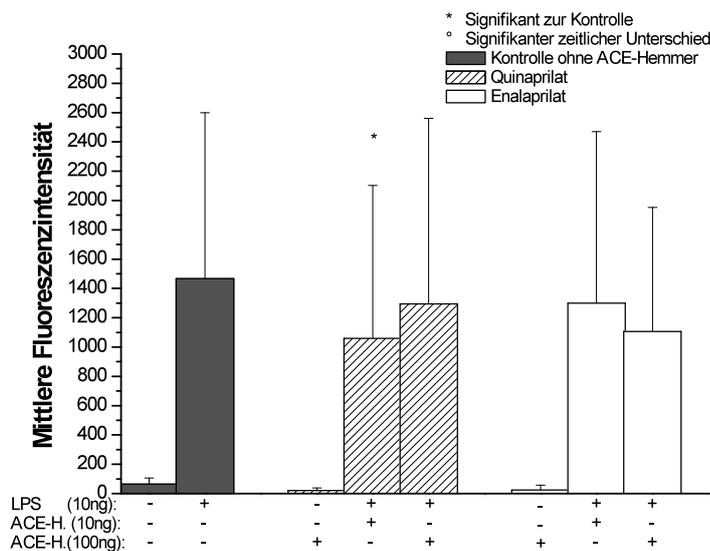


Abbildung 13: Konzentration des Entzündungsmediators Interleukin-8 im Überstand nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.

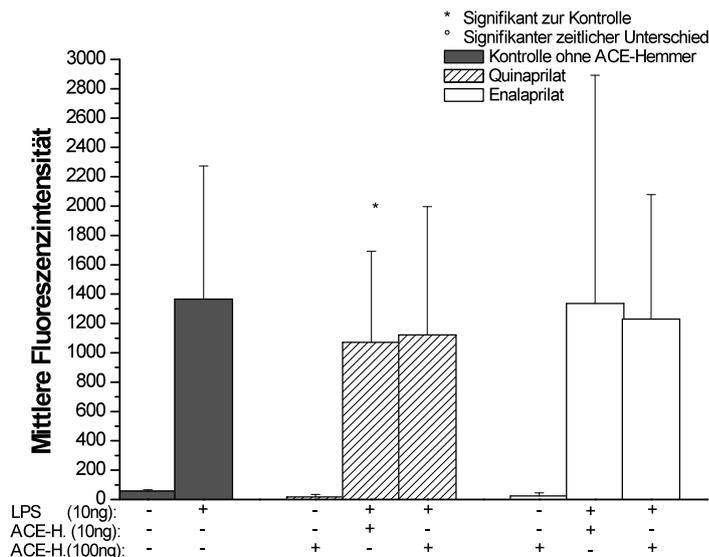


Abbildung 14: Konzentration des Entzündungsmediators Interleukin-8 im Überstand nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.

3.1.5 Phagozytoseaktivität

Untersucht wurde in dieser Versuchsreihe die Änderung der Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten bei Inkubation mit je 100 ng/ml Quinaprilat und Enalaprilat. Die Phagozytoseaktivität errechnete sich dabei aus der Fluoreszenzintensität von phagozytiertem, FITC-markierten *Staphylococcus aureus* und wurde als Anzahl der phagozytierten Bakterien pro Granulozyt angegeben. Quinaprilat verminderte die Phagozytoseaktivität nach 15 minütiger Inkubation signifikant um 45% (143 ± 51 versus 79 ± 34) und zeigte eine Steigerung des Effektes bei 180 minütiger Inkubation auf 50% (126 ± 37 versus 62 ± 18). Enalaprilat zeigte dagegen bereits nach 15 min eine signifikante Supprimierung um 60% (143 ± 51 versus 55 ± 20), welche mit längerer Inkubation auf 40% absank (126 ± 37 versus 75 ± 82). Außerdem fiel beim Vergleich der stimulierten Kontrollen ein auf Grund der geringen Standardabweichung ($p=0,099$) signifikanter Unterschied von 10% (143 ± 51 nach 15 min und 126 ± 37 nach 180 min) auf.

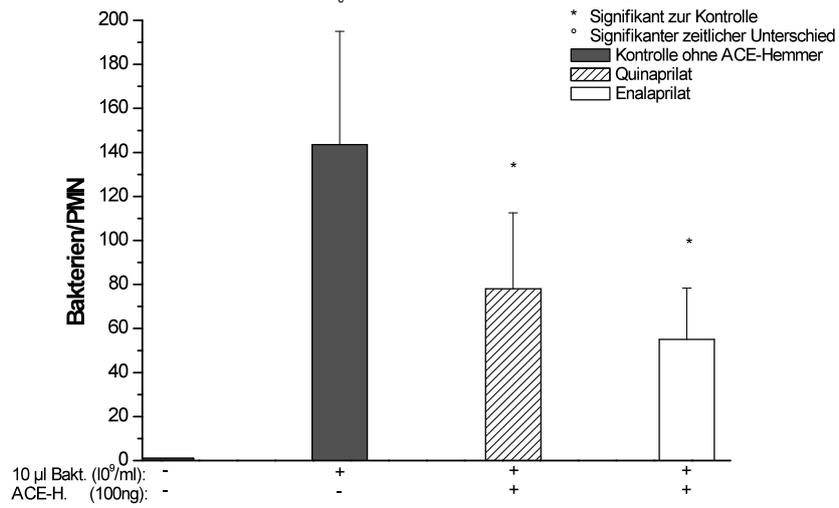


Abbildung 15: Phagozytoseaktivität der PMN nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat (ausgewiesen als ng/ml) Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung, n=12.

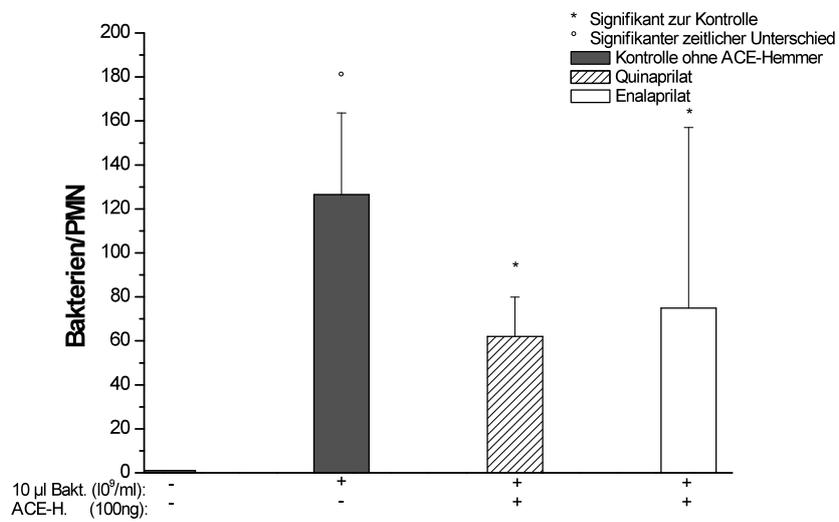


Abbildung 16: Phagozytoseaktivität der PMN nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat (ausgewiesen als ng/ml) Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung, n=12.

3.1.6 Oxidativer Burst

Zur Untersuchung des Einflusses der ACE-Hemmer auf den oxidativen Burst neutrophiler Granulozyten wurde das Vollblut zunächst mit je 100 ng/ml Quinaprilat und Enalaprilat und dann mit unmarkiertem Staphylococcus aureus inkubiert. Quinaprilat supprimierte dabei den oxidativen Burst signifikant um 15%, Enalaprilat um 20%. Ein zeitlicher Effekt war nicht festzustellen.

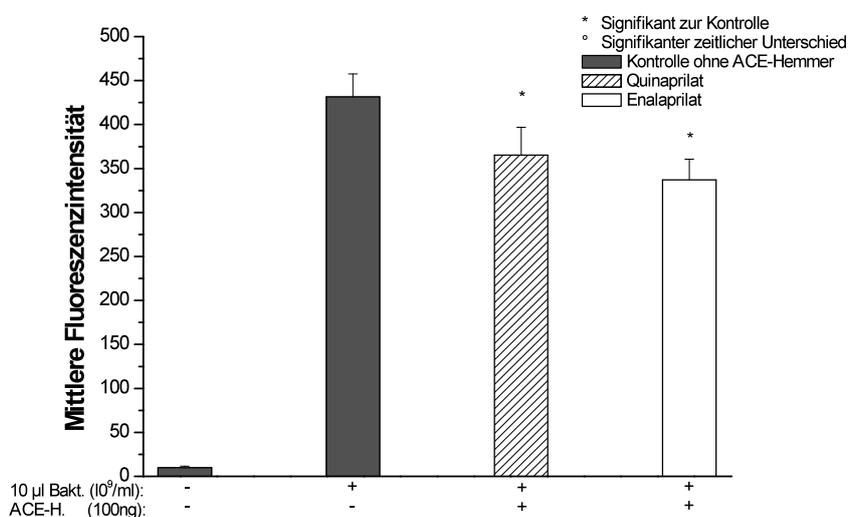


Abbildung 17: Oxidativer Burst der PMN nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat (ausgewiesen als ng/ml) Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.

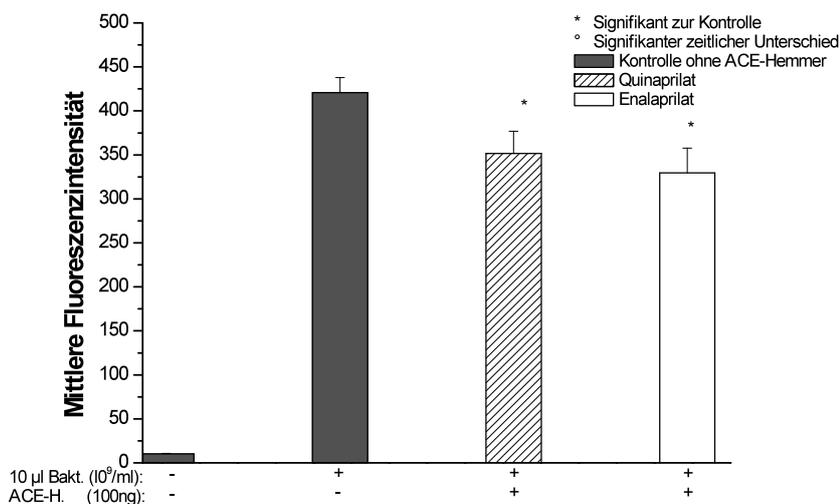


Abbildung 18: Oxidativer Burst der PMN nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat (ausgewiesen als ng/ml). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.

3.2 Auswirkung der ACE-Hemmer auf Monozyten

3.2.1 CR3 (CD11b/CD18)-Expression

Es wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen von Quinaprilat und Enalaprilat zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf die LPS-induzierte CR3 (CD11b/CD18)-Expression von Monozyten untersucht. Quinaprilat und Enalaprilat zeigten gleichsam bereits nach 15 minütiger Inkubation mit einer Konzentration von 10 ng/ml eine signifikante Reduzierung der CR3 (CD11b/CD18)-Expression um die Hälfte der Ausgangsfluoreszenz. Eine Konzentrationserhöhung brachte keine weitere Veränderung. Eine Verlängerung der Inkubationszeit führte auch hier zu einem Rückgang dieses Effektes. Während nach 15 minütiger Inkubation Quinaprilat bzw. Enalaprilat bereits eine signifikante Supprimierung der Autofluoreszenz um 20% bewirkten, konnte dieser Effekt in der 180 minütigen Inkubation nicht gezeigt werden. Der bereits bei den neutrophilen Granulozyten nachgewiesene Effekt, dass die Stimulierbarkeit mit längerer Inkubation abnimmt, führte bei den Monozyten zu einem Rückgang um die Hälfte im Vergleich zur 15 minütigen Inkubation (443 ± 169 nach 15 min bzw. 235 ± 120 nach 180 min).

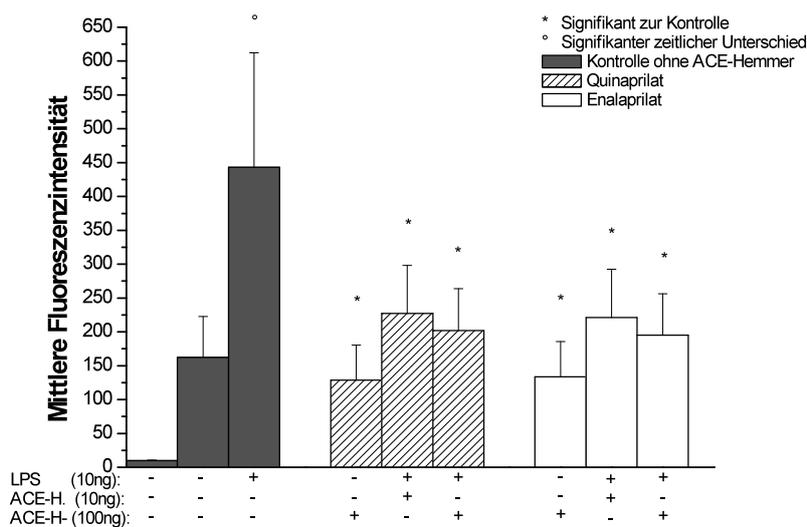


Abbildung 19: Expression des Oberflächenrezeptors CR3 (CD11b/CD18) auf Monozyten nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=12$. Die Justierung des Durchflusszytometers erfolgte mittels unmarkiertem Antikörper (erste Säule).

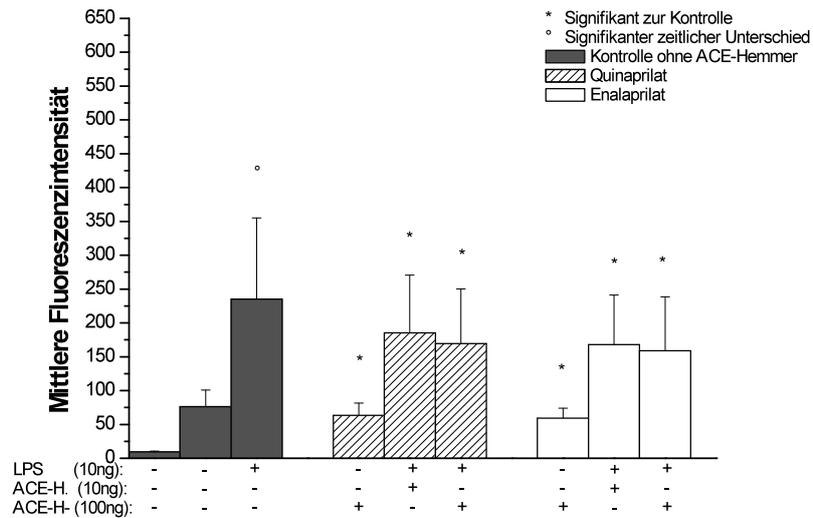


Abbildung 20: Expression des Oberflächenrezeptors CR3 (CD11b/CD18) auf Monozyten nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12. Die Justierung des Durchflusszytometers erfolgte mittels unmarkiertem Antikörper (erste Säule).

3.2.2 CD14-Expression

Die Expression des LPS-Rezeptors CD14 wurde signifikant durch Inkubation mit 100 ng/ml Quinaprilat bzw. Enalaprilat um 20% supprimiert. Ein zeitlicher Effekt war nicht zu beobachten. Auf eine Inkubation im subklinischen Konzentrationsbereich wurde auf Grund der geringen Unterschiede verzichtet.

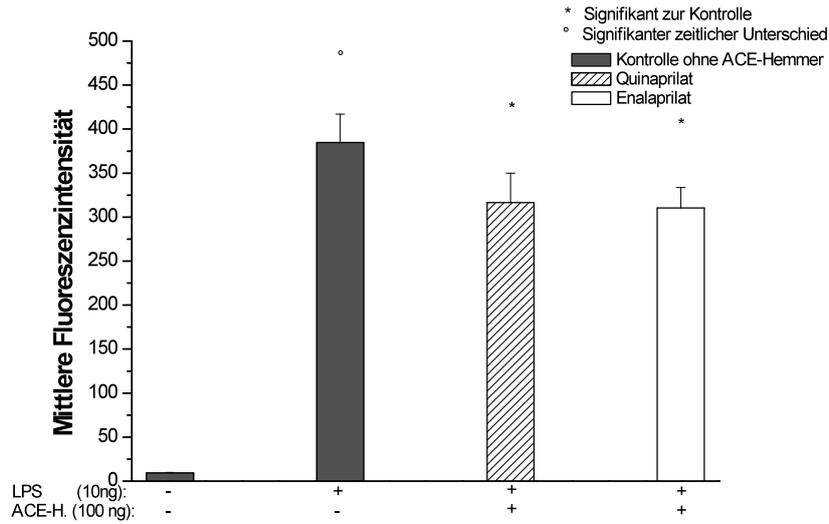


Abbildung 21: Expression des Oberflächenrezeptors CD14 auf Monozyten nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat und LPS-Stimulation (ausgewiesen als ng/ml). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.

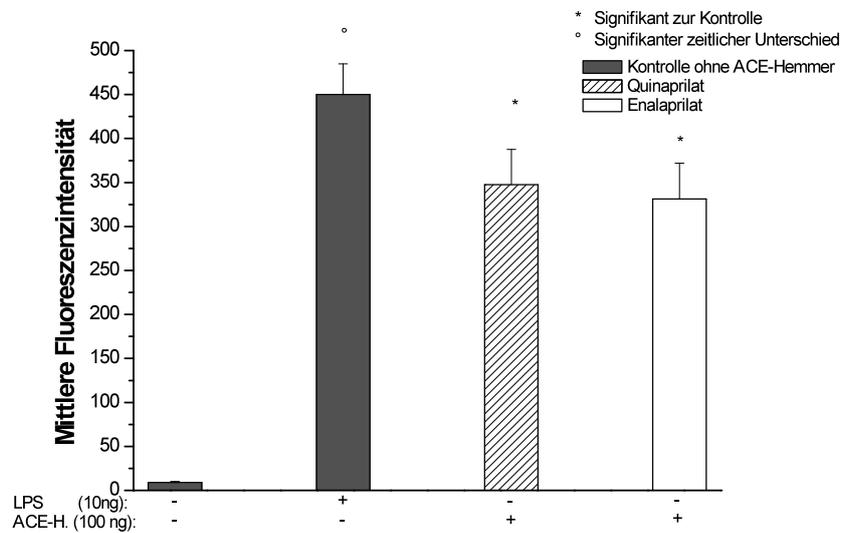


Abbildung 22: Expression des Oberflächenrezeptors CD14 auf Monozyten nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat und LPS-Stimulation (ausgewiesen als ng/ml). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.

3.2.3 Intranukleäre AP-1-Konzentration

Untersucht wurde die LPS-induzierte Veränderung der intranukleären Konzentration des Transkriptionsfaktors AP-1 nach 15 bzw. 180 minütiger Inkubation mit unterschiedlichen ACE-Hemmer-Konzentrationen. AP-1 wurde durch Quinaprilat bzw. Enalaprilat bereits nach 15 minütiger Inkubation signifikant konzentrationsabhängig supprimiert. Dabei bewirkte die niedrigere Konzentration der ACE-Hemmer (10 ng/ml) eine 30%ige, die höhere (100 ng/ml) eine 40%ige Verminderung der intranukleären AP-1-Konzentrationen. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 180 min führte zu einer 40%igen Supprimierung in der geringen und zu einer 30%igen Reduktion in der höheren Konzentration.

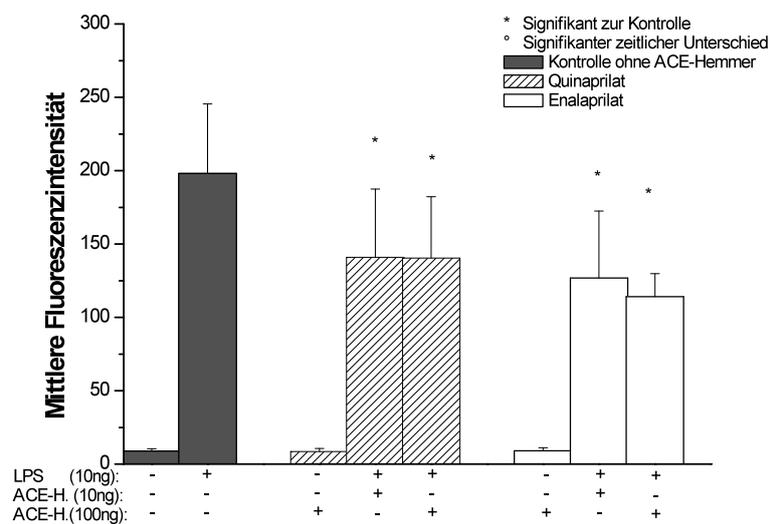


Abbildung 23: Intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors AP-1 in Monozyten nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.

