



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Charakterisierung von Endotoxin-Aggregaten in Hinblick  
auf die Zitratantikoagulation“

verfasst von / submitted by

Jasmine Sadler

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2017 / Vienna, 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt /  
degree programme code as it appears on  
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /  
degree programme as it appears on  
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor



## Danksagung

*Besonders möchte ich mich bei Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die Vermittlung der Diplomarbeitsstelle und die Betreuung bedanken.*

*Ein großer Dank gilt ebenfalls meinem Betreuer Dr. Jens Hartmann, der es mir ermöglicht hat, an der Donau-Universität Krems meine Diplomarbeit durchzuführen. Weiters möchte ich mich für die engagierte Betreuung während der gesamten Zeit und für das Korrekturlesen meiner Diplomarbeit bedanken.*

*Großer Dank gebührt auch DI Stephan Harm, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist und sich immer Zeit für alle Fragen genommen hat.*

*Bedanken möchte ich mich auch bei Ute Fichtinger, die mir mit großer Hilfsbereitschaft alle nötigen Laborkenntnisse beigebracht hat.*

*Besonders möchte ich mich für die lustigen und schönen Momente während der gesamten Zeit im Zentrum für Biomedizinische Technologie bedanken.*

*Mein allergrößter Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Sebastian Renner, die mich immer auf allen Wegen unterstützt haben. Ohne euch wäre die Fertigstellung meines Studiums nie möglich gewesen.*



## Inhalt

1.	Einleitung.....	7
2.	Hintergrund.....	8
2.1.	Allgemein.....	8
2.2.	Sepsis.....	9
2.3.	Proteininteraktion .....	10
2.4.	Aggregatbildung .....	10
2.5.	Endotoxine im Blutplasma .....	12
2.6.	Extrakorporale Verfahren zur Entfernung von Endotoxinen aus Blut....	12
2.7.	Die Zitratantikoagulation .....	14
2.8.	Die Heparinantikoagulation .....	15
3.	Material & Methoden .....	16
3.1.	Material .....	16
3.1.1	Verwendete Substanzen und Chemikalien.....	16
3.1.2.	Blutaufbereitung.....	16
3.1.3.	LAL-Analytik.....	17
3.1.4.	Sonstige verwendete Materialien und Geräte.....	17
3.1.5.	Größenvermessung .....	17
3.2.	Methoden.....	18
3.2.1.	Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test).....	18
3.2.1.1.	Einfluss der Zitratzugabe auf den ionisierten Kalziumgehalt im Plasma.....	19
3.2.1.2.	Einfluss der Zitratantikoagulation auf die LPS-Aktivität im Plasma in Abhängigkeit der Zitratkonzentrationen.....	19
3.2.1.3.	Einfluss der Zitratzugabe vor oder nach der LPS-Zugabe auf die Endotoxin-Aktivität.....	20
3.2.1.4.	Die Endotoxin-Aktivität in gefrorenem, frischem und gekühltem Plasma.....	20
3.2.1.5.	Austestung der Endotoxin-Aktivität in Vollblut.....	20
3.2.1.6.	Bindung von LPS an Erythrozyten, PBMC und Thrombozyten .....	21
3.2.1.7.	Unterschiede der LAL-Aktivität in Heparinplasma und Serum.....	24
3.2.1.8.	Einfluss der Heparinkonzentration auf die Endotoxin-Aktivität in Plasma und Serum.....	24
3.2.1.9.	Einfluss von Fondaparinux auf die Endotoxin-Aktivität in Serum.....	25

3.2.2.	Zytokin-Analytik mittels Luminex.....	25
3.2.2.1.	Einfluss des Zeitpunktes der Zitratantikoagulation auf die Zytokinausschüttung in Vollblut.....	26
3.2.2.2.	Einfluss der Zitratantikoagulation und der Rekalzifizierung auf die Zytokinausschüttung durch Endotoxine.....	26
3.2.2.3.	Einfluss der Heparinkonzentration auf die Zytokinausschüttung in LPS-stimuliertem Vollblut.....	27
3.2.3.	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.....	28
3.2.3.1.	Bindung von LPS an den Fibrinklot.....	28
3.2.3.2.	Bindung von LPS an Kryopräzipitat .....	29
3.2.3.3.	Testung der LPS-Affinität zum Kryopräzipitat.....	29
3.2.4.	Einfluss von LPS auf die plasmatische Gerinnung.....	30
3.2.5.	ESPTM-Kit .....	30
3.2.6.	Vermessung der Größe von Endotoxin-Aggregaten.....	31
3.2.7.	Statistik.....	33
4.	Ergebnisse & Diskussion.....	34
4.1.	Einfluss der Zitratzugabe auf den ionisierten Kalziumgehalt im Plasma.....	34
4.2.	Einfluss der Zitratantikoagulation auf die LPS-Aktivität im Plasma in Abhängigkeit der Zitratkonzentrationen .....	36
4.3.	Einfluss der Zitratzugabe vor oder nach der LPS-Zugabe auf die Endotoxin-Aktivität.....	37
4.4.	Die Endotoxin-Aktivität in gefrorenem, frischem und gekühltem Plasma.....	38
4.5.	Austestung der Endotoxin-Aktivität in Vollblut.....	39
4.6.	Bindung von LPS an Erythrozyten, PBMC und Thrombozyten .....	40
4.7.	Unterschiede der LAL-Aktivität in Heparinplasma und Serum.....	41
4.8.	Einfluss der Heparinkonzentration auf die Endotoxin-Aktivität in Plasma und Serum.....	42
4.9.	Einfluss von Fondaparinux auf die Endotoxin-Aktivität in Serum.....	44
4.10	Zusammenfassung der getesteten Antikoagulantien und deren Einfluss auf die LPS-Aktivität in Plasma/Serum.....	44
4.11.	Einfluss des Zeitpunktes der Zitratantikoagulation auf die Zytokinausschüttung in Vollblut.....	45

4.12.	Einfluss der Zitratantikoagulation und der Rekalzifizierung auf die Zytokinausschüttung durch Endotoxine.....	48
4.13.	Einfluss der Heparinkonzentration auf die Zytokinausschüttung in LPS-stimuliertem Vollblut.....	53
4.14.	Bindung von LPS an den Fibrinklot.....	55
4.15.	Bindung von LPS an Kryopräzipitat .....	56
4.16.	Testung der LPS-Affinität zum Kryopräzipitat.....	57
4.17.	Einfluss von LPS auf die plasmatische Gerinnung.....	58
4.18.	ESP™-Kit .....	60
4.19.	Vermessung der Größe von Endotoxin-Aggregaten.....	61
5.	Zusammenfassung .....	65
6.	Abstract.....	67
7.	Literaturverzeichnis.....	69
8.	Abkürzungsverzeichnis und Akronyme.....	72
9.	Abbildungsverzeichnis .....	73
10.	Tabellenverzeichnis.....	76



## 1. Einleitung

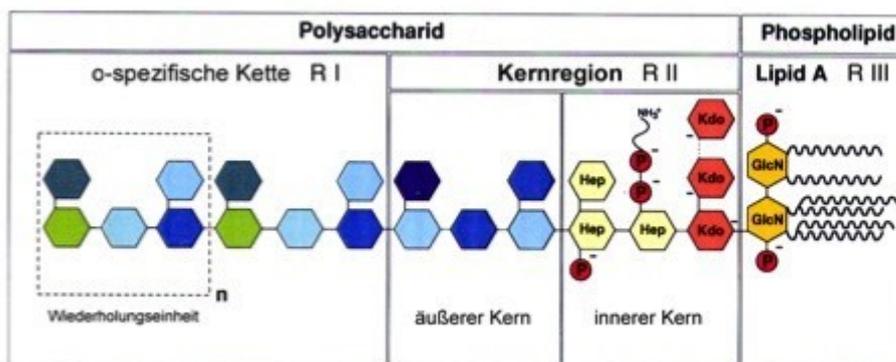
Sepsis ist die dritthäufigste Todesursache mit 1,5 Millionen Erkrankungen und 500.000 Todesfällen pro Jahr weltweit. Mit einer Sterberate von 33,3% sterben jeden Tag 154 Menschen deutschlandweit [1]. Die Therapiemöglichkeiten mit Antibiotika und die systemische Behandlung der Symptome sind unzureichend und können die Mortalität kaum senken. Die Wahl des Antibiotikums zur Sanierung des Infektionsherdes ist maßgebend. Die im Laufe der Zeit entstandenen Resistenzen, vor allem im Bereich der gramnegativen Bakterien, schmälern die Auswahl an adäquaten Antibiotika und somit die Chancen auf eine erfolgreiche Behandlung. Die Erforschung von Alternativen für die Sepsistherapie ist von großer Bedeutung.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, das Verfahren der Zitratantikoagulation hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Endotoxin-Aktivität zu untersuchen. Hierzu werden unterschiedliche Zitratkonzentrationen im Plasma, welches mit Lipopolysacchariden versetzt wurde, mittels Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) Test ausgetestet. Weiters werden die Reihenfolge der Zitratzugabe und die Endotoxin-Aktivität in verschiedenen behandelten Plasmen getestet. Um eine eventuelle Bindung an Blutzellen zu untersuchen, werden Lipopolysaccharide (LPS) unterschiedlich lange in Vollblut inkubiert und die Endotoxin-Aktivität in LAL-Tests verglichen. Anschließend werden Erythrozyten, Thrombozyten und mononukleäre Zellen des peripheren Bluts auf ihre Fähigkeit Endotoxine zu binden geprüft. Weiters wird die Zytokinausschüttung in Zusammenhang mit der Reihenfolge der Zitratzugabe und der Rekalzifizierung endotoxinhaltigen Bluts mittels ELISA (Luminex) analysiert. Zusätzlich wird der Einfluss von Heparin in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Endotoxin-Aktivität in Plasma und Serum untersucht. Ebenfalls soll die Zytokinausschüttung im Zusammenhang mit Heparin erforscht werden. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wird eine mögliche Bindung von FITC-markierten Lipopolysacchariden an ein Kryopräzipitat und einen Fibrinklot dargestellt. Zusätzlich soll der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von LPS auf die plasmatische Gerinnungskaskade untersucht werden. Der Endotoxin Sample Preparation™ – Kit (ESP™ – Kit) wird herangezogen, um Zitratplasma mit Heparinplasma auf eine mögliche Proteinbindung der Endotoxine durch Zitrat zu vergleichen. Die Vermessung der Größe der Endotoxin-Aggregate wird mit Zetatsizer Nano ZS durchgeführt. Es werden die Aggregate hinsichtlich ihrer Größe vor und nach Zitratzugabe verglichen.

## 2. Hintergrund

### 2.1. Allgemein

Endotoxine, auch Lipopolysaccharide (LPS) genannt, sind ein Teil der äußeren Zellwand von gramnegativen Bakterien. Sie werden vermehrt während der Teilung und des Wachstums der Zellen freigesetzt, vor allem jedoch beim Zelltod. Antibiotika, insbesondere Beta-Lactam-Antibiotika, stehen im Verdacht, die Anzahl der Sepsisfälle zu erhöhen, indem sie die Zellwände zerstören und somit Endotoxine freigesetzt werden können. Da LPS ca. 75% der Oberfläche auf gramnegativen Bakterien einnehmen, können somit 2 Millionen LPS-Moleküle pro Zelle vorhanden sein. Bakterien können unter widrigsten Bedingungen bestehen und sich vermehren, z.B. in Puffern oder Säuren. Daher sind auch Endotoxine ubiquitär vorhanden. Die Entfernung von Endotoxinen stellt eine große Herausforderung dar, weil Endotoxine sehr hitzestabil sind. Sie können erst ab Temperaturen von 250°C für 30 Minuten oder 180°C für mehr als 3 Stunden abgetötet werden [2]. Weiters können sie durch Säuren oder Basen von 0,1 M zerstört werden. Die maximale Kontamination mit Endotoxinen ist in allen Pharmakopoen für intravenöse Applikation von pharmazeutischen und biologischen Produkten mit 5 EU (Endotoxin Units) pro kg Körpergewicht pro Stunde angegeben [3].



**Abbildung 1: Aufbau eines Lipopolysaccharids bestehend aus Lipid A, der Kernregion und der spezifischen Kette (Oligosaccharid O) [4]**

LPS bestehen aus einem hydrophoben Teil namens Lipid A, dem „inneren und äußeren Kern“ und dem Oligosaccharid O. Lipid A ist ein Disaccherid von Glucosamin, durch seine langen Fettketten hydrophob und ist für die Verankerung in der Zellwand gramnegativer Bakterien verantwortlich. Der Kern kann aus bis zu 15

Oligosacchariden bestehen und ist negativ geladen. Er besteht aus einem äußeren Kern, der an der O-Kette hängt, und einem inneren Kern, der an Lipid A gekoppelt ist. Der innere Kern erhält seine negative Ladung durch gebundene Phosphatgruppen und kann Kationen wie  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  binden. Die O-Kette ist in der Anordnung und der Zahl der angehängten Zucker sehr variabel und entgeht somit der Antigen-Antwort. Sie kann aus bis zu 50 sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten aufgebaut sein, welche dieses Makromolekül wasserlöslich machen [5].

LPS bindet an Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP), welches in den Hepatozyten gebildet wird. Dieser Komplex bindet wiederum an CD14 Rezeptoren, welche auf Monozyten, Makrophagen und Granulozyten zu finden sind. CD14 Rezeptoren können auch in löslicher Form als sCD14 vorliegen. Sie dienen als Rezeptoren für Zellen, die selbst kein CD14 an ihrer Oberfläche exprimieren. Der Komplex aus LPS und LBP bindet an sCD14 oder CD14 und stimuliert die Bindung von TNF-alpha in den Zellen. Ein weiterer Rezeptor, der LPS binden kann, ist bacterial-permeability-increasing Protein (BPI) [6]. Weiters wurde festgestellt, dass LPS auch an Toll-like-Rezeptoren (TLR-4) binden kann. Dazu wird aber zusätzlich das Molekül MD-2 zur Bindung von LPS benötigt [7].

## **2.2. Sepsis**

Sepsis wird als lebensbedrohliche Organdysfunktion definiert, welche durch eine fehlgesteuerte Reaktion des Körpers auf eine Infektion ausgelöst wird. Physiologische, pathophysiologische und biochemische Anomalitäten, welche durch eine Infektion hervorgerufen werden, gelten als Symptome der Sepsis. Sepsis ist die primäre Ursache des Todes durch eine Infektion, insbesondere bei Nichtbehandlung und verspäteter Diagnose. Eine Unterkategorie der Sepsis ist der septische Schock, bei welchem zelluläre und metabolische Fehlfunktionen und Durchblutungsstörungen mit einem höheren Mortalitätsrisiko, als bei einer Sepsis allein assoziiert sind [8]. Bei einer Infektion kommt es zu einer Abwehrreaktion des Körpers, die sich letztendlich auch gegen körpereigene Zellen und Organe richten kann. Gelangen gramnegative Bakterien oder LPS in die Blutbahn, stimulieren sie insbesondere die Produktion von TNF-alpha, IL-6 und IL-1 in den Makrophagen. Bei einer Sepsis spielen sowohl pro-inflammatorische Zytokine als auch anti-inflammatorische Zytokine (IL-10, IL-4) als

Mediatoren des Immunsystems eine wichtige Rolle [9]. Weiters sind sekundäre Mediatoren wie Stickstoff und Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels wesentlich beteiligt. Diese Mediatoren sind primär für Schädigungen der Endothel- und Parenchymzellen verantwortlich [10]. Die Symptome reichen von Fieber, Hypothermie, „Resperatory Distress Syndrom“ und disseminierter intravasaler Gerinnung bis hin zu Multiorganversagen. Bereits Dosen von 2-4 ng/kg Endotoxine i.v. verursachen Symptome einer Influenza, jedoch ist die Dosis nicht ausreichend, um das Komplementsystem zu aktivieren [9].

### **2.3. Proteininteraktion**

Es ist nicht eindeutig geklärt, welche Interaktionen für die Bindung von Endotoxinen an Proteinen verantwortlich sind. Es sind hydrophobe Interaktionen denkbar, aber als wahrscheinlicher gelten Interaktionen mit den Phosphatgruppen des Endotoxins, die für die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  verantwortlich sind, und den Carboxylgruppen eines Proteins, welche zur Bildung stabiler Kalziumbrücken führen [11]. Zu den Biomolekülen, die Endotoxine binden können, gehören LPB, BPI, Amyloid-P-Komponenten, kationische Proteine, Laktoferrin, Hämoglobin sowie Enzyme des LAL-Tests [12]. Bestimmte Proteine, die sich im Plasma von Säugern befinden, können durch Interaktion mit LPS die Immunantwort von LPS verstärken oder hemmen [13]. Das Serumprotein BPI sowie die Plasmaproteine HDL oder LDL, welche für Bindung und Metabolismus von Triglyceriden und Cholesterin verantwortlich sind, können LPS binden und dessen Toxizität herabsetzen [14]. LPB hingegen verstärkt die Immunantwort und führt dazu, dass geringste Mengen an Endotoxinen bioaktiv werden. Die Proteinbindung von Endotoxinen erschwert deren Entfernung mit extrakorporalen Therapie.

### **2.4. Aggregatbildung**

Lipopolysaccharide, die aus der äußeren Membran gramnegativer Zellen freigesetzt wurden, formen Mizellen oder Aggregate. Diese Lipopolysaccharid-Einheiten können durch die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  große Vesikel bilden. Diese zweiwertigen Ionen dienen als Verbindung zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen des inneren Kerns [15].

In wässrigen Lösungen können Detergenzien wie Deoxycholsäure Mizellen zerschlagen und zur Bildung von Monomeren beitragen, deren molekulare Masse 10.000-20.000 Dalton beträgt. Diese Schritte sind reversibel, wenn die Detergenzien entfernt werden und bivalente Kationen erneut hinzugefügt werden. Aggregate können bis zu 0,1 µm groß werden und in hexagonaler, lamellarer, non-lamellarer kubischer oder in invertierter hexagonaler Form auftreten [16] [17]. Durch Zugabe von Ca<sup>2+</sup> zu Protein-LPS-Lösungen kommt es ebenfalls zur Reaggregation der LPS-Subeinheiten [18].

Als die aktive Subeinheit in Aggregaten wird Lipid A benannt. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass reines Lipid A in Form von Aggregaten von 300.000-1.000.000 Dalton in physiologischen wässrigen Lösungen vorliegt [16]. Galanos et al. zeigten, dass Lipid A die aktive Subeinheit des Lipopolysaccharids ist. Synthetisch hergestelltes Lipid A konnte im Tierversuch bei der intravenösen Injektion dieselben Reaktionen hervorrufen wie natives LPS. Dazu gehörten Toxizität, Pyrogenität, TNF-Alpha-Aktivität und die Induktion der Prostaglandin-Synthese in den Makrophagen[19].

Es ist weitgehend unklar, ob Aggregate oder Monomere die biologisch aktive Form von Endotoxinen darstellen. Müller et al. plädierten, dass der biologisch aktive Zustand von Endotoxinen die Aggregate und nicht die Monomere sind. Um diese Hypothese zu beweisen, wurden durch Dialyse Endotoxin-Monomere von Suspensionen von Endotoxin-Monomeren mit Endotoxin-Aggregaten getrennt und die biologische Aktivität der Monomere und Aggregate in gleicher Konzentration vermessen. Die Ergebnisse zeigten, dass nur Endotoxin-Aggregate die biologisch aktive Form darstellen [20]. Ribi et al. führten Versuche mit Aggregaten durch, die durch das Gallensalz Natriumdesoxycholat (NaD) zerschlagen wurden. Die entstandenen Monomere zeigten keine Pyrogenität nach der Injektion. Nachdem diese Mischung von LPS und Natriumdesoxycholat im Anschluss wieder verdünnt wurde, konnte keine Reduktion der Pyrogenität festgestellt werden. Man geht davon aus, dass sich die Endotoxine wieder reaggregieren und somit ihre volle Pyrogenität wiedererlangen [21]. Takayama et al. hingegen konnten beweisen, dass Monomere *in vitro* eine vielfach höhere biologische Aktivität vorweisen als Aggregate [22].

Des Weiteren wird diskutiert, ob die Struktur der Aggregate einen Einfluss auf die Pyrogenität aufweist. Lamellare Strukturen werden als biologisch inaktiv angesehen und somit nicht als pyrogen oder toxisch. Dreidimensionale Strukturen wie die invertierte kubische Form sollen eine besonders hohe Aktivität im menschlichen Organismus aufweisen [17].

## **2.5. Endotoxine im Blutplasma**

Manche Autoren gehen davon aus, dass Endotoxine in Plasma an Proteine binden und inaktiviert werden [23]. In einem Versuch von Ribí et al. wurden Endotoxine mit NaD in Monomere zerschlagen. Eine Reaggregation und somit eine Wiederherstellung der Pyrogenität, nach Verdünnung, konnte durch Zugabe von kleinen Mengen an humanem Plasma vor der Verdünnung unterbunden werden [21]. Zugabe von proteolytischen Enzymen und anschließende Fällung mit Ethylalkohol hingegen führte zu einer Wiederherstellung der Pyrogenität [23]. Man geht davon aus, dass Endotoxinmonomere, die durch Auflösen von Aggregaten entstehen, im Plasma an Proteine gebunden werden. In einem Pyrogenitätstest konnte keine Pyrogenität durch Monomere ausgelöst werden [21].

## **2.6. Extrakorporale Verfahren zur Entfernung von Endotoxinen aus Blut**

### Allgemein

Es gibt noch keine effizienten Verfahren, um Endotoxine aus Proteinlösungen zu entfernen. Zu den Problemen zählen unter anderem unzureichende Selektivität, geringe Absorptionskapazität und nicht gewährleistete Unversehrtheit von Proteinen. Um Endotoxine effizient entfernen zu können, muss eruiert werden, zu welchen Proteinen sie die größte Affinität besitzen, dies ist bis jetzt nicht gänzlich geklärt.

Es wurden Strategien entwickelt, welche nur auf bestimmte Charakteristika Rücksicht nehmen. Zum Beispiel können durch Ultrafiltration große Endotoxin-Aggregate von kleinen Proteinen entfernt werden, jedoch scheitert diese Methode bei großen Proteinen. Weiters können Endotoxin-Protein-Interaktionen dazu führen, dass Proteine Endotoxinmonomere durch die Membran transportieren und die Methode somit ineffizient ist. In wässrigen Lösungen ist es einfach, durch Ultrafiltration

Endotoxine zu entfernen, jedoch ist nicht bekannt, welche Form Endotoxine in Proteinlösungen annehmen können [12]. Bei Anionenaustauschern werden die negativ geladenen Phosphatgruppen von Endotoxinen ausgenutzt, aber es besteht die Gefahr eines Verlustes von negativ geladenen Proteinen, die ebenfalls an die Matrix binden können [12].