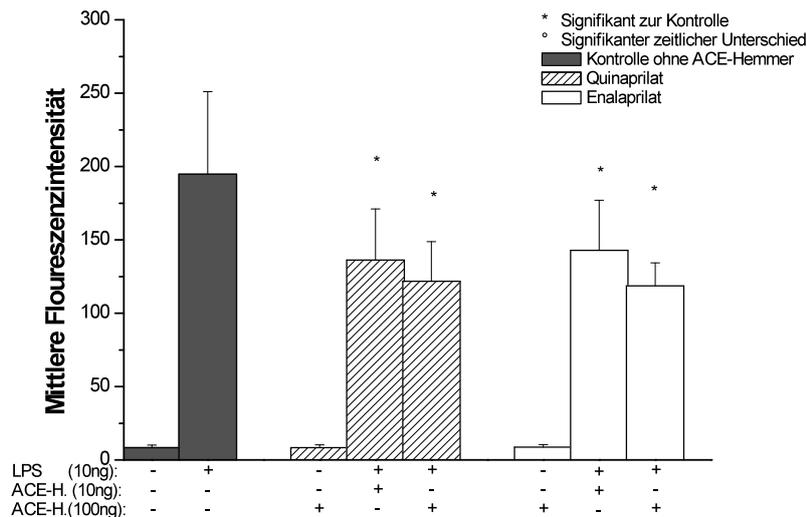


Abbildung 24: Intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors AP-1 in Monozyten nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.

3.2.4 Intranukleäre NF- κ B-Konzentration

Die intranukleäre NF- κ B-Konzentration in Monozyten wurde parallel zur AP-1-Expression konzentrationsabhängig bereits nach 15 minütiger Inkubation mit einer Quinaprilat- bzw. Enalaprilatkonzentration von 10 ng/ml signifikant um 30% und bei einer Konzentration von 100 ng/ml um 40% reduziert. Eine Verlängerung der Inkubationszeit brachte keine Veränderung des Effektes.

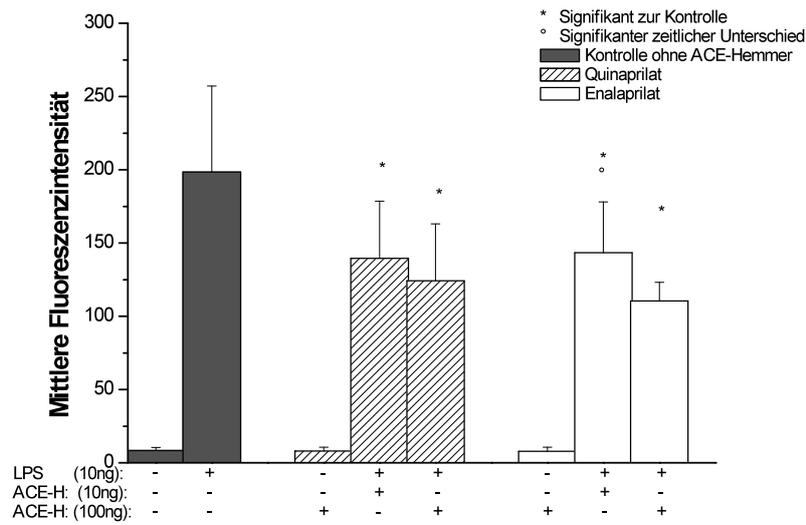


Abbildung 25: Intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors NF-κB in Monozyten nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung, n=12.

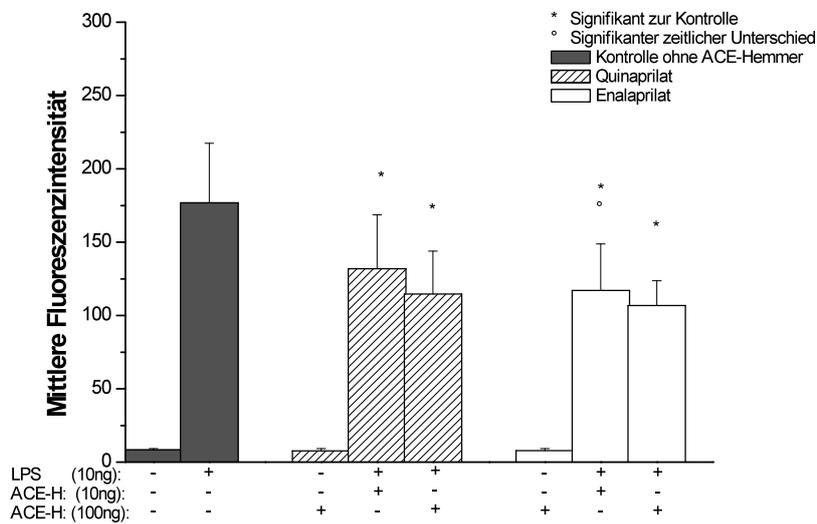


Abbildung 26: Intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors NF-κB in Monozyten nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung, n=12.

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen klinischer und subklinischer ACE-Hemmer-Konzentrationen auf die Funktion neutrophiler Granulozyten und Monozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten getestet. Dabei untersuchten wir den direkten Einfluss von ACE-Hemmern auf die transkriptionelle Ebene (AP-1 und NF- κ B), auf die Chemokinproduktion (Interleukin-8), auf die Rezeptorenexpression (CD11b/CD18 und CD14) und auf die funktionelle Aktivität (Phagozytoseleistung und oxidativer Burst) von Phagozyten. Anhand der Simulation eines septischen Krankheitsgeschehens wurde unter Verwendung von Vollblutmethoden mit möglichst physiologischen Bedingungen in-vitro die immunmodulatorische Wirkung von ACE-Hemmern untersucht.

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Probenaufarbeitung für durchflusszytometrische Messungen

Die in dieser Studie verwandte Vollblutmethodik weist sowohl für durchflusszytometrische Untersuchungen als auch für die Bestimmung der Interleukin-8-Sekretion mittels ELISA wichtige Vorteile gegenüber anderen Analyseverfahren auf: Zum einen kann auf eine physikalische Isolierung der Zellen verzichtet werden, zum anderen bleibt durch eine Reduktion der Arbeitsschritte, und damit geringerer Manipulation, die Funktion peripherer Blutzellen weitestgehend bestehen [258]. Des Weiteren können durch Belassen der Zellpopulation in ihrem physiologischen Milieu immunologische Interaktionen zwischen zellulären und humoralen Faktoren erhalten werden. Die Zellisolierung, meist durch Zentrifugation in einem Dichtegradienten, führt vor allem bei Verwendung eines sucrosehaltigen Ficollgradienten zu Veränderungen in der Funktion und Morphologie der Leukozytenpopulationen [38;42;58;223;275]. Diese Formveränderungen führen bei Granulozyten zu einer erhöhten Zelladhärenz an Glasoberflächen sowie zu einer Verminderung der Chemotaxis [105]. Sie können als toxische Schädigung der Zellen interpretiert werden. Als Zeichen der Zellaktivierung zeigt sich dabei eine Up-Regulation des Komplementrezeptors CR3 (CD11b/CD18) auf der Oberfläche von Granulozyten um ca. 400%. Dies entspricht einer Stimulation mit Phorbol-

12-Myistat-13-Acetat (PMA) [249;273]. Darüber hinaus wurde nach Zellisolierung im Vergleich zur Vollblutmethodik eine Erhöhung des oxidativen Burst beschrieben. Die Phagozytoseaktivität blieb hingegen weitestgehend unbeeinflusst [240]. Bei Verwendung eines sucrosefreien Percollgradienten konnte keine Steigerung der Komplementrezeptorexpression als Zeichen einer Aktivierung der Granulozyten gefunden werden [18]. Dies entspricht einer fehlenden Adhäsivität der Granulozyten [58;105]. In Folge dessen wurde in dieser Studie die Granulozytenisolation lediglich zur Vitalitätsmessung der Zellen durchgeführt. Dabei wurde ein sucrosefreier Percoll-Dichtegradient verwendet.

Die in der vorliegenden Studie durchgeführte Lyse der Vollblutprobe mittels FACS®-Brand-Lysing-Solution (Fa.Becton Dickinson, Heidelberg) ermöglicht durch Reduktion des Debris und Fixierung der Leukozytenpopulation eine genaue Detektion der neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Dabei kann es, ausgelöst durch entstandene Zelltrümmer, zu einer Veränderung des Streusignals der Zellen kommen. Das Fluoreszenzsignal hingegen bleibt dadurch unverändert. Ein signifikanter, quantitativer Verlust an neutrophilen Granulozyten tritt nicht auf [208]. Zum Ausschluss einer lysebedingten erhöhten Hintergrundfluoreszenz durch vermehrte unspezifische Bindungen [198] wurde in dieser Studie die Vollblutprobe zunächst mit Antikörpern inkubiert und erst danach lysiert. Des Weiteren wurde als interne Qualitätskontrolle jeweils eine Probe parallel mit unspezifischem anti-Human-IgG-Antikörper inkubiert. Dabei zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede im Vergleich zur Fluoreszenz der Kontrolle. Eine weitere wesentliche Einflussgröße ist die Temperaturabhängigkeit der Rezeptorexpression [71;100;120;151;255;273]. So konnte gezeigt werden, dass eine Erwärmung von 4°C auf 37°C zu einer signifikanten Steigerung der Integrin-, Antigen-, und der CR1 (CD35)-Oberflächenrezeptorexpression auf Granulozyten sowie deren Oxidaseaktivität führte [82]. Eine derartige Temperaturabhängigkeit mit erhöhter Expression fand sich auch für CR3 (CD11b/CD18) [23;76]. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde die Expression der einzelnen Entzündungsmediatoren in dieser Studie bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Inkubation der Vollblutproben mit den zu untersuchenden Substanzen erfolgte unmittelbar nach Blutentnahme im Brutschrank bei 37°C, 4% CO₂ Gehalt und physiologischer Luftfeuchte, um möglichst realistische Bedingungen zu simulieren. Erst danach wurde die Rezeptormarkierung bei Raumtemperatur vorgenommen.

Zur Stimulation von Oberflächenrezeptorenexpression und Transkriptionsfaktoren wurde die Vollblutprobe mit LPS für 30 min inkubiert, eine Methode, die als ex-vivo Modell zur

Simulation septischer Krankheitsbilder etabliert ist und eine Beurteilung der zellulären Antwort auf proinflammatorische Reize ermöglicht [19;140;154;262]. Die intrazellulären Mechanismen, die durch eine derartige Stimulation induziert werden, sind an leukozytären Zelllinien und isolierten Blutzellen ausreichend dargestellt worden [14;110;146;150;160]. Neben dem Zusammenspiel der einzelnen Mediatoren untereinander ist die Interaktion mit dem Gefäßendothel ein weiterer wichtiger Bestandteil der Entzündungsreaktion. Die Rekrutierung der Immunzellen ins Entzündungsgebiet mittels Rolling, Adhäsion und nachfolgender Transmigration [226] wird durch Bindung leukozytärer Selektine und Integrine an Adhäsionsmoleküle des Endothels vermittelt [119]. Diese Interaktionen zwischen Endothelium und Phagozyten können bei Verwendung eines Vollblut-Assays nicht stattfinden. Daher kann eine Aussage zu Adhäsion und Transmigration nicht getroffen werden.

Maximale Fluoreszenzintensitäten werden in Untersuchungen von Phagozytose und oxidativem Burst nach Inkubationszeiten von 5-15 min erzielt [187;188;199;240]. Dabei unterliegen die Absolutwerte der granulozytär phagozytierten Bakterien von Autor zu Autor extremen Schwankungen [186]. In dieser Studie fanden sich Phagozytoseraten von ca. 60-140 Bakterien/Granulozyt. Dieser Wert entspricht eigenen Voruntersuchungen [254], liegt aber über dem von Perschel et al. beschriebenen Wert von 3-65 Bakterien/Phagozyt [186]. Dies lässt sich vermutlich auf die Definition unterschiedlicher Probandenkollektive zurückführen. Während Perschel et al. keine speziellen Ausschlusskriterien festlegten, rekrutierten wir in der vorliegenden Studie ausschließlich immunkompetente männliche Probanden ohne Nikotinkonsum, Allergien, akuten Infektionen oder immunsuppressiver Therapie. Trotz interindividueller Differenzen in der Phagozytoseaktivität liegt eine gute Korrelation zwischen durchflusszytometrischer Bestimmung und fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle vor [186]. Um ein Krankheitsgeschehen mit einem klinisch relevanten Keim zu simulieren, wurde in dieser Studie vitaler vermehrungsfähiger *Staphylococcus aureus* verwendet [186]. In bisherigen Untersuchungen wurden vorwiegend abgetötete Mikroorganismen oder synthetische Partikel eingesetzt.

Störfaktoren bei der durchflusszytometrischen Bestimmung der Phagozytoseaktivität stellen nicht phagozytierte, an der PMN-Oberfläche adhärente Bakterien dar. Zur Vermeidung daraus resultierender Messartefakte wurde als „Quenching-Lösung“ Trypanblau verwendet. Dieses entfernt über eine Strukturänderung der Membran extrazellulär anhaftende, fluoreszierende Bakterien [241]. Dadurch wird eine Abgrenzung

zu phagozytierten, intrazellulären Bakterien ermöglicht [188]. Trypanblau erwies sich dabei als inert und zuverlässig. Quenching mit Trypanblau entfernt ca. 90% der granulozytären Oberflächenfluoreszenz und lässt dabei die intrazelluläre Fluoreszenz unbeeinflusst [241].

Die Messung des oxidativen Burst erfolgte in dieser Studie mittels nichtfluoreszierendem Dihydrorhodamin 123 (DHR 123), welches durch H_2O_2 unter Katalyse der Myeloperoxidase in fluoreszierendes Rhodamin 123 oxidiert wird [145;210;242]. Die Myeloperoxidase ist ein Enzym, das aus azidophilen Granula freigesetzt wird und bakterizide Verbindungen aus H_2O_2 und Chlorid-Anionen katalysiert [165]. DHR 123 passiert ungehindert die neutral geladene Granulozytenmembran, kann aber den Intrazellularraum nicht wieder verlassen. Die Konversion zum fluoreszierenden Rhodamin 123 erfolgt dann in den azidophilen Granula, da nur dort die nötige Myeloperoxidase lokalisiert ist [107;210;242]. Es kann allerdings nur eine Interpretation der H_2O_2 -Produktion erfolgen, weitere Reaktionsschritte werden nicht erfasst. Dadurch wird die Aussagekraft des Messverfahrens dahingehend eingeschränkt [211;242]. Der in dieser Studie verwendete Vollblut-Assay zur Bestimmung des oxidativen Burst besitzt eine hohe Sensitivität, so dass auch diskrete Stimuli erfasst werden können [72;210]. Dies stellt einen Vorteil gegenüber den bisher häufig verwendeten semiquantitativen Messverfahren mittels luminolabhängiger Chemilumineszenz dar [199]. Im Gegensatz zu zwei vorherigen Studien [72;242], in denen große interindividuelle Unterschiede beschrieben werden, konnten wir in der vorliegenden Untersuchung nur eine relativ geringe interindividuelle Varianz feststellen. Stimulationsstudien wurden mit PMA, Zymosan oder FMLP stimulierten, isolierten Granulozyten durchgeführt [224;242]. Zum einen kann die Isolationstechnik, zum anderen kann aber auch die beschriebene Modulation der Granulozyten durch DHR123 Ursache für die divergierenden Ergebnisse sein. Die DHR123-Konzentration sowie die Leukozytenzahl beeinflussen die Aufnahme des Farbstoffes in die Granulozyten [207;248]. In den hier zitierten Studien wurde die Phagozytose erst nach der Zugabe von DHR123 induziert. Auch wenn andere Untersuchungen diese Ergebnisse nicht bestätigen konnten [149], wurde auch in der vorliegenden Untersuchung DHR123 erst nach Phagozytoseinduktion zugegeben. Hiermit konnten Interaktionen zwischen DHR123 und Phagozytosevorgang ausgeschlossen werden.

Zur Kernfärbung wurde rotfluoreszierendes Propidiumiodid verwandt. Es bindet an zelluläre DNA und ermöglicht zusammen mit der Größe des Messevents die

Differenzierung zwischen Zelltrümmern und vollständigen Zellen. Die gemessene Fluoreszenz ergibt sich aus der Bindung der verwendeten Fluochrome an spezifischen Bindungsstellen und der durch Flavoproteine emittierten Eigenfluoreszenz der Zelle. Zur Vermeidung von Störungen durch freie Antikörperreste wurde als letzter Schritt der Aufarbeitung, die Probe jeweils mittels PBS-Lösung „gewaschen“ und somit von freien Antikörperresten befreit. Die Eichung des Gerätes erfolgte durch Einstellung des Negativbereichs auf $<10^1$ mit Hilfe eines unmarkierten Antikörpers im Kontrollansatz bzw. durch Weglassen des Primärantikörpers im Sandwichverfahren.

4.1.2 Durchflusszytometrie

Prinzipiell stellt die Durchflusszytometrie eine Weiterentwicklung der Fluoreszenzmikroskopie dar. Beide Verfahren weisen in Bezug auf die quantitative Auswertung der unterschiedlichen Zellpopulationen hohe Korrelationen auf [175;186], zeigen jedoch Unterschiede in der Relation der Leukozytenpopulationen zueinander [232]. Der Vergleich von Durchflusszytometrie, Fluoreszenzmikroskopie und automatischer Zählung erbrachte signifikante Differenzen, die zumindest teilweise in der ungenauen Abgrenzbarkeit der unterschiedlichen Zellpopulationen im „Live Gating“ begründet liegen [232]. Das gemessene Streulicht ist abhängig von Form, Oberflächenstruktur und intrazellulärer Granularität der Zellen [56;232]. Zwar wird durch die Aktivierung z.B. von PMN deren Zellform und Größe verändert [122], eine Korrelation mit der Streulichtveränderung besteht jedoch nicht [40]. Die Messung des Streulichts stellt somit keine geeignete Methode für die Beurteilung von Zellvolumen und Zellform dar [145], erlaubt aber eine grobe Unterscheidung der Leukozytensubpopulationen. Die Streulichtsignale von Monozyten und Granulozyten überschneiden sich in der durchflusszytometrischen Dot-Plot-Darstellung, was eine definitive Trennung trotz Eingrenzung in der zweiparametrischen Darstellung nicht immer erlaubt [193;197]. Auf Grund der quantitativen Überlegenheit, vor allem der neutrophilen Granulozyten, ist bei einer Anzahl von 10.000 Zellen/Analyse der Anteil der gleichzeitig ausgewerteten Monozyten jedoch vernachlässigbar [232]. Anders verhält es sich bei der Abgrenzung der Monozyten. Dort ist der Anteil an Granulozyten eine nicht zu vernachlässigende Einflussgröße. Somit erfolgte in der vorliegenden Untersuchung die Auswertung der einzelnen Parameter für Monozyten nur, wenn eine Abgrenzung einwandfrei möglich war.

So war bei den Funktionsparametern „Phagozytose“ und „Oxidativer Burst“ auf Grund der deutlich zunehmenden Inhomogenität in der Neutrophilenpopulation nach Stimulation eine Abgrenzung der Monozyten nicht zweifelsfrei möglich. Des Weiteren war z.B. durch die Spezifität des verwendeten CD14-Antikörpers für Monozyten dessen Anwendbarkeit auf Granulozyten nicht gegeben.

Die gemessenen Fluoreszenzsignale sind innerhalb des Häufigkeitsdiagramms um einen Mittelwert gestreut [186]. Zur Auswertung der Fluoreszenzintensität stehen prinzipiell das arithmetische Mittel, das geometrische Mittel und der Median zur Verfügung. Bei der statistischen Auswertung von Messwerten mit einer starken Streuung ist der Median im Vergleich zu den anderen Parametern relativ stabil gegenüber „Ausreißern“ [213]. Dies ergibt eine bessere Reproduzierbarkeit sowie eine höhere Präzision der Probenanalyse. Trotz geringer nomineller Unterschiede war der Median als Auswertemodus vor allem auf Grund der hohen interindividuellen Differenz bei der Bewertung der Phagozytose vorteilhaft. Er beschreibt die durchschnittliche Fluoreszenz der Zellpopulation und ist als Fluoreszenzsignal der Zahl der durch neutrophile Granulozyten phagozytierten Bakterien direkt proportional [194].

4.1.3 Durchflusszytometrische Bestimmung von Transkriptionsfaktoren

Die durchflusszytometrische Bestimmung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 hat gegenüber den klassischen Bestimmungsmöglichkeiten entscheidende Vorteile. Klassischerweise wird zur Bestimmung transkriptionsregulierender Proteine die Bindung eines radioaktiv markierten Oligonukleotids mit spezifischer Konsensussequenz für den zu analysierenden Faktor induziert. Dieser kann nach elektrophoretischer Auftrennung audiographisch dargestellt werden. Dabei ist es möglich weitere Untereinheiten zu differenzieren, welche dann mittels Supershift-Assay spezifiziert werden können. Zur Markierung der Oligonukleotide werden entweder radioaktiv markiertes Phosphor oder Digoxigenin verwendet. Das Arbeiten mit Isotopen unterliegt jedoch nicht nur gewissen Sicherheitsbestimmungen sondern birgt auch gewisse Risiken für Umwelt und Gesundheit. Alternativ kann in einem relativ zeitaufwendigen Verfahren die Markierung mittels Digoxigenin erfolgen, welches durch anschließendes Blotting mit verschiedenen Antikörpern nachgewiesen werden kann. Im Gegensatz dazu ist die durchflusszytometrische Bestimmung risikoärmer und zeitsparender. Durch Verwendung verschiedener Antikörper,

die spezifisch mit Untereinheiten des Transkriptionsfaktors reagieren, wie p65 (RelA) des NF- κ B und c-jun des AP-1, ist es möglich, die Zusammensetzung der nukleären Heterodimere nachzuweisen. Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurde mittels Nachweis einer singulären, der Größe des entsprechenden Proteins entsprechenden Bande im Western Blot nachgewiesen. Im Vergleich zum Supershift-Assay ist die Spezifität jedoch geringer. Konventionelle Methoden, wie EMSA oder Western Blot haben ferner den Nachteil, dass sie eine Zellseparation erfordern. Wie bereits erläutert, führt dies jedoch zu einer Stimulation der Leukozyten, was eine Quantifizierung und Interpretation von Aktivitäts- bzw. Konzentrationsänderungen nur eingeschränkt erlaubt. Dagegen ermöglicht die durchflusszytometrische Methodik eine separate, quantitative Darstellung des DNA-gebundenen NF- κ B- bzw. AP-1-Gehalts in polymorphkernigen Granulozyten und Monozyten [84]. Auch die Erhaltung eines möglichst physiologischen Mediums erhöht die Interpretierbarkeit [262]. Des Weiteren beinhaltet die klassische Methode des EMSA den Nachteil, dass bei der Proteinextraktion Proteinasen freigesetzt werden, die die Untereinheiten des NF- κ B proteolytisch spalten [160]. Eine derartige Proteolyse ist auch für andere Transkriptionsfaktoren beschrieben [160]. Dies kann zwar durch Zugabe spezieller Antiproteasen weitgehend verhindert werden [160;233], falsch negative oder sehr niedrige Konzentrationen vermindern jedoch die quantitative Auswertbarkeit der Ergebnisse. Dagegen erfolgt bei der durchflusszytometrischen Methode zwar ebenfalls eine Permeabilisierung der Zellmembran, die Struktur der Zellorganellen bleibt jedoch erhalten. Dies garantiert eine hohe Reproduzierbarkeit, was sich in der vorliegenden Studie in einer äußerst geringen Standardabweichung niederschlägt. Ein weiterer praktischer Vorteil der Methodik ist die geringe Probenmenge von 100 μ l Vollblut im Vergleich zu ca. 10 ml Vollblut bei Verwendung des EMSA. Daraus ergeben sich bei qualitativ und quantitativ vergleichbaren Ergebnissen verbesserte Einsatzmöglichkeiten z.B. als Screeningmethode von Patienten oder bei Kleintiersversuchsmodellen. Durch Stimulation der Proben mittels LPS kann eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 sicher induziert werden und als ex-vivo-Modell zur Simulation eines septischen Krankheitsgeschehens angewandt werden [74;131;154]. Eine Validierung dieser Methodik erfolgte jedoch bisher nur insofern, dass eine LPS-induzierte Translokation von NF- κ B in den Nukleolus beschrieben wurde, welche mittels klassischer NF- κ B Inhibitoren gehemmt werden konnte [84]. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass der direkte Vergleich von durchflusszytometrischer Bestimmung und den konventionellen Methoden EMSA und

Western blot an monozytären und granulozytären Zellen grundsätzlich vergleichbare Ergebnisse liefert [175;186].

4.1.4 ELISA

Zur Ergänzung der durchflusszytometrischen Ergebnisse wurde die Interleukin-8-Plasmakonzentration mittels Sandwich-ELISA im Rahmen eines Vollblut-Assays ermittelt. Der Vorteil der Vollblutmethodik liegt neben der Erhaltung autokriner Stoffwechselprozesse mit möglichst realistischer Simulation des Entzündungsprozesses in der Vergleichbarkeit mit den durchflusszytometrisch ermittelten Ergebnissen. Die Stimulation mit LPS bietet eine sichere Aktivierung der Zytokinsynthese [155], zeigt jedoch hohe interindividuelle Variationen sowohl im Vollblut als auch bei isolierten Zellen [267]. Auch die vorliegenden Untersuchungen zeigen hohe interindividuelle Schwankungen, gekennzeichnet durch hohe Standardabweichungen. Die Kontrollwerte dieser Studie unterschieden sich deutlich von zuvor gemachten Untersuchungen. Dabei müssen allerdings unterschiedliche Versuchsbedingungen berücksichtigt werden. So zeigte sich in der vorliegenden Versuchsreihe nach 8-stündiger Inkubation mit 10 ng/ml LPS eine durchschnittliche IL-8-Produktion von 900-1000 pg/ml, was deutlich unter den Kontrollwerten von 16 ng/ml einer früheren Untersuchung liegt [154]. Dabei wurde allerdings eine längere Inkubationszeit von 24 h und höhere LPS-Konzentrationen von 100 ng/ml eingesetzt [154]. Wie bereits erwähnt, wird Interleukin-8 nicht ausschließlich von Granulozyten synthetisiert sondern auch durch verschiedene andere Zellreihen wie Monozyten oder Fibroblasten [21;39;179]. Diese Zellen können im Vollblut-Assay divergent reagieren und eventuelle granulozytenspezifische Medikamenteneffekte überlagern [12;118]. Weitere Einflussgrößen wie Plasmaproteine und die Interaktion von Leukozyten untereinander sind mögliche Störfaktoren, die einen Einfluss auf spezifische wie unspezifische Effekte hervorrufen können. Auch dies könnte zu den beobachteten interindividuellen Schwankungen beitragen und die hohen Standardabweichungen erklären. Ferner muss der extensive Kontakt mit der Fremdoberfläche als möglicher Störfaktor in Betracht gezogen werden [138]. Mit Hilfe der ELISA-Methodik können im Rahmen experimenteller Untersuchungen und klinischer Diagnostik Proteine, Viren aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Toxine, Pestizide, etc. in einer Probe nachgewiesen werden.

Sie besitzt als vergleichsweise einfache und kostengünstige Methode einen festen Platz in Forschung und Diagnostik z.B. von Autoimmunerkrankungen, Transplantationsrisiken, Allergien, Infektionskrankheiten, usw. [73;94]. Im Rahmen dieser Studie ist aber auf Grund der hohen Schwankungsbreite die Aussagekraft der Interleukin-8-Bestimmung mittels Sandwich-ELISA im Vergleich zum durchflusszytometrischen Versuchsaufbau eingeschränkt und muss durch weitere Untersuchungsparameter ergänzt werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Angiotensin II ist ein Octapeptid gebildet durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) aus Angiotensin I. Es wirkt im Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem (RAAS) agonistisch auf die Aldosteronfreisetzung aus der Zona glomerulosa der Nebenniere und auch direkt als starker Vasokonstriktor an Arteriolen. Die große Mehrzahl der kardiovaskulären, renalen und adrenalen Effekte werden über direkte Stimulation des Angiotensin Typ-1-(AT₁)-Rezeptors vermittelt. Dies ist ein 7-transmembranöser G-protein gekoppelter Rezeptor, welcher positiv an Proteinkinase C und negativ an Adenylatzyklase gebunden ist. Angiotensin II bindet gleichfalls an einen weiteren Rezeptor, den Angiotensin Typ-2-(AT₂)-Rezeptor [49]. Die damit verbundene Signaltransduktion und Funktion ist jedoch bis heute weiterhin unklar. Neben der Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II metabolisiert das ACE das vasodilatatorische und natriuretische Bradykinin in seine inaktiven Metaboliten. Eine medikamentöse ACE-Hemmung bewirkt somit einerseits eine verminderte Bildung des vasokonstriktorischen Angiotensin II, als auch via verminderter Bradykinininaktivierung eine direkte Vasodilatation [36].

Neben diesen Effekten wird seit geraumer Zeit eine immunmodulatorische Wirkung des Angiotensin II diskutiert und experimentell erforscht. Alvarez et al. zeigten beispielsweise in einem Rattenmodell eine massive Leukozyteninfiltration und -adhäsion nach intraperitonealer Injektion von Angiotensin II sowie signifikante Veränderungen der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 (vaskular-cell-adhesion-molecule-1) und eine gesteigerte Expression von P-Selektin und E-Selektin [7]. Ruiz-Ortega et al. fanden nach systemischer Angiotensin II-Applikation in Ratten einen Anstieg des Tumor-Nekrose-Faktors- α (TNF- α) in Nierenzellen, eine deutliche Synthesesteigerung von Interleukin-6, des Chemokins MCP-1 (monocyte-chemottractant-protein-1) sowie von NF- κ B [212]. Wolf et al. beschreiben den stimulierenden Einfluss von Angiotensin II auf

die Produktion von intrazellulärem ROS (reactive-oxygen-species), Phagozytose und oxidativen Burst [264]. Strawn et al. konnten eine vermehrte CR3 (CD11b/CD18)-Expression auf Monozyten nachweisen [229] und postulieren Assoziationen zwischen gesteigertem oxidativen Stress bei Patienten mit koronarer arteriellen Gefäßkrankheiten und Angiotensin II [230].

Zur Klärung der genauen Mechanismen der Aktivierung immunkompetenter Zellen durch Angiotensin II wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt. Ruiz-Ortega et al. zeigten bei Ratten mit induzierter Immunkomplexnephritis die Supprimierbarkeit von TNF- α durch den ACE-Inhibitor Quinalapril [212]. Strawn et al. wiesen die Expression von AT₁- und AT₂-Rezeptoren auf hämatopoetischen bone-marrow-cells (BMC) sowie marrow-stromacells (MSC) nach und leiteten daraus einen potenziell autokrin-parakrinen Mechanismus für eine lokale Renin-Angiotensin-vermittelte Regulation der Hämatopoese ab [231]. Guba et al. zeigten anhand stimulierter Endothelzellen in einem Hamstermodell in-vivo die Reduktion der Zelladhäsion polymorphkerniger Granulozyten auf Grund verminderter ICAM-1- und VCAM-1-Expression durch den ACE-Inhibitor Enalapril. Die fehlende Wirksamkeit des AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan führte zur Überlegung, dass diese Effekte selektiv durch Angiotensin II vermittelt werden [102]. Da an anderer Stelle jedoch durchaus eine supprimierende Potenz von AT₁-Antagonisten auf die zelluläre Immunität dargestellt werden konnte, bleiben die genauen Mechanismen bis heute unklar [16;130;148;216;228].

4.2.1 ACE-Hemmer-induzierte Veränderungen des Komplementrezeptors CR3 (CD11b/CD18) und des LPS-Rezeptors CD14

Die aktivierten Formen des Komplementrezeptors C3, C3b und C3bi sind zentrale Mediatoren der Komplementkaskade [17]. Sie unterstützten die Adhärenz von zu phagozytierenden Mikroorganismen an Granulozyten und Monozyten und wirken synergistisch mit Immunglobulinen bei der Opsonisierung von Bakterien [246]. Dabei genügen bereits geringe Mengen an C3b-Molekülen zur Aktivierung von Leukozyten [196]. Als Folge kommt es zu einer Ausschüttung der Komplementrezeptoren aus intrazellulären Granula und damit zur vermehrten Expression auf der Oberfläche [141;174;256;277]. In der Aktivierungsphase werden dabei sowohl der Komplementrezeptor CR1 (CD35) als Bindungsstelle für C3bi, als auch

CR3 (CD11b/CD18) als Bindungsstelle für C3b vermehrt exprimiert [95;237]. Dies führt wiederum im Sinne eines autokrinen, positiven Feedbackmechanismus zur Steigerung der Komplementaktivierung mit gesteigerter Opsonisierung und C3-Freisetzung [189]. Die maximale Expression von CR3 (CD11b/CD18) wird dabei nach einer Inkubationszeit von 8 min bei 37°C erreicht [115]. Nach FMLP-Aktivierung konnte eine Verstärkung der Oberflächenrezeptorexpression nach etwa 4-10 minütiger Stimulation registriert werden [64]. Dieser rasche Effekt kann durch die Ausschüttung aus präformierten „Pools“ erklärt werden, eine de-novo Synthese als kausaler Mechanismus entfällt [64]. Bei gesunden Probanden lag das Expressionsmaximum für CR3 (CD11b/CD18) bei 10-15 min [106]. Die in anderen Studien gezeigte Zunahme der Spontanfluoreszenz des CR3 (CD11b/CD18)-Rezeptors bei verlängerter in-vitro Inkubationszeit konnte in dieser Studie nicht beobachtet werden [23;168]. Allerdings zeigte sich ein Rückgang der Stimulierbarkeit von CR3 (CD11b/CD18) um 30 % auf Granulozyten und um 50 % auf Monozyten nach 180 minütiger Inkubation. Dies könnte durch Unterschiede in der Inkubationsweise erklärt werden. Während in den erwähnten Studien die Inkubation mittels Wasserbad durchgeführt wurde, versuchten wir mittels Inkubation im Brutschrank bei 37°C, erhöhter Luftfeuchtigkeit und einem CO₂ Gehalt von 4% möglichst physiologische Bedingungen zu simulieren. Die Mobilisierung der Rezeptoren aus präformierten Pools (Früheffekt) scheint dabei weitestgehend unbeeinflusst, deren Neusynthese (Späteffekt) durch diese Art der Inkubation jedoch gehemmt zu werden.

Die Korrelation zwischen erhöhtem Angiotensin II und vermehrter CR3 (CD11b/CD18)-Expression konnte bereits vielfach dargestellt werden [192;228;229;235]. Wir zeigten in unseren Untersuchungen einen deutlich signifikanten Rückgang der spontanen CR3 (CD11b/CD18)-Expression durch die Inkubation bereits subklinischer Dosierungen von Enalaprilat und Quinaprilat um 20-30 %. Nach Stimulation mit LPS konnte unter ACE-Hemmern im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine Reduktion dieser Oberflächenrezeptoren auf Granulozyten und Monozyten um mehr als die Hälfte erzielt werden. Bereits Schindler et al. untersuchten die Auswirkungen verschiedener ACE-Hemmer auf Zytokine und C3. Sie zeigten eine signifikante Suppression der Il-1 β -induzierten TNF- α und Interleukin-1-Synthese durch Captopril, Enalapril und Cilazapril. Dagegen zeigten Ramipril, Lisinopril, Perindopril und Spirapril keinen Effekt. Ein Einfluss auf die Synthese von monozytärem C3 konnte jedoch für keinen der untersuchten ACE-Hemmer registriert werden [215]. Auch Martinez et al. fanden im Tiermodell an hypertensiven Ratten zwar eine Reduktion der Leukozytenmigration und

-adhärenz sowie des endothelialen intrazellulären Adhäsionsmoleküls-1, jedoch keine Beeinflussung der CR3 (CD11b/CD18)-Expression durch ACE-Hemmer [157].

Dementgegen konnten wir deutlich die Inhibierung der CR3 (CD11b/CD18)-Rezeptorexpression auf Monozyten um mehr als 50% darstellen. Auch Kupatt et al. konnten bei der Untersuchung der Auswirkungen des ACE-Hemmers Cilazaprilat im Tiermodell auf die Leukozyten-vermittelte postischämische Myokardreperfusionstörung eine komplette Suppression von CR3 (CD11b/CD18) durch die ACE-Inhibierung nachweisen [135].

Da Strawn et al. im Tiermodell die Reduktion von CR3 (CD11b/CD18) und anderer zirkulierender Marker (MCP-1, VCAM-1, E-Selektin und CRP) durch den AT₁-Antagonisten Losartan darstellen konnten, ist dieser Effekt somit nicht ACE-Hemmer spezifisch [228]. Die in dieser Studie beschriebenen Langzeiteffekte nach 12 Wochen könnten die von uns beobachteten rasch einsetzenden Wirkungen bereits nach 15 minütiger Inkubation ergänzen.

Die inhibierenden Mechanismen sind bislang jedoch nicht im Detail geklärt. Die Supprimierung von CR3 (CD11b/CD18) durch den AT₁-Antagonisten Losartan zeigt, dass dieser Effekt zumindest teilweise über den AT₁-Rezeptor vermittelt wird. Für die ACE-Hemmer-vermittelte Immunmodulation scheint darüber hinaus die Bradykininfreisetzung eine Rolle zu spielen. Bradykinin induziert zum einen durch den auf Monozyten und Makrophagen exprimierten Bradykininrezeptor 2 (B₂R) die Sekretion von Superoxidradikalen, Arachidonsäure und Prostaglandin E₂ (PGE₂) [216], zum anderen erhöht es über NO-Synthasestimulation die intrazelluläre NO-Konzentration. Bereits Kubes et al. zeigten den Zusammenhang zwischen CR3 (CD11b/CD18)-vermittelter Leukozytenadhäsivität und NO [132]. Für den ACE-Hemmer Cilaprilat konnten Kupatt et al. eine Abnahme der Adhäsivität von neutrophilen Granulozyten und darüber hinaus die Antagonisierbarkeit dieses Effekts mittels Nitro-L-arginin-induzierter NO-Synthaseblockade darstellen [135]. Auch eigene Voruntersuchungen mit dem NO-Synthasehemmer N(Omega)-Nitro-L-arginin-Methyl-ester (L-NAME) deuten in diese Richtung. Die genauen Zusammenhänge diesbezüglich bleiben aber weiterhin zu klären.

CD14 übt über die Bindung an LPS-bindendes Protein (LBP), einen synergistischen Effekt im Rahmen der Toll-like-Rezeptor (TLR) vermittelten Zellaktivierung durch LPS aus. TLR erkennen dabei pathogenspezifische Moleküle und aktivieren über intrazelluläre Signalkaskaden u.a. NF-κB über eine zytoplasmatische Toll/II-1-Rezeptordomäne. Dies

wiederum führt zur gesteigerten Synthese inflammatorischer Mediatoren wie Zytokine oder NO [236]. TLR4 ist dabei anhand rezeptordefizienter Mäuse als der für LPS spezifische Rezeptor identifiziert worden [190]. Seine volle Wirkung wird allerdings erst im Zusammenspiel mit CD14 entfaltet [190].

Der Einfluss von ACE-Hemmern auf die Expression von CD14 konnte bisher nicht suffizient geklärt werden. Sassy-Prigent et al. untersuchten anhand eines Tiermodells den Einfluss u.a. von Cilazapril auf die durch Streptozotozin ausgelöste, diabetische Glomerulosklerose. Zur Evaluation der Frühphase des glomerulären Makrophagenrekrutments wurde nach täglicher ACE-Hemmermedikation (10 mg/kg KG) via RT-PCR die CD14-mRNA-Konzentration quantifiziert. Nach 8 bzw. 30 Tagen konnten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe verifiziert werden [214]. Auf Grund völlig unterschiedlicher Vorgehensweisen und Studienkonzepte sind jedoch deren Ergebnisse mit denjenigen der vorliegenden Studie nicht vergleichbar. Lediglich Lapteva et al. untersuchten bisher den Effekt von Captopril u.a. auf die CD14-Rezeptorexpression in humanen dendritischen Zellen. Dabei ließ sich mittels LPS zwar eine Stimulation der Monozyten im Sinne einer vermehrten CD14-Expression erzielen, eine anschließende signifikante Änderung der CD14-Rezeptorexpression durch Captopril konnte dabei jedoch ebenfalls nicht gezeigt werden [139]. Im Unterschied dazu zeigen unsere Ergebnisse erstmalig an humanen Monozyten eine signifikante Senkung der CD14-Rezeptorexpression durch Enalaprilat und Quinaprilat um bis zu 20%. Gründe dafür mögen die Wahl des ACE-Hemmers oder die Unterschiede im Versuchsaufbau sein. Während unsere Vollblutmethode durch erhaltene Stoffwechselprozesse einen möglichst physiologischen Zustand imitiert, führten Lapteva et al. ihre Untersuchungen an isolierten Monozyten durch. Die lange Inkubationszeit von 24 h, sowie die hohe LPS-Konzentration von 100 ng/ml können weitere Ursachen für die differierenden Ergebnisse darstellen. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie die inhibierende Potenz von Enalaprilat und Quinaprilat auf die LPS-induzierte Rezeptorenexpression im Vollblut-Assay. Die Tatsache, dass auch die unstimulierten Proben durch die ACE-Inhibitoren beeinflusst wurden, weist jedoch auch auf eine mögliche Aktivierung der Leukozyten durch den Kontakt mit der künstlichen Oberfläche des Inkubationsgefäßes hin.

4.2.2 ACE-Hemmer-induzierte Veränderung der Phagozytose und des oxidativen Burst

Die Bindung C3b- bzw. C3bi-opsonisierter Partikel an CR3 fördert die Phagozytosefähigkeit der neutrophilen Granulozyten. Durch die alleinige Gabe von C3b/C3bi bleibt der oxidative Burst als direkt folgender Schritt jedoch nahezu unbeeinflusst [23;75;168]. So zeigt sich keine Korrelation zwischen CR3 (CD11b/CD18)-Expression und Aktivierung der NADPH-Oxidase als Ausdruck einer Zunahme des oxidativen Burst [20;243]. Dies wird durch die Beobachtung, dass es bei Verlängerung der Inkubation auf 180 min zu einem signifikanten Rückgang der Phagozytoserate um 10% kam, während der oxidative Burst davon unbeeinflusst blieb, unterstützt.