### Alteco

Alteco LPS Adsorber (Alteco Medical AB, Lund, Schweden) findet in der extrakorporalen Blutreinigung Anwendung. Er adsorbiert LPS aus heparinisiertem Blut mit einer Blutflussrate von  $150 \pm 50$  ml/min für eine Behandlungsdauer von 2 Stunden bis maximal 6 Stunden. Sollte eine ungenügende Verbesserung des Gesundheitszustandes feststellbar sein, kann die Behandlung nach 24 Stunden wiederholt werden. Der Adsorber basiert auf kationischen Peptiden, die auf einer porösen Polyethylenmatrix kovalent immobilisiert sind. LPS besitzt durch seine negativen Ladungen hohe Affinität zu den positiv geladenen Peptiden des Adsorbers und wird somit über ionische Wechselwirkungen adsorbiert. Die Absorptionskapazität wird von der Herstellern mit  $> 7500$  EU beziffert. In einer Studie von V.V. Kulabukhov (2008) konnte eine LPS-Reduktion von 1,44 EU/ml vor der Behandlung zu 0,03 EU/ml nach der Behandlung bewiesen werden. Zusätzlich wurde eine Zytokin-Reduzierung und eine Verbesserung der Hämodynamik beobachtet [24]. Eine weitere Studie konnte jedoch keine signifikante Reduktion der LPS-Konzentration in verschiedenen Medien feststellen. Versuche in Puffer, Proteinlösung, Serum, heparinisiertem Plasma und Blut brachten allesamt ungenügende Ergebnisse in Hinsicht auf die LPS-Reduktion [25]. Aufgrund der geringen Anzahl an aussagekräftigen klinischen Studien ist die Wirksamkeit nicht erwiesen.

### Toramyxin

Toramyxin (Toray Medical Co., Chiba, Japan) ist ein Endotoxin-Adsorber für die extrakorporale Hämoperfusion, der auf immobilisiertem Polymyxin B beruht, das kovalent an Fasern aus Polyesterderivaten gebunden ist. Polymyxin B ist ein Antibiotikum, das vor allem bei Infektionen mit multi-resistenten gramnegativen Bakterien zum Einsatz kommt. Seine Struktur besteht aus einem polykationischen Peptidring und einer Tripeptid-Seitenkette mit einem Fettsäurerest. Mit seinem Peptidring bindet Polymyxin B an die Membranen von Bakterien und verdrängt die

zur Brückenbildung von LPS nötigen Ionen  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  [26]. Weiters entstehen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Aminosäuren des Polymyxin B und der hydrophoben Region des LPS, dem Lipid A [27]. Toramycin wurde an insgesamt 150.000 Patienten seit 1994 in Japan und seit 2002 in Europa in mehr als 90 Studien angewendet [28] [29].

## **2.7. Die Zitratantikoagulation**

Zitrat, das Anion der Zitronensäure, spielt im Körper als Zwischenprodukt des Zitratzyklus, der in den Mitochondrien stattfindet, eine wichtige Rolle. Zitrat wird vorwiegend in der Leber, aber auch in den Nieren und der Skelettmuskulatur metabolisiert [30]. Neben Heparin kommt in extrakorporalen Blutreinigungsverfahren auch Zitrat zur Antikoagulation des Bluts zum Einsatz. Zitrat bildet im Blut Chelatkomplexe mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  und wirkt auf verschiedensten Ebenen des Gerinnungssystems durch den Entzug von  $\text{Ca}^{2+}$ . Fehlt  $\text{Ca}^{2+}$  als Gerinnungsfaktor so kann die plasmatische Gerinnungskaskade nicht ablaufen. Der physiologische Spiegel an ionisiertem Kalzium (iCa) beträgt 1,15 – 1,35 mmol/l. Bei extrakorporalen Verfahren werden ionisierte Kalziumspiegel von 0,3 mmol/l im extrakorporalen Kreislauf angestrebt.

Bei der Zitratdialyse wird Zitrat in Form von Trinatriumzitrat dem arteriellen Schenkel des Dialysesystems zugeführt. Die Dialyse erfolgt unter Verwendung eines bicarbonathältigen, kalziumfreien Dialysats. Ein Großteil des Trinatriumzitrats wird über den Dialysator entfernt und gelangt nicht mehr in den systemischen Blutkreislauf des Patienten. Bevor das Blut wieder in den Patienten rückinfundiert wird, wird am venösen Schenkel Kalzium substituiert, um den Effekt der Antikoagulation wieder aufzuheben [31]. Nur ein geringer Teil des Zitrats gelangt dennoch in die Blutbahn des Patienten und wird durch die Leber metabolisiert. Die Verwendung von Zitrat statt Heparin führt zu weniger Gerinnselbildung im Filter. Weitere Vorteile im Vergleich zu Heparin sind längere Haltbarkeit der Filter, Hemmung von Entzündungsmediatoren, selteneres Auftreten von Blutungen und geringere Aktivierung der Thrombozyten. Nachteile der Zitratantikoagulation sind das Auftreten von metabolischen Alkalosen, Hypernatriämie sowie bei Leberschäden metabolische Azidosen. Alkalosen können durch angepasste Dialysatlösungen mit verringerter Bikarbonatkonzentration vermieden werden. Hypernatriämien, ausgelöst

durch Trinatrium-Zitratlösungen, können durch die Verringerung der Natriumkonzentration im Dialysat verhindert werden. Patienten mit Leberversagen oder chronischer Leberinsuffizienz können Zitrat nicht in selbigen Maß metabolisieren wie gesunde Patienten. Dadurch kann es durch Zitratakkumulation zur Ausbildung von metabolischen Azidosen kommen [31].

## **2.8. Die Heparinantikoagulation**

Heparin kommt neben Histamin in Gewebs-Mastzellen des Körpers vor. Seine Funktion ist noch unzureichend geklärt, jedoch wird angenommen, dass es eine gerinnungshemmende Eigenschaft bei der histamininduzierten Vasodilatation einnimmt. Therapeutisches Heparin wird aus Schweindarmmucosa und Rinderlungen extrahiert. Heparin ist ein Glucosaminoglykan, das einen variablen Molekülaufbau aus D-Glucosamin und Uronsäure mit variabler Kettenlänge besitzt. Der antikoagulatorische Effekt beruht auf der Bindung des Pentasaccharids, bestehend aus drei sulfatierten Glucosaminen und zwei Uronsäuremolekülen, an Antithrombin III. Durch die Aktivierung von Antithrombin III erfolgt die Bindung und daraus resultierende Inaktivierung von aktivierten Gerinnungsfaktoren (Thrombin). Diese Reaktion läuft unter physiologischen Bedingungen relativ langsam ab, wird aber durch Heparin stark beschleunigt. Der Komplex aus Heparin und Antithrombin inaktiviert auch die Faktoren IIa, Xa, IXa, XIa und XIIa. Durch die Sulfatgruppen ist Heparin stark negativ geladen und bildet mit zahlreichen körpereigenen Bindungspartnern Komplexe. Weiters ist die Anlagerung an zelluläre Membranen möglich und führt neben der antikoagulatorischen Funktion zu zahlreichen weiteren Wirkungen [32].

### **3. Material & Methoden**

#### **3.1. Material**

Folgende Endotoxine wurden für die Experimente von Sigma Aldrich, Wien verwendet:

- Lipopolysaccharid von *Pseudomonas aeruginosa* 10 (L-7018, Lot: 78H4104)
- Lipopolysaccharid von *Escherichia coli* 055:B5 (L-2880, Lot: 025M4040V)
- FITC-Lipopolysaccharid von *Escherichia coli* 0111:4 (F-3665, Lot: 012M4023V)

#### **3.1.1. Verwendete Substanzen und Chemikalien**

Die physiologische Kochsalzlösung und Aqua bidestillata wurden von Fresenius Kabi Austria, Graz, erworben. Die Natrium-Zitrat-Lösung (500 mmol/L) und die Kalziumchlorid/Magnesiumchlorid (500/250 mmol/L)-Lösung wurde von der Anstaltsapotheke des Klinikums Bad Ischl gekauft.

Heparin Gilvasan® 5000 I.E./ml wurde von Gilvasan Pharma GmbH, Wien, bezogen. Weiters wurde Arixtra® 1,5 mg / 0,3 ml, Aspen, Frankreich, verwendet.

#### **3.1.2. Blutaufbereitung**

Für die Versuche wurde jeweils drei gesunden Spendern venöses Blut abgenommen. Für die Plasmagewinnung wurde den Vacuetten-Tubes 9 ml ohne Additiv (Ref.: 45501) entweder Heparin oder Zitrat zugesetzt. Für die Serumgewinnung wurden die Vacuetten ohne Additiv zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im Anschluss wurden die Blutproben bei 2300 g für 10 Minuten abzentrifugiert (Heraus Multifuge X1R, Thermo Fischer Scientific, Deutschland). Das überstehende Plasma oder Serum wurde abpipetiert und entweder sofort verwendet oder bei -20 °C eingefroren. Gefrorenes Plasma wurde bei 37 °C für 10 Minuten im Wasserbad aufgetaut.

### **3.1.3. LAL-Analytik**

Für die LAL-Analytik wurde Charles River Endosafe Endochrome-K, Charles River Laboratories, Charleston, verwendet. Die Mikrotiterplatten (96 well, flat bottom, Endosafe<sup>®</sup>, Charles River Laboratories, Charleston) wurden mit dem Microplatten-Reader Tecan Sunrise ausgelesen. Endoscan-V (Version 3.1.0), Charles River Endosafe<sup>®</sup>, Charleston, wurde als Software eingesetzt. Für die LAL-Analytik kamen pyrogenfreie Charles River Endosafe<sup>®</sup> Tubes (10x75 mm und 12x75 mm), Charles River Laboratories, Charleston, zum Einsatz. Es wurden sterile Pipettenspitzen Eppendorf Biopur<sup>®</sup> (100 µl, 1000 µl, 5000 µl), Eppendorf AG, Deutschland, verwendet.

### **3.1.4. Sonstige verwendete Materialien und Geräte**

Es kamen 2 ml Vacuetten Tubes ohne Additiv und Polypropylen-Röhrchen (15 ml und 50 ml) und Mikrozentrifugenröhrchen (1,5 ml und 2,0 ml), Greiner Bio-one, Österreich, zur Anwendung.

Für die Bestimmung der Ionen wurde ein Ionometer (Elektrolyt 8<sup>+</sup> Analyzer, NOVA Biomedical) verwendet. Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde mittels Hitachi TM-1000 (Roche Diagnostics GmbH, Österreich) durchgeführt. Die Proben wurden mit dem Sputter Coater Quorum Q150R ES, Gabler Labor Instrumente GmbH, Deutschland, beschichtet. Mikroskopische Aufnahmen mit Fluoreszenz wurden mit einem Olympus BX51 Mikroskop, Olympus Optical Co., Japan, durchgeführt. Für die UV-Anregung wurde Olympus MT 20 Cell IR, Olympus Biosystems, Deutschland, eingesetzt. Weiters wurde ein Plattenphotometer (Synergy 2, Biotek) mit der Software Gen5 genutzt. Für die Durchführung der Experimente wurden ein Vortexer (Scientific Industries Vortex-Genie 2) und eine Mikrozentrifuge verwendet.

### **3.1.5. Größenvermessung**

Die für die Vermessung notwendigen Filter wurden bei Sigma Aldrich, Wien, erworben. Die Partikelgröße wurde mit Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments LTD., Worcestershire, UK, gemessen. Zur Herstellung der Lysate wurde *Escherichia coli* (ATCC<sup>®</sup> 11303<sup>TM</sup>), American Type Culture Collection, verwendet.

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test)

Neben dem Kaninchenpyrogentest und dem Monozyten-Aktivierungs-Test (MAT) dient der LAL-Test zur Detektion von Endotoxinen. Verschiedene Methoden zur Durchführung des LAL-Tests werden angeboten: Gel-Clot-Assay, chromogene Substrat-Methode und turbidimetrische Methode. Die Detektion von LPS ist bei der Herstellung von parenteralen Zubereitungen von essentieller Bedeutung für die pharmazeutische und medizinische Industrie.

Hierfür wird Blut aus dem Pfeilschwanzkrebs (*Limulus polyphemus*) gewonnen. Die im Blut befindlichen Amöbozyten reagieren mit gramnegativen Bakterien, was zur Ausschüttung der „kleinen“ und „großen“ Granulate führt. Durch die Degranulation werden Gerinnungsfaktoren in das Blut des Pfeilschwanzkrebses abgegeben [33, 34].

Am Anfang dieser Kaskade steht Faktor C, welcher die Reaktion für die Umwandlung von löslichem Koagulogen in unlösliches Koagulogen-Gel in Gang setzt. Endotoxine gramnegativer Bakterien führen zur Aktivierung von Faktor C (Glykoprotein). Die Aktivierung von Faktor C setzt die Aktivierung von Faktor B in Gange. Diese Kaskade kann auch über (1,3)-Beta-D-Glucan aktiviert werden, indem es Faktor G aktiviert. Im nächsten Schritt werden Proclottingenzyme durch die Aktivierung von Faktor B oder Faktor G zu Clottingenzymen umgewandelt. Clottingenzyme wandeln durch die Abspaltung von Peptid C Koagulogen in Koagulin um. Dies führt zur Ausbildung eines festen Gels. In diesem letzten Schritt wird das für die kinetische chromogene Reaktion notwendige p-Nitroanilid von einem chromogenen Substrat abgespalten. Koagulogen wird in dieser Methode vollkommen gegen ein chromogenes Substrat ausgetauscht.

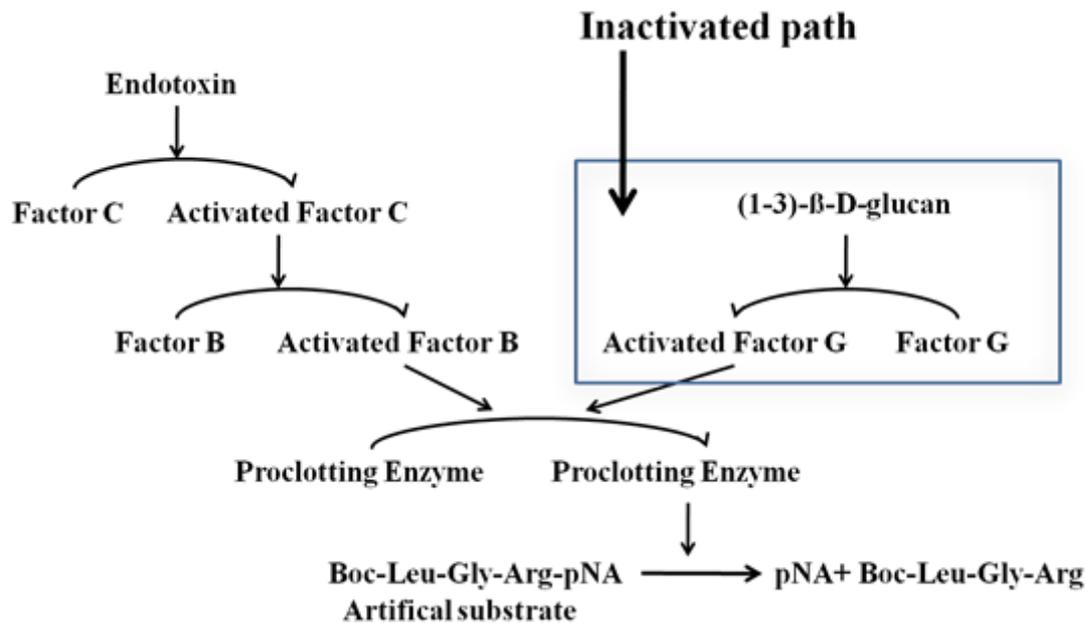


Abbildung 2: Schematische Darstellung der LAL-Kaskade [35]

### 3.2.1.1. Einfluss der Zitratzugabe auf den ionisierten Kalziumgehalt im Plasma

Durch die Zitratantikoagulation wird die Menge an ionisiertem Kalzium im Blut verringert. In Vorversuchen wird festgestellt, wie viel Natriumzitrat zugesetzt werden muss, um den Kalziumspiegel zu senken. Je 1000 µl aufgetautem Heparinplasma (5 IU) werden unterschiedliche Mengen an Natriumzitrat zupipettiert und der iCa-Spiegel mittels Ionometer gemessen. Zudem soll ermittelt werden, wieviel Kalziumchlorid/Magnesiumchlorid-Lösung zugesetzt werden muss, um die physiologischen Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen wieder herzustellen. Verschiedene Konzentrationen an Zitrat (3, 6, 9 mM) werden jeweils 1000 µl aufgetautem Heparinplasma (5 IU) zugesetzt. Durch Zugabe unterschiedlicher Mengen an Kalziumchlorid/Magnesiumchlorid-Lösung wird die Zitratantikoagulation wieder aufgehoben und der iCa-Spiegel mittels Ionometer gemessen.

### 3.2.1.2. Einfluss der Zitratantikoagulation auf die LPS-Aktivität im Plasma in Abhängigkeit der Zitratkonzentrationen

Für die Herstellung einer 50 mM Natrium-Zitrat-Lösung wird eine 500 mM Natrium-Zitrat-Lösung 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt. Frisches Heparinplasma (5 IU) wird mit

einer *Pseudomonas aeruginosa* LPS-Lösung mit einer Konzentration von 500 ng/ml versetzt. Die vorliegende Konzentration an Endotoxinen im Plasma beträgt 50 ng/ml. Das Plasma wird nach der Zugabe intensiv gevortext und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubationszeit erfolgt die Zugabe von Zitrat in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Zitratkonzentrationen im Plasma betragen 0,5, 1, 2, 3, 6, 9 und 12 mM. Um eine Verdünnung der Endotoxine durch Zitratzugabe zu verhindern, wird das Volumen mit NaCl wieder ausgeglichen. Eine positive Kontrolle ohne Zitrat wird ebenfalls angefertigt. Die Proben werden wieder intensiv gevortext und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

#### **3.2.1.3. Einfluss der Zitratzugabe vor oder nach der LPS-Zugabe auf die Endotoxin-Aktivität**

Frisches Plasma wird entweder mit *Pseudomonas aeruginosa* LPS-Lösung auf 50 ng/ml gespikelt und dann mit einer 100 mM Natriumzitrat-Lösung auf eine Konzentration von 9 mM gebracht, oder es wird in entgegengesetzter Reihenfolge vorgegangen. Die Proben werden gevortext und 10 Minuten inkubiert.

#### **3.2.1.4. Die Endotoxin-Aktivität in gefrorenem, frischem und gekühltem Plasma**

Frisches, gefrorenes und gekühltes Heparinplasma (5 IU) werden mit einer *Pseudomonas aeruginosa* LPS-Lösung versetzt, um eine Endkonzentration von 50 ng/ml zu erreichen. Nach intensivem Vortexen folgte eine Inkubationszeit von 10 Minuten. Zitrat wird in einer Konzentration von 6 mM zugesetzt und die Proben nach dem Vortexen wieder für 10 Minuten inkubiert. Die Positivkontrolle wird nicht mit Zitrat versetzt, jedoch wird die Probe mit derselben Menge NaCl versetzt.

#### **3.2.1.5. Austestung der Endotoxin-Aktivität in Vollblut**

LPS von *Pseudomonas aeruginosa* wird frischem Heparinplasma (5 IU) in einer Konzentration von 50 ng/ml zugesetzt. Danach werden in 2 ml-Vacuetten 4 x 1000 µl Blutzellenkonzentrat mit 1000 µl LPS-gespiktem Plasma vermengt. In ein zusätzliches Röhrchen werden nur 1000 µl Plasma pipettiert. Die Inkubation erfolgte am Rollenmischer bei 37 °C. Nach 0, 60, 120 und 240 Minuten wird von jedem Spenderblut durch Zentrifugieren das Plasma gewonnen. 50 µl davon werden bis zur LAL-Analytik in einem separaten LAL-Röhrchen bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Nach Beendigung der gesamten Inkubationszeit (4 Stunden) wird der LAL-Test durchgeführt. Pro Spender sollten folgende Proben vorhanden sein:

- Plasma nach 4h
- Plasma aus Vollblut nach 0 h
- Plasma aus Vollblut nach 1 h
- Plasma aus Vollblut nach 2 h
- Plasma aus Vollblut nach 4 h

Da das Blutzellenkonzentrat auch noch Restplasma enthält, muss dies bei der Gegenüberstellung der LAL-Ergebnisse berücksichtigt werden. Mittels starker Zentrifugation wird der Restplasmagehalt ermittelt.

### **3.2.1.6. Bindung von LPS an Erythrozyten, PBMC und Thrombozyten**

#### Vorbereitung

Für die Herstellung einer 10 mM PBS/Heparin-Lösung werden 4 Tabletten des PBS-Puffer in 800 ml Aqua destillata gelöst und 5 IU Heparin hinzugefügt (1 ml Heparin mit 5000 IU/ml). In Polypropylen-Röhrchen (50 ml) wird 15 ml Ficoll-Lösung vorgelegt. Pro Spender werden 2 Röhrchen benötigt.