Die Beeinflussung der Phagozytoseleistung durch Angiotensin II wurde bereits im Zusammenhang mit der Identifikation von Angiotensin II-Rezeptoren auf Makrophagen durch Weinstock et al. postuliert [250]. Der immunmodulatorische Effekt wurde dabei auf eine Polymerisation von intrazellulärem Aktin zurückgeführt, da die Hemmung der Aktinfilamentinteraktion durch Cytochalasin B den phagozytosefördernden Effekt des Angiotensin II inhibierte [250]. Die Rolle von C3b bei der Interaktion von Angiotensin II und der Phagozytoseaktivität zeigten Foris et al. anhand von Peritonealmakrophagen in verschiedenen Tiermodellen [80]. So konnte eine Steigerung der Phagozytoseleistung durch Angiotensin II im Zusammenhang mit einer signifikant erhöhten C3b-Konzentration dargestellt werden [79]. Belline et al. fanden ebenfalls eine gesteigerte Phagozytoserate durch Angiotensin II und wiesen die inhibitorische Funktion des AT₁-Rezeptors durch Losartan nach [16]. Die inhibitorische Potenz von ACE-Hemmern wurde durch Freischlag et al. bestätigt, die anhand von isolierten humanen PMN die signifikante Reduktion der Phagozytoseleistung durch Enalapril mittels verminderter Ingestion von opsonisiertem Zymosan darstellen konnten [87]. Dies entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Studie, in der eine deutlich signifikante Hemmung der Phagozytose um bis zu 60% durch Enalaprilat und Quinaprilat gezeigt werden konnte. Die Inhibierung der CR3 (CD11b/CD18)-Expression in vergleichbarer Größenordnung legt einen kausalen Zusammenhang zwischen Oberflächenrezeptorexpression und funktioneller Aktivität der zellulären Immunität nahe. Die Verwendung von vitalem, vermehrungsfähigem *Staphylococcus aureus* erhöht dabei die Aussagekraft in Bezug auf klinisch relevante septische Krankheitsbilder.

Der oxidative Burst wird durch die membranständige NADPH-Oxidase induziert. Zuerst werden Sauerstoffmetabolite produziert, in dem O_2 -Moleküle in Perhydroxylradikale (HO_2^{\bullet}) und Superoxidanionen (O_2^-) umgewandelt werden [15;68;188]. H_2O_2 wird durch einen aus einem membranständigen und einer zytosolischen Komponente bestehenden NADPH-Oxidase-Komplex durch Umwandlung von O_2^- -Anionen erzeugt [30;203]. Rodgers et al. demonstrierten anhand von Peritonealmakrophagen und Blutmonozyten nicht nur einen Einfluss von Angiotensin II auf die Phagozytoseleistung sondern auch dessen Rolle im Rahmen des oxidativen Burst [204]. Auch Prabha et al. zeigten die Korrelation von erhöhten Angiotensin II-Konzentrationen und gesteigerter Produktion freier Radikale in PMN [191]. Die Sekretion von Angiotensin II führt dabei über eine Induktion der NADPH-Oxidase zur Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten, O_2^- sowie H_2O_2 und damit zu einer Steigerung des oxidativen Stress in unterschiedlichen Zellen [83;101;220;238;251]. Die gesteigerte Aktivität der NADPH-Oxidase durch Angiotensin II spiegelt sich dabei im Nachweis von gp91phox, einer NADPH-Subeinheit, wider. Dieser Mechanismus wird durch den AT_1 -Rezeptorantagonisten Losartan gehemmt [148]. Auch für die ACE-Hemmer Quinapril und Ramiprilat konnte eine Hemmung von Parametern des oxidativen Burst gezeigt werden. Während die Enalaprilwirkung auf freie Radikale zumindest teilweise auf die bradykininvermittelte NO-Freisetzung zurückgeführt wird, wurde für Captopril eine direkte reduzierende und somit radikalfangende Wirkung diskutiert. So fanden Egan et al. eine direkte Reduktion von Fe^{3+} -Cytochrom C durch Captopril und bezogen diesen Effekt auf dessen endständige Thiol-Gruppe [70]. Auch Bagchi et al. wiesen für Captopril diese Wirkung nach, wobei der genaue Mechanismus aber weiterhin nicht abschließend geklärt ist [9]. Um eine direkte Interaktion auf Grund der chemischen Struktur möglichst auszuschließen, untersuchten wir daher die ACE-Hemmer Enalaprilat und Quinaprilat, für die eine eigenständige radikalfangende Potenz nicht beschrieben ist. Im Einklang mit den genannten Studien zeigen unsere Untersuchungen eine Hemmung des oxidativen Burst durch die ACE-Inhibitoren im Sinne einer Reduktion der intrazellulären H_2O_2 -Produktion um bis zu 20%.

4.2.3 ACE-Hemmer-induzierte Veränderungen der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1

Eng verbunden mit der Stimulation von Oberflächenrezeptoren, Phagozytoseleistung und oxidativem Burst kommt der transkriptionellen Induktion im Rahmen des Endzündungsprozesses eine zentrale Position zu. In zahlreichen Studien konnten die im oxidativen Burst entstehenden reaktiven Sauerstoffmetaboliten als Aktivator von NF- κ B und als Induktor von Interleukin-8 identifiziert werden [3;11;51;205;206;217]. Bereits Naftilan et al. zeigten im Tiermodell an glatten Muskelzellen die Induktion der Protoonkogene c-fos und c-myc und des Proteinprodukts AP-1 durch Angiotensin II mit konsekutiv gesteigerter Synthese von platelet-derived-growth-factor (PDGF) [171]. Fujita et al. fanden bei der Untersuchung einer möglichen karzinogenen Wirkung von Angiotensin II eine gesteigerte Aktivität von Proteinkinase C, AP-1 und NF- κ B in Fibroblasten sowie eine Erhöhung von angiogeneseinduzierendem vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) [89]. Ferner konnte die Aktivierung von NF- κ B durch Angiotensin II in humanen glatten Muskelzellen dargestellt werden sowie eine Angiotensin II-assoziierte Synthesesteigerung von Interleukin-6 und dessen Suppression mittels Captopril, Ramiprilat und dem AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan [130]. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch für isolierte humane Monozyten. Auch hier ließ sich die Angiotensin II-vermittelte Stimulation von NF- κ B durch Losartan vermindern. [129].

Neuere Untersuchungen von Söhnlein et al. zeigen u.a. den Einfluss von ACE-Hemmern auf die Angiotensin II-induzierte intrazelluläre NF- κ B-Aktivität in humanen Endothelzellen in-vitro. Durchflusszytometrisch konnte dabei die signifikante Reduktion der intranukleären p65 Translokation nach 20 stündiger Inkubation mit 1 μ M Ramiprilat dargestellt werden ($p < 0,01$) [225]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigen die Daten der vorliegenden Studie ebenfalls eine konzentrationsabhängige Reduktion von NF- κ B in Monozyten von 30-40 % durch die ACE-Hemmer Enalaprilat und Quinaprilat. Auch bei diesen durchflusszytometrisch erhobenen Daten war die Standardabweichung gering, so dass ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$ erreicht wurde. Im Gegensatz zur langen Inkubationszeit von Söhnlein et al. zeigen die vorliegenden Untersuchungen eher einen ACE-Hemmer spezifischen Früheffekt. So konnten die gezeigten Effekte bereits nach 15 minütiger Inkubation determiniert werden. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 3 h brachte dabei keinen signifikanten Unterschied. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für die intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors in polymorphkernigen

neutrophilen Granulozyten gezeigt werden. Auch hier führte die Inkubation mit Enalaprilat und Quinaprilat zu einer deutlich dosisabhängigen Reduktion von NF- κ B um 20-30%. In-vivo zeigten Gupta et al. anhand eines Tiermodells den Zusammenhang von vermehrter NF- κ B-Expression und kardialer Hypertrophie sowie die signifikante Reduktion des Transkriptionsfaktors unter mehrwöchiger Captoprilmedikation [103]. Dabei determinierten sie anhand von Ratten mit induzierter Hypertension ein im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhtes NF- κ B-Niveau. Nach 10 wöchiger Captoprilmedikation (25 mg/kg/d) zeigte sich nicht nur eine Reduktion des entsprechenden Herzgewichts, sondern auch eine Reduktion der NF- κ B-Aktivität (169 ± 5 vs. 106 ± 12) [103]. Demgegenüber fanden Dandona et al. bei ihren Untersuchungen anhand gesunder Probanden keine Beeinflussung der intrazellulären NF- κ B-Konzentration durch den ACE-Hemmer Quinalapril [48]. Untersucht wurde via EMSA und Western blot die Beeinflussung der intrazellulären NF- κ B-Aktivität von Monozyten nach 7 tägiger Einnahme von 40 mg Quinalapril und 160 mg Valsartan. Während Valsartan alle untersuchten Parameter (NF- κ B, CRP, ROS) signifikant beeinflusste, zeigte Quinalapril keinen Effekt. Dies überrascht, da zum einen ACE-Hemmer, wie bereits dargestellt, die entsprechende Potenz zeigen, zum anderen in unseren Untersuchungen deutlich die Reduktion der NF- κ B-Aktivität um 20-30% auf PMN und 30-40% auf Monozyten gezeigt werden konnte. Gründe dafür mögen sein, dass es sich bei den von Dandona et al. untersuchten Probanden um junge, gesunde Probanden mit folglich inaktivem Immunstatus handelt, die gewonnenen Zellen jedoch später in-vitro nicht stimuliert wurden. Auch in unseren Untersuchungen zeigten die determinierten ACE-Hemmer selbst in hoher Dosis (100 ng/ml) keine Beeinflussung der Spontanexpression von intrazellulärem NF- κ B. Folglich wäre die Untersuchung an einem entsprechenden Patienten-/Probandenkollektiv mit nachgewiesener gesteigerter NF- κ B Aktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine denkbare Konzeption zur Klärung des Sachverhaltes. Des Weiteren zeigen die dargestellten Effekte der vorliegenden Untersuchung nach LPS-Stimulation einen Rückgang der maximalen Stimulierbarkeit bereits nach 3 stündiger Inkubation. So könnten die beobachteten Effekte nach 7 tägiger Quinalapril Einnahme bereits abgeklungen sein. Die Erkenntnisse bezüglich der genauen Mechanismen dieser Effekte differieren zum Teil erheblich. So postulierten Schönlein et al. auf Grund einer reduzierten AT₁- bei unveränderter AT₂-Expression durch Ramiprilat die Rezeptorselektivität der immunmodulatorischen Potenz via AT₁ [225]. Dem gegenüber fanden Wolf et al. sehr wohl eine Aktivierbarkeit von NF- κ B über den AT₂-Rezeptor [265]. Da es bislang keine

ausreichenden Experimente zu allen NF- κ B-Subeinheiten gibt sowie die genauen Interaktionen zwischen AT₁- und AT₂-Rezeptor weiterhin unklar sind, können dazu derzeit keine definitiven Aussagen getroffen werden [265].

Die Interaktion von AP-1 und Angiotensin II wurde bereits durch die Untersuchungen von Kim et al. beleuchtet [125]. Untersucht wurde dabei die zentrale Rolle in der AP-1 Aktivierung durch ERK's (extracellular-signal-regulated-kinase) und JNK's (c-jun-NH₂-terminal-kinase) aus der Familie der MAP-Kinasen (mitogen-activated-protein-kinase). JNK's moduliert dabei via Phosphorylierung spezifischer c-jun Promoterregionen die Aktivierung von AP-1. Am Tiermodell zeigte man die Beeinflussung dieser Faktoren mittels ACE-Inhibition (Cilazapril) und AT₁-Rezeptorantagonismus (E4177). Beide Substanzen führten dabei zu einer signifikanten Verminderung der arteriellen JNK-Aktivierung durch den ACE-Hemmer Cilazapril sowie einer deutlichen Reduktion der DNA-Bindungsaktivität von AP-1 [125]. Bestätigt wurden die Ergebnisse durch Otsuka et al., die ebenfalls im Tiermodell ähnliche Effekte für Cilazapril zeigen konnten [181]. Yoshiyama et al. beleuchteten die Rolle von MAPK's, AP-1 und NF- κ B im linksventrikulären Remodelling nach induziertem Infarkt. Nach Ligation der linken Koronararterie konnte in Kardiomyozyten ein signifikanter Anstieg von AP-1 und NF- κ B nach 5-7 Tagen verzeichnet werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die Ratten mit Temocaprilmedikation (3 und 30 mg/kg/d) eine deutliche Supprimierung der JNK's, NF- κ B- und AP-1-Aktivität [272]. Im Gegensatz dazu konnten Frantz et al. den Einfluss des ACE-Hemmers Trandolapril auf die NF- κ B- und AP-1-Konzentration in Kardiomyozyten sowohl tierexperimentell als auch anhand explantierter humaner Herzzellen nicht darstellen [86]. Da es sich hierbei um ein Patientenkollektiv mit immunsuppressiver Steroidmedikation handelt, sind die Aussagen dieser Studie dahingehend eingeschränkt. Auch scheint der ACE-Hemmereffekt auf die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 in unterschiedlichen Zellsystemen unterschiedlich ausgeprägt zu sein. So fanden Ortiz et al. bei der Untersuchung von Mäusen mit pulmonalem Hypertonus nicht nur eine Reduktion der TNF- α -induzierten NF- κ B- und AP-1-Konzentration durch Enalapril, sondern zeigten auch dessen protektiven Effekt im Rahmen der pulmonalen Hypertonie [180].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen deutlich den Einfluss der ACE-Inhibitoren Enalaprilat und Quinalaprilat auf humane Monozyten und Granulozyten. Ob die dargestellten Effekte auch nach dem Zeitraum von 3 h noch nachweisbar sind und somit

unter mehrtägiger bzw. mehrwöchiger ACE-Hemmermedikation in-vivo klinische Relevanz besitzen, bleibt in weiteren Untersuchungen zu klären.

4.2.4 ACE-Hemmer-induzierte Veränderungen der Interleukin-8-Synthese

Interleukin-8 gehört zur Gruppe der Chemokine und ist ein proinflammatorisches Zytokin. Es wird von einer Vielzahl von Zellen u.a. Monozyten, Granulozyten, endothelialen Zellen und Fibroblasten produziert [21;179]. Verschiedene inflammatorische Stimuli wie LPS, TNF- α , IL-6 und IL-1 β sowie physikalische Reize sind in der Lage, eine vermehrte Interleukin-8-Produktion zu induzieren. Die Regulation erfolgt dabei auf transkriptioneller Ebene über Bindung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, AP-1 und NF-IL-6 an Sequenzen im Interleukin-8-Promoter [133]. Im Entzündungsprozess stellt Interleukin-8 einen potenten und spezifischen Entzündungsmediator dar, welcher mittels Demargination, Aktivierung und Chemotaxis neutrophiler Granulozyten proinflammatorische Vorgänge verstärkt. Durch Sekretion von Interleukin-8 unterhalten und verstärken neutrophile Granulozyten ihren Aktivierungsgrad im Sinne eines autokrinen Regulationsmechanismus. Zwei Hauptaufgaben sind für Interleukin-8 beschrieben: Zum einen induziert und unterhält IL-8 die Chemotaxis von Leukozyten entlang eines steigenden Konzentrationsgradienten zum Infektionsort; zum anderen führt es über Konformationsänderungen zur Stabilisierung der rollenden Interaktionen von Leukozyten und Endothelzellen [195;278]. Im Rahmen septischer Krankheitsgeschehen, nach Trauma oder Verbrennungen ist Interleukin-8 neben anderen proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und Interleukin-6 signifikant erhöht [96;153;156;161;239;245]. Eine Stimulation mittels LPS führt über die Aktivierung von TNF- α zu einer synchronen Aktivierung der IL-8- und IL-6-Sekretion und ist als in-vitro Stimulation zur Simulation septischer Krankheitsbilder geeignet [52;121].

In dieser Studie diente der Nachweis von Veränderungen der Interleukin-8-Produktion zum einen der Darstellung eines NF- κ B bzw. AP-1 regulierten Endprodukts, zum anderen der Bestätigung der durchflusszytometrisch beobachteten hemmenden Effekte von ACE-Inhibitoren auf die Phagozytenfunktion. Es konnte trotz hoher Standardabweichungen eine Reduktion der Interleukin-8-Konzentration sowohl für Quinaprilat als auch Enalaprilat bereits nach 15 minütiger Inkubation gezeigt werden. Durch Verlängerung der Inkubationszeit und damit verbundener längerer Kontaktzeit der Monozyten und Granulozyten mit Fremdoberflächen erhöhte sich die Standardabweichung derart, dass das Signifikanzniveau hier nicht mehr erreicht wurde. Die Aktivierung der

Leukozyten durch den prolongierten Kontakt mit Fremdoberflächen spielt hierbei möglicherweise eine Rolle. Dennoch war auch hier die hemmende Wirkung der ACE-Inhibitoren auf die IL-8-Produktion tendenziell zu erkennen. Hernandez-Presa et al. zeigten im Rahmen eines Atherosklerosetiermodells den Einfluss von Quinaprilat auf die NF- κ B-Aktivität, MCP-1-Konzentration und IL-8-Synthese. Eine orale Applikation von Quinalapril führte dabei nach 28 Tagen zu einer signifikanten Reduktion der untersuchten Entzündungsparameter bei atherosklerotischen Kaninchen [108]. Für Ramipril demonstrierten Jones et al. eine signifikante Reduktion der Interleukin-8-Synthese in isolierten Mastzellen an subtotal nephrektomierten Ratten [116]. Schmeisser et al. zeigten anhand eines Patientenkollektivs mit Atherosklerose die Angiotensin II-induzierte Hochregulierung von Interleukin-8, MCP-1 und NF- κ B in Monozyten und Endothelzellen. Gleichfalls stellten sie die differenten Effekte des ACE-Inhibitors Ramipril, des AT₁-Antagonisten Losartan und des AT₂-Blockers PD 123.319 dar. Während Ramipril und Losartan zu einer deutlich signifikanten Reduktion von IL-8 und MCP-1 führten, zeigte PD123.319 keinen Effekt. Ferner zeigten sie die Reduktion der AT₁-Rezeptoren auf Monozyten und Endothelzellen durch Ramipril. Dies zeigte erstmalig den differenten immunmodulatorischen Wirkmechanismus über eine Reduktion von NF- κ B durch ACE-Hemmung einerseits, aber auch via direkter Rezeptordownregulation andererseits [216].

In der vorliegenden Studie ergänzen die durchflusszytometrischen Ergebnisse zu zellulären Immunparametern den eindeutig hemmenden Trend der ACE-Hemmer auch in Bezug auf die Interleukin-8-Sekretion. Auf Grund der hohen interindividuellen Schwankungen wurde bei der Bestimmung der Interleukin-8-Synthese als Downstream-Parameter jedoch kein signifikanter Effekt erzielt.

Zusammenfassend betrachtet weisen die inhibitorischen Effekte von Quinaprilat und Enalaprilat auf die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 sowie die Hemmung der LPS-induzierten IL-8-Produktion auf einen kausalen Wirkmechanismus hin. Somit konnte hier erstmalig der Einfluss von Enalaprilat und Quinaprilat auf Monozyten und Granulozyten an unterschiedlichsten Ebenen zellulärer Immunität in-vitro gezeigt werden. Der den physiologischen Verhältnissen angepasste Versuchsaufbau und die Erhaltung von intra- und interzellulären Stoffwechselprozessen erhöht dabei die Aussagekraft hinsichtlich klinisch relevanter Entzündungsvorgänge. Weitere in-vivo Untersuchungen, z.B. anhand eines kardiochirurgischen Patientenkollektivs, könnten interessante Aspekte über die tatsächliche klinische Nutzbarkeit dieser Ergebnisse liefern.

4.2.5 Mögliche klinische Relevanz und Ausblick

Die klinische Relevanz und die potenzielle therapeutische Nutzung immunmodulatorischer Nebeneffekte von ACE-Inhibitoren sind vielfältig. Die meisten Untersuchungen diesbezüglich gibt es im Rahmen von Untersuchungen zur Atherosklerose, einem Krankheitsbild mit weltweit enormer Morbidität und Mortalität [77]. Lokale und systemische inflammatorische Prozesse des Gefäßendothels, perivaskulär und der glatten Gefäßmuskulatur sind dabei pathophysiologisch bedeutsam [201;209]. Unterschiedlichste intra- und interzelluläre Stoffwechselprozesse sowie verschiedenste Mediatoren und Aktivatoren sind involviert. Die genaue Pathogenese der Atherosklerose ist jedoch bis dato nicht abschließend geklärt. Die Aktivierung verschiedenster proinflammatorischer, immunologischer Parameter (wie NF- κ B, AP-1, TNF- α , MCP-1, ICAM, VCAM, ET-1, MAPK's, PDGF, VEGF, Chemokine, Zytokine, Komplement, etc.) und funktioneller Prozesse wie Phagozytose und oxidativer Burst, sowie in deren Rahmen entstehende reaktive Metaboliten spielen eine entscheidende Rolle. Eine zentrale, aktivierende Funktion ist dabei für Angiotensin II zu definieren [130;171;220]. Lokale, zelluläre, aber auch systemische Renin-Angiotensin-Systeme werden in diesem Zusammenhang erwähnt. Die Blockade von Angiotensin II durch verschiedenste ACE-Inhibitoren senkt dabei signifikant die Produktion der unterschiedlichen proinflammatorischen Mediatoren [108;172]. Dabei werden verschiedene Signaltransduktionswege diskutiert: Zum einen können direkte AT₁-Rezeptor-vermittelte Vorgänge [125;128;216], zum anderen aber auch sekundäre Effekte durch Veränderungen z.B. in der Bradykininkonzentration mit sekundärer NO-Vermehrung [45;83;220;269] und direkt reduzierende Bestandteile von ACE-Hemmern wie Sulfhydryl- [45;221] und Thiolgruppen [70] eine Rolle spielen. Der Nachweis von AT-Rezeptoren auf unterschiedlichen Zellen wie Endothelzellen, Monozyten oder Myozyten der Gefäßmuskulatur etc. stützten diese Überlegungen [8;231]. Widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf verschiedene Angiotensinrezeptorantagonisten wie Losartan, Valsartan, Candesartan, E4177, PD123.319, etc. machen eindeutige Aussagen jedoch schwierig [16;102;125;130;192;228-230;265].