#### Zellisolierung

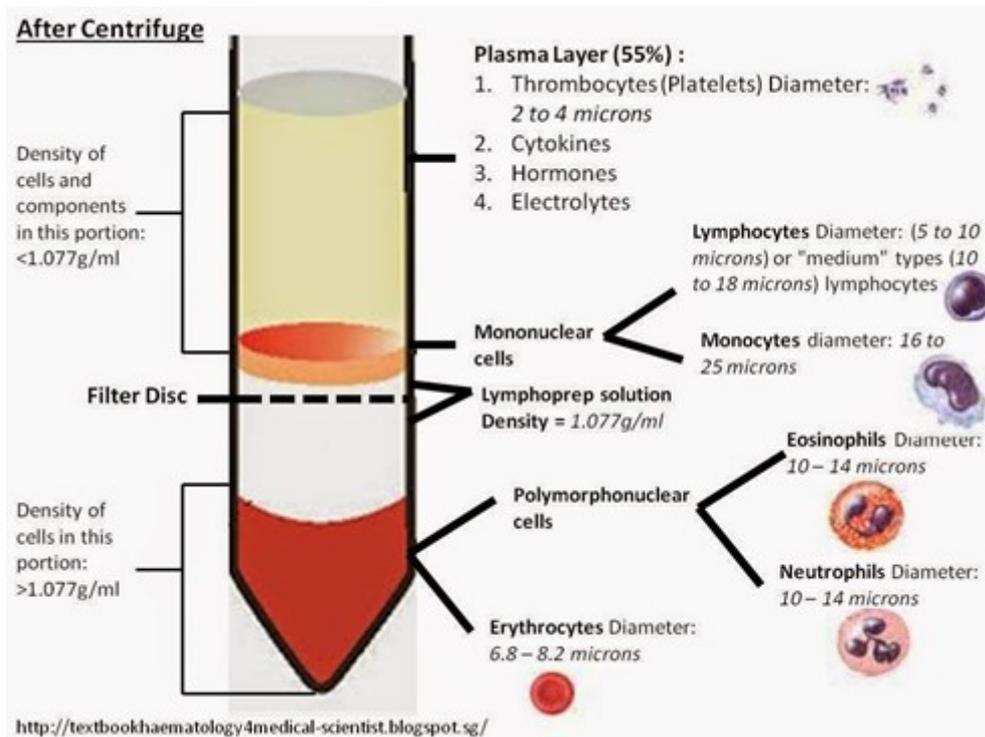
Von drei Spendern werden je 6 Röhrchen á 9 ml Blut (54 ml insgesamt) mit 5 IU/ml Heparin abgenommen. Anschließend wird das Blut für 10 Minuten bei 2300 g abzentrifugiert und das überstehende Plasma abgehoben und für die Weiterverarbeitung zum thrombozytenreichen Plasma gepoolt. Im Anschluss wird dieses Plasma für 20 Minuten bei 3000 g abzentrifugiert, um thrombozytenfreies Plasma zu erhalten. Im unteren Bereich des Röhrchens entsteht ein Pellet reich an Thrombozyten. Das Pellet wird in 1 ml thrombozytenfreiem Plasma resuspendiert. Durch Verdünnen mit NaCl wird die Zellzahl mittels Sysmex KX21N bestimmt.

Im nächsten Schritt wird das verbliebene Blutzellkonzentrat (2x ca. 12 ml) mit der doppelten Menge an PBS/Heparin-Lösung verdünnt (ca. 2x24 ml pro Spender). Die vorgelegten 15 ml Ficoll-Lösung werden vorsichtig mit dem Blutzell/PBS/Heparinmischung überschichtet. Dann wird für 30 Minuten bei 1180 g

zentrifugiert (Beschleunigung: 2, Bremse: 0) und im Anschluss der Überstand an PBS abgehoben. Mit einer 5 ml Pipette werden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) eines Spenders abgehoben und in einem 50 ml Polypropylenröhrchen gepoolt. Mit dem PBS/Heparinmisch wird die Lösung auf ca. 50 ml aufgefüllt. Das Gemisch wird für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert (Beschleunigung: 4, Bremse: 0) und der Überstand abgehoben. Das PBMC-Pellet wird mit Puffer verdünnt und bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben und der Vorgang wiederholt. Das Pellet enthält nun reine Monozyten und Lymphozyten. Es wird mit 1 ml thrombozytenfreiem Plasma resuspendiert und durch Verdünnung mit NaCl die Zellzahl mittels Sysmex KX21N bestimmt.

Zum Schluss wird das Erythrozytenkonzentrat gewaschen. Zuvor müssen die Granulozyten abgehoben und das Konzentrat mit doppelter Menge an Puffer aufgefüllt werden. Im Anschluss wird bei 3000 g für 10 Minuten zentrifugiert (Beschleunigung: 9 Bremse: 7). Der oben beschriebene Waschvorgang wird ein zweites Mal durchgeführt. Das entstandene Pellet wird in 1 ml thrombozytenfreiem Plasma resuspendiert.

Die Thrombozyten-Zellzahl wurde auf  $65-70 \times 10^3$  eingestellt. Die Zellkonzentrate (Thrombozyten, PBMCs, Erythrozyten) werden mit Hilfe von thrombozytenfreiem Plasma wieder auf eine Zellzahl von ca.  $5 \text{ bis } 6 \times 10^3$  pro  $\mu\text{l}$  eingestellt.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Trennung des Vollbluts in Plasma, mononukleäre Zellen und Erythrozyten** Quelle: <http://textbookhaematology4medical-scientist.blogspot.sg/>

### Versuchsablauf

Es wird jeweils 1 ml von jedem hergestelltem Plasma in 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen überführt und mit 10  $\mu\text{l}$  FITC-LPS (1 mg/ml) pro 2 ml Plasma versetzt. Ebenfalls werden Negativkontrollproben ohne FITC-LPS von jedem Plasma hergestellt. Die Proben werden für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben mit FITC-LPS werden bei 2300 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben und die Fluoreszenz mit einem Plattenphotometer gemessen. Für die genaue Quantifizierung wurde pro Spenderplasma eine Standardkurve mit FITC-LPS erstellt. Das übriggebliebene Zellpellet wird zweimal mit NaCl gewaschen und auf einen Objektträger übertragen. Das Zellpellet wird mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops mit UV-Anregung auf Fluoreszenz überprüft. Die Anregung erfolgt bei einer Wellenlänge von 490 nm und ein Emissionsfilter mit 510 nm wird verwendet.

Des Weiteren werden von den hergestellten Plasmen je 900  $\mu\text{l}$  ebenfalls in Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert und 100  $\mu\text{l}$  *Pseudomonas aeruginosa* Endotoxin (500 ng/ml) pro Probe zugesetzt. Im Anschluss werden alle Proben für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Proben werden mittels LAL-Analytik analysiert.

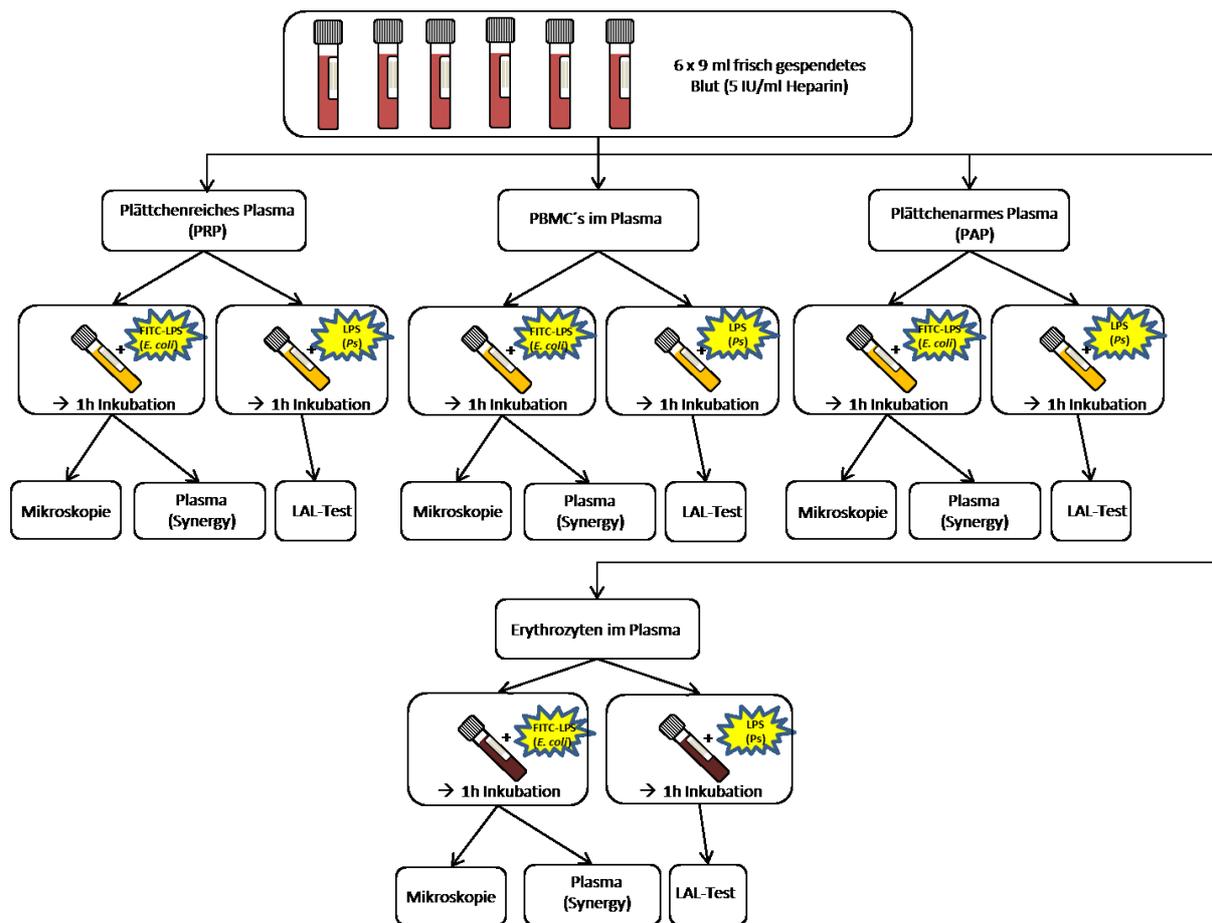


Abbildung 4: Versuchsablauf der Verarbeitung von plättchenreichem Plasma, PBMCs, plättchenarmem Plasma und Erythrozyten

### 3.2.1.7. Unterschiede der LAL-Aktivität in Heparinplasma und Serum

Das gewonnene Plasma enthält eine Heparinkonzentration von 5 IU Heparin, und gewonnenes Serum wird nachträglich mit 5 IU Heparin versetzt. Zusätzlich wird eine Negativkontrolle des Serums ohne Heparin angefertigt. Heparinplasma und Serum mit Heparin werden in verschiedenen Verhältnissen miteinander gemischt (0, 5, 12,5, 25, 50, 75, 100% Serum) und mit LPS von *Pseudomonas aeruginosa* gespikt. Die Konzentration von LPS in den Proben beträgt 50 ng/ml.

### 3.2.1.8. Einfluss der Heparinkonzentration auf die Endotoxin-Aktivität in Plasma und Serum

2 ml Heparinplasma (0,5 IU) wird mit Heparin (250 IU/ml) gespikt, um eine Konzentration von 10 IU/ml Heparin zu erhalten. Die niedrigste Heparinkonzentration im Plasma beträgt 0,5 IU, da nur so die plasmatische Gerinnung verhindert werden

kann. Um verschiedene Konzentrationen von Heparin zu erreichen, wird Plasma mit 0,5 IU/ml Heparin und Plasma mit 10 IU/ml Heparin gemischt. Die Heparinkonzentrationen im Plasma betragen 0,5; 1, 2,5; 5 und 10 IU/ml.

Des Weiteren wird 2 ml Serum mit Heparin (250 IU/ml) gespikt, um eine Konzentration von 10 IU/ml Heparin zu erhalten. Auch hier wird, um verschiedene Konzentrationen zu erreichen, Serum ohne Heparin und Serum mit 10 IU/ml Heparin gemischt. Die Heparinkonzentrationen im Serum betragen 0,5; 1; 2,5; 5 und 10 IU/ml. Den fertigen Mischungen von Serum und Plasma wird jeweils LPS von *E. coli* in einer Konzentration von 50 ng/ml zugespielt.

#### **3.2.1.9. Einfluss von Fondaparinux auf die Endotoxin-Aktivität in Serum**

Fondaparinuxlösung wird von einer Konzentration von 5000 µg/ml auf 500 µg/ml mit NaCl verdünnt. Ein Teil des Serums wird mit 10 µg/ml Fondaparinuxlösung gespikt. Serum mit Fondaparinuxlösung und Serum ohne Antikoagulanzen werden gemischt, um Konzentrationen von 0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 und 10 µg/ml zu erhalten. Die Proben werden mit LPS von *E. coli* auf eine Konzentration von 50 ng/ml gespikt.

#### **3.2.2. Zytokin-Analytik mittels Luminex**

Der Luminex-Assay besteht aus mikroskopisch kleinen Polystyrolkugeln, auch Mikrosphären oder Beads genannt. Diese Kugeln unterscheiden sich in ihrem Fluoreszenzfarbcode, der durch die Mischung zweier Farbstoffe zustande kommt. Diese Beads sind mit unterschiedlichen Antikörpern gekoppelt, die zu einer spezifischen Bindung des Analyten führen. Durch Zugabe eines zweiten spezifischen Antikörpers erfolgt der quantitative Nachweis des Analyten. Der zweite Antikörper besitzt einen Fluoreszenzfarbstoff, der sich vom spektralen Bereich der Polystyrolkugeln unterscheidet. Die Beads können durch ihre hohe spezifische Bindung zum Analyten auch zusammen in ein geringes Probenvolumen eingebracht werden. So können gleichzeitig bis zu 100 verschiedene Nachweisreaktionen durchgeführt werden. Die Beads werden einzeln von zwei Festkörperlasern detektiert und durch Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes analysiert [36].

### **3.2.2.1. Einfluss des Zeitpunktes der Zitratantikoagulation auf die Zytokinausschüttung in Vollblut**

Von jedem Spender werden je 2 ml Vollblut in zehn 2-ml-Vacuetten vorgelegt. Zu den Proben wird jeweils 10 µl *Pseudomonas aeruginosa* LPS (100 ng/ml) zugespielt. Die Konzentration von LPS in den Proben beträgt 0,5 ng/ml. Zur Negativkontrolle wird kein LPS zugesetzt. Die Zitratzugabe (3 mM und 6 mM) zu den einzelnen Proben erfolgte 15 Minuten, 30 Minuten und 60 Minuten nach LPS-Zugabe. Bei den Proben ohne Wartezeit (0 Minuten) wird das Zitrat vor LPS-Zugabe im Vollblut vorgelegt. Ab der Zugabe von LPS werden die Proben 4 Stunden unter der Wärmehaube bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Proben zentrifugiert, der Überstand abgehoben und bei -80 °C eingefroren. Es werden Aliquote von 50 µl in Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert und bei -80 °C bis zur Zytokinanalyse mit Luminex eingefroren.

### **3.2.2.2. Einfluss der Zitratantikoagulation und der Rekalzifizierung auf die Zytokinausschüttung durch Endotoxine**

15 ml Heparinplasma (5 IU) wird mit *Pseudomonas aeruginosa* LPS auf eine Konzentration von 50 ng/ml gespielt. 6 ml des frischen Plasmas wird sofort zur Weiterverarbeitung genutzt und das verbleibende Plasma mit Endotoxinen für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Beide Plasmafraktionen werden für die LAL-Messung und die Zytokinmessung im Luminex identisch mit einem Zeitabstand von 3 Stunden vorbereitet. Das entnommene Plasma wird in Aliquote zu je 2 ml aufgeteilt. Das 1. Aliquot dient zur Positivkontrolle, dem 2. und 3. Aliquot werden 9 mM Zitrat hinzugefügt. Die Proben werden gevortext und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das 3. Aliquot mit einer Kalziumchlorid/Magnesiumchlorid-Lösung (500 mM/250 mM) auf physiologische iCa-Werte rekalzifiziert und nach dem Vortexen für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

#### Proben:

- 1. Aliquot: Plasma + LPS
- 2. Aliquot: Plasma + LPS + Natriumzitrat
- 3. Aliquot: Plasma + LPS + Zitrat + CaCl<sub>2</sub>

Für die LAL-Analytik werden die Proben direkt im Anschluss hitzeinaktiviert. Durch die Hitzeinaktivierung sind die Proben bei 2-8 °C für 24 Stunden haltbar.

Für die Weiterverarbeitung zur Zytokinmessung im Luminex wird 1 ml Blutzellenkonzentrat mit 1 ml Plasma vermischt und für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss werden die Proben abzentrifugiert und Aliquote von 50 µl bei -80 °C bis zur Messung eingefroren. Die Zytokinanalytik erfolgt mittels Luminex-Gerät.

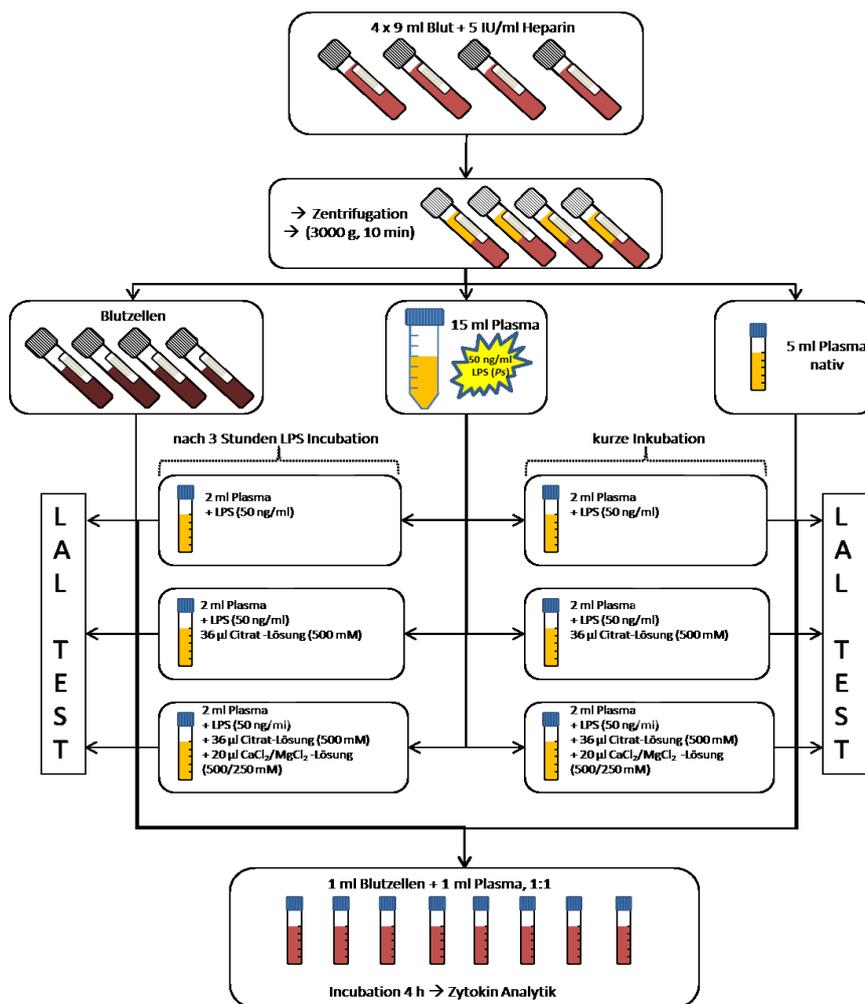


Abbildung 5: Versuchsablauf der Verarbeitung des Vollbluts bis zur LAL-Messung und Zytokin-Messung

### 3.2.2.3. Einfluss der Heparinkonzentration auf die Zytokinausschüttung in LPS-stimuliertem Vollblut

Pro Spender werden 2 Vacuetten mit 2,7 µg/ml Fondaparinux und 2 Vacuetten mit 10 IU Heparin Plasmakonzentration und 2,7 µg/ml Fondaparinux gespikt. Das abzentrifugierte Fondaparinuxplasma ohne Heparin und das Fondaparinuxplasma mit Heparin werden gemischt, um unterschiedliche Konzentrationen an Heparin zu erhalten. Die Heparinkonzentrationen im Fondaparinuxplasma beträgt 0; 0,1; 0,5; 1;

2,5 und 5 IU Heparin. Die fertigen Proben werden mit einer Konzentration von 2 ng/ml LPS von *E. coli* gespikt. Anschließend wird zu jeder Probe 1 ml Blutzellenkonzentrat zupipettiert. Als Negativkontrolle dient Fondaparinuxplasma ohne Heparin und ohne LPS. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37 °C am Rollmischer werden die Blutproben abzentrifugiert und ein Aliquot von 50 µl der Plasmaproben für die Zytokinanalyse mittels Luminex bei -80 °C eingefroren.

### **3.2.3. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen**

Die Fluoreszenzmikroskopie beruht auf dem Prinzip der Lichtmikroskopie, die sich die Fluoreszenz zunutze macht. Unter Fluoreszenz versteht man, dass bestimmte Stoffe (Fluorochrome) mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden können und diese Energie in Form von Licht in einer längeren Wellenlänge wieder abgeben. Durch Absorption von Photonen werden Elektronen des fluoreszierenden Stoffes auf ein höheres Energieniveau gehoben. Wenn die Elektronen wieder auf ein niedrigeres Energieniveau in den Grundzustand herabfallen, setzen sie Energie in Form von Licht (Fluoreszenz) und Wärme wieder frei.

#### **3.2.3.1. Bindung von LPS an den Fibrinklot**

Die Blutabnahme erfolgt unter Verwendung von 9-ml-Vacuetten ohne Antikoagulanzen. Das entnommene Blut wird sofort abzentrifugiert und das überstehende Plasma abgehoben. Zwei 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen werden mit je 500 µl Plasma befüllt. In ein Mikrozentrifugenröhrchen wird 20 µl FITC-LPS zugegeben. Die Konzentration an FITC-LPS im Plasma beträgt 40 ng/ml. Als Negativkontrollen dienen die Plasmaproben ohne Zugabe von FITC-LPS. Im Anschluss folgt eine Wartezeit von 2 Stunden bis zur Gerinnung des Plasmas. Das geronnene Plasma wird abzentrifugiert und der entstandene Klot 1x mit NaCl und 3x mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Der gewaschene Klot und das abzentrifugierte Plasma werden auf einen Objektträger übertragen und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops mit UV-Anregung auf Fluoreszenz überprüft. Die Anregung erfolgt bei einer Wellenlänge von 490 nm, unter Verwendung eines 520-nm-Emissionsfilters.

Es werden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Dafür wird der Klot 1x mit NaCl und 3x mit H<sub>2</sub>O gewaschen und mit 2,5%-iger Glutaraldehyd-Lösung fixiert.

Der Klot wird schrittweise durch eine Alkoholreihe entwässert und im Exsikkator getrocknet. Anschließend wird die Probe mit einem Goldfilm besputtert.

### **3.2.3.2. Bindung von LPS an Kryopräzipitat**

Es wird 2 ml frisches Heparinplasma (5 IU) mit 10 µl FITC-LPS (1 mg/ml) versetzt. Die Konzentration an LPS in der Probe beträgt 5 ng/ml. Als Negativkontrolle wird die Plasmaprobe ohne Zusatz von LPS verwendet. Die Proben werden für 6 Stunden bei -20 °C eingefroren und im Anschluss über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C aufgetaut. Das entstandene Kryopräzipitat wird abzentrifugiert und 1x mit NaCl und 3x mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Kryopräzipitat und das abzentrifugierte Plasma werden auf einen Objektträger übertragen und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops mit UV-Anregung auf Fluoreszenz überprüft. Die Anregung erfolgt bei einer Wellenlänge von 490 nm unter Verwendung eines 520-nm-Emissionsfilters.

Es werden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Dafür wird das Kryopräzipitat 1x mit NaCl und 3x mit H<sub>2</sub>O gewaschen und mit 2,5%-igem Glutaraldehyd versetzt. Das Kryopräzipitat wird schrittweise durch eine Alkoholreihe entwässert und im Exsikkator getrocknet. Anschließend wird die Probe mit einem Goldfilm besputtert.

### **3.2.3.3. Testung der LPS-Affinität zum Kryopräzipitat**

9 ml Zitratplasma (9 mM) und Heparinplasma (5 IU) wird mit 90 µl (5 µg/ml) LPS von *Pseudomonas aeruginosa* auf eine Konzentration von 50 ng/ml gespikt. Die LAL-Aktivität wird im frischen Plasma direkt nach der Endotoxinzugabe gemessen.

Das gespikte Zitrat- und Heparinplasma wird eingefroren und dann langsam aufgetaut, um ein Kryopräzipitat zu erhalten. Anschließend wird auch hier die LAL-Aktivität gemessen.

Somit ergeben sich pro Spender jeweils folgende Proben:

- Zitratplasma und Heparinplasma frisch
- Zitratplasma und Heparinplasma bei -20 °C

### 3.2.4. Einfluss von LPS auf die plasmatische Gerinnung

Kalziumchlorid/Magnesiumchlorid-Lösung wird in einer Mikrotiterplatte zusammen mit den unterschiedlichen Endotoxinkonzentrationen von *E. coli* (10; 5; 1; 0,1; 0,05; 0,01 µg/ml) vorgelegt. Für die Negativkontrolle wird nur die CaCl<sub>2</sub>-Lösung ohne Endotoxin vorgelegt. Anschließend wird 200 µl Zitratplasma (6 mM) mit einer Multipipette in jedes Nöpfchen pipettiert. Die optische Dichte wird mit einem Plattenphotometer bei 600 nm gemessen.

### 3.2.5. ESP™-Kit

Dieser Kit besteht aus zwei ESP-Puffern (#1 und #2) und einem Protease-Cocktail. ESP-Puffer #1 säuert das Plasma an, um neutrale und basische Enzyme zu deaktivieren. Durch den Protease-Cocktail kommt es zum enzymatischen Verdau von Proteinen, und das an Protein gebundene Endotoxin wird wieder frei und im LAL-Test messbar. Mittels ESP-Puffer #2 wird die Probe wieder auf optimale pH-Verhältnisse gebracht. Der Test wurde speziell für Zitratplasma entwickelt, um die Wiederfindung der Endotoxine im Plasma deutlich zu erhöhen [37].

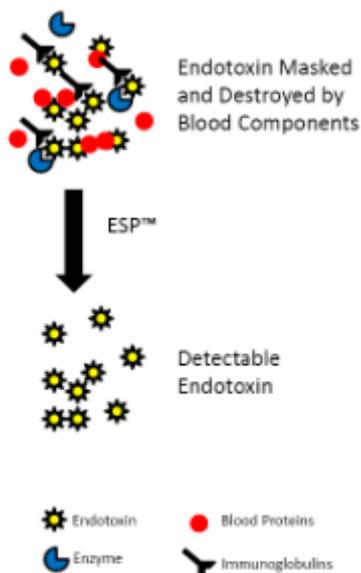


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Demaskierung von Endotoxinen durch enzymatischen Verdau. © BioDtech's ESP™

### ESP™-Kit Vorbereitung:

1 ml ESP#1-Puffer in das ESP™ Protease Solution Bottle pipettieren und schwenken. Diese Proteaselösung ist 3 Monate im Kühlschrank (4 °C) lagerbar.

### ESP™-Kit Prozedur:

1. Plasmaproben werden 30 Minuten lang bei 60 °C zur Enzymaktivierung (Serin-Proteasen) behandelt
2. 270 µl ESP-Puffer#1 + 30 µl Probe
3. + 30 µl ESP™ Protease Lösung
4. Inkubation bei 37 °C für 30 - 60 min
5. 450 µl ESP-Puffer#2 + 50 µl enzymatisch verdaute Probe
6. LAL-Messung

Zitratplasma mit ESP-Kit (Lot: ESP-042915)-Prozedur und Zitratplasma ohne ESP-Kit-Prozedur werden miteinander verglichen. Das Zitratplasma wird in beiden Fällen auf eine Konzentration von 500 ng/ml *Pseudomonas aeruginosa* gespikt.

### **3.2.6. Vermessung der Größe von Endotoxin-Aggregaten**

#### Messprinzip

Das Zetasizer Nano ZS System beruht auf dem Prinzip der dynamischen Lichtstreuung (DLS), auch quasielastische Lichtstreuung (QELS) genannt. Um die Größe der Partikel, in diesem Fall der Endotoxinaggregate, zu vermessen, wird das an den Partikeln gestreute Licht des Lasers ausgewertet. Diese Methode ist nichtinvasiv und für die Messungen von Partikelgrößen zwischen 0,3 nm und 10 µm geeignet.

Die Partikel diffundieren in der Lösung durch die Brown'sche Molekularbewegung. Werden solche Partikel durch den Laser getroffen, kommt es zur Streuung des Lichts und zu Interferenzen. Diese können zur gegenseitigen Verstärkung oder Auslöschung des Streulichts führen. Die Molekülgröße, Viskosität und Temperatur spielen dabei eine entscheidende Rolle. Je schneller oder langsamer die Molekülbewegung basierend auf diesen Parametern ist, desto schneller oder

langsamer ändert sich die Steuichtintensität. Folglich wird das emittierte Licht als eine Funktion der Zeit betrachtet. Über die Stokes-Einstein-Beziehung wird die Partikelgröße errechnet [38].

### Versuchsdurchführung

Folgende Filter wurden für die Durchführung der Experimente benötigt:

- FILTER DEVICE, PURADISC 25 AS, 0,45 µm Polyethersulfon-Membran (Firma: GE Healthcare Life Sciences Whatman™, Lot – Nr.: 7023333, Ref – Nr.: 6780-2504)
- Rotilabo ® - Spritzenfilter, PES, steril 0,22 µm Polyethersulfon-Membran (Firma: Carl Roth GmbH + Co. KG, Lot – Nr.: R5PA67041, Ref – Nr.: SE2M228I04)
- Spin – X<sup>R</sup> UF 500, 100k MWCO PES, (Firma: CORNING®, Lot – Nr.: 02714001, Ref – Nr.: 431481)
- Spin – X<sup>R</sup> UF 500, 50k MWCO PES (Firma: CORNING®, Lot – Nr.: 09214002, Ref – Nr.: 431580)
- Spin – X<sup>R</sup> UF 500, 30k MWCO PES (Firma: CORNING®, Lot – Nr.: 34414007, Ref – Nr.: 431497)
- Spin – X<sup>R</sup> UF 500, 10k MWCO PES (Firma: CORNING®, Lot – Nr.: 03316004, Ref – Nr.: 431478)
- Spin – X<sup>R</sup> UF 500, 5k MWCO PES (Firma: CORNING®, Lot – Nr.: 01316001, Ref – Nr.: 431477)

Für die Herstellung eines *E. coli*-Lysats wird mittels einer Impföse das LB-Medium in einem 150-ml-Kolben mit dem zu verwendenden *E. coli* - Stamm angeimpft und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, um eine OD<sub>600</sub>>2 zu erreichen. Die Kultur wird bei 4696 g für 10 Minuten abzentrifugiert und zweimal mit je 50 ml NaCl gewaschen. Das aufsuspendierte Pellet wird für 2 Stunden bei 40 °C mit Ultraschall behandelt. Danach wird die Bakteriensuspension für 2 Stunden bei -80 °C schockgefroren. Das Lysat wird aufgetaut und bei 4696 g für 10 Minuten abzentrifugiert und anschließend durch Filtermembranen mit einer Porengröße von 0,45 µm und 0,22 µm filtriert. Anschließend wird das Filtrat durch die restlichen

Membranfilter (100 kDa, 50 kDa, 30 kDa, 10 kDa, 5 kDa) mittels Zentrifugation bei 15558 g für 10 Minuten filtriert.

Als Vergleichsprobe wird LPS von *E. coli* mit physiologischer NaCl-Lösung auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt. Anschließend wird die LPS-Lösung durch die 0,45 µm große Membran filtriert und das Filtrat wie das Lysat durch die restlichen Filter filtriert.

Als 2. Vergleichsprobe dient ultraschallbehandeltes LPS von *E. coli*. LPS wird mit einer 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung auf eine Konzentration von 100 µg/ml verdünnt und im Anschluss für 1 Stunde bei 40 °C im Ultraschallbad behandelt. Die Probe wird über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Die erhaltenen Proben werden für die Größenvermessungen im Zetatsizer mit CaCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub>-Lösung versetzt, um eine physiologische iCa-Konzentration (1,2 mM) einzustellen. Um eine Größenänderung durch Zitrat zu bestimmen, werden die Proben mit 9 mM Zitrat nach der Messung gespikt und abermals vermessen. Alle Proben (mit Ausnahme der ultraschallbehandelten Probe) werden mittels LAL-Test auf etwaige Endotoxin-Aktivität überprüft.

### **3.2.7. Statistik**

Mittelwert und Standardabweichung werden mit MS Exel 2010 berechnet. Für ANOVA und t-test kommt SigmaPlot 13 zum Einsatz.

## 4. Ergebnisse & Diskussion

### 4.1. Einfluss der Zitratzugabe auf den ionisierten Kalziumgehalt im Plasma

Zitrat kann als Chelatbildner zweiwertige Ionen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  binden. Die plasmatische Gerinnungskaskade kann bei Konzentrationen  $\leq 0,4$  mmol/l ionisiertes Kalzium nicht mehr ablaufen. Hier soll gezeigt werden, wie viel Zitrat notwendig ist, um bestimmte ionisierte Kalziumspiegel (iCa) zu erhalten.

Für diese Versuche werden Plasmen von drei verschiedenen Spendern verwendet. Die iCa-Spiegel liegen im nativen Heparinplasma bei  $1,03 \pm 0,02$  mmol/l. Tabelle 1 zeigt die Zielkonzentration von Zitrat in mM und die verwendeten  $\mu\text{l}$  50 mM Zitratlösung in 1000  $\mu\text{l}$  Plasma.

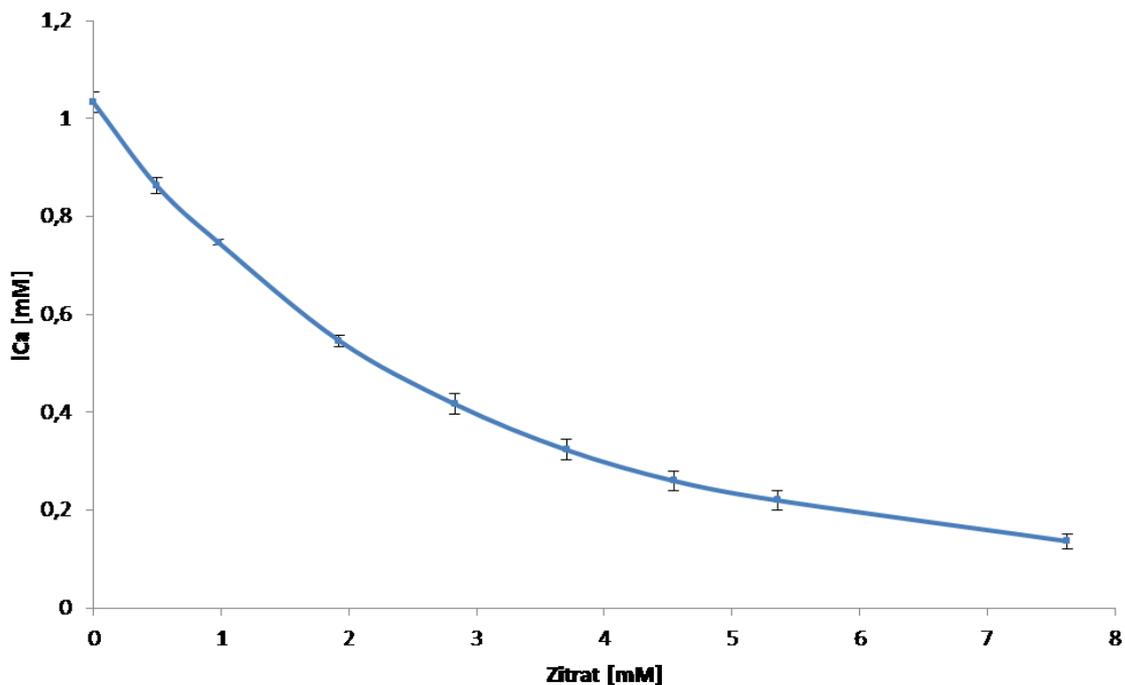


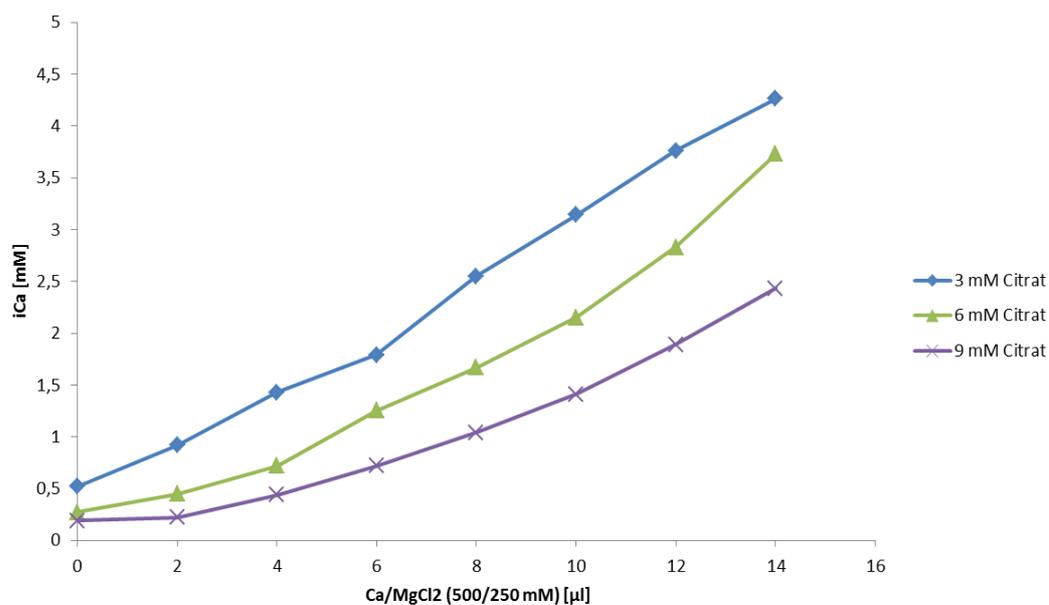
Abbildung 7: Ionisierte Kalziumkonzentration in Abhängigkeit von der Zitratzugabe (n=3)

Ziel Citrat [mM]	iCa <sup>2+</sup> [mM]
0	1,03 ± 0,02
0,5	0,86 ± 0,01
1	0,74 ± 0,005
2	0,54 ± 0,01
3	0,41 ± 0,02
4	0,32 ± 0,02
5	0,26 ± 0,02
6	0,22 ± 0,02
9	0,13 ± 0,01

**Tabelle 1: Die Zugabe von Zitrat und die daraus resultierende Absenkung des iCa-Wertes (n=3)**

Bei allen Zitratkonzentrationen konnte eine Absenkung des iCa-Wertes erzielt werden. Für die weiterführenden Versuche sind Zitratkonzentrationen von 3, 6 und 9 mM relevant.

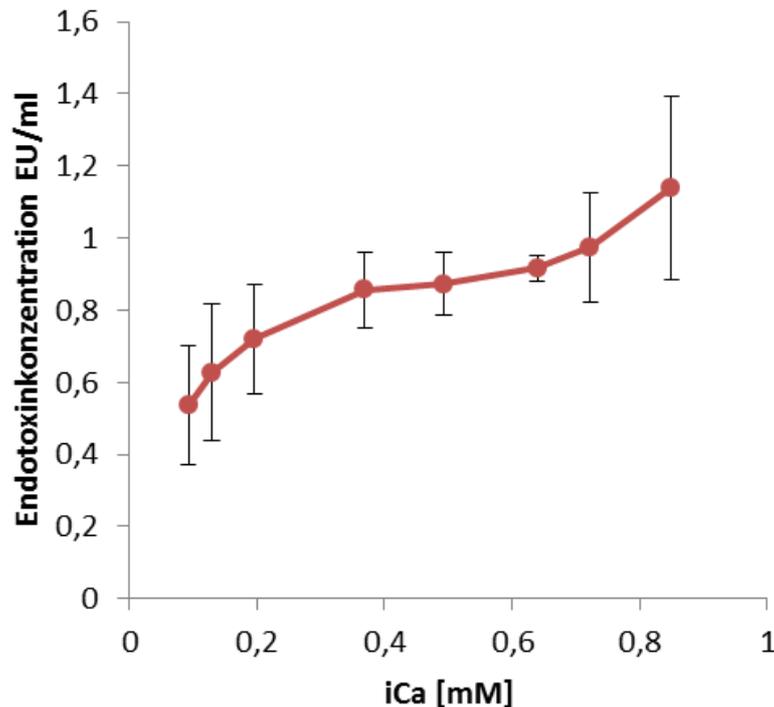
Um die Zitrat-Antikoagulation wieder aufzuheben, wird eine Zugabe von Kalzium in Form von Kalziumchlorid notwendig. Es werden Zitratplasmen mit 3, 6 und 9 mM Zitrat ausgetestet. Abbildung 8 zeigt, wie viel Kalziumchlorid/Magnesiumchlorid (500/250 mM) notwendig ist, um die physiologischen Werte wieder herzustellen. Für jede Zitratkonzentration wird jeweils ein frisches Spenderplasma verwendet.



**Abbildung 8: Ionisierte Kalziumkonzentration [mM] in Abhängigkeit von der Konzentration der zugegebenen Kalzium/Magnesiumchlorid-Lösung (500/250 mM)**

#### 4.2. Einfluss der Zitratantikoagulation auf die LPS-Aktivität im Plasma in Abhängigkeit der Zitratkonzentration

Ziel dieses Versuches ist es, eine konzentrationsabhängige Kurve zu ermitteln, aus der hervorgeht, bei welcher Zitratmenge die maximale Reduktion der LPS-Aktivität im LAL-Test erfolgt. Es werden folgende Zitratkonzentrationen getestet: 0,5, 1, 2, 3, 6, 9 und 12 mM.



**Abbildung 9: Endotoxin-Wiederfindung im LAL-Test in Abhängigkeit von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die höchste Konzentration entspricht dem physiologischen Wert von nativem Plasma (der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wert ist unter der physiologischen Konzentration aufgrund einer durch den Test bedingten Verdünnung mit NaCl) (n=3)**

Es konnte eine Verringerung der Endotoxin-Aktivität mit abnehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in allen Plasmaproben von drei verschiedenen Spendern ermittelt werden (one way ANOVA,  $p=0,02$ ). Plasmaproben ohne Zitrat werden  $100 \pm 22,2$  % Wiederfindung gleichgesetzt. Bei Zugabe von 0,5 mM Zitrat beträgt die Wiederfindung  $86 \pm 13$  %, bei 1 mM  $80 \pm 3$  %, bei 2 mM  $77 \pm 8$  %, bei 3 mM  $75 \pm 9$  %, bei 6 mM  $63 \pm 13$  %, bei 9 mM  $55 \pm 17$  % und bei 12 mM  $47 \pm 14$  %. Die Wiederfindung der Endotoxin-Aktivität im LAL-Test zeigt eine Abhängigkeit von der ionisierten Kalziumkonzentration im Plasma. Grund dafür könnte eine eventuelle

Maskierung der Endotoxine durch verschiedenste Proteine im Plasma sein. Durch die Entfernung von Kalzium- und Magnesiumionen, welche für die Stabilisierung von LPS-Aggregaten verantwortlich sind, kann die Anlagerung von Plasmaproteinen an LPS-Monomeren erleichtert werden, wodurch eine Reduktion der Endotoxin-Aktivität stattfindet.

### 4.3. Einfluss der Zitratzugabe vor oder nach der LPS-Zugabe auf die Endotoxin-Aktivität

Bei Experimenten *in vitro* wird LPS oft in Zitratplasma gespikt, jedoch erfolgt *in vivo*, bei der Dialyse von Patienten mit Endotoxinämie die Zitratzugabe in Blut, das bereits LPS enthält. In diesem Versuch wird ermittelt, ob die Zitratzugabe vor oder nach dem LPS-Spike einen Einfluss auf die Endotoxin-Aktivität hat. Die Wiederfindung der Plasmaproben, die mit LPS versetzt werden, beträgt  $100 \pm 27$  %. Erfolgt die Zugabe von Zitrat (9 mM) vor LPS-Zugabe ergibt sich eine Wiederfindung von  $35 \pm 5$  %. Die Wiederfindung von LPS bei nachträglicher Zitratzugabe beträgt, wie auch schon in den vorigen Versuchen gezeigt,  $66 \pm 11$  %. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe von Zitrat vor LPS-Zugabe die LPS-Aktivität stärker herabsetzt als die Zitratzugabe nach dem LPS-Spike (one way ANOVA,  $p=0,10$ ).