Verschiedene Studien (z.B. HOPE, OPTIMAAL) belegen die Verbesserung der klinischen Situation und des Outcomes atherosklerotisch vorbelasteter Patienten unter ACE-Hemmertherapie [54;274]. Durch die Applikation von ACE-Hemmern verbessert sich nicht nur die allgemeine Gefäßsituation von Patienten mit essentieller Hypertonie, [57;238] es zeigen sich auch positive Effekte bei koronararteriellen Verschlüssen,

postischämischem Zellrecruitment und Remodelling in-vitro und in-vivo [102;135;136;272] sowie eine allgemeine Kardioprotektion [37;219]. Bei diesen pathophysiologischen Vorgängen spielen Phagozyten, insbesondere Monozyten und Granulozyten, eine entscheidende Rolle. Immunmodulierende Effekte auf diese Zelltypen könnten somit die Entstehung bzw. das Fortschreiten einer Arteriosklerose als inflammatorischen Prozess maßgeblich beeinflussen. Vor allem bestimmte Risikogruppen könnten von derartigen Effekten profitieren [264]. So ist für Patienten mit diabetogener Stoffwechsellage, metabolischem Syndrom oder diabetischen Endsyndromen wie der diabetischen Nephropathie ein ACE-Hemmer-induzierter Benefit wahrscheinlich [123;214]. Insbesondere weil diese Erkrankungen zunehmend mit Entzündungsvorgängen unter maßgeblicher Beteiligung von Monozyten und Granulozyten assoziiert werden.

Interessant wäre folglich ein Einsatz von ACE-Hemmern bei kritisch Kranken mit SIRS, Sepsis und MODS (multi-organ-dysfunction-syndrome). Französische Erhebungen zufolge entwickeln etwa 50% aller Intensivpatienten ein unterschiedlich ausgeprägtes SIRS, etwa 10-15% eine Sepsis mit Organdysfunktionen, von denen wiederum etwa ein Viertel einen septischen Schock erleiden. Die Sterblichkeit bei SIRS beträgt je nach Altersgruppe, Vorerkrankungen, etc. 7-17%, bei Sepsis 20% und bei septischem Schock 46% [33]. Ursache des septischen Krankheitsgeschehens ist die Infektion mit gramnegativen oder grampositiven Erregern sowie Mischinfektionen. Als Kriterien für die Diagnose der Sepsis gelten die sogenannten ACCP/SCCM-Konsensus-Konferenz-Kriterien von 1992 [1]. Beim SIRS handelt es sich um ein sepsisähnliches, systemisches Krankheitsgeschehen jedoch ohne Nachweis des auslösenden Erregers. Gemein ist beiden die massive Aktivierung vor allem der unspezifischen zellulären und humoralen Abwehr mit den bereits beschriebenen Faktoren. Eine zentrale Bedeutung kommt dabei den Zytokinen zu. Bei überschießender und unkontrollierter Produktion im SIRS kommt es zum „Capillary Leak Syndrome“ mit Übertritt von Plasmabestandteilen in das Gewebe sowie zur direkten Zellschädigung durch toxische Sauerstoffmetaboliten. Die Folge sind akute Organdysfunktionen, wie septische Kardiomyopathie, ARDS, akutes Nierenversagen, Leberfunktionsstörungen, disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) und neurologische Störungen. Durch die Simulation eines septischen Krankheitsgeschehens in der vorliegenden Studie unter möglichst physiologischen Bedingungen in-vitro konnte nicht nur die Hemmung verschiedener Signaltransduktionswege in Phagozyten gezeigt werden sondern auch die Verminderung der Funktionen „Phagozytose“ und „oxidativer Burst“. Diese Ergebnisse legen einen positiven Einfluss von ACE-Inhibitoren in Bezug auf

endotheliale Dysfunktion und „capillary leak“ im Rahmen der Sepsis nahe. Wiel et al. zeigten im Tiermodell, dass Perinopril via NO die endotheliale Dysfunktion in einem endotoxininduzierten Schock positiv beeinflussen kann [260]. In einer klinischen Studie wurde ferner ein positiver Effekt von Enalaprilat auf die endotheliale Funktion bei kritisch kranken Patienten dargelegt: In einem septischen Patientenkollektiv (n=40) konnte eine deutliche Reduktion der endothelassozierten Faktoren Endothelin-1 und Thrombomodulin sowie verschiedener Adhäsionsmoleküle (endothelial-leukozyte-adhesion-molecule-1, intercellular-adhesion-molecule-1, vascular-cell-adhesion-molecule-1 und granule-membrane-protein-140) unter kontinuierlicher Applikation von 0,25mg/h Enalaprilat im Vergleich zum Placebo gezeigt werden [28]. Laurent et al. beschrieben die Rolle des Komplementrezeptor CR3 (CD11b/CD18) im Rahmen des ARDS [142] und Gao et al. den therapeutischen Effekt seiner Blockade [91]. Im Tiermodell steigerte Captopril signifikant den arteriellen Sauerstoffpartialdruck (paO₂), reduzierte den pulmonalarteriellen Druck (PAP) und die Anzahl zirkulierender Endothelzellen als Maß für den pulmonalen Kapillarschaden und hat somit positive Auswirkungen im ARDS [147]. De Gusmao et al. zeigten kürzlich den positiven Einfluss von Captopril im Rahmen des myokardialen Reperfusionsschadens nach Ischämie [50]. Die dabei gezeigte verminderte Leukozyteninfiltration und Verbesserung der myokardialen Kontraktilität machen deren Einsatz im Rahmen von septischen Kardiomyopathien oder auch bei myokardialen Ischämien interessant. Auch die deutliche Reduktion entzündlicher Parameter und die Verbesserung des Outcomes bei Patienten mit Nephropathien [4;35;123;127;128;167;212;214;234;265] sowie die Untersuchungen von ACE-Inhibitoren bei Septikämien deuten auf einen supportiven Effekt im septischen Krankheitsgeschehen hin [92]. In einer weiteren Untersuchung von Boldt et al. zeigten Intensivpatienten nach 5-tägiger kontinuierlicher Enalaprilatinfusion eine signifikante Verbesserung kardiorespiratorischer Parameter wie Cardiac Index (CI), Sauerstoffangebot (DO₂), Sauerstoffaufnahme (VO₂), Sauerstoffextraktionsrate (O_{2ER}) und Blutlaktatkonzentration [27]. Bezüglich des Outcomes divergieren die Ergebnisse für mit ACE-Hemmern behandelte kritisch kranke Patienten mit SIRS/Sepsis. Während Belline und Rodgers et al. die klinische Relevanz immunmodulatorischer Effekte von ACE-Hemmern postulierten, fanden Graninger et al. keine relevante Verbesserung des Outcomes [16;98;204]. Im Rahmen der Sepsis mit ihren multimodalen Induktionswegen ist eine ACE-Hemmermedikation damit durchaus als supportive Therapieoption mit immunmodulatorischem und kardiovaskulärem Effekt denkbar. Diese Hypothese wird

durch die vorliegenden Ergebnisse gestützt, muss allerdings anhand klinischer Studien überprüft werden. Die Untersuchung der bereits in-vitro dargestellten Parameter in-vivo an einem intensivmedizinischen Patientenkollektiv verbunden mit einer Outcome-Erhebung mittels Scoringsystem (SOFA, MOF, Apache II, etc.) wäre eine denkbare Konzeption zur Klärung dieser Fragestellung.

Da Sepsis bzw. SIRS häufig postoperative Komplikationen darstellen, wäre auch ein Studiendesign denkbar, bei dem im Rahmen der Prämedikation bzw. dem Einsatz unter kontrollierten Narkosebedingungen anhand eines Patientenkollektivs eine immunmodulatorische Potenz untersucht wird. Die Prämedikation mittels ACE-Hemmern bzw. deren intraoperativer Einsatz wird auf Grund kardiovaskulärer Nebenwirkungen, vor allem schweren Hypotonien, kontrovers diskutiert [31;44]. Insbesondere gilt dies für akute hypovolämische Zustände z.B. bei hohen intraoperativen Blutverlusten. Allerdings wird bei adäquater, präoperativer Volumentherapie die Unterbrechung einer ACE-Hemmerdauertherapie nicht empfohlen [44].

Kardiochirurgische Eingriffe führen zu einer Imbalance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen [159;247;276], die signifikant zur Morbidität nach kardiopulmonalen Bypass-Operationen (CPB) beiträgt [111]. Bereits Boldt et al. zeigten, dass die perioperative Applikation von Enalapril im Sinne eines kardioprotektiven Effektes myokardischämiespezifische Parameter wie Kreatinkinase-MB (CK-MB) und Troponin T deutlich geringer ansteigen ließ als in einer unbehandelten Kontrollgruppe [29]. Bei Ischämie-Reperfusionsvorgängen wird den zirkulierenden Granulozyten und Monozyten, die in der Reperusionsphase am Endothel adhärieren und in das umliegende Gewebe migrieren, eine entscheidende Bedeutung zugemessen. Der inhibierende Effekt von ACE-Hemmern auf die Expression von Adhäsinen im Reperfusionssyndrom könnte positive Auswirkungen haben. Kwapisz et al. zeigten den hämodynamisch vorteilhaften Einsatz von Quinaprilat unter CPB [137]. Untersucht wurde in einer randomisierten Doppelblindstudie die Auswirkung der intravenösen Applikation von 0,08 mg/kg KG Quinalapril versus Placebo bei 40 Patienten vor elektiver koronararterieller Bypass-OP auf proinflammatorische bzw. vasoaktive Parameter (IL-1 β , IL-8, TNF- α , IL-10, IL-1-Rezeptorantagonist und Angiotensin II). Im Gegensatz zu den deutlichen Ergebnissen der hier vorliegenden Studie zeigte sich dabei kein Einfluss von Quinalapril auf die gewählten proinflammatorischen Zytokine. Mögliche Ursachen mögen das gewählte Verfahren sein (ELISA) mit den bereits beschriebenen Nachteilen für die in-vivo Beurteilung eines dynamischen Zytokinprozesses, das inhomogene Patientenkollektiv mit seinem unklaren

Einfluss auf die Zytokinproduktion [13;218;259], die Vollheparinisierung [184] oder auch die Wahl der detektierten Parameter sein. Im Gegensatz zu unserer Untersuchungsreihe wurden zelluläre Immunparameter nicht bestimmt. Die in der vorliegenden Untersuchung erhobenen funktionellen Parameter wie Phagozytose und oxidativer Burst oder die Expression der Oberflächenrezeptoren erscheinen jedoch eher geeignet, die körpereigene inflammatorische Reaktion bei herzchirurgischen Eingriffen zu determinieren [41;162;176;185;247;271]. Bislang ist die Bedeutung von ACE-Hemmern auf die in-vivo Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1 ungeklärt. Yeh et al. zeigten anhand eines Tiermodells deutlich verringerte postoperative Werte von NF- κ B, TNF- α und Interleukin-8 sowie eine Reduktion des myokardspezifischen Troponin T nach CPB bei Prämedikation mit einem NF- κ B-Inhibitor. Eine Modulation der transkriptionellen Aktivität, z.B. durch einen ACE-Hemmer könnte einen interessanten Therapieansatz darstellen [270].

Die einmalige ACE-Hemmerinjektion scheint die Angiotensin II-Plasmaspiegel während des gesamten Beobachtungszeitpunkts ausreichend zu supprimieren. Die vorliegenden in-vitro Ergebnisse zeigen, dass die beobachtbaren Effekte der ACE-Inhibitoren bereits nach 15 minütiger Inkubation festzustellen waren. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 3 h erbrachte keine signifikante Veränderung der Ergebnisse, so dass in weiteren klinischen Untersuchungen insbesondere kurzfristige Effekte berücksichtigt werden sollten. Eine langfristige Wirkung kann dabei jedoch nicht ausgeschlossen werden. Unklar bleibt, inwieweit die von uns in-vitro an einem gesunden Probandenkollektiv beobachteten Ergebnisse auf in-vivo Patientenkollektive übertragbar sind. Dies sollte in weiteren klinischen Studien z.B. an herzchirurgischen oder intensivmedizinischen Patienten evaluiert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Ausweitung der Therapieoptionen durch einen immunmodulatorischen und in diesem Zusammenhang kardioprotektiven Effekt von ACE-Inhibitoren die Behandlung von kritisch Kranken und kardiochirurgischen Patienten positiv beeinflussen könnte. Die durchflusszytometrische Bestimmung als schnelles und reproduzierbares Verfahren könnte im Rahmen von in-vitro- und in-vivo-Studien zu einem besseren Verständnis der Immunvorgänge beitragen, die durch ACE-Hemmer beeinflusst werden.

5 Zusammenfassung

Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)-Inhibitoren haben als effektive Antihypertensiva heute einen festen Platz in der Behandlung von Hypertonie und myokardialer Insuffizienz. Seit geraumer Zeit wird auch eine immunmodulatorische Potenz diskutiert. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden mittels Vollblut-Assay durchflusszytometrisch die Effekte von ACE-Inhibitoren auf die Funktion neutrophiler Granulozyten und Monozyten untersucht. Anhand eines Kollektivs gesunder Probanden konnten die differenten Effekte von verschiedenen Enalaprilat- und Quinaprilatkonzentrationen auf unterschiedlichen Ebenen der zellulären Immunität zu unterschiedlichen Zeitpunkten determiniert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Enalaprilat und Quinaprilat deutliche Effekte auf die schnelle zelluläre Immunantwort besitzen. Dabei wurde die spontane, ebenso wie die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Expression der Oberflächenrezeptoren CR3 (CD11b/CD18) und des LPS-Rezeptors CD14 bereits nach kurzer Inkubationszeit signifikant supprimiert. Außerdem konnte eine signifikante Reduktion in der LPS-induzierten Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 sowie eine Hemmung funktioneller Parameter wie Phagozytose und oxidativer Burst dargestellt werden. Zur Ergänzung der durchflusszytometrischen Daten wurden zusätzlich derartige Effekte auf die Synthese des Zytokins Interleukin-8 mittels Sandwich-ELISA untersucht. Zwar zeigen die Ergebnisse ebenfalls eine Reduktion der Interleukin-8-Synthese, auf Grund hoher Standardabweichungen wurde das Signifikanzniveau jedoch nicht erreicht. Die immunmodulatorische Potenz von ACE-Hemmern könnte dazu beitragen, immunassoziierte Erkrankungen positiv zu beeinflussen, oder inflammatorische Risiken operativer Eingriffe zu minimieren. Weitere klinische Untersuchungen z.B. anhand eines kardiochirurgischen Patientenkollektivs sind erforderlich, um diese Ergebnisse hinsichtlich ihrer in-vivo Bedeutung zu klären. Der in dieser Studie verwendete durchflusszytometrische Assay stellt dabei ein schnelles, reproduzierbares Verfahren zu Klärung derartiger Fragestellungen dar.

6 Summary

ACE-inhibitors as effective antihypertensive drugs play an important role in the treatment of hypertension and chronic heart failure. Immunomodulatory effects of ACE-inhibitors have been postulated. We therefore evaluated the effects of ACE-inhibitors on neutrophil granulocyte and monocyte function in a whole blood flow cytometric assay.

Based on a study population of healthy volunteers we determined concentration and time dependent effects of enalaprilat and quinaprilat on different levels of cellular immunity. We showed a significant inhibition in the LPS-induced expression of complement receptor CR3 (CD11b/CD18) as well as the LPS receptor CD14 after a short incubation time of 15 minutes. We also showed an inhibitory effect of both ACE-inhibitors on LPS-induced activity of transcription factors NF- κ B, AP-1 and on functional parameters such as phagocytosis and oxidative burst. Furthermore, the synthesis of the cytokine IL-8, as determined by Sandwich-ELISA, decreased after incubation with ACE-inhibitors. However, this effect failed to be significant because of high standard deviation.

ACE-inhibitors could have a positive influence on the therapy of immune changes associated with anaesthesia, trauma or critical illness and could help to decrease the inflammatory complications of surgery. Further clinical investigations, e.g. in cardiac surgery patients, are warranted to verify these results in-vivo. Flow cytometric analysis provides a fast and reproduceable method to answer these questions.

7 Literaturverzeichnis

1. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20(6):864-874.
2. Adam A, Cugno M, Molinaro G, Perez M, Lepage Y, Agostoni A. Aminopeptidase P in individuals with a history of angioedema on ACE inhibitors. *Lancet* 2002; 359(9323):2088-2089.
3. Adcock IM, Brown CR, Kwon O, Barnes PJ. Oxidative stress induces NF kappa B DNA binding and inducible NOS mRNA in the human epithelial cell line A549. *Biochem Soc Trans* 1994; 22(2):186.
4. Adler S, Huang H. Oxidant stress in kidneys of spontaneously hypertensive rats involves both oxidase overexpression and loss of extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287(5):907-913.
5. Aida Y, Pabst MJ. Neutrophil responses to lipopolysaccharide. Effect of adherence on triggering and priming of the respiratory burst. *J Immunol* 1991; 146(4):1271-1276.
6. Altstaedt J, Kirchner H, Rink L. Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology* 1996; 89(4):563-568.
7. Alvarez A, Cerda-Nicolas M, Naim Abu NY, Mata M, Issekutz AC, Panes J, Lobb RR, Sanz MJ. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood* 2004; 104(2):402-408.
8. Arakawa K, Urata H. Hypothesis regarding the pathophysiological role of alternative pathways of angiotensin II formation in atherosclerosis. *Hypertension* 2000; 36(4):638-641.
9. Bagchi D, Prasad R, Das DK. Direct scavenging of free radicals by captopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158(1):52-57.
10. Bailly S, Fay M, Israel N, Gougerot-Pocidallo MA. The transcription factor AP-1 binds to the human interleukin 1 alpha promoter. *Eur Cytokine Netw* 1996; 7(2):125-128.
11. Barchowsky A, Munro SR, Morana SJ, Vincenti MP, Treadwell M. Oxidant-sensitive and phosphorylation-dependent activation of NF-kappa B and AP-1 in endothelial cells. *Am J Physiol* 1995; 269(6 Pt 1):829-836.
12. Barth E, Fischer G, Schneider EM, Wollmeyer J, Georgieff M, Weiss M. Differences in the expression of CD64 and mCD14 on polymorphonuclear cells and on monocytes in patients with septic shock. *Cytokine* 2001; 14(5):299-302.

13. Bauer I, Bauer M, Raddatz A, Luedtke C, Werth M, Silomon M, Rensing H, Wilhelm W. Influence of gender on stimulated cytokine response in patients with severe sepsis. *Anaesthesist* 2006; 55(5):515-527.
14. Bayon Y, Alonso A, Sanchez CM. Stimulation of Fc gamma receptors in rat peritoneal macrophages induces the expression of nitric oxide synthase and chemokines by mechanisms showing different sensitivities to antioxidants and nitric oxide donors. *J Immunol* 1997; 159(2):887-894.
15. Bellavite P. The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. *Free Radic Biol Med* 1988; 4(4):225-261.
16. Belline P, da Melo PS, Haun M, Palhares FB, Boer PA, Gontijo JA, Figueiredo JF. Effect of angiotensin II and losartan on the phagocytic activity of peritoneal macrophages from Balb/C mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99(2):167-172.
17. Berger M, Birx DL, Wetzler EM, O'Shea JJ, Brown EJ, Cross AS. Calcium requirements for increased complement receptor expression during neutrophil activation. *J Immunol* 1985; 135(2):1342-1348.
18. Berger M, O'Shea J, Cross AS, Folks TM, Chused TM, Brown EJ, Frank MM. Human neutrophils increase expression of C3bi as well as C3b receptors upon activation. *J Clin Invest* 1984; 74(5):1566-1571.
19. Bergmann M, Gornikiewicz A, Sautner T, Waldmann E, Weber T, Mittlbock M, Roth E, Fugger R. Attenuation of catecholamine-induced immunosuppression in whole blood from patients with sepsis. *Shock* 1999; 12:421-427.
20. Berton G, Laudanna C, Sorio C, Rossi F. Generation of signals activating neutrophil functions by leukocyte integrins: LFA-1 and gp150, but not CR3 are able to stimulate the respiratory burst of human neutrophils. *J Cell Biol* 1992;116(4):1007-1017.
21. Bettex-Galland M, Studer UE, Walz A, Dewald B, Baggiolini M. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 detection in human urine during acute bladder inflammation caused by transurethral resection of superficial cancer and bacillus Calmette-Guerin administration. *Eur Urol* 1991; 19(2):171-175.
22. Bicket DP. Using ACE inhibitors appropriately. *Am Fam Physician* 2002; 66(3):461-468.
23. Bikoue A, George F, Poncelet P, Mutin M, Janossy G, Sampol J. Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression: normal adult values. *Cytometry* 1996; 26(2):137-147.
24. Blackwell TS, Blackwell TR, Holden EP, Christman BW, Christman JW. In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor-kappa B activation and neutrophilic lung inflammation. *J Immunol* 1996; 157(4):1630-1637.
25. Blix IJ, Helgeland K, Kahler H, Lyberg T. LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the expression of beta2 integrins and L-selectin in an ex vivo human whole blood system. *Eur J Oral Sci* 1999; 107:14-20.