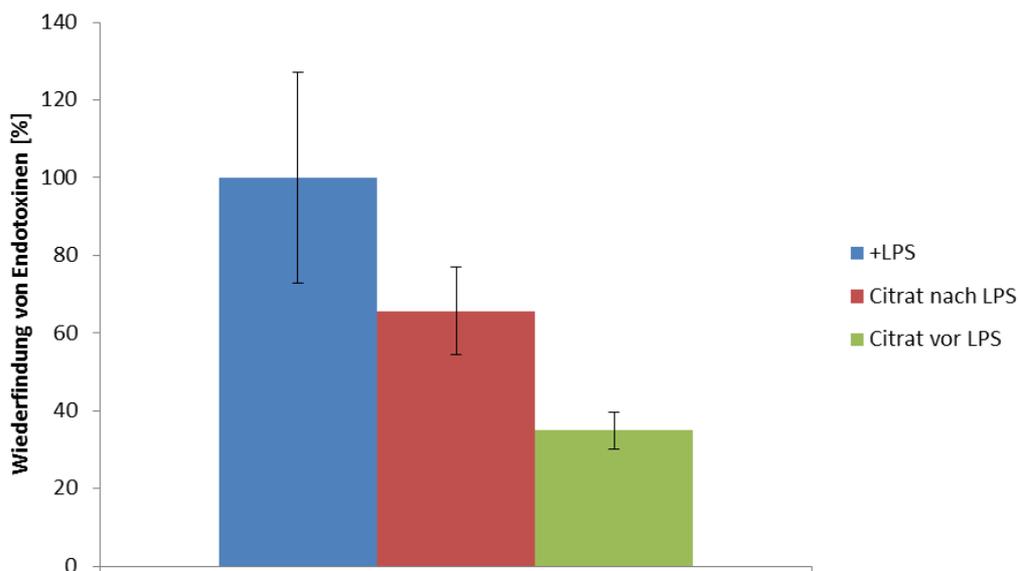


Abbildung 10: Wiederfindung der Endotoxine im LAL-Test bei unterschiedlicher Reihenfolge der Zitratzugabe (n=3)

#### 4.4. Die Endotoxin-Aktivität in gefrorenem, frischem und gekühltem Plasma

Da bei Experimenten *in vitro* oft mit aufgetautem Plasma gearbeitet wird, soll ermittelt werden, ob das Einfrieren und Lagern einen Einfluss auf die Endotoxin-Aktivität hat. Die LPS-Zugabe erfolgt entweder direkt zum frischen Plasma, nach dem Auftauen des gefrorenen Plasmas oder nach der Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C für 24 Stunden.

LPS-gespiktes frisches, gefrorenes und gekühltes Plasma wird jeweils auf seine Endotoxin-Aktivität getestet (frisches Plasma:  $100 \pm 24$  %, gefrorenes Plasma:  $100 \pm 25$  %, gekühltes Plasma:  $100 \pm 20$  %). Bei Zugabe von jeweils 6 mM Zitrat beträgt die Wiederfindung in frischem Plasma  $62 \pm 11$  %, in gefrorenem Plasma  $57 \pm 16$  % und in gekühlt gelagertem Plasma  $71 \pm 20$  %. Somit ergibt sich bei Zugabe von Zitrat kein Unterschied in der Endotoxin-Aktivität zwischen gefrorenen, frischen und gekühlt gelagerten Proben. Bei Experimenten *in vitro* hat die Lagerung der Plasmaproben (frisch, gekühlt und gefroren) keinen Einfluss auf die Endotoxin-Aktivität im LAL-Test (one way ANOVA,  $p=0,88$ ). Versuche mit frischem Plasma sind jedoch vorzuziehen, um eventuelle Verunreinigungen durch die Lagerung und Hantieren mit dem Plasma zu vermeiden.

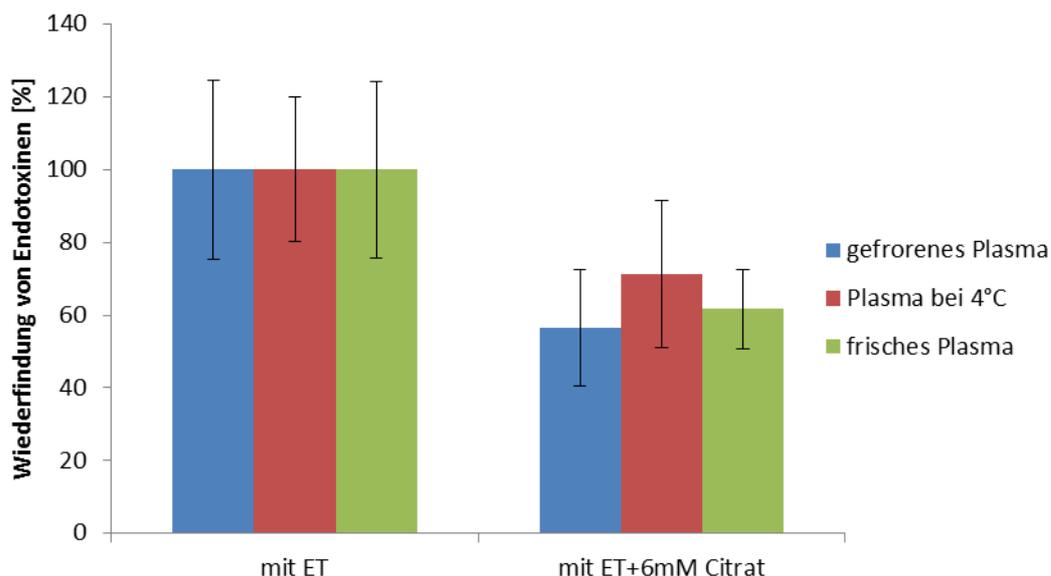


Abbildung 11: Wiederfindung von Endotoxinen im LAL-Test, nach Zugabe von Zitrat zu gefrorenem, gekühltem (4 °C) und frischem Plasma (n=3)

#### 4.5. Austestung der Endotoxin-Aktivität in Vollblut

In diesem Versuch soll ermittelt werden, ob Endotoxine im Blut an Blutzellen irreversibel gebunden werden oder sich im Plasma homogen verteilen. Um die Verteilung von LPS in Vollblut zu ermitteln, erfolgt die Inkubation mit LPS zuerst im Plasma und im Anschluss wird ein Blutzellenkonzentrat hinzugefügt. Nach unterschiedlich langer Inkubationszeit (0, 1, 2, 4 Stunden) wird das Plasma abzentrifugiert und im LAL-Test analysiert. Plasma, das 0 h mit Blutzellen inkubiert wurde, wird auf eine Wiederfindung von  $100 \pm 24 \%$  gesetzt. Nach 1 Stunde beträgt die Wiederfindung  $70 \pm 24 \%$  und nach 2 Stunden  $78 \pm 21 \%$ . Erst nach 4 Stunden ist eine Reduktion der Endotoxin-Aktivität auf  $47 \pm 10 \%$  sichtbar. In den ersten beiden Stunden kann eine Reduktion der Endotoxin-Aktivität im Plasma festgestellt werden. Dies kann durch einen Verdünnungseffekt des zugesetzten Blutzellenkonzentrats erklärt werden. Eine Bindung an Blutzellen müsste einen erheblichen Aktivitätsverlust in den ersten beiden Stunden verursachen. Die Reduktion in der 4. Stunde kann durch eine mögliche Phagozytose der Endotoxine durch Makrophagen erklärt werden. Die Endotoxin-Aktivität nimmt mit zunehmender Inkubationszeit ab. Diese Abnahme ist allerdings nicht signifikant (one way ANOVA,  $p=0,08$ ). Um eine sichere Aussage treffen zu können, ob Endotoxine an den Blutzellen binden, werden weitere Untersuchungen (siehe 4.6) durchgeführt.

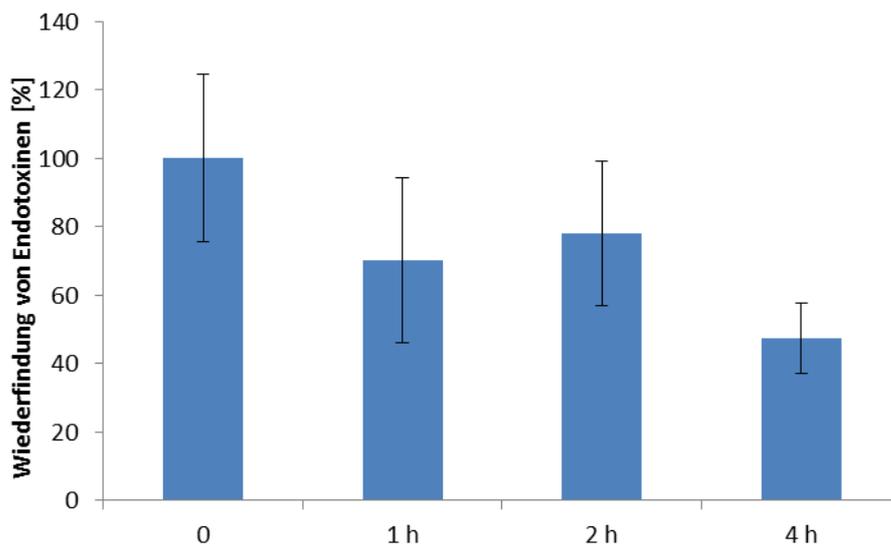
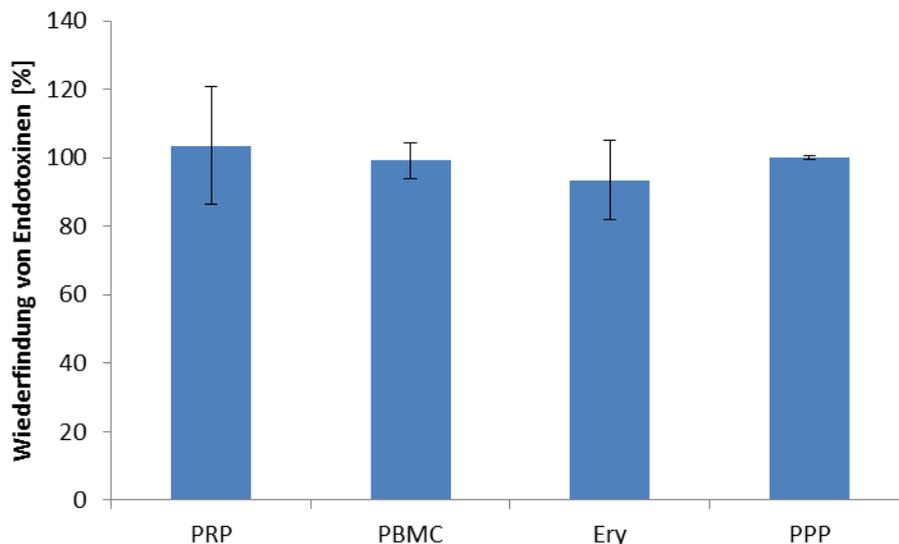


Abbildung 12: Endotoxin-Aktivität von LPS-gespiktem Plasma nach 1, 2, 3 und 4 Stunden Inkubation mit Erythrozyten im LAL-Test (n=3)

#### 4.6. Bindung von LPS an Erythrozyten, PBMC und Thrombozyten

Im vorigen Versuch (4.5) konnte anhand der LAL-Analytik festgestellt werden, dass Endotoxine möglicherweise nicht an Blutzellen binden. Um genauere Aussagen treffen zu können, muss man einzelne Zelltypen genauer untersuchen. Dazu werden Erythrozyten, PBMCs und Thrombozyten isoliert und in plättchenarmem Plasma in einer bestimmten Konzentration wieder resuspendiert. Als Negativ- bzw. Positivkontrolle wird plättchenarmes Plasma verwendet.

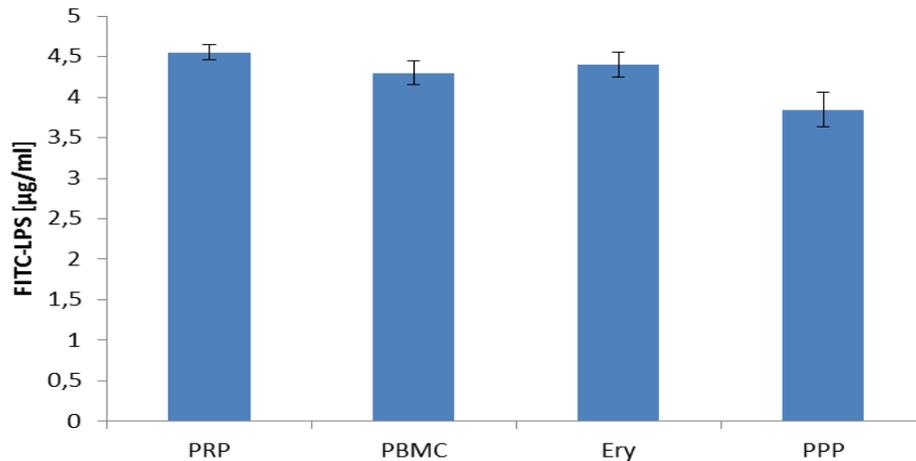
Plasma mit PBMCs erreichte im Vergleich zum plättchenarmen Plasma ( $100 \pm 0.5$  %) eine Endotoxin-Aktivität von  $99 \pm 5$  %. Thrombozytenreiches Plasma erreicht eine Wiederfindung von  $104 \pm 17$  %. Bei erythrozytenhaltigem Plasma muss ein Hämatokrit von 35 % mit eingerechnet werden, wodurch sich eine Wiederfindung von  $93 \pm 12$  % ergibt. Die Ergebnisse im LAL-Test zeigen zwar einen geringen Unterschied in der Endotoxin-Wiederfindung zwischen den verschiedenen Plasmen (one way ANOVA,  $p=0,014$ ), aufgrund der niedrigen Fallzahl werden daher weiter Untersuchungen durchgeführt.



**Abbildung 13: Endotoxin-Wiederfindung im LAL-Test nach Inkubation in PRP-, PBMC-, erythrozyten- und PPP-reichem Plasma (n=3)**

Um obige Ergebnisse zu verifizieren, werden zusätzlich Untersuchungen mit fluoreszenzmarkiertem LPS durchgeführt. Dazu wird den Proben FITC-LPS zugespielt. Nach Trennung der Zellpellets von den Plasmen werden diese untersucht. Die Zellen werden mittels Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert und das überstehende Plasma mittels Plattenphotometer analysiert. Es konnte keine

Fluoreszenz an den verschiedenen Zelltypen detektiert werden. Die Analyse am Fluorometer ergab eine geringfügige Abnahme des FITC-LPS in den verschiedenen Plasmen (one way ANOVA,  $p=0,003$ ).



**Abbildung 14: Fluoreszenzmessung von FITC-LPS in PRP-, PBMC-, erythrozyten- und PPP-reichem Plasma mittels Fluorometer (n=3)**

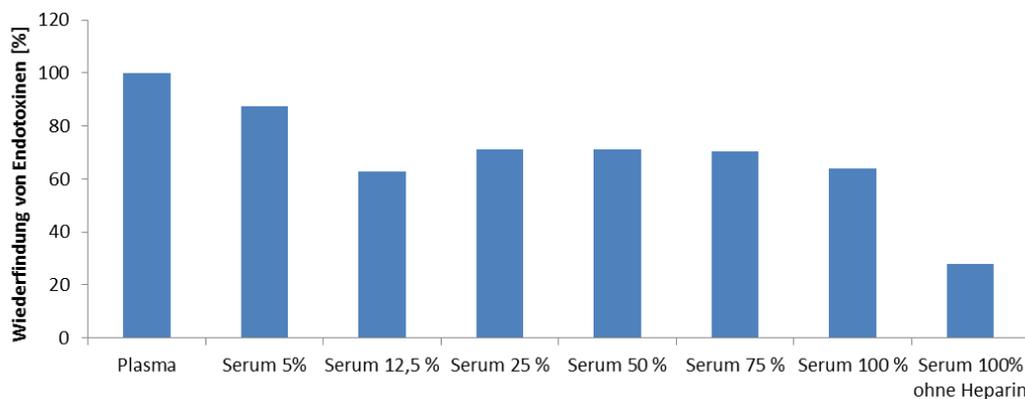
Aufgrund der geringen Fallzahl müssen die Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden. Ein Anhaften von Endotoxinen an PBMCs, Erythrozyten und Thrombozyten kann nicht ausgeschlossen werden. Weiters ist ein kurzes Andocken der Endotoxine und keine irreversible Bindung an Toll-ähnliche Rezeptoren möglich. Ein Verlust der Endotoxin-Aktivität durch Zugabe von Zitrat kann somit nicht vollständig durch die Bindung an Blutzellen erklärt werden. Wahrscheinlicher ist, dass die Maskierung durch Plasmaproteine hervorgerufen wird. Diese Erkenntnis ermöglicht die Entwicklung eines Endotoxinadsorbens im Plasmakreislauf.

#### **4.7. Unterschiede der LAL-Aktivität in Heparinplasma und Serum**

Studien haben gezeigt, dass die Endotoxin-Wiederfindung in Plasma höher ist als in Serum [39]. In diesem Versuch soll unter anderem gezeigt werden, wie hoch der Unterschied der Wiederfindung von LPS in Plasma und Serum ist. Zusätzlich werden Mischungen von Plasma und Serum mit Heparin angefertigt, um einen möglichen Einfluss von Heparin auf die LPS-Wiederfindung zu beobachten. Dazu werden Heparinplasma und heparinisierendes Serum in verschiedenen Konzentrationen (0, 5, 12.5, 25, 50, 75, 100 % Serum) miteinander vermischt. Als Negativkontrolle wird Serum ohne Heparin verwendet. Heparinplasma mit LPS dient als Positivkontrolle. Dieser Test wurde mit Plasma und Serum vom gleichen Spender durchgeführt. Im

Plasma mit 5 % Serum beträgt die Wiederfindung 87 %. Ab einer Konzentration von 13 % Serum im Plasma ist die Endotoxin-Wiederfindung gleichbleibend. Mit 13 % Serum beträgt die Wiederfindung 63 %, mit 25 % Serum 71%, mit 50 % Serum 71 %, mit 75 % Serum 70 % und für Serum mit Heparin 64 %. Bei der Negativkontrolle (Serum ohne Heparin) konnte eine Wiederfindung von 28 %, im Vergleich zur Positivkontrolle Heparinplasma mit LPS beobachtet werden.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass Serum ohne Heparin im Vergleich zu Heparinplasma eine deutlich niedrigere Wiederfindung aufweist. Wird Serum jedoch mit Heparin gespickt, ist der Unterschied zu Plasma geringer. Dies lässt auf einen möglichen Einfluss von Heparin auf die Endotoxin-Wiederfindung in Plasma und Serum schließen. Es ist nicht geklärt, ob Heparin direkt den LAL-Test beeinflusst oder Heparin in Zusammenspiel mit LPS die Wiederfindung beeinflusst.



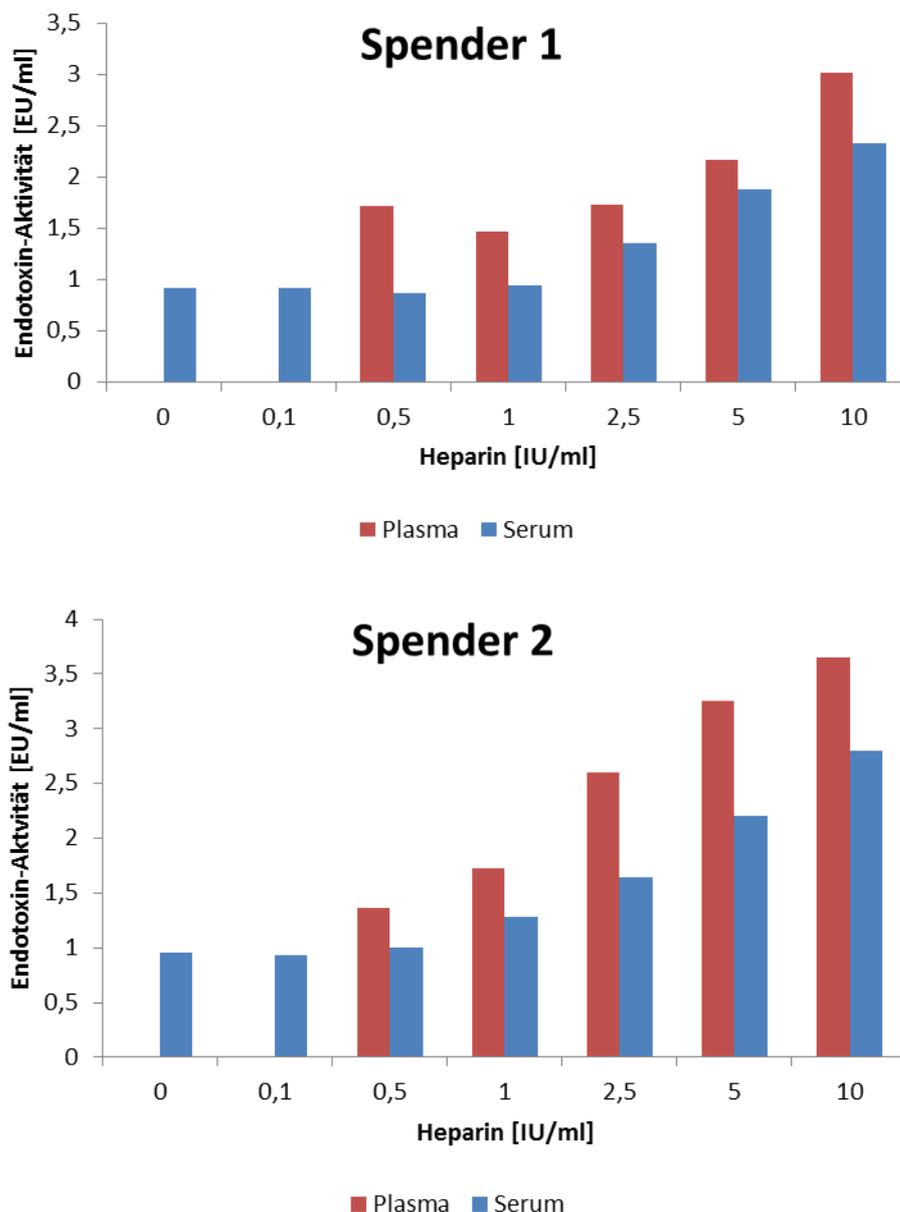
**Abbildung 15: Unterschiede in der Endotoxin-Wiederfindung in Plasma, Serum und Mischungen aus Plasma und Serum im LAL-Test (n=1)**

#### **4.8. Einfluss der Heparinkonzentration auf die Endotoxin-Aktivität in Plasma und Serum**

Um zu klären, ob Heparin einen Einfluss auf die Endotoxin-Aktivität besitzt, werden Plasma und Serumproben von 2 Spendern mit unterschiedlichen Konzentrationen Heparin gespickt. Die Konzentration von Heparin in Serum beträgt 0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 und 10 IU/ml. Um eine plasmatische Gerinnung zu unterbinden, durfte im Plasma die Heparin-Konzentration von 0,5 IU/ml nicht unterschritten werden. Im Plasma betragen die Konzentrationen 0,5; 1; 2,5; 5 und 10 IU/ml.

Bei beiden Spendern konnte nachgewiesen werden, dass Heparin die LPS-Aktivität in Plasma und im Serum im LAL-Test erhöht. Sowohl in Serum als auch in Plasma wird die Endotoxin-Aktivität durch Zugabe von 10 IU/ml Heparin mehr als verdoppelt.

Ein deutlicher Anstieg der Endotoxin-Aktivität ist ab 1 IU/ml Heparin ersichtlich. Grund dafür könnte sein, dass Heparin durch seine stark negative Ladungen an Proteine bindet, welche für die Endotoxin-Maskierung verantwortlich sind. LPS selbst ist ebenfalls negativ geladen, wird jedoch durch das stärker negativ geladene Heparinmolekül verdrängt. Proteine mit starker Affinität zu Heparin sind: Fibronectin, histidinreiche Glykoproteine, Apolipoproteine, die Komplementfaktoren C3 und C4b und vor allem Antithrombin III [40].



**Abbildung 16: Endotoxin-Aktivität im LAL-Test in Abhängigkeit von der Heparinkonzentration bei zwei Spendern**

#### 4.9. Einfluss von Fondaparinux auf die Endotoxin-Aktivität in Serum

Der synthetisch hergestellte Wirkstoff Fondaparinux wird zur Hemmung der Blutgerinnung verwendet. Die Wirkungsweise beruht auf der Hemmung des aktivierten Faktor Xa. Fondaparinux wird zur Substanzklasse der selektiven Inhibitoren gezählt. Dieses Antithrombotikum verstärkt (ca. 300-fach) durch seine selektive Bindung an Antithrombin-III (AT III) eine antithrombin-III-vermittelte Faktor-Xa-Inhibierung. Die Blutgerinnungskaskade wird unterbrochen, und es kommt nicht zur Bildung von Thrombin. Fondaparinux verhindert indirekt die Bildung von Thrombin und das Wachstum von vorhandenen Thromben.

Ziel dieses Versuches ist es zu ermitteln, ob das Antikoagulans Fondaparinux ebenfalls einen Einfluss auf die Endotoxin-Aktivität in Serum aufweist. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Endotoxin-Aktivität mit steigender Fondaparinuxkonzentration nicht ändert (Bonferroni t-test,  $p=0,02$  für Paarvergleich 0 vs. 1  $\mu\text{g/ml}$ ;  $p>0,08$  für alle übrigen Paarvergleiche). Daraus kann man schließen, dass AT III nicht für die LPS-Maskierung verantwortlich ist.

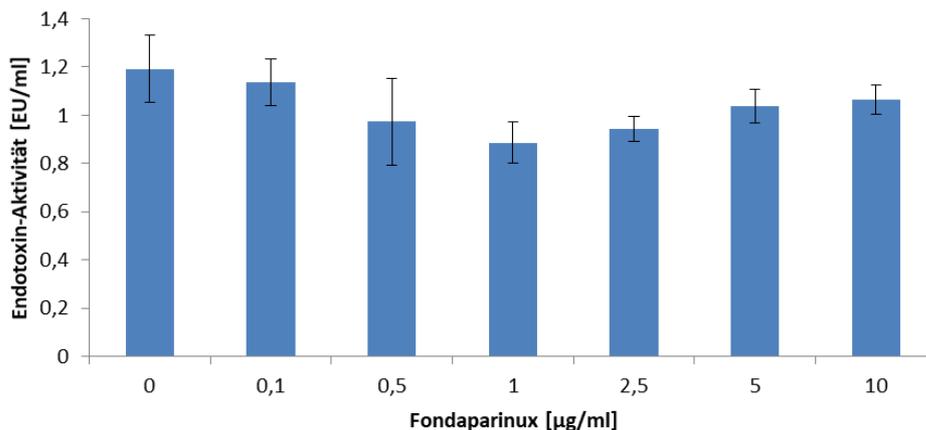
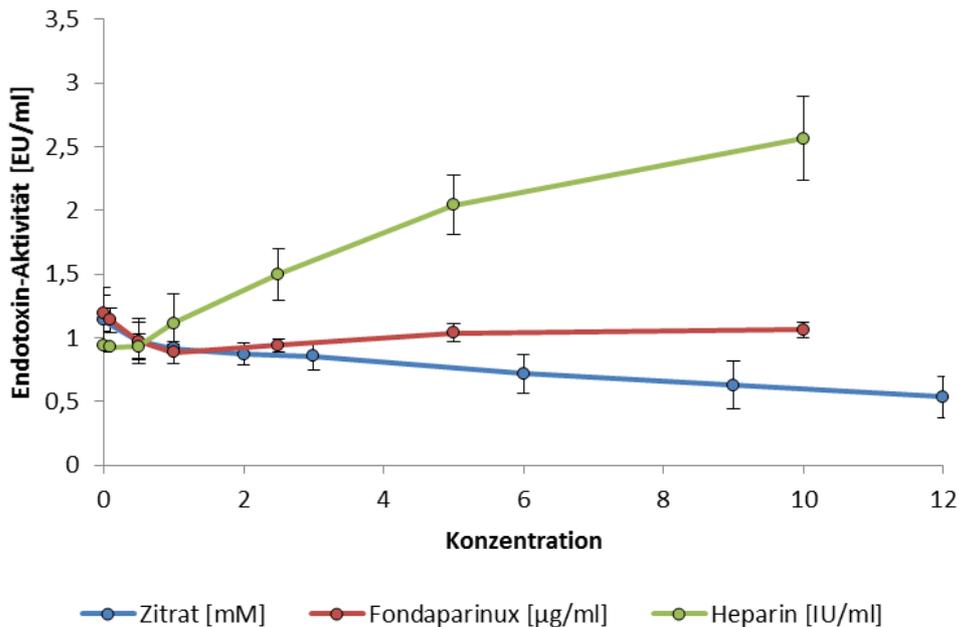


Abbildung 17: Endotoxin-Aktivität in Abhängigkeit von steigender Fondaparinux-Konzentration im LAL-Test (n=3)

#### 4.10. Zusammenfassung der getesteten Antikoagulantien und deren Einfluss auf die LPS-Aktivität in Plasma/Serum

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass Heparin die LPS-Aktivität in Serum und Plasma erhöht, Fondaparinux keinen Einfluss auf die LPS-Aktivität (gemessen nur in Serum) hat und Zitrat die LPS-Aktivität verringert.

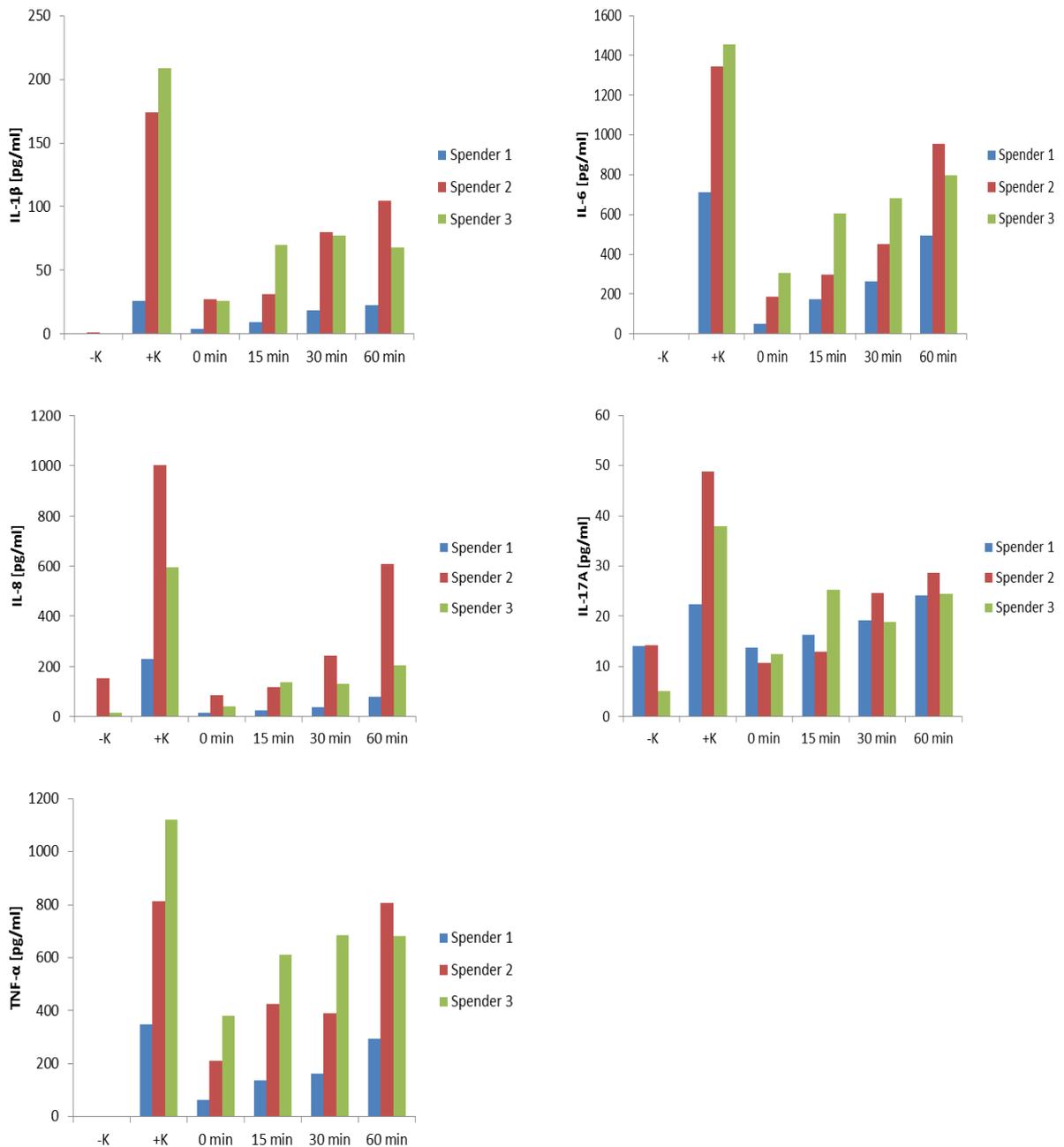


**Abbildung 18: Endotoxin-Aktivität in Abhängigkeit von verschiedenen Antikoagulantien im LAL-Test**

#### 4.11. Einfluss des Zeitpunktes der Zitratantikoagulation auf die Zytokinausschüttung in Vollblut

*In vivo* erfolgt eine Infektion mit Endotoxinen und eine damit verbundene Ausschüttung von Zytokinen über einen längeren Zeitraum. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Zitrat die Endotoxin-Aktivität im LAL-Test herabsetzen kann. Ob eine Zitratantikoagulation auch den Prozess der Zytokinausschüttung mindern oder zum Stillstand bringen kann, wurde noch nicht systematisch untersucht. Somit wird Vollblut mit LPS stimuliert und zu verschiedenen Zeiten (0, 15, 30, 60 Minuten) mit Zitrat versetzt.

Als Positivkontrolle dient Vollblut, gespikelt mit LPS, als Negativkontrolle wird natives Vollblut ohne Additive verwendet. Für diese Versuche wird 3 Spendern Blut abgenommen. Die proinflammatorischen Zytokine, die nach der LPS-Stimulation gemessen werden, sind Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8), Interleukin 17A (IL-17A) und Tumornekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).



**Abbildung 19: Konzentrationen der Zytokine IL-1β, IL-6, IL-8, IL-17A und TNF-α nach Stimulation mit 0,5 ng/ml LPS in Abhängigkeit des Zeitpunkts der Zitrat-Zugabe**

Die Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten Zytokine in Abhängigkeit des Zeitpunkts der Zitratzugabe ansteigen. Die mittlere Reduktion der Zytokinausschüttung in Prozent sowie die Absolutwerte für die drei Spender sind in Tabelle 2 dargestellt.

Spender 1	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	IL-17A	TNF- $\alpha$
K -	0	0	3	14	2
K +	26	712	228	22	350
0 Minuten	4	49	14	14	63
15 Minuten	9	173	25	16	136
30 Minuten	18	266	38	19	163
60 Minuten	22	493	78	24	295

Spender 2	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	IL-17A	TNF- $\alpha$
K -	1	0	152	14	3
K +	174	1343	1003	49	814
0 Minuten	27	186	85	11	211
15 Minuten	31	300	119	13	425
30 Minuten	80	452	242	25	389
60 Minuten	105	956	607	29	806

Spender 3	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	IL-17A	TNF- $\alpha$
K -	0	0	15	5	4
K +	209	1455	597	38	1119
0 Minuten	26	308	42	12	380
15 Minuten	70	606	136	25	611
30 Minuten	77	680	130	19	685
60 Minuten	68	796	203	24	680

**Tabelle 2: Absolutwerte der Zytokinmessung von 3 Spendern**

### Zusammenfassung

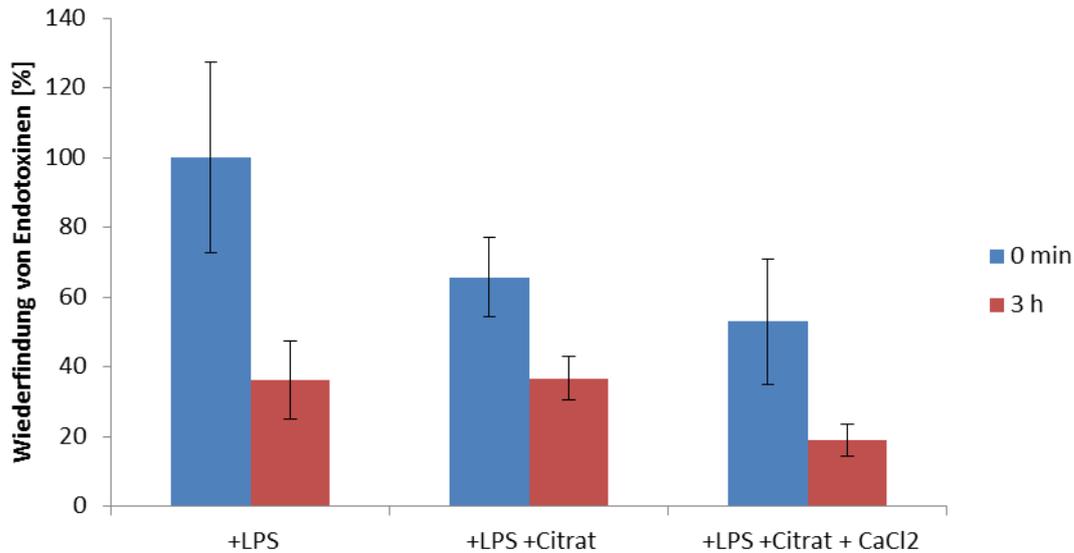
Durch Zugabe von Zitrat kann die Zytokinausschüttung herabgesetzt werden. Entscheidend ist jedoch der Zeitpunkt der Zugabe von Zitrat. Je länger LPS mit den Leukozyten interagieren kann, desto weniger Reduktion erfolgt. Ist der Prozess der Zytokinausschüttung bereits in Gang gesetzt, hat Zitrat wenig Auswirkung auf die Ausschüttung. Des Weiteren ist zu beachten, dass Endotoxine *in vivo* wesentlich länger im Blut des Patienten zirkulieren, bis eine Behandlung erfolgen kann. *In vitro* erfolgte die Inkubation maximal 60 Minuten. Somit ist zu vermuten, dass Zitrat die endotoxin-induzierte Zytokinausschüttung *in vivo* nicht oder nur geringfügig reduzieren kann.

#### 4.12. Einfluss der Zitratantikoagulation und der Rekalzifizierung auf die Zytokinausschüttung durch Endotoxine

Bei der Zitrat-Hämodialyse wird in den arteriellen Schenkel des extrakorporalen Blutkreislaufes Zitrat infundiert und vor dem Rückfluss des Blutes in den Patienten wieder mit Kalzium-Lösung substituiert [31].

Dieser Versuch hat unter anderem zum Ziel, eine Zitratdialyse mit 3 Spendern in einem Batchversuch *in vitro* zu simulieren. Dazu wird Plasma mit LPS gespikt und entweder sofort oder nach 3-stündiger Inkubation mit Zitrat antikoaguliert. Im Anschluss erfolgt die Rekalzifizierung des Plasmas auf physiologische  $iCa$ -Werte (4.1).

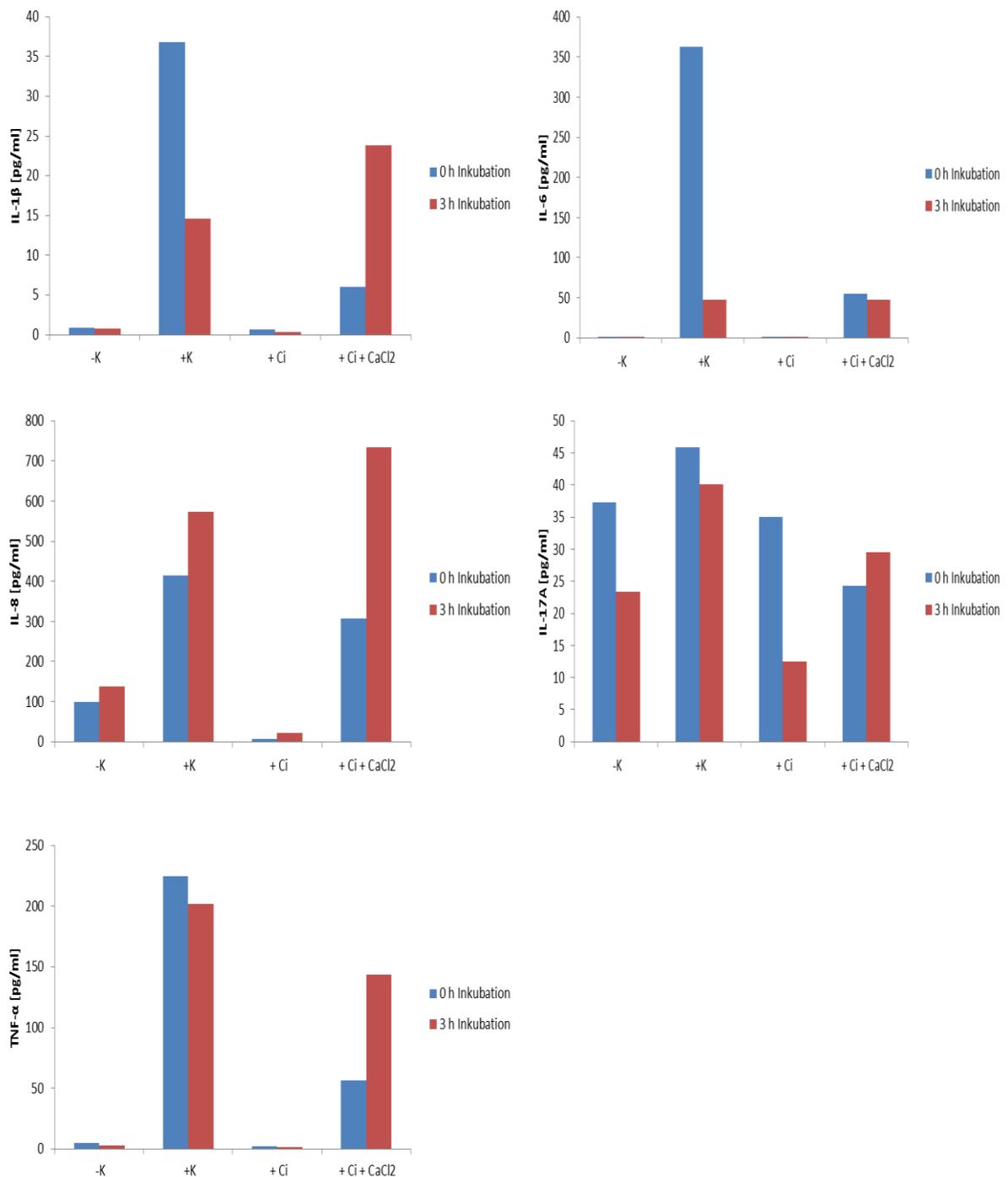
Die Analyse wird mittels LAL-Test durchgeführt. Als Positivkontrolle dient LPS-gespiktes Plasma ohne Inkubation ( $100 \pm 27 \%$ ). Die Ergebnisse des LAL-Tests zeigen, dass bei den Proben, die sofort verarbeitet wurden, eine erwartete Reduktion der Endotoxinaktivität bei der Zitrat-Antikoagulation auftritt. Bei 9 mM Zitrat wird eine Reduktion auf  $66 \pm 11 \%$  erzielt. Durch die anschließende Kalzium-Zugabe kann keine Aktivitätssteigerung von LPS erzielt werden (t-test,  $p=0,38$ ). Die Wiederfindung bleibt trotz Zugabe von Kalzium bei einem Wert von  $53 \pm 18 \%$ . Bei 3-stündiger Inkubation von LPS mit Plasma, ist ein deutlicher Aktivitätsverlust bei der Positivkontrolle mit LPS auf  $37 \pm 11 \%$  im Vergleich zur Positivkontrolle 0 h sichtbar (t-test,  $p=0,02$ ). Hier zeigt sich ein geringer Effekt der Reduktion der Endotoxin-Aktivität durch Zitrat (one way ANOVA,  $p=0,001$ ). Die Wiederfindung beträgt  $37 \pm 6\%$ . Durch Zugabe von Kalzium lässt sich die Wiederfindung von LPS minimal auf  $19 \pm 5 \%$  senken. Der Vorgang der Zitratdialyse kann somit die Endotoxinaktivität im Plasma, das 0 Stunden mit LPS inkubiert wurde, senken. Wird Plasma jedoch 3 Stunden inkubiert, erfolgt ein drastischer Aktivitätsverlust der Endotoxine. *In vivo* kann die Kontaktzeit von LPS mit Vollblut mehrere Stunden oder Tage betragen. Es ist daher anzunehmen, dass *in vivo* die Endotoxin-Aktivität durch eine Zitratdialyse nicht abzusenken ist. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass je länger LPS im Plasma inkubiert wird, desto geringer wird seine Endotoxin-Aktivität im LAL-Test. Es ist anzunehmen, dass LPS im Plasma geeignete Bindungspartner findet und dass dieser Effekt durch Zitrat beschleunigt, aber nicht verstärkt wird. Potentielle Bindungspartner können Plasmakomponenten, welche Bestandteil unserer angeborenen Immunantwort sind (Laktoferrin, BPI, Defensin u.a.), und Gerinnungsfaktoren sein.