26. Bohmer RH, Trinkle LS, Staneck JL. Dose effects of LPS on neutrophils in a whole blood flow cytometric assay of phagocytosis and oxidative burst. *Cytometry* 1992; 13(5):525-531.
27. Boldt J, Muller M, Heesen M, Harter K, Hempelmann G. Cardiorespiratory effects of continuous i.v. administration of the ACE inhibitor enalaprilat in the critically ill. *Br J Clin Pharmacol* 1995; 40(5):415-422.
28. Boldt J, Papsdorf M, Kumle B, Piper S, Hempelmann G. Influence of angiotensin-converting enzyme inhibitor enalaprilat on endothelial-derived substances in the critically ill. *Crit Care Med* 1998; 26(10):1663-1670.
29. Boldt J, Schindler E, Harter K, Gorchach G, Hempelmann G. Influence of intravenous administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor enalaprilat on cardiovascular mediators in cardiac surgery patients. *Anesth Analg* 1995; 80(3):480-485.
30. Borregaard N, Tauber AI. Subcellular localization of the human neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1984; 259:47-52.
31. Brabant SM, Bertrand M, Eyraud D, Darmon PL, Coriat P. The hemodynamic effects of anesthetic induction in vascular surgical patients chronically treated with angiotensin II receptor antagonists. *Anesth Analg* 1999; 89(6):1388-1392.
32. Brostjan C, Anrather J, Csizmadia V, Stroka D, Soares M, Bach FH, Winkler H. Glucocorticoid-mediated repression of NFkappaB activity in endothelial cells does not involve induction of IkappaBalpha synthesis. *J Biol Chem* 1996; 271(32):19612-19616.
33. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med* 2000; 26 Suppl 1:64-74.
34. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991; 67(6):1033-1036.
35. Cao Z, Cooper ME. Role of angiotensin II in tubulointerstitial injury. *Semin Nephrol* 2001; 21(6):554-562.
36. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 2003; 24(3):261-271.
37. Cargnoni A, Boraso A, Scotti C, Ghirardelli N, Benigno M, Bernocchi P, Pedersini P, Ferrari R. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition with quinaprilat on the ischaemic and reperfused myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26(1):69-86.
38. Carter PH, Resto-Ruiz S, Washington GC. Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants and five cell preparations. *Cytometry* 1992; 13:68-74.
39. Cavaillon JM, Munoz C, Fitting C, Misset B, Carlet J. Circulating cytokines: the tip of the iceberg? *Circ Shock* 1992; 38(2):145-152.

40. Chae BK, Lee HW, Sun K, Choi YH, Kim HM. The effect of combined epidural and light general anesthesia on stress hormones in open heart surgery patients. *Surg Today* 1998; 28(7):727-731.
41. Chello M, Mastroroberto P, Cirillo F, Bevacqua E, Carrano A, Perticone F, Marchese AR. Neutrophil-endothelial cells modulation in diabetic patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998; 14(4):373-379.
42. Chen WY, Lei HY, Wang JY, Lu CC. Direct measurement of neutrophil F-actin content in microvolume whole blood samples. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 110(4):325-331.
43. Chu SC, Marks-Konczalik J, Wu HP, Banks TC, Moss J. Analysis of the cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene: characterization of differences between human and mouse iNOS promoters. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248(3):871-878.
44. Colson P, Ryckwaert F, Coriat P. Renin angiotensin system antagonists and anesthesia. *Anesth Analg* 1999; 89(5):1143-1155.
45. Cominacini L, Pasini A, Garbin U, Evangelista S, Crea AE, Tagliacozzi D, Nava C, Davoli A, LoCascio V. Zofenopril inhibits the expression of adhesion molecules on endothelial cells by reducing reactive oxygen species. *Am J Hypertens* 2002; 15(10 Pt 1):891-895.
46. Constantinescu CS, Goodman DB, Ventura ES. Captopril and lisinopril suppress production of interleukin-12 by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunol Lett* 1998; 62(1):25-31.
47. Crozier TA, Muller JE, Quittkatt D, Weyland W, Sydow M, Wuttke W, Kettler D. Interleukin-1 beta and interleukin-6-plasma concentrations in laparotomies. Interaction with neuroendocrine secretion and postoperative temperature regulation? *Anaesthesist* 1993; 42(6):343-349.
48. Dandona P, Kumar V, Aljada A, Ghanim H, Syed T, Hofmayer D, Mohanty P, Tripathy D, Garg R. Angiotensin II receptor blocker valsartan suppresses reactive oxygen species generation in leukocytes, nuclear factor-kappa B, in mononuclear cells of normal subjects: evidence of an antiinflammatory action. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(9):4496-4501.
49. De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52(3):415-472.
50. De Gusmao FM, Becker C, Carvalho MH, Barros LF. Angiotensin II inhibition during myocardial ischemia-reperfusion in dogs: effects on leukocyte infiltration, nitric oxide synthase isoenzymes activity and left ventricular ejection fraction. *Int J Cardiol* 2005; 100(3):363-370.
51. DeForge LE, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem* 1993; 268(34):25568-25576.

52. DeForge LE, Remick DG. Kinetics of TNF, IL-6, and IL-8 gene expression in LPS-stimulated human whole blood. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174(1):18-24.
53. Detmers PA, Zhou D, Powell D, Lichenstein H, Kelley M, Pironkova R. Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase. *J Immunol* 1995; 155:2085-2095.
54. Dickstein K, Kjekshus J. Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomised trial. Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II Antagonist Losartan. *Lancet* 2002; 360(9335):752-760.
55. Dokter WH, Koopmans SB, Vellenga E. Effects of IL-10 and IL-4 on LPS-induced transcription factors (AP-1, NF-IL6 and NF-kappa B) which are involved in IL-6 regulation. *Leukemia* 1996; 10(8):1308-1316.
56. Donabedian H, Sawyer T, Senitzer D. Inhibition of neutrophil shape change by an inhibitor of chemotaxis. *J Leukoc Biol* 1987; 42(5):510-518.
57. Donmez G, Derici U, Erbas D, Arinsoy T, Onk A, Sindel S, Hasanoglu E. The effects of losartan and enalapril therapies on the levels of nitric oxide, malondialdehyde, and glutathione in patients with essential hypertension. *Jpn J Physiol* 2002; 52(5):435-440.
58. Dooley DC, Simpson JF, Meryman HT. Isolation of large numbers of fully viable human neutrophils: A preparative technique using Percoll density gradient centrifugation. *Exp Hematol* 1982; 10(7):591-599.
59. Dri P, Cramer R, Romano M, Spessotto P, Patriarca P. Effect of biological surfaces on neutrophil O₂- production and its relationship to the CD11b/CD18 integrin-dependent adherence. *Int J Tissue React* 1991; 13(4):193-201.
60. Dunne JL, Ballantyne CM, Beaudet AL, Ley K. Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood* 2002; 99(1):336-341.
61. Dunne JL, Collins RG, Beaudet AL, Ballantyne CM, Ley K. Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation. *J Immunol* 2003; 171(11):6105-6111.
62. Dustin ML, Springer TA. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:27-66.
63. Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:155-177.
64. Edwards SW. The generation and recognition of neutrophil-activating factors: Structure and function of neutrophil receptors. In: Edwards SW. *Biochemistry and physiology of the neutrophil*. Cambridge. Cambridge University Press 1994;(3)77-125.

65. Edwards SW. Neutrophils and host defence: The fight against infection. In: Edwards SW. Biochemistry and physiology of the neutrophil. Cambridge Cambridge University Press 1994;(1):1-32.
66. Edwards SW. The generation and recognition of neutrophil-activating factors: Structure and function of neutrophil receptors. In: Edwards SW. Biochemistry and physiology of the neutrophil. Cambridge. Cambridge University Press 1994;(3):77-127.
67. Edwards SW, Watson F. The cell biology of phagocytes. Immunology today 1995; 16(11):508-510.
68. Edwards SW. The generation and recognition of neutrophil-activating factors: Structure and function of neutrophil receptors. In: Edwards SW, editor. Biochemistry and physiology of the neutrophil. Cambridge: Cambridge University Press, 1994;(3):77-124.
69. Edwards SW. Cell signalling by integrins and immunoglobulin receptors in primed neutrophils. Trends Biochem Sci 1995; 20:362-367.
70. Egan TM, Minta JO, Scrimgeour KG, Cooper JD. Captopril--a potential free radical scavenger: inhibition of PMN NADPH oxidase. Clin Invest Med 1988; 11(5):351-356.
71. El Habbal MH, Carter H, Smith LJ, Elliott MJ, Strobel S. Neutrophil activation in paediatric extracorporeal circuits: effect of circulation and temperature variation. Cardiovascular Research 1995; 29(1):102-107.
72. Emmendörffer A, Hecht M, Lohmann-Matthes M-L, Roesler J. A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. J Immunol Meth 1990; 131(2):269-275.
73. Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 1971; 8(9):871-874.
74. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. Blood 1995; 85:1341-1347.
75. Fällmann M, Andersson R, Andersson T. Signaling properties of CR3 (CD11b/CD18) and CR1 (CD35) in relation to phagocytosis of complement-opsinized particles. J Immunol 1993; 151(1):330-338.
76. Fearon DT, Collins LA. Increased expression of C3b receptors on polymorphonuclear leukocytes induced by chemotactic factors and by purification procedures. J Immunol 1983; 130(1):370-375.
77. Ferrario CM, Richmond RS, Smith R, Levy P, Strawn WB, Kivlighn S. Renin-angiotensin system as a therapeutic target in managing atherosclerosis. Am J Ther 2004; 11(1):44-53.

78. Filatov MV, Varfolomeeva EY, Ivanov EI. Flow cytofluorometric detection of inflammatory processes by measuring respiratory burst reaction of peripheral blood neutrophils. *Biochem Mol Med* 1995; 55(2):116-121.
79. Foris G, Dezso B, Medgyesi GA, Fust G. Effect of angiotensin II on macrophage functions. *Immunology* 1983; 48(3):529-535.
80. Foris G, Fust G, Medgyesi GA. The effect of oligopeptides on the C3b receptor-mediated functions of rat macrophages. *Immunol Lett* 1983; 6(1):7-11.
81. Forrester JV, Lackie JM. Adhesion of neutrophil leucocytes under conditions of flow. *J Cell Sci* 1984; 70:93-110.
82. Forsyth KD, Levinsky RJ. Preparative procedures of cooling and re-warming increase leucocyte integrin expression and function on neutrophils. *J Immunol Meth* 1990; 128(2):159-163.
83. Fortuno A, Olivan S, Beloqui O, San Jose G, Moreno MU, Diez J, Zalba G. Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. *J Hypertens* 2004; 22(11):2169-2175.
84. Foulds S. Novel flow cytometric method for quantifying nuclear binding of the transcription factor nuclear factor kappa B in unseparated human monocytes and polymorphonuclear cells. *Cytometry* 1997; 29(2):182-186.
85. Förstermann U. Pharmakologie des kardiovaskulären Systems: Die Blutgefäße. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1996: 407-412.
86. Frantz S, Fraccarollo D, Wagner H, Behr TM, Jung P, Angermann CE, Ertl G, Bauersachs J. Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 2003; 57(3):749-756.
87. Freischlag JA, Colburn MD, Quinones-Baldrich WJ, Moore WS. Alteration of neutrophil (PMN) function by heparin, dexamethasone, and enalapril. *J Surg Res* 1992; 52(5):523-529.
88. Friedman M. The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. *J Amer Stat Assoc* 1937;(32):675-701.
89. Fujita M, Hayashi I, Yamashina S, Fukamizu A, Itoman M, Majima M. Angiotensin type 1a receptor signaling-dependent induction of vascular endothelial growth factor in stroma is relevant to tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Carcinogenesis* 2005; 26(2):271-279.
90. Galon J, Gauchat JF, Mazieres N, Spagnoli R, Storkus W, Lotze M, Bonnefoy JY, Fridman WH, Sautes C. Soluble Fc gamma receptor type III (Fc gamma RIII, CD16) triggers cell activation through interaction with complement receptors. *J Immunol* 1996; 157(3):1184-1192.

91. Gao XP, Liu Q, Broman M, Predescu D, Frey RS, Malik AB. Inactivation of CD11b in a mouse transgenic model protects against sepsis-induced lung PMN infiltration and vascular injury. *Physiol Genomics* 2005; 21(2):230-242.
92. Gennari R, Alexander JW, Boyce ST, Lilly N, Babcock GF, Cornaggia M. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on bacterial translocation after thermal injury and bacterial challenge. *Shock* 1996; 6(2):95-100.
93. Giertz H, Flohe L, Göthert M, Peskar B, Resch K. Mediatoren der Entzündung und Allergie: Arzneimittelallergie; Pharmakotherapie der Allergie. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1996: 333-337.
94. Goldsby RA. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: Kindt TJ, Osborne BA, Goldsby RA. *Immunology*. Palgrave Macmillan 5th ed. 2003: 113-125.
95. Gordon DL, Rice JL, McDonald PJ. Regulation of human neutrophil type 3 complement receptor (iC3b receptor) expression during phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Immunology* 1989; 67(4):460-465.
96. Goris RJ, Boekholtz WK, van Bebber IP, Nuytinck JK, Schillings PH. Multiple-organ failure and sepsis without bacteria. An experimental model. *Arch Surg* 1986; 121(8):897-901.
97. Goto M, Katayama KI, Shirakawa F, Tanaka I. Involvement of NF-kappaB p50/p65 heterodimer in activation of the human pro-interleukin-1beta gene at two subregions of the upstream enhancer element. *Cytokine* 1999; 11(1):16-28.
98. Graninger M, Marsik C, Dukic T, Wagner OF, Blann AD, Jilma B. Enalapril does not alter adhesion molecule levels in human endotoxemia. *Shock* 2003; 19(5):448-451.
99. Graves V, Gabig T, McCarthy L, Strour EF, Leemhuis T, English D. Simultaneous mobilization of Mac-1 (CD11b/CD18) and formyl peptide chemoattractant receptors in human neutrophils. *Blood* 1992; 80(3):776-787.
100. Graves V, Gabig T, McCarthy L, Strour EF, Leemhuis T, English D. Simultaneous mobilization of Mac-1 (CD11b/CD18) and formyl peptide chemoattractant receptors in human neutrophils. *Blood* 1992; 80(3):776-787.
101. Griendling KK, Ushio-Fukai M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept* 2000; 91(1-3):21-27.
102. Guba M, Steinbauer M, Buchner M, Frolich D, Farkas S, Jauch KW, Anthuber M. Differential effects of short-term ace- and AT1-receptor inhibition on postischemic injury and leukocyte adherence in vivo and in vitro. *Shock* 2000; 13(3):190-196.
103. Gupta S, Young D, Sen S. Inhibition of NF-kappaB induces regression of cardiac hypertrophy, independent of blood pressure control, in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(1):20-29.

104. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 1994; 56(5):559-564.
105. Haslett C, Guthrie LA, Kopaniak MM, Johnston RB, Henson PM. Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace contamination of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol* 1985; 119(1):101-110.
106. Hed J, Berg O, Forslid J, Hallden G, Larka-Rafner G. The expression of CR1 and CR3 on non-modulated granulocytes of healthy blood donors as measured by flow cytofluorometry. *Scand J Immunol* 1988;28(3):339-344.
107. Henderson LM, Chappell JB. Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur J Biochem* 1993; 217(3):973-980.
108. Hernandez-Presa MA, Bustos C, Ortego M, Tunon J, Ortega L, Egido J. ACE inhibitor quinapril reduces the arterial expression of NF-kappaB-dependent proinflammatory factors but not of collagen I in a rabbit model of atherosclerosis. *Am J Pathol* 1998; 153(6):1825-1837.
109. Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48(4):549-554.
110. Ikewaki N, Tamauchi H, Inoko H. Modulation of cell surface antigens and regulation of phagocytic activity mediated by CD11b in the monocyte-like cell line U937 in response to lipopolysaccharide. *Tissue Antigens* 1993; 42(3):125-132.
111. Ito H, Hamano K, Gohra H, Katoh T, Fujimura Y, Tsuboi H, Esato K. Relationship between respiratory distress and cytokine response after cardiopulmonary bypass. *Surg Today* 1997; 27(3):220-225.
112. Jain J, Loh C, Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 1995; 7(3):333-342.
113. Janesway CA, Travers P. Grundbegriffe der Immunologie. In: Janesway CA, Travers P, editors. *Immunologie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1997: 3-7.
114. Johnson DR, Douglas I, Jahnke A, Ghosh S, Pober JS. A sustained reduction in IkappaB-beta may contribute to persistent NF-kappaB activation in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1996; 271(27):16317-16322.
115. Jones DH, Anderson DC, Burr BL, Rudloff HE, Smith CW, Krater SS, Schmalstieg FC. Quantitation of intracellular Mac-1 (CD11b/CD18) pools in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 1988; 44(6):535-544.
116. Jones SE, Kelly DJ, Cox AJ, Zhang Y, Gow RM, Gilbert RE. Mast cell infiltration and chemokine expression in progressive renal disease. *Kidney Int* 2003; 64(3):906-913.
117. Jung U, Ley K. Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *J Immunol* 1999; 162(11):6755-6762.

118. Kamp DW, Bauer KD, Knap A, Dunn MM. Contrasting effects of inflammatory stimuli on neutrophil and monocyte adherence to endothelial cells. *J Appl Physiol* 1989; 67(2):556-562.
119. Kansas GS. Selectins and their ligands. *Blood* 1996; 88(9):3259-3287.
120. Kappelmayer J, Bernabei A, Gikakis N, Edmunds LH, Jr., Colman RW. Upregulation of Mac-1 surface expression on neutrophils during simulated extracorporeal circulation. *J Lab Clin Med* 1993; 121(1):118-126.
121. Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Ogata J, Inoue Y, Shigematsu A. Ketamine suppresses proinflammatory cytokine production in human whole blood in vitro. *Anesth Analg* 1999; 89(3):665-669.
122. Keller HU, Fedier A, Rohner R. Relationship between light scattering in flow cytometry and changes in shape, volume, and actin polymerization in human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* 1995; 58(5):519-525.
123. Khan BV, Sola S, Lauten WB, Natarajan R, Hooper WC, Menon RG, Lerakis S, Helmy T. Quinapril, an ACE inhibitor, reduces markers of oxidative stress in the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2004; 27(7):1712-1715.
124. Kim FJ, Moore EE, Moore FA, Koike K, Carl VS, Banerjee A. Disparate signal transduction in neutrophil CD18 adhesion receptor expression versus superoxide generation. *Surgery* 1994; 116(2):262-266.
125. Kim S, Izumi Y, Yano M, Hamaguchi A, Miura K, Yamanaka S, Miyazaki H, Iwao H. Angiotensin blockade inhibits activation of mitogen-activated protein kinases in rat balloon-injured artery. *Circulation* 1998; 97(17):1731-1737.
126. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 1989; 245(4923):1238-1241.
127. Klahr S. Obstructive nephropathy. *Intern Med* 2000; 39(5):355-361.
128. Klahr S, Morrissey JJ. Comparative study of ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in interstitial scarring. *Kidney Int Suppl* 1997; 63:111-114.
129. Kranzhofer R, Browatzki M, Schmidt J, Kubler W. Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257(3):826-828.
130. Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kubler W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(7):1623-1629.
131. Kremer JP, Jarrar D, Steckholzer U, Ertel W. Interleukin-1, -6 and tumor necrosis factor-alpha release is down-regulated in whole blood from septic patients. *Acta Haematol* 1996; 95:268-273.
132. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(11):4651-4655.

133. Kunsch C, Lang RK, Rosen CA, Shannon MF. Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J Immunol* 1994; 153(1):153-164.
134. Kunsch C, Rosen CA. NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol* 1993; 13(10):6137-6146.
135. Kupatt C, Habazettl H, Zahler S, Weber C, Becker BF, Messmer K, Gerlach E. ACE-inhibition prevents postischemic coronary leukocyte adhesion and leukocyte-dependent reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1997; 36(3):386-395.
136. Kupatt C, Zahler S, Seligmann C, Massoudy P, Becker BF, Gerlach E. Nitric oxide mitigates leukocyte adhesion and vascular leak after myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28(3):643-654.
137. Kwapisz MM, Muller M, Schindler E, Demir S, Veit M, Roth P, Hempelmann G. The effect of intravenous quinaprilat on plasma cytokines and hemodynamic variables during cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2004; 18(1):53-58.
138. Lappegard KT, Fung M, Bergseth G, Riesenfeld J, Mollnes TE. Artificial surface-induced cytokine synthesis: effect of heparin coating and complement inhibition. *Ann Thorac Surg* 2004; 78(1):38-44.
139. Lapteva N, Ide K, Nieda M, Ando Y, Hatta-Ohashi Y, Minami M, Dymshits G, Egawa K, Juji T, Tokunaga K. Activation and suppression of renin-angiotensin system in human dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296(1):194-200.
140. Larsen B, Hoff G, Wilhelm W, Buchinger H, Wanner GA, Bauer M. Effect of intravenous anesthetics on spontaneous and endotoxin-stimulated cytokine response in cultured human whole blood. *Anesthesiology* 1998; 89(5):1218-1227.
141. Larson RS, Springer TA. Structure and function of leucocyte integrins. *Immunol Rev* 1990; 114:181-217.
142. Laurent T, Markert M, Von F, V, Feihl F, Schaller MD, Tagan MC, Chiolero R, Perret C. CD11b/CD18 expression, adherence, and chemotaxis of granulocyte in adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149(6):1534-1538.
143. Lee JD, Kato K, Tobias PS, Kirkland TN, Ulevitch RJ. Transfection of CD14 into 70Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *J Exp Med* 1992; 175:1697-1705.
144. Ley K, Bullard DC, Arbones ML, Bosse R, Vestweber D, Tedder TF, Beaudet AL. Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med* 1995; 181(2):669-675.
145. Lieberman MM, Sachanandani DM, Pinney CA. Comparative study of neutrophil activation by chemiluminescence and flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 3(6):654-662.

146. Limb GA, Hamblin AS, Wolstencroft RA, Dumonde DC. Selective up-regulation of human granulocytes integrins and complement receptor 1 by cytokines. *Immunology* 1991; 74(4):696-702.
147. Liu H, Zhao J. An experimental study of therapeutic effect of ACEI on chemical-induced ARDS in rats. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 2002; 36(2):93-96.
148. Lu L, Quinn MT, Sun Y. Oxidative stress in the infarcted heart: role of de novo angiotensin II production. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325(3):943-951.
149. Lund-Johansen F, Olweus J. Signal transduction in monocytes and granulocytes measured by multiparameter flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13(7):693-702.
150. Lynn WA, Raetz CR, Qureshi N, Golenbock DT. Lipopolysaccharide-induced stimulation of CD11b/CD18 expression on neutrophils. Evidence of specific receptor-based response and inhibition by lipid A-based antagonists. *J Immunol* 1991; 147(9):3072-3079.
151. Macey MG, Jiang XP, Veys P, McCarthy D, Newland AC. Expression of functional antigens on neutrophils. Effects of preparation. *J Immunol Methods* 1992; 149:37-42.
152. Madara JL. Migration of neutrophils through epithelial monolayers. *Trends Cell Biol* 1994; 4(1):4-7.
153. Marano MA, Fong Y, Moldawer LL, Wei H, Calvano SE, Tracey KJ, Barie PS, Manogue K, Cerami A, Shires GT, . Serum cachectin/tumor necrosis factor in critically ill patients with burns correlates with infection and mortality. *Surg Gynecol Obstet* 1990; 170(1):32-38.
154. Marie C, Fitting C, Muret J, Payen D, Cavaillon JM. Interleukin 8 production in whole blood assays: Is interleukin 10 responsible for the downregulation observed in sepsis? *Cytokine* 2000; 12(1):55-61.
155. Marie C, Muret J, Fitting C, Losser MR, Payen D, Cavaillon JM. Reduced ex vivo interleukin-8 production by neutrophils in septic and nonseptic systemic inflammatory response syndrome. *Blood* 1998; 91(9):3439-3446.
156. Marshall WG, Jr., Dimick AR. The natural history of major burns with multiple subsystem failure. *J Trauma* 1983; 23(2):102-105.
157. Martinez LL, Oliveira MA, Miguel AS, Rastelli VM, Walber J, Cruz MC, Tostes RC, Carvalho MH, Nigro D, Fortes ZB. Enalapril interferes with the effect of diclofenac on leucocyte-endothelium interaction in hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43(2):258-265.
158. Masuda K, Kinoshita Y, Hasui M, Kobayashi Y. Polymorphonuclear leukocyte heterogeneity of Fc receptor expression and membrane potential in human neonates. *Biol Neonate* 1991; 60(3-4):168-175.
159. McBride WT, Armstrong MA, Crockard AD, McMurray TJ, Rea JM. Cytokine balance and immunosuppressive changes at cardiac surgery: contrasting response between patients and isolated CPB circuits. *Br J Anaesth* 1995; 75(6):724-733.

160. McDonald PP, Bovolenta C, Cassatella MA. Activation of distinct transcription factors in neutrophils by bacterial LPS, interferon-gamma, and GM-CSF and the necessity to overcome the action of endogenous proteases. *Biochemistry* 1998; 37(38):13165-13173.
161. Meade P, Shoemaker WC, Donnelly TJ, Abraham E, Jagels MA, Cryer HG, Hugli TE, Bishop MH, Wo CC. Temporal patterns of hemodynamics, oxygen transport, cytokine activity, and complement activity in the development of adult respiratory distress syndrome after severe injury. *J Trauma* 1994; 36(5):651-657.
162. Meldrum DR, Partrick DA, Cleveland JC, Jr., Shenkar R, Meldrum KK, Raiesdana A, Ayala A, Brown JW, Harken AH. On-pump coronary artery bypass surgery activates human myocardial NF-kappaB and increases TNF-alpha in the heart. *J Surg Res* 2003; 112(2):175-179.
163. Meyer M, Pahl HL, Baeuerle PA. Regulation of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 by redox changes. *Chem Biol Interact* 1994; 91(2-3):91-100.
164. Moll T, Czyz M, Holzmuller H, Hofer-Warbinek R, Wagner E, Winkler H, Bach FH, Hofer E. Regulation of the tissue factor promoter in endothelial cells. Binding of NF kappa B-, AP-1-, and Sp1-like transcription factors. *J Biol Chem* 1995; 270(8):3849-3857.
165. Morel F, Doussi re J, Vignais PV. The superoxide-generation oxidase of phagocytic cells: physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* 1991; 201(3):523-546.
166. Mori N, Oishi K, Sar B, Mukaida N, Nagatake T, Matsushima K, Yamamoto N. Essential role of transcription factor nuclear factor-kappaB in regulation of interleukin-8 gene expression by nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory epithelial cells. *Infect Immun* 1999; 67(8):3872-3878.
167. Morrissey JJ, Klahr S. Rapid communication. Enalapril decreases nuclear factor kappa B activation in the kidney with ureteral obstruction. *Kidney Int* 1997; 52(4):926-933.
168. Muirhead KA, Schmitt TC, Muirhead AR. Determination of linear fluorescence intensities from flow cytometric data accumulated with logarithmic amplifiers. *Cytometry* 1983;3(4):251-256.
169. Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 1994; 56(5):554-558.
170. Muller M, Schindler E, Kwapisz M, Klemm S, Akinturk H, Heidt M, Hempelmann G. Effect of intraoperative angiotensin-converting enzyme inhibition by quinaprilat on hypertension after coronary artery surgery. *Br J Anaesth* 2000; 84(3):396-398.
171. Naftilan AJ, Gilliland GK, Eldridge CS, Kraft AS. Induction of the proto-oncogene c-jun by angiotensin II. *Mol Cell Biol* 1990; 10(10):5536-5540.
172. Napoleone E, Di Santo A, Camera M, Tremoli E, Lorenzet R. Angiotensin-converting enzyme inhibitors downregulate tissue factor synthesis in monocytes. *Circ Res* 2000; 86(2):139-143.

173. Nash S, Stafford J, Madara JL. Effects of polymorphonuclear leukocyte transmigration on the barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1987; 80(4):1104-1113.
174. Nathan C, Srimal S, Farber C. Cytokine induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11b/CD18 integrins. *J Cell Biol* 1989; 109(3):1341-1349.
175. Nebe CT. Flow cytometry and data analysis. *Infusionsther Transfusionsmed* 1996; 23(2):111-113.
176. Nelson DP, Wechsler SB, Miura T, Stagg A, Newburger JW, Mayer JE, Jr., Neufeld EJ. Myocardial immediate early gene activation after cardiopulmonary bypass with cardiac ischemia-reperfusion. *Ann Thorac Surg* 2002; 73(1):156-162.
177. O'Shea JJ, Brown EJ, Seligmann BE, Metcalf JA, Frank MM, Gallin JI. Evidence for distinct intracellular pools of receptors for C3b and C3bi in human neutrophils. *J Immunol* 1985; 134(4):2580-2587.
178. Ohlsson K, Linder C, Lundberg E, Axelsson L. Release of cytokines and proteases from human peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells following phagocytosis and LPS stimulation. *Scand J Clin Lab Invest* 1996; 56(5):461-470.
179. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:617-648.
180. Ortiz LA, Champion HC, Lasky JA, Gambelli F, Gozal E, Hoyle GW, Beasley MB, Hyman AL, Friedman M, Kadowitz PJ. Enalapril protects mice from pulmonary hypertension by inhibiting TNF-mediated activation of NF-kappaB and AP-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282(6):1209-1221.
181. Otsuka F, Ogura T, Yamauchi T, Sato M, Kataoka H, Kageyama J, Makino H. Chronic treatment with angiotensin II type 1 receptor antagonist suppresses glomerular activator protein-1 activity in salt-sensitive hypertensive rats. *Kidney Blood Press Res* 2000; 23(1):35-41.
182. Pahl HL, Baeuerle PA. Activation of NF-kappa B by ER stress requires both Ca²⁺ and reactive oxygen intermediates as messengers. *FEBS Lett* 1996; 392(2):129-136.
183. Pahl HL, Baeuerle PA. The ER-overload response: activation of NF-kappa B. *Trends Biochem Sci* 1997; 22(2):63-67.
184. Paparella D, Al Radi OO, Meng QH, Venner T, Teoh K, Young E. The effects of high-dose heparin on inflammatory and coagulation parameters following cardiopulmonary bypass. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005; 16(5):323-328.
185. Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002; 21(2):232-244.

186. Perschel WT, Langefeld T, Yildiz M. Beschreibung einer Methode zur Quantifizierung der granulozytären Phagozytose von *Staphylococcus aureus* K 807 mittels Flow-Zytometrie. *Med Welt* 1994; 45:100-105.
187. Perticarari S, Presani G, Banfi E. A new flow cytometric assay for the evaluation of phagocytosis and the oxidative burst in whole blood. *J Immunol Methods* 1994; 170(1):117-124.
188. Perticarari S, Presani G, Mangiarotti MA, Banfi E. Simultaneous flow cytometric method to measure phagocytosis and oxidative products by neutrophils. *Cytometry* 1991; 12(7):687-693.
189. Petty HR, Francis JW, Todd RF3, Petrequin P, Boxer LA. Neutrophil C3bi receptors: formation of membrane clusters during cell triggering requires intracellular granules. *J Cell Physiol* 1987; 133(2):235-42,256.
190. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282(5396):2085-2088.
191. Prabha PS, Das UN, Koratkar R, Sagar PS, Ramesh G. Free radical generation, lipid peroxidation and essential fatty acids in uncontrolled essential hypertension. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1990; 41(1):27-33.
192. Prasad A, Koh KK, Schenke WH, Mincemoyer R, Csako G, Fleischer TA, Brown M, Selvaggi TA, Quyyumi AA. Role of angiotensin II type 1 receptor in the regulation of cellular adhesion molecules in atherosclerosis. *Am Heart J* 2001; 142(2):248-253.
193. Radtke H. Quantitative Durchflusszytometrie: Absolutzahlmessung in Vollblut und Blutkomponenten. *Infusionsther Transfusionsmed* 1996; 23:114.
194. Raffael A, Nebe CT, Valet G. Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: G.Schmitz und G.Rothe (Hrsg.). *Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Stuttgart: Schattauer-Verlag, 1994: 3-49.
195. Rainger GE, Fisher AC, Nash GB. Endothelial-borne platelet-activating factor and interleukin-8 rapidly immobilize rolling neutrophils. *Am J Physiol* 1997; 272(1 Pt 2):114-122.
196. Rajkovic IA, Williams R. Inhibition of neutrophil function by hydrogen peroxide. Effect of SH-group-containing compounds. *Biochem Pharmacol* 1985;34(12):2083-2090.
197. Repo H, Jansson SE, Leirisalo Repo M. Flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo. *J Immunol Methods* 1993; 164(2):193-202.
198. Repo H, Jansson SE, Leirisalo Repo M. Anticoagulant selection influences flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo and ex vivo. *J Immunol Methods* 1995; 185(1):65-79.

199. Rest RF. Measurement of human neutrophil respiratory burst activity during phagocytosis of bacteria. *Methods Enzymol* 1994; 236:119-136.
200. Richard S, Shaw AS, Showell HJ, Connelly PA. The role of individual Fc gamma receptors in aggregated IgG- stimulated protein tyrosine phosphorylation in the human neutrophil. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199(2):653-661.
201. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342(12):836-843.
202. Riordan JF. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biol* 2003; 4(8):225.
203. Robinson JM, Badwey JA. The NADPH oxidase complex of phagocytic leucocytes: a biochemical and cytochemical view. *Histochemistry* 1995; 103(3):163-180.
204. Rodgers K, Xiong S, Espinoza T, Roda N, Maldonado S, diZerega GS. Angiotensin II increases host resistance to peritonitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7(4):635-640.
205. Roebuck KA. Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *Int J Mol Med* 1999; 4(3):223-230.
206. Roebuck KA, Carpenter LR, Lakshminarayanan V, Page SM, Moy JN, Thomas LL. Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *J Leukoc Biol* 1999; 65(3):291-298.
207. Romano MF, Lamberti A, Petrella A, Bisogni R, Tassone PF, Formisano S, Venuta S, Turco MC. IL-10 inhibits nuclear factor-kappa B/Rel nuclear activity in CD3-stimulated human peripheral T lymphocytes. *J Immunol* 1996; 156(6):2119-2123.
208. Romeu MA, Mestre M, Gonzalez L, Valls A, Verdager J, Corominas M, Bas J, Massip E, Buendia E. Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults. Comparison of fresh blood lysis technique, Ficoll-Paque separation and cryopreservation. *J Immunol Methods* 1992; 154:7-10.
209. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999; 138(5 Pt 2):419-420.
210. Rothe G, Oser A, Valet G. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* 1988; 75(7):354-355.
211. Rothe G, Valet G. Flow cytometric assays of oxidative burst activity in phagocytes. *Methods Enzymol* 1994; 233:539-548.
212. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, Egido J. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int Suppl* 2002;(82):12-22.

213. Sachs L. Verteilungsunabhängige Verfahren. In: Angewandte Statistik. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York 1997: 380-393.
214. Sassy-Prigent C, Heudes D, Mandet C, Belair MF, Michel O, Perdereau B, Bariety J, Bruneval P. Early glomerular macrophage recruitment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 2000; 49(3):466-475.
215. Schindler R, Dinarello CA, Koch KM. Angiotensin-converting-enzyme inhibitors suppress synthesis of tumour necrosis factor and interleukin 1 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 1995; 7(6):526-533.
216. Schmeisser A, Soehnlein O, Illmer T, Lorenz HM, Eskafi S, Roerick O, Gabler C, Strasser R, Daniel WG, Garlachs CD. ACE inhibition lowers angiotensin II-induced chemokine expression by reduction of NF-kappaB activity and AT1 receptor expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325(2):532-540.
217. Schmidt KN, Traenckner EB, Meier B, Baeuerle PA. Induction of oxidative stress by okadaic acid is required for activation of transcription factor NF-kappa B. *J Biol Chem* 1995; 270(45):27136-27142.
218. Schroder J, Kahlke V, Staubach KH, Zabel P, Stuber F. Gender differences in human sepsis. *Arch Surg* 1998; 133(11):1200-1205.
219. Schror K, Felsch A. Ramiprilat prevents PAF-induced myocellular and endothelial injury in a neutrophil-perfused heart preparation. *Agents Actions Suppl* 1992; 38(3):209-216.
220. Schulman IH, Zhou MS, Rajj L. Nitric Oxide, Angiotensin II, and Reactive Oxygen Species in Hypertension and Atherogenesis. *Curr Hypertens Rep* 2005; 7(1):61-67.
221. Scribner AW, Loscalzo J, Napoli C. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial function and oxidant stress. *Eur J Pharmacol* 2003; 482(1-3):95-99.
222. Sen CK, Roy S, Packer L. Involvement of intracellular Ca²⁺ in oxidant-induced NF-kappa B activation. *FEBS Lett* 1996; 385(1-2):58-62.
223. Simon SI, Chambers JD, Butcher E, Sklar LA. Neutrophil aggregation is beta 2-integrin- and L-selectin- dependent in blood and isolated cells. *J Immunol* 1992; 149(8):2765-2771.
224. Smith JA, Weidemann MJ. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993; 162(2):261-268.
225. Soehnlein O, Schmeisser A, Cicha I, Reiss C, Ulbrich H, Lindbom L, Daniel WG, Garlachs CD. ACE inhibition lowers angiotensin-II-induced monocyte adhesion to HUVEC by reduction of p65 translocation and AT 1 expression. *J Vasc Res* 2005; 42(5):399-407.
226. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346(6283):425-434.

227. Stein B, Baldwin AS, Jr., Ballard DW, Greene WC, Angel P, Herrlich P. Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J* 1993; 12(10):3879-3891.
228. Strawn WB, Chappell MC, Dean RH, Kivlighn S, Ferrario CM. Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation* 2000; 101(13):1586-1593.
229. Strawn WB, Dean RH, Ferrario CM. Novel mechanisms linking angiotensin II and early atherogenesis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2000; 1(1):11-17.
230. Strawn WB, Ferrario CM. Mechanisms linking angiotensin II and atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13(5):505-512.
231. Strawn WB, Richmond RS, Ann TE, Gallagher PE, Ferrario CM. Renin-angiotensin system expression in rat bone marrow haematopoietic and stromal cells. *Br J Haematol* 2004; 126(1):120-126.
232. Sucic M, Kolevska T, Kopjar B, Kosanovic M, Drobnjak M, Zalud I, Marusic M. Accuracy of routine flow-cytometric bitmap selection for three leucocyte populations. *Cytometry* 1989; 10:442-447.
233. Sugita N, Kimura A, Matsuki Y, Yamamoto T, Yoshie H, Hara K. Activation of transcription factors and IL-8 expression in neutrophils stimulated with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *Inflammation* 1998; 22(3):253-267.
234. Suzuki Y, Lopez-Franco O, Gomez-Garre D, Tejera N, Gomez-Guerrero C, Sugaya T, Bernal R, Blanco J, Ortega L, Egido J. Renal tubulointerstitial damage caused by persistent proteinuria is attenuated in AT1-deficient mice: role of endothelin-1. *Am J Pathol* 2001; 159(5):1895-1904.
235. Syrbe U, Moebes A, Scholze J, Swidsinski A, Dorffel Y. Effects of the angiotensin II type 1 receptor antagonist telmisartan on monocyte adhesion and activation in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 2007; 30(6):521-528.
236. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17(1):1-14.
237. Tetteroo PAT, Bos MJE, Visser FJ. Neutrophil activation detected by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1986; 136:3427-3432.
238. Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II - editorial review. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14(2):125-131.
239. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ, III, Zentella A, Albert JD. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986; 234(4775):470-474.
240. Trinkle LS, Wellhausen SR, McLeish KR. A simultaneous flow cytometric measurement of neutrophil phagocytosis and oxidative burst in whole blood. *Diagn Clin Immunol* 1987; 5(2):62-68.

241. Van Amersfoort ES, van Strijp JA. Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leucocytes. *Cytometry* 1994; 17(4):294-301.
242. Van Pelt LJ, van Zwieten R, Weening RS, Roos D, Verhoeven AJ, Bolscher BG. Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst. *J Immunol Methods* 1996; 191(2):187-196.
243. Vandenbroucke Grauls CM, Thijssen HM, Tetteroo PA, Rozemuller E, Verhoef J. Increased expression of leucocyte adherence-related glycoproteins by polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis of staphylococci on an endothelial surface. *Scand J Immunol* 1989; 30(1):91-98.
244. Vlahopoulos S, Boldogh I, Casola A, Brasier AR. Nuclear factor-kappaB-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor alpha: evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. *Blood* 1999; 94(6):1878-1889.
245. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med* 1989; 169(1):333-338.
246. Walport M. Complement. In: Roitt IM, Brostoff J, Male DK. *Immunology*. Stuttgart, New York: Thieme-Verlag, 1995: 158-273.
247. Wan S, DeSmet JM, Barvais L, Goldstein M, Vincent JL, LeClerc JL. Myocardium is a major source of proinflammatory cytokines in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112(3):806-811.
248. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS, Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996; 274(5288):784-787.
249. Wehlin L, Gustavsson K, Hallden G, Emilson A, Svensson A, Hild M, Lundahl J. Complement activation during blood sampling procedures alters the expression of CD11b/CD18 on human neutrophils. *Vox Sang* 1998; 74(1):21-26.
250. Weinstock JV, Kassab JT. Angiotensin II stimulation of granuloma macrophage phagocytosis and actin polymerization in murine schistosomiasis mansoni. *Cell Immunol* 1984; 89(1):46-54.
251. Welch WJ, Blau J, Xie H, Chabrashvili T, Wilcox CS. Angiotensin-induced defects in renal oxygenation: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288(1):22-28.
252. Welters ID. Effekte von Morphin, Fentanyl, Ketamin, auf leukozytäre Funktion, Transkriptionsfaktoren und Interleukin-8-Synthese. Gießen: Habil.Schrift, Justus-Liebig-Universität, 2000.
253. Welters ID, Fimiani C, Bilfinger TV, Stefano GB. NF-kappaB, nitric oxide and opiate signaling. *Med Hypotheses* 2000; 54(2):263-268.