**Abbildung 20: Wiederfindung von Endotoxinen bei sofortiger Verarbeitung und nach 3 Stunden. Verglichen werden LPS, LPS mit Zitrat und LPS mit Zitrat und CaCl<sub>2</sub> im LAL-Test (n=3)**

Für die Zytokin-Analytik werden die Plasmen, die 3 Stunden und 0 Stunden mit LPS inkubiert werden, 1:1 mit Blutzellenkonzentrat vermischt und 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Aus den gewonnenen Plasmaproben erfolgt die Zytokin-Analyse mittels Luminex.

Bei der Zytokin-Induktion muss beachtet werden, dass Patienten unterschiedlich in ihrer Zytokinausschüttung reagieren können. Manche Patienten werden sehr stark durch LPS stimuliert, manche nur wenig. Daher sind Standardabweichungen in nachstehenden Grafiken nicht dargestellt.



**Abbildung 21: Konzentration der Zytokine IL-1β, IL-6, IL-8, IL-17A und TNF-α nach Zugabe von Zitrat und nach anschließender Rekalzifizierung**

Die Ergebnisse der Zytokinanalytik zeigen, dass Zitrat sowohl nach 0 h als auch nach 3 h die Zytokinausschüttung beeinflussen kann. Die Inkubation von LPS nach 0 h zeigt eine hohe Ausschüttung von Zytokinen bei den Positivkontrollen. Lediglich IL-17A zeigt keine deutlichen Unterschiede zwischen Positiv- und Negativkontrolle. Nach 0 h kann durch die Zitratantikoagulation der Zytokinspiegel bei allen Proben, außer IL-17A, deutlich gesenkt werden. Eine Zugabe von Calcium-/Magnesiumchlorid Lösung bewirkt einen wiederholten Anstieg der Zytokinausschüttung, jedoch nicht auf das Niveau der Positivkontrolle. Wird LPS 3 h mit Plasma inkubiert, zeigen sich Unterschiede zwischen den einzelnen Zytokinen. Bei IL-1 $\beta$  und IL-6 ergibt sich im Vergleich zu 0 h eine geringere Zytokinausschüttung der Positivkontrolle. Demgegenüber zeigen IL-8, IL-17A und TNF-A eine annähernd gleiche Zytokinausschüttung bei den Positivkontrollen. Wie auch bei 0 h kann die Zitratantikoagulation die Zytokinsekretion senken. Nach Einstellung der Proben auf physiologische Calcium-Spiegel werden in allen 3-h-Proben die Zytokine wieder erhöht.

Zitrat kann die LPS-induzierte Zytokinausschüttung von Leukozyten durch das Herabsetzen des iCa reduzieren. Wird aber der iCa-Spiegel wieder auf physiologische Werte gebracht, ist dieser Effekt reversibel. Bei Proben die 0 h Inkubiert werden, ist die erhöhte Zytokinausschüttung durch Rekalzifizierung nicht so stark ausgeprägt wie bei den 3-h-Proben. *In vitro* spiegeln die 3-h-Ergebnisse die realen Bedingungen wider. Somit ist davon auszugehen, dass die Zitratantikoagulation bei der extrakorporalen Zitratdialyse zu keiner nennenswerten Reduktion der LPS-induzierten Zytokinausschüttung führt. In *In vitro*-Modellen sollte zugespiktes LPS daher über mehrere Stunden im Plasma inkubiert werden, bevor weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die *in vivo* vorherrschenden Bedingungen besser zu simulieren.

Spender 1	IL-1 $\beta$		IL-6		IL-8		IL-17A		TNF- $\alpha$	
	0 h	3 h	0 h	3 h	0 h	3 h	0 h	3 h	0 h	3 h
K -	1	1	1	0	198	283	32	31	4	4
K +	76	30	855	112	828	1054	57	40	422	440
+Citrat	1	1	1	0	10	46	39	20	3	1
+ Citrat + CaCl <sub>2</sub>	10	60	109	128	495	1460	42	44	91	385

Spender 2	IL-1 $\beta$		IL-6		IL-8		IL-17A		TNF- $\alpha$	
	0 h	3 h	0 h	3 h	0 h	3 h	0 h	3 h	0 h	3 h
K -	1	1	1	0	89	115	5	3	7	3
K +	22	2	151	2	224	176	9	11	203	12
+Citrat	0	0	0	0	5	3	9	6	2	3
+ Citrat + CaCl <sub>2</sub>	5	3	34	2	288	359	5	10	61	10

Spender 3	IL-1 $\beta$		IL-6		IL-8		IL-17A		TNF- $\alpha$	
	0 h	3 h	0 h	3 h	0 h	3 h	0 h	3 h	0 h	3 h
K -	0	0	0	0	7	13	75	35	4	1
K +	12	12	83	28	188	491	71	69	49	154
+Citrat	1	0	1	0	7	16	57	11	2	2
+ Citrat + CaCl <sub>2</sub>	3	9	23	11	140	381	26	34	18	35

**Tabelle 3: Absolutwerte der Zytokininduktion in Abhängigkeit der Inkubationszeit von Endotoxin und der Rekalzifizierung in pg/ml von 3 Spendern**

#### 4.13. Einfluss der Heparinkonzentration auf die Zytokinausschüttung in LPS-stimuliertem Vollblut.

In Versuch 4.8 konnte eine Aktivitätssteigerung von LPS durch Heparin im LAL-Test beobachtet werden. Es soll verifiziert werden, ob dieser Anstieg durch eine Interaktion von Heparin mit dem LAL-Test oder durch eine tatsächliche Interaktion von Heparin mit der Inflammationskaskade zustande kommt. Es wird eine Zytokinanalyse mit unterschiedlichen Konzentrationen an Heparin (0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5) durchgeführt. Als Negativkontrolle dient Vollblut, das mit Fondaparinux, einem synthetischen Antikoagulans, antikoagultiert wurde.

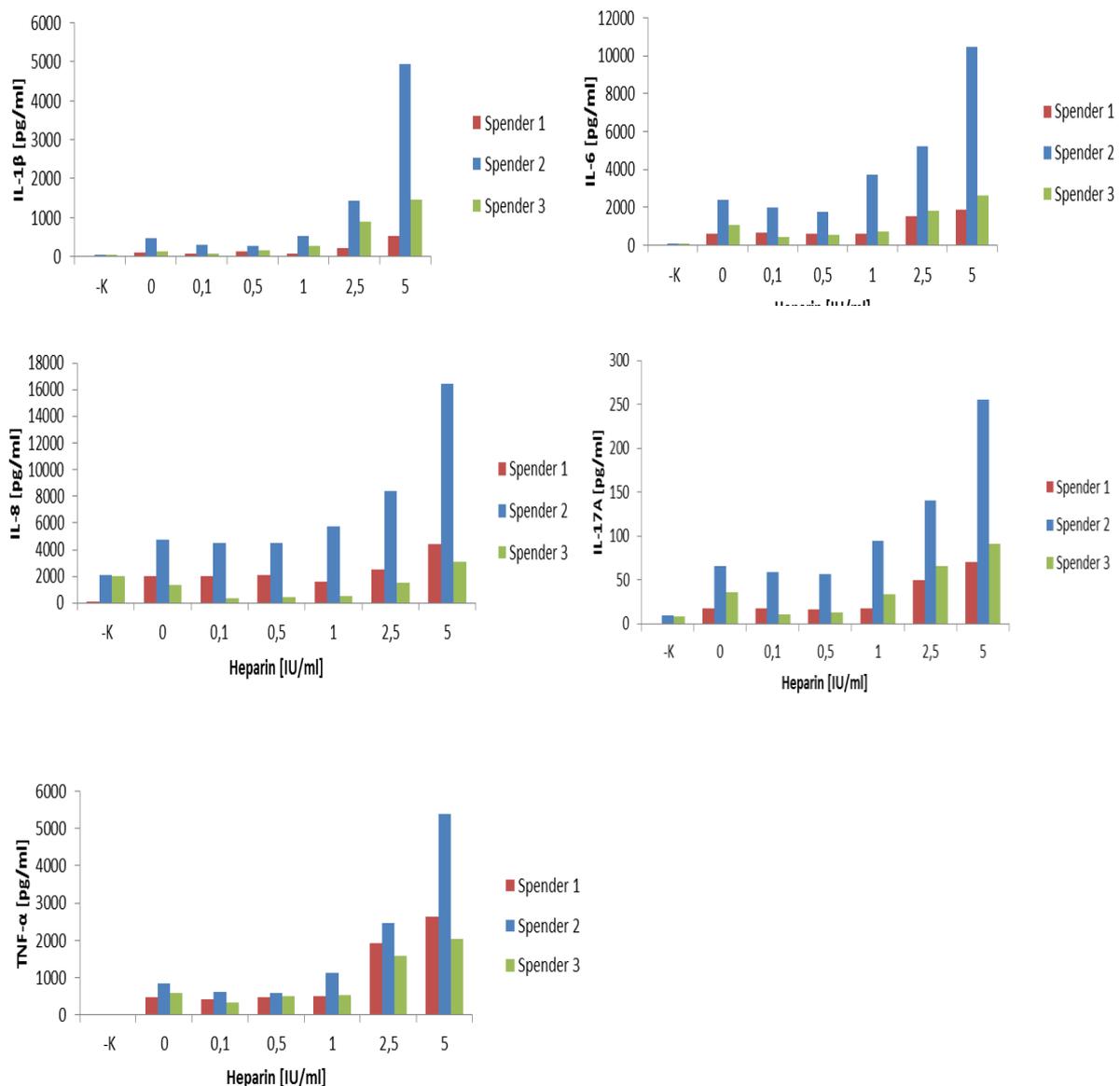


Abbildung 22: Konzentration der Zytokine IL-1β, IL-6, IL8, IL-17A und TNF-α in Abhängigkeit von steigender Heparinkonzentration

Alle Zytokine zeigen einen gleichmäßigen Anstieg der Sekretion bei Zunahme der Heparinkonzentration. Ab 1 IU/ml Heparin kann eine verstärkte Zytokinausschüttung beobachtet werden. Wie auch in den vorigen Versuchen zeigen die Blutproben von den Spendern individuelle Reaktionen auf die LPS-Stimulation, jedoch ist bei allen Proben die gleiche Tendenz zur Zytokinerrhöhung durch Heparin festzustellen.

<b>Spender 1</b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-8</b>	<b>IL-17A</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>
<b>K -</b>	0	0	80	0	0
<b>0</b>	86	612	2017	18	477
<b>0,1</b>	67	662	2044	18	427
<b>0,5</b>	127	594	2078	17	467
<b>1</b>	69	614	1557	18	501
<b>2,5</b>	212	1520	2479	50	1922
<b>5</b>	512	1862	4410	70	2634

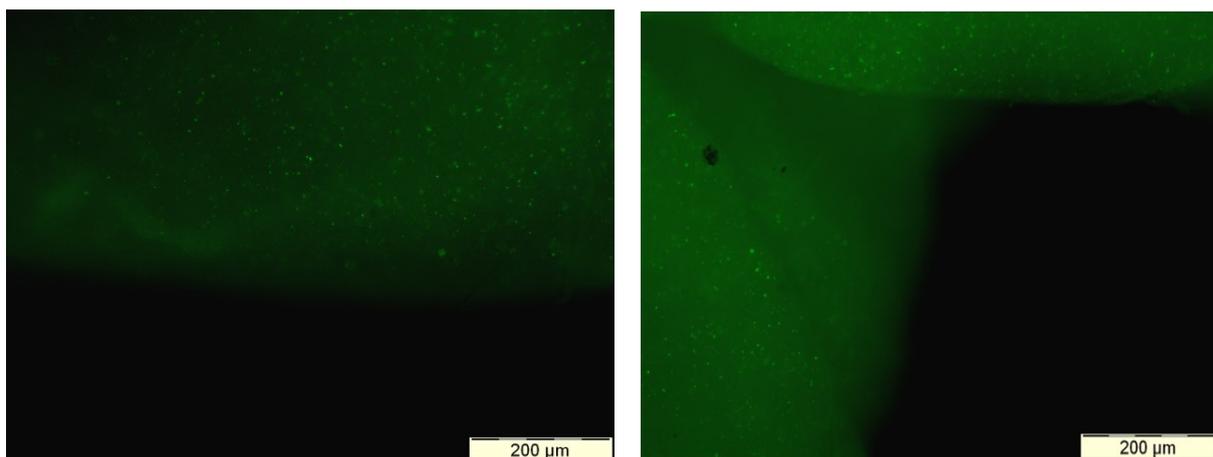
<b>Spender 2</b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-8</b>	<b>IL-17A</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>
<b>K -</b>	11	8	2120	10	28
<b>0</b>	462	2421	4724	66	833
<b>0,1</b>	304	1971	4516	60	619
<b>0,5</b>	276	1768	4477	57	579
<b>1</b>	509	3725	5762	94	1134
<b>2,5</b>	1421	5234	8422	141	2473
<b>5</b>	4940	10443	16458	255	5388

<b>Spender 3</b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-8</b>	<b>IL-17A</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>
<b>K -</b>	8	7	1991	9	12
<b>0</b>	138	1050	1375	36	573
<b>0,1</b>	64	447	374	11	332
<b>0,5</b>	144	547	436	13	497
<b>1</b>	265	688	522	34	531
<b>2,5</b>	899	1797	1481	66	1582
<b>5</b>	1445	2632	3104	92	2030

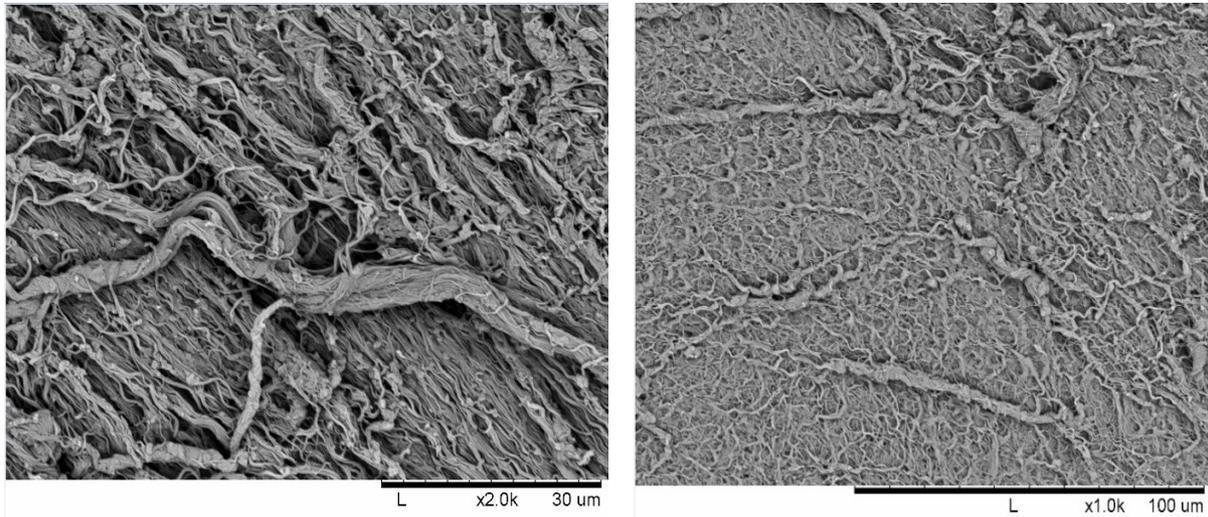
**Tabelle 4: Zytokininduktion durch LPS in Abhängigkeit der Heparinkonzentration in pg/ml von 3 Spendern**

#### 4.14. Bindung von LPS an den Fibrinklot

In Versuch 4.12 konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen LPS und dessen Bindung an Komponenten im Plasma aufgezeigt werden. In den folgenden Versuchen wird ermittelt, ob LPS an Gerinnungsfaktoren bzw. an die in der Blutgerinnung involvierten Plasmakomponenten bindet. Hierzu wird untersucht, ob LPS im Fibrinklot verstärkt aufzufinden ist. Dies soll durch Verwendung von FITC-LPS in der Fluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht werden. Plasma ohne Antikoagulans wird mit FITC-LPS versehen, und es folgt die Bildung eines Plasmaklots. Es ist eine deutliche Fluoreszenz des gewaschenen Plasmaklots sichtbar (siehe Abb. 23). Man erkennt, dass FITC-LPS gleichmäßig über den Klot verteilt ist. Der Klot ohne FITC-LPS zeigt keine Fluoreszenz, d.h. der Plasmaklot hat keine Eigenfluoreszenz. Dies bedeutet, dass die Fluoreszenz vom FITC-markierten-LPS stammt. Als Kontrolle dient das zuvor abzentrifugierte überstehende Plasma. Bei der Mikroskopie ist auch hier eine deutliche Fluoreszenz erkennbar. Hätte FITC-LPS eine stärkere Affinität zu im Plasmaklot eingebauten Proteinen, als zu den restlichen Plasmabestandteilen, dürfte der Überstand keine oder nur geringere Fluoreszenz aufweisen. Im überstehenden Plasma des Plasmaklot ohne FITC-LPS ist keine Fluoreszenz erkennbar. Somit ist davon auszugehen, dass FITC-LPS keine stärkere Affinität zum Plasmaklot aufweist und homogen im Plasma und im Klot verteilt ist.



**Abbildung 23: Mikroskopische Abbildung eines Fibrinklots mit eingeschlossenem FITC-LPS**



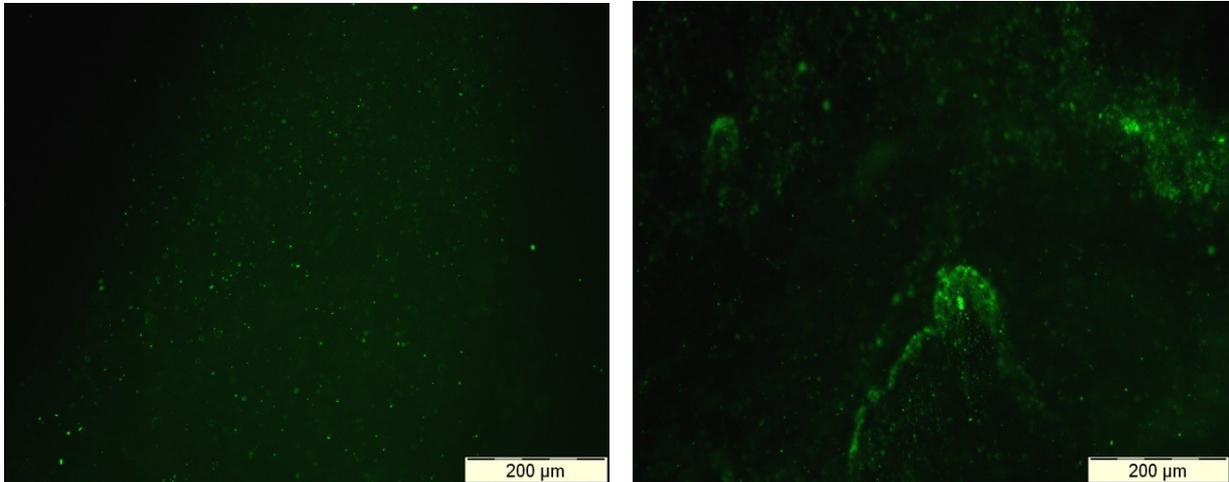
**Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Fibrinklots**

#### **4.15. Bindung von LPS an Kryopräzipitat**

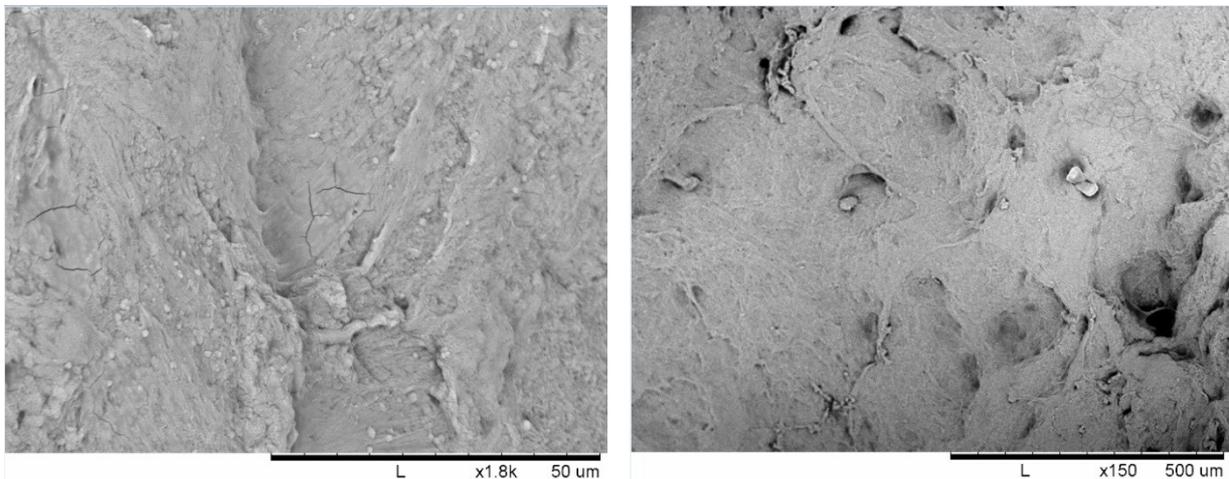
Anhand der Ergebnisse des vorigen Versuchs (4.14) ist eine erhöhte Bindung von LPS zum Plasmaklot auszuschließen. Eine weitere Möglichkeit, einen Zusammenhang zwischen LPS und Gerinnungsfaktoren zu eruieren, ist die eventuelle Bindung von LPS im Kryopräzipitat zu untersuchen. Kryopräzipitate entstehen durch Einfrieren von Heparin- oder Zitratplasma und anschließendem langsamen Auftauen. Es besteht größtenteils aus Faktor VIII, von-Willebrand-Faktor und Fibrinogen. Faktor VIII ist ein wichtiger Teil der Gerinnungskaskade, der zusammen mit Kalzium den Faktor X aktiviert und somit die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin in Gang setzt [41]. Faktor VIII hat im Plasma eine mittlere Halbwertszeit von 12 Stunden, die biexponentiell geteilt ist. Die erste kurze Halbwertszeit beträgt 4-6 Stunden und wird von einer zweiten Phase von 14 Stunden gefolgt [42]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Endotoxin-Aktivität im LAL-Test mit zunehmender Inkubationszeit von LPS mit Plasma abnimmt. Ein eventueller Zusammenhang zwischen der LPS-Inkubation von 3 Stunden und der ersten Halbwertszeit von Faktor VIII könnte möglich sein. Weiters ist die Aktivität von Faktor VIII kalziumabhängig und somit durch die Zitratantikoagulation beeinflusst.

In diesem Versuchsaufbau wurde Heparinplasma mit FITC-LPS gespikt und eingefroren. Nach dem Einfrieren wurde das Plasma langsam bei Raumtemperatur aufgetaut und das entstandene Kryopräzipitat abzentrifugiert. Das gewaschene Kryopräzipitat wird im Mikroskop auf Fluoreszenz geprüft. Es ist eine deutliche homogen verteilte Fluoreszenz des FITC-LPS im Kryopräzipitat sichtbar. Der Überstand des abzentrifugierten Kryopräzipitats weist keinerlei Fluoreszenz auf. Die Negativkontrollen ohne FITC-LPS zeigen weder im Kryopräzipitat noch im

überstehenden Plasma eine Eigenfluoreszenz. FITC-LPS hat folglich eine höhere Affinität zum Kryopräzipitat als zum überstehenden Faktor VIII abgereichertem Plasma.



**Abbildung 26: Mikroskopische Abbildung eines Kryopräzipitats mit eingeschlossenem FITC-LPS**



**Abbildung 25: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Kryopräzipitats**

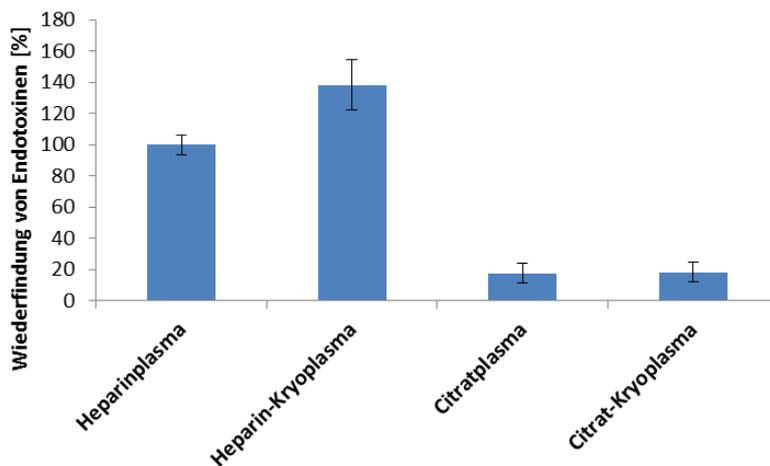
#### **4.16. Testung der LPS-Affinität zum Kryopräzipitat**

Versuch 4.15 zeigte, dass FITC-LPS eine höhere Affinität zum Kryopräzipitat besitzt als zum überstehenden Plasma. Um einen eventuellen Zusammenhang zu verifizieren, wird in diesem Versuch kryopräzipitat-abgereichertes Plasma auf eine vorliegende Endotoxin-Aktivität mittels LAL-Test analysiert. Heparinplasma und Zitratplasma von 3 Spendern wird mit LPS gespikt und anschließend eingefroren und wieder aufgetaut. Das entstandene Kryopräzipitat wird abzentrifugiert und das

überstehende Plasma analysiert. Als Positivkontrolle wird ein Aliquot des noch nicht eingefrorenen Plasmas analysiert.

Es konnten keine Unterschiede in der LAL-Aktivität zwischen kryopräzipitat-abgereichertes Plasma und der Positivkontrolle gefunden werden. In kryopräzipitat-abgereichertem Heparinplasma wird eine geringfügig höhere Endotoxin-Aktivität festgestellt. Die Ergebnisse mit FITC-LPS konnten in diesem Versuch nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse ist, dass fluoreszierendes LPS durch den kovalent gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff andere Bindungsaffinitäten zu unterschiedlichen Plasmakomponenten aufweist als normales LPS.

Ein weiteres Ergebnis aus diesem Test zeigt die Unterschiede der Endotoxin-Wiederfindung im Zitratplasma und Heparinplasma. Zitratplasma weist eine 82 % geringere Endotoxin-Aktivität als Heparinplasma auf. Diese Ergebnisse spiegeln auch die Ergebnisse des Versuchs 4.3 wider.



**Abbildung 27: Wiederfindung von Endotoxinen in Heparinplasma, Heparin-Kryoplasma, Zitratplasma und Zitrat-Kryoplasma im LAL-Test (n=3)**

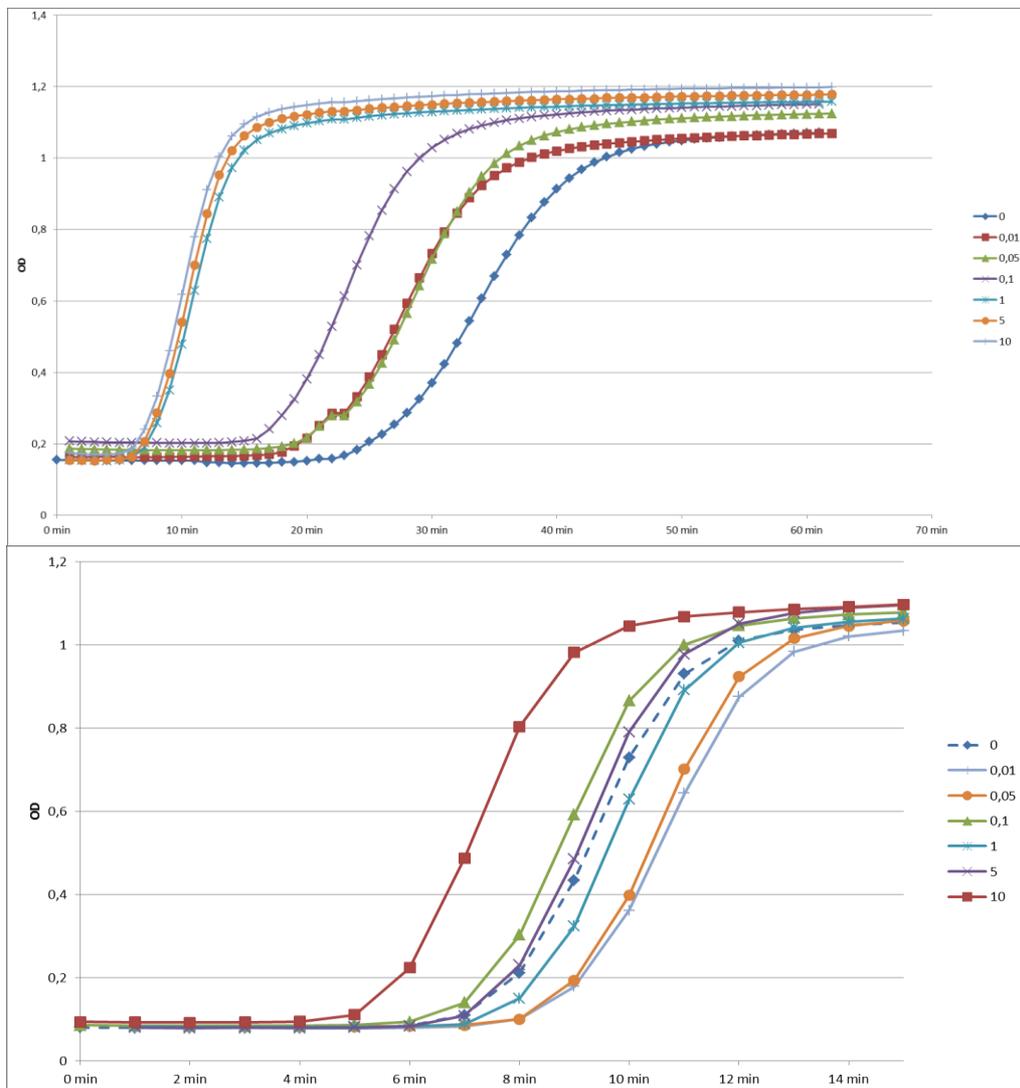
#### **4.17. Einfluss von LPS auf die plasmatische Gerinnung**

Tissue factor (TF) zählt zu den Gerinnungsfaktoren, die durch Bindung von Faktor VII oder Faktor VIIa die Aktivierung von Faktor X und IX in Gang setzen. LPS kann durch seine proinflammatorische Funktion die TF-Expression durch die Stimulation von Monozyten und Endothelzellen mit freigesetzten Zytokinen initiieren. In klinischen Untersuchungen und Tierexperimenten konnte der Zusammenhang von LPS mit der Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade und einer durch

Sepsis ausgelösten disseminierten intravasalen Koagulopathie gefunden werden [43].

In diesem Versuch soll gezeigt werden, dass die plasmatische Gerinnung durch unterschiedliche Konzentrationen an LPS beeinflusst werden kann. Dazu wird Zitratplasma von 2 Spendern mit LPS gespickt und die Antikoagulation durch Kalzium/Magnesiumchlorid-Lösung aufgehoben. Die optische Dichte der entstandenen Trübung durch das geronnene Plasma kann mittels Plattenphotometer analysiert werden.

Die Ergebnisse aus dieser Versuchsserie zeigen, dass bereits bei 10 ng LPS/ml die plasmatische Gerinnung beschleunigt wird. Weiters ist aus den Versuchsergebnissen ersichtlich, dass die Aktivierung der Gerinnung von der LPS-Konzentration abhängig ist. Zusätzlich kann auch eine spenderabhängige Aktivierung festgestellt werden.



**Abbildung 28: Aktivierung der Gerinnung durch unterschiedliche Konzentrationen von LPS bei 2 Spendern, ermittelt durch Trübungsmessung bei 600 nm**

#### 4.18. ESP™-Kit

Das Prinzip des ESP-Kits ist der enzymatische Abbau endotoxin-maskierender Proteine und eine dadurch erhöhte Wiederfindung der Endotoxin-Aktivität im Zitratplasma mittels LAL-Test. In vorhergehenden Versuchen konnte der Unterschied in der Endotoxin-Wiederfindung zwischen Zitratplasma und Heparinplasma gezeigt werden. Durch eine simulierte Zitratantikoagulation und Rekalzifizierung, wie sie in der klinischen Dialyse stattfindet, konnte eine Erniedrigung der Endotoxin-Aktivität beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass es durch Zugabe von Zitrat zur Verkleinerung der Endotoxin-Aggregate in einen energetisch stabileren Zustand kommt. Diese Endotoxin-Monomere oder kleineren Endotoxin-Aggregate binden an Plasmaproteine und weisen im LAL-Test eine geringere biologische Aktivität auf. Ziel dieser Untersuchung ist daher, durch den enzymatischen Verdau von Proteinen eine höhere Wiederfindung zu erlangen. Es wird Zitratplasma von 3 Spendern mit LPS gespikt und via ESP™-Kit Prozedur behandelt und analysiert. Als Kontrolle wird Zitratplasma mit LPS-Spike ohne ESP™-Kit Prozedur analysiert. Für Zitratplasma ohne ESP™-Kit wird die Wiederfindung auf 100 % gesetzt. Zitratplasma mit ESP™-Kit erreicht eine Wiederfindung von  $57 \pm 24$  %. Die Endotoxin-Wiederfindung ist ohne enzymatischen Verdau deutlich höher (one tailed t-test,  $p=0,04$ ). Dies lässt darauf schließen, dass entweder der ESP™-Kit nicht hält, was er verspricht, oder die Theorie der LPS-Maskierung durch Proteine nicht korrekt ist. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass der enzymatische Verdau nicht vollständig verläuft und Artefakte zurück bleiben, welche möglicherweise LPS binden können. Das ESP™-Kit ist unter den getesteten Bedingungen nicht geeignet für die Erhöhung der Endotoxin-Wiederfindung im Zitratplasma.

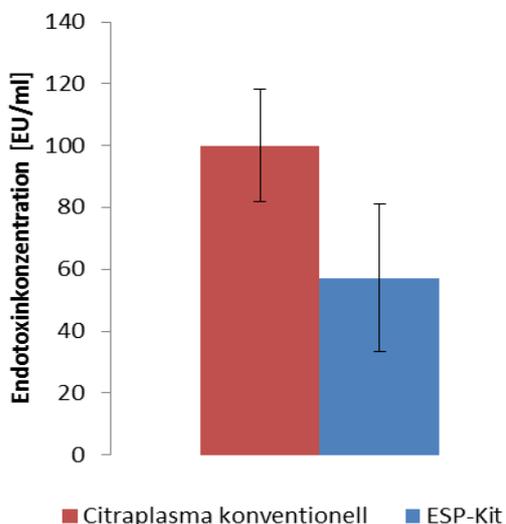


Abbildung 29: Endotoxinwiederfindung in Heparinplasma mit und ohne ESP™-Kit

#### **4.19. Vermessung der Größe von Endotoxin-Aggregaten**

Kalzium spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Endotoxin-Aggregaten. Durch die negativ geladenen Phosphatgruppen des inneren Kerns bilden sich in Anwesenheit von Kalzium in wässriger Lösung Aggregate aus. In einer Studie von Santos et. al konnte gezeigt werden, dass sich bei einer Konzentration von 80 µg/ml LPS Aggregate von einem Durchmesser von 40-600 nm bilden (Durchschnitt: 190 nm). Bei einer geringeren Konzentration (15 µg/ml) bildeten sich Aggregate mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 120 nm, welche vom Autor als pre-mizellare Oligomere bezeichnet werden [44].

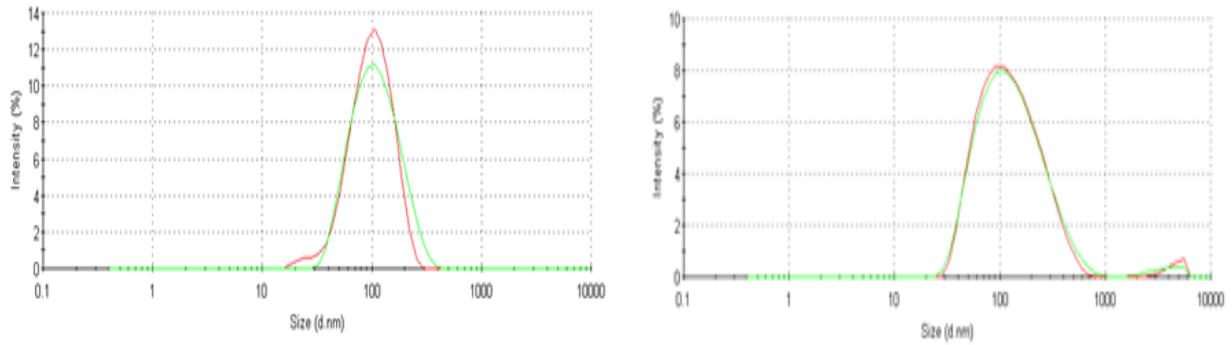
In diesem Versuch soll ermittelt werden, ob die Aggregatgröße von Endotoxinen in wässriger Lösung durch Zugabe von Zitrat beeinflusst wird. Dazu wird die Aggregatgröße mittels Zetasizer Nano ZS vermessen. Es wird LPS von Bakterienlysaten und LPS (10 µg/ml) in reiner Form als Lyophilisat in wässriger Lösung vermessen. Die Proben werden durch Filtermembranen mit unterschiedlichem Cut-off im Bereich von Mikrometern (µm) und Kilodalton (kDa) filtriert (0,45 µm, 0,22 µm, 100 kDa, 50 kDa, 30 kDa, 10 kDa, 5 kDa). Alle filtrierten Proben werden mittels LAL-Analytik auf Endotoxin-Aktivität untersucht. Zusätzlich wird eine ultraschall-behandelte wässrige LPS Lösung (100 µg/ml) vermessen. Nach der Größemessung erfolgt die Zugabe von 9 mM Zitrat und eine erneute Größemessung mittels Zetasizer.

In der LAL-Analytik konnte gezeigt werden, dass sowohl LPS (rein) als auch LPS des Bakterienlysats in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 mit 0,22 und 0,45 µm Cut-off eine Aktivität von über 12 EU/ml erreichen. Ab 100 kDa und darunter konnte keine LAL-Aktivität in beiden LPS-Proben beobachtet werden. Durch die Filter mit 0,22 µm und 0,45 µm Porengröße können LPS-Aggregate ungehindert filtriert und eine hohe Endotoxin-Aktivität im LAL-Test erreicht werden. Die LAL-Ergebnisse zeigen, dass keine Endotoxin-Aggregate die Membranen mit einem molekularen Cut-off ≤ 100 kDa durchdringen können.

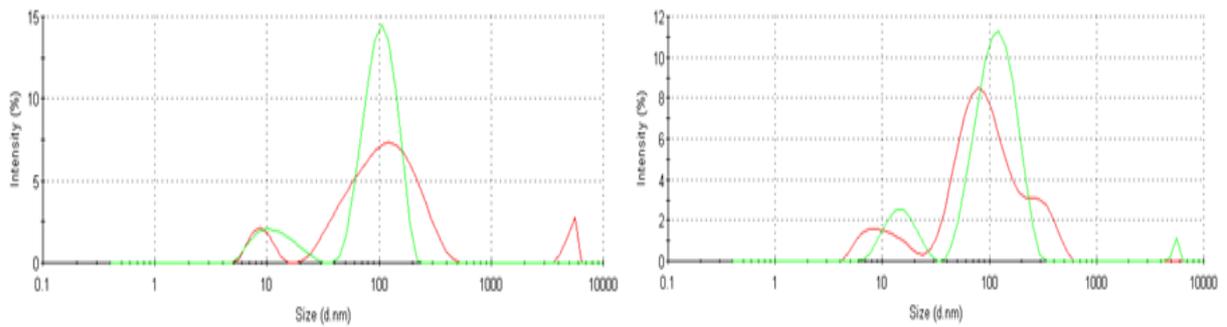
Die gemessenen Werte des Zetasizer Nano ZS werden in Form einer Größenverteilung dargestellt. Die Vermessung des Lysats ergibt bei einem Cut-off von 0,45 µm eine Durchschnittsgröße von 80 nm und bei 0,22 µm 108 nm. Bei Zugabe von Zitrat vergrößert sich der Durchmesser bei 0,45 µm auf 124 nm und bei 0,22 µm verringert er sich auf 78 nm. Eine Verringerung der Aggregatgröße durch Zitrat kann bei den Bakterienlysaten nur bei einer Porengröße des Filters von 0,22

$\mu\text{m}$  beobachtet werden. Reines LPS weist bei einem Cut-off von  $0,45 \mu\text{m}$  eine Durchschnittsgröße von  $108 \text{ nm}$  und bei  $0,22 \mu\text{m}$   $105 \text{ nm}$  auf. Zitrat lässt die Größe bei  $0,45 \mu\text{m}$  auf  $96$  und bei  $0,22 \mu\text{m}$  auf  $105 \text{ nm}$  sinken. Somit ist die Verkleinerung der LPS-Aggregate in beiden Fällen nicht wesentlich ersichtlich, jedoch ist bei  $0,45 \mu\text{m}$  Filterdurchmesser eine geringfügig stärker ausgeprägte Verkleinerung bemerkbar. Ab einem Filterdurchmesser von  $\leq 100 \text{ kDa}$  sind sowohl bei den Proben mit Bakterienlysat als auch bei reinem LPS keine Aggregate in den vorherigen Größenbereichen messbar. Dies korreliert mit den Ergebnissen des LAL-Tests, welche bestätigen, dass Endotoxine ab einem Filterdurchmesser von  $\leq 100 \text{ kDa}$  nicht mehr die Membran durchdringen. Die ultraschallbehandelten LPS-Proben weisen eine Größe von  $330 \mu\text{m}$  auf. Eine Verringerung der Aggregatgröße durch Zitrat kann nicht erreicht werden.

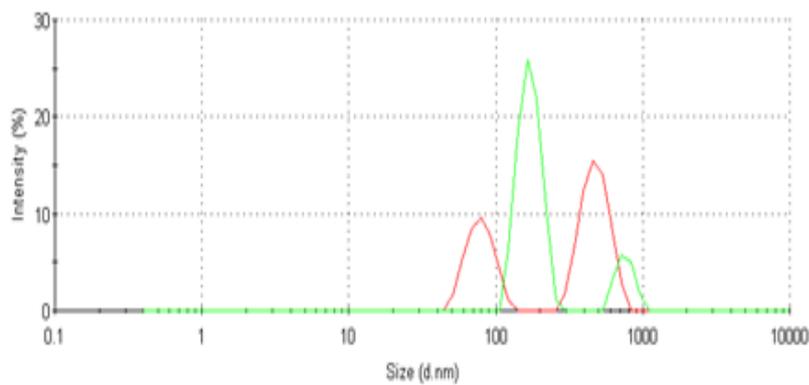
Bei der Betrachtung der Abbildungen 30, 31 und 32 kann festgestellt werden, dass sich sowohl bei  $0,45 \mu\text{m}$  als auch bei  $0,22 \mu\text{m}$  Filterdurchmesser die Verteilungskurve der Aggregatgröße bei Zugabe von Zitrat zu den Bakterienlysaten verändert. Diese Kurve ähnelt in ihrer Ausprägung jener für  $0,45 \mu\text{m}$  Filterdurchmesser mit reinem LPS und Zugabe von Zitrat. Weiters ist festzustellen, dass sich bei  $0,45 \mu\text{m}$  und  $0,22 \mu\text{m}$  Filterdurchmesser die Kurven des reinen LPS bei Zugabe von Zitrat nicht weiter verändern. Es ist anzunehmen, dass die Aggregatgröße im wässrigen Milieu bei reinem LPS die stabilste Aggregatkonfiguration ist. Selbst die Zugabe von Zitrat kann diese LPS-Formation nicht auflösen. Bei den Proben mit Bakterienlysaten kann beobachtet werden, dass sich durch Zugabe von Zitrat ebenfalls diese stabile Form der Aggregate ausbildet. Die ultraschallbehandelten Proben zeigen zwei Verteilungskurven unterschiedlicher Größe. Nach Zugabe von Zitrat ist nur mehr eine Kurve ersichtlich. Wie sich LPS-Aggregate jedoch in Proteinlösungen verhalten, ist mittels Zetasizer Nano ZS nicht zu ermitteln. Es ist anzunehmen, dass sich LPS-Aggregate in Vollblut anders verhalten. Das Zusammenwirken der hydrophilen und hydrophoben Kräfte kann gänzlich verschiedene Strukturen zum Vorschein bringen. Es ist fraglich, ob sich diese Aggregate durch Zitratantikoagulation in Vollblut besser beeinflussen lassen als in wässrigem Milieu. Aus den vorhergehenden Versuchen kann man schließen, dass Zitrat einen