254. Welters ID, Menzebach A, Goumon Y, Langefeld TW, Teschemacher H, Hempelmann G, Stefano GB. Morphine suppresses complement receptor expression, phagocytosis, and respiratory burst in neutrophils by a nitric oxide and mu(3) opiate receptor-dependent mechanism. *J Neuroimmunol* 2000; 111(1-2):139-145.
255. Wenisch C, Narzt E, Sessler DI, Parschalk B, Lenhardt R, Kurz A, Graninger W. Mild intraoperative hypothermia reduces production of reactive oxygen intermediates by polymorphonuclear leukocytes. *Anesth Analg* 1996; 82(4):810-816.
256. Werfel T, Witter W, Götze O. CD11b and CD11c antigens are rapidly increased on human natural killer cells upon activation. *J Immunol* 1991; 147(7):2423-2427.
257. White-Owen C, Alexander JW, Babcock GF. Reduced expression of neutrophil CD11b and CD16 after severe traumatic injury. *J Surg Res* 1992; 52(1):22-26.
258. White Owen C, Alexander JW, Sramkoski RM, Babcock GF. Rapid whole-blood microassay using flow cytometry for measuring neutrophil phagocytosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30(8):2071-2076.
259. Wichmann MW, Inthorn D, Andress HJ, Schildberg FW. Incidence and mortality of severe sepsis in surgical intensive care patients: the influence of patient gender on disease process and outcome. *Intensive Care Med* 2000; 26(2):167-172.
260. Wiel E, Pu Q, Leclerc J, Corseaux D, Bordet R, Lund N, Jude B, Vallet B. Effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril on endothelial injury and hemostasis in rabbit endotoxic shock. *Intensive Care Med* 2004; 30(8):1652-1659.
261. Wilcoxon F, Wilcox RA. Some rapid approximate statistical procedure. American Cyanamid Co. Lederle Laboratories. Pearl River, New York 1964.
262. Wilson BM, Severn A, Rapson NT, Chana J, Hopkins P. A convenient human whole blood culture system for studying the regulation of tumour necrosis factor release by bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol Methods* 1991; 139(2):233-240.
263. Wissink S, van de SA, Caldenhoven E, Koenderman L, van der Saag PT. NF-kappa B/Rel family members regulating the ICAM-1 promoter in monocytic THP-1 cells. *Immunobiology* 1997; 198(1-3):50-64.
264. Wolf G. Free radical production and angiotensin. *Curr Hypertens Rep* 2000; 2(2):167-173.
265. Wolf G, Wenzel U, Burns KD, Harris RC, Stahl RA, Thaiss F. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors. *Kidney Int* 2002; 61(6):1986-1995.
266. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994; 269(7):4705-4708.

267. Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. Comparison of cytokine production in cultures of whole human blood and purified mononuclear cells. *Cytokine* 1999; 11(8):600-605.
268. Yasui K, Becker EL, Sha'afi RI. Lipopolysaccharide and serum cause the translocation of G-protein to the membrane and prime neutrophils via CD14. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183(3):1280-1286.
269. Yavuz D, Koc M, Toprak A, Akpinar I, Velioglu A, Deyneli O, Haklar G, Akalin S. Effects of ACE inhibition and AT1-receptor antagonism on endothelial function and insulin sensitivity in essential hypertensive patients. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2003; 4(3):197-203.
270. Yeh CH, Chen TP, Wu YC, Lin YM, Jing LP. Inhibition of NFkappaB activation with curcumin attenuates plasma inflammatory cytokines surge and cardiomyocytic apoptosis following cardiac ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 2005; 125(1):109-116.
271. Yeh CH, Lin YM, Wu YC, Lin PJ. Inhibition of NF-kappa B activation can attenuate ischemia/reperfusion-induced contractility impairment via decreasing cardiomyocytic proinflammatory gene up-regulation and matrix metalloproteinase expression. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 45(4):301-309.
272. Yoshiyama M, Omura T, Takeuchi K, Kim S, Shimada K, Yamagishi H, Teragaki M, Akioka K, Iwao H, Yoshikawa J. Angiotensin blockade inhibits increased JNKs, AP-1 and NF- kappa B DNA-binding activities in myocardial infarcted rats. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33(4):799-810.
273. Youssef PP, Mantzioris BX, Roberts Thomson PJ, Ahern MJ, Smith MD. Effects of ex vivo manipulation on the expression of cell adhesion molecules on neutrophils. *J Immunol Methods* 1995; 186(2):217-224.
274. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000;342(3):145-153.
275. Zahler S, Kowalski C, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, Gerlach E. The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J Immunol Methods* 1997; 200(1-2):173-179.
276. Zahler S, Massoudy P, Hartl H, Hahnel C, Meisner H, Becker BF. Acute cardiac inflammatory responses to postischemic reperfusion during cardiopulmonary bypass. *Cardiovasc Res* 1999; 41(3):722-730.
277. Zhang J, Kaupke CJ, Yousefi S, Cesario TC, Vaziri ND. Flow cytometric investigation of neutrophil activation pathways by n-formyl-Met-Leu-Phe and phorbol myristate acetate. *Biol Cell* 1995; 84(3):147-153.
278. Zimmerman GA, McIntyre TM, Mehra M, Prescott SM. Endothelial cell-associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion. *J Cell Biol* 1990; 110(2):529-540.

8 Anhang

8.1 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1: Die Komplementrezeptoren CR 1 (CD35) und CR3 (CD11b/CD18) vermitteln die Erkennung opsonierter Partikel durch Phagozyten. Modifiziert nach [252].	3
Abbildung 2: Darstellung der NF- κ B- und AP-1-Aktivierung. Modifiziert nach [163] und [253].	5
Abbildung 3: Prinzip der Funktionsweise eines Flow-Zytometers. Das Laserlicht wird durch eine Zelle (Event) abgelenkt. Modifiziert nach [186].	24
Abbildung 4: FSC/SSC- Diagramm	26
Abbildung 5: „Live-Gating“	27
Abbildung 6: Negativ und Positiv-Darstellung der FL1-Height	27
Abbildung 7: Expression des Oberflächenrezeptors CR3 (CD11b/CD18) auf PMN nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12. Die Justierung des Durchflusszytometers erfolgte mittels unmarkiertem Antikörper (erste Säule).	31
Abbildung 8: Expression des Oberflächenrezeptors CR3 (CD11b/CD18) auf PMN nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12. Die Justierung des Durchflusszytometers erfolgte mittels unmarkiertem Antikörper (erste Säule).	31
Abbildung 9: Intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors AP-1 in PMN nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.	32
Abbildung 10: Intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors AP-1 in PMN nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.	33
Abbildung 11: Intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors NF- κ B in PMN nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.	34
Abbildung 12: Intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors NF- κ B in PMN nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.	34
Abbildung 13: Konzentration des Entzündungsmediators Interleukin-8 im Überstand nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.	35
Abbildung 14: Konzentration des Entzündungsmediators Interleukin-8 im Überstand nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.	36
Abbildung 15: Phagozytoseaktivität der PMN nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat (ausgewiesen als ng/ml) Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.	37

Abbildung 16: Phagozytoseaktivität der PMN nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat (ausgewiesen als ng/ml) Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.	37
Abbildung 17: Oxidativer Burst der PMN nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat (ausgewiesen als ng/ml) Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.	38
Abbildung 18: Oxidativer Burst der PMN nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat (ausgewiesen als ng/ml). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.	38
Abbildung 19: Expression des Oberflächenrezeptors CR3 (CD11b/CD18) auf Monozyten nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12. Die Justierung des Durchflusszytometers erfolgte mittels unmarkiertem Antikörper (erste Säule).	39
Abbildung 20: Expression des Oberflächenrezeptors CR3 (CD11b/CD18) auf Monozyten nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12. Die Justierung des Durchflusszytometers erfolgte mittels unmarkiertem Antikörper (erste Säule).	40
Abbildung 21: Expression des Oberflächenrezeptors CD14 auf Monozyten nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat und LPS-Stimulation (ausgewiesen als ng/ml). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.	41
Abbildung 22: Expression des Oberflächenrezeptors CD14 auf Monozyten nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat und LPS-Stimulation (ausgewiesen als ng/ml). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.	41
Abbildung 23: Intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors AP-1 in Monozyten nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12.	42
Abbildung 24: Intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors AP-1 in Monozyten nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12...	43
Abbildung 25: Intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Monozyten nach 15 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12...	44
Abbildung 26: Intranukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Monozyten nach 180 minütiger Inkubation mit Quinaprilat und Enalaprilat in verschiedenen Konzentrationen (ausgewiesen als ng/ml) mit und ohne LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n=12...	44

8.2 Abkürzungen

α	Alpha
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACCP/SCCM	American College of chest physicians/ Society of critical care medicine
Aqua dest	Aqua destillatum
AP-1	Aktivatorprotein-1
ARDS	Acute-respiratory-distress-syndrome
AT	Angiotensin
β	Beta
BMC	Bone-marrow-cell
B ₂ R	Bradykininrezeptor 2
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Zirka
CD	Cluster of Differentiation
CK-MB	Kreatinkinase-MB
CR	Komplementrezeptor
C-	Komplementfaktor
Ca ²⁺	Kalziumion
CI	Cardiac Index
CO ₂	Kohlendioxid
CPB	Cardio-pulmonary-bypass
CRP	C-reaktives Protein
DAC	1,2-Diacylglycerol
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d.h.	Das heißt
DHR	Dehydrorhodamin
DO ₂	Sauerstoffangebot
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-Assay

ET ₁	Endothelin 1
et al.	Et alii
ERK's	Extracellular-signalregulated-kinase
FACS	Fluorescens-activated-cell-sorter
Fa.	Firma
Fe ³⁺	Eisen
TGF	Transforming-growth-factor
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
Fc	Fragment-crystalline
FL	Fluoreszenz
FMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	Forward-Angle-Light-Scatter
°C	Grad Celsius
γ	Gamma
g	Erdbeschleunigung
G-CSF	Granulocyte-colony-stimulating-factor
h	Stunde
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HNA	Humanes-Neutrophiles-Alloantigen
HO ₂ [•]	Perhydroxylradikal
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICAM	Intercellular-adhesion-molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INOS	Induzierbare NO-Synthase
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
i.v.	Intravenös
JNK's	C-jun-NH ₂ -terminal-kinase
K ⁺	Kaliumion
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramm
KgKG	Kilogramm Körpergewicht
λ	Lamda

LASER	Light-amplification by stimulated-emission of radiation
LBP	LPS-bindendes-Protein
LFA	Lymphozyten-funktionsassoziiertes-Antigen
L-NAME	N(Omega)-Nitro-L-Arginin-Methylester
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MAP-Kinase	Mitogen-activated-kinase-protein
MCP	Monocyte-chemotractant-protein
Mg	Milligramm
min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mM	Millimol
MODS	Multiorgan-dysfunctions-syndrom
mRNA	Messenger-ribonucleid-acid
MSC	Marrow-stoma-cell
mW	Milliwatt
μg	Mykrogramm
μl	Mykroliter
μm	Mykrometer
μM	Mykromol
Na^+	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-diphosphat
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
NF- κB	Nuclear Factor-kappa B
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
o.g.	Oben genannt
O_2	Superoxidanionen
$\text{O}_{2\text{ER}}$	Sauerstoffextraktionsrate
PAP	Pulmonalarterieller Druck
paO_2	Sauerstoffpartialdruck

PAMP	Pathogen-associated-molecular-pattern
PBS	Phosphat-buffered-saline
PCWP	Pulmonalkapillärer Verschlussdruck
PDGF	Platelet-derived-growth-factor
pH	Potentia hydrogenii
PI	Propidiumiodid
pg	Pikogramm
PGE	Prostaglandin
PGI	Prostazyklin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PRR	Pattern-recognition-receptors
/	Pro
%	Prozent
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	Reactive-oxygen-species
RPMI	Rockwell-park-memorial-institut
RT-PCR	Reverse-transcriptase-polymerase-chain-reaction
RVEF	Rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion
SSC	Side-scatter
SIRS	Systemic-inflammatory-response-syndrome
St.aureus	Staphylococcus aureus
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
T-Zellen	Thymus-Zellen (Lymphozyten)
u.a.	Unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
VCAM	Vascular-celladhesion-molecule
VEGF	Vascular-endothelial-growth-factor
VO ₂	Sauerstoffaufnahme
z.B.	Zum Beispiel
z.T.	Zum Teil

8.3 *Verwendete Materialien und Reagenzien*

Substanz bzw. Material	Hersteller
Accupro [®]	Pfizer AG , Zürich, Schweiz
Anti-AP-1 (c-jun) Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA
Anti-NFκB (p65) polyklonaler rabbit Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA
Anti-CD11b/CD18-Antikörper Klon 44	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anti-CD11b/CD18-Antikörper Klon 44 / FITC	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anti-CD14-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA
Anti-CD14-Antikörper/FITC	Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA
Anti-Rabbit-IgG / FITC Antikörper FITC	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anti-human-IgG Antikörper / FITC	BD PharMingen, San Diego, Ca, USA
Aqua ad iniectabilia	Baxter, Deerfield, IL, USA
Assay Diluent	BD PharMingen, San Diego, Ca, USA
CellQuest [®] Software	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Cycle Test [™] Plus DNA Reagent KIT	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
ELISA –Reader	Bio-Rad, USA
FACS [®] -Calibur [™]	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS [®] -Flow [™]	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS- [®] Brand-Lysing-Solution	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FLMP	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
LPS (Serotyp 026:B6)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
OptEIA [™] Set: Anti-human IL-8	BD PharMingen, San Diego, Ca, USA
PBS	BAG, Lich, Deutschland
Phagoburst-Testkit	Orpegen Pharma, Heidelberg, Deutschland
Power MAC	Apple, Cupertino, Ca, USA
RPMI-1640 Medium	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tween 20	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Xanef [®]	MSD Sharp&Dohme, Haar, Deutschland

9 Schriftliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.“

Frankfurt, 08.08.2009

.....

Christian Reyher

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Frau PD Dr. med. Ingeborg Welters für die Überlassung des Themas, stetige Ansprechbarkeit, Kompetenz, Antrieb, gelebte Freude an Forschung und eine außergewöhnlich engagierte und freundschaftliche Betreuung während der gesamten Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Gunter Hempelmann für die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Mitarbeit in der Abteilung Anästhesiologie und operative Intensivmedizin.

Herrn Dr. med. Georg Hafer für eine besondere Freundschaft, die in guten Zeiten Spaß macht und in schlechten Zeiten zeigt was sie Wert ist.

Herrn Dr. med. Axel Menzebach für die Einarbeitung sowie theoretische und praktische Unterstützung in der Frühphase der Arbeit.

Herrn Dipl.-Math. Martin Mogk (MoRe Data GmbH) für die statistische Auswertung der Daten.

Frau Birgit Weber (†) und dem Team der Lungenfunktion für große Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor.

Frau Dr. sc. agr. Stephanie-Mabinti Busche für Liebe und Freundschaft in aller Zeit.

Frau Dr. med. Christiane Inholte für die detaillierte Durchsicht der Arbeit.

Allen Probanden für ihre Bereitschaft zur Teilnahme an dieser Studie.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

12 Veröffentlichung der Studienergebnisse

Welters ID, Reyher C, Hafer G, Hempelmann G, Menzebach A, Müller M, Heidt MC. ACE inhibitors enalaprilat and quinaprilat inhibit monocyte surface receptor expression Eur J Anaesthesiology 2004, 21, Supplement S33, S7

ACE inhibitors enalaprilat and quinaprilat inhibit monocyte surface receptor expression

I.D. Welters, C. Reyher, G. Hafer, G. Hempelmann, A. Menzebach, M. Mueller, M.C. Heidt

Departments of Anaesthesiology and Cardiovascular Surgery, University Hospital Gießen, Germany

Introduction: Cardiac surgery with or without cardiopulmonary bypass (CPB) leads to activation of cellular as well as humoral components of the immune response. The majority of patients with coronary artery disease are treated with ACE inhibitors to optimize afterload. However, the possible immunomodulating effects of ACE inhibitors remain to be elucidated. The aim of this study was to investigate anti-inflammatory effects of the ACE inhibitors enalaprilat and quinaprilat on spontaneous and LPS-induced monocyte surface receptor expression.

Method: The study was approved by the local ethical board. After informed consent 100 µL whole blood from 12 healthy donors was incubated with different concentrations of enalaprilat and quinaprilat for 15 and 180 minutes respectively, where indicated, aliquots were stimulated with 100 ng/mL LPS. Blood incubated with a FITC-labelled non-specific antibody against IgG served as a control and for flow cytometer setup. Fluoresceine isothiocyanate (FITC) labelled antibodies against LPS receptor CD14 and complement receptor 3 (CD11b/CD18) were used for determination of surface receptor expression. Median fluorescence intensities were determined to assess receptor expression.

Results: Enalaprilat and quinaprilat inhibited spontaneous CD14 expression in a time and concentration dependent manner:

Incubation Anti-CD14 Q 100 ng/ml E 100 ng/ml

15 minutes 384.6 ± 32.2 316.6 ± 33.2* 310.3 ± 23.4*

30 minutes 450.2 ± 34.8 347.6 ± 40.1* 331.2 ± 40.7*

* denotes $P < 0.05$ compared to FITC-anti-CD14 (Wilcoxon–Wilcox test and Bonferroni procedure). Q = quinaprilat, E = enalaprilat.

This decrease in CD14 expression correlated well with a reduced spontaneous CD11b expression:

Incubation Anti-CD11b Q 100 ng/ml E 100 ng/ml

15 minutes 162.5 ± 60.2 128.8 ± 51.6* 133.7 ± 51.9*

30 minutes 76.4 ± 24.4 63.3 ± 18.1* 59.2 ± 14.8*

LPS-induced CD11b expression was also significantly inhibited:

Incubation Anti-CD11b Q 100 ng/ml E 100 ng/ml

15 minutes 443.1 ± 169 201.8 ± 62.1* 195.1 ± 61.3*

30 minutes 235.4 ± 120 169.3 ± 81* 159.1 ± 79.5*

Discussion: Immunoinhibitory effects of ACE inhibitors are at least partly mediated by reduced surface receptor expression. This anti-inflammatory mechanism may attenuate cell damage in ischaemia/reperfusion [1] syndromes as well as CPB-induced immune responses or cytokine production [2]. Further clinical studies are warranted to investigate whether CPB-induced monocyte activation may be influenced by pre- or intraoperative administration of ACE inhibitors.

References:

- 1 Guba M, Steinbauer M, Buchner M, et al. Differential effects of short-term ace- and AT1-receptor inhibition on postischemic injury and leukocyte adherence in vivo and in vitro. *Shock* 2000; **13**: 190–196.
- 2 Schindler R, Dinarello CA, Koch KM. Angiotensin-converting-enzyme inhibitors suppress synthesis of tumour necrosis factor and interleukin 1 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 1995; **7**: 526–533.

Welters ID, Reyher C, Nöst R, Menzebach A, Hempelmann G, Müller M. Die ACE-Hemmer Enalaprilat und Quinaprilat hemmen die Funktion neutrophiler Granulozyten. *Intensivmed Notfallmed* 2002, 39, Supplement 1, I/40

Die ACE-Hemmer Enalaprilat und Quinaprilat hemmen die Funktion neutrophiler Granulozyten

Ingeborg D. Welters, Christian Reyher, Ralph Nöst, Myron Kwapisz, Axel Menzebach, Gunter Hempelmann, Matthias Müller

*Abteilung Anaesthesiologie, Schmerztherapie und Intensivmedizin
Universitätsklinikum Gießen*

Einleitung:

In dieser Arbeit untersuchen wir die Effekte der ACE-Hemmer Quinaprilat und Enalaprilat auf die Granulozytenfunktion sowie auf die Lipopolysaccharid (LPS)-stimulierte Expression von Oberflächenrezeptoren und die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B.

Material und Methoden:

100 μ l Vollblut wurden für 15 bzw. 180 Min mit verschiedenen Enalaprilat- und Quinaprilatkonzentrationen inkubiert. Mit Hilfe von FITC-markierten Antikörpern wurde die Expression von CD11b auf der Zelloberfläche determiniert. Die Bestimmung des Oxidativen Burst erfolgte durch die Umwandlung von Dihydrorhodamin 123 in grünfluoreszierendes Rhodamin 123. Die Phagozytose-Aktivität wurde mittels FITC-markierten Bakterien ermittelt. Mit Hilfe eines durchflusszytometrischen Vollblutverfahrens wurde der p65-Gehalt im Zellkern ermittelt. Zur Auswertung diente der Median der Fluoreszenzintensität (MFI).

Ergebnisse:

Der MFI für die CD11b-Expression sank konzentrationsabhängig von 658 ± 49 (LPS-Stimulation mit 100 ng/ml) auf 279 ± 115 (Quinaprilat 10 ng/ml + LPS) bzw. 272 ± 113 (Enalaprilat 10 ng/ml + LPS). Phagozytoseaktivität und Oxidativer Burst wurden um ca. 20% reduziert. Der nukleäre p65-Gehalt wurde durch beide ACE-Hemmer um bis zu 30% vermindert. Die Dauer der Inkubationszeit blieb ohne Einfluss.

Schlussfolgerung:

Immuninhibitorische Effekte von ACE-Hemmern werden zumindest teilweise durch die hemmende Wirkung auf die Rezeptorenexpression, die Phagozytose und den Oxidativen Burst in Granulozyten erklärt. Zudem wird die LPS-induzierte Aktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B gehemmt. Diese hemmenden Effekte auf die Granulozytenfunktion könnten zu einer Begrenzung des Zellschadens nach Ischämie/Reperfusion beitragen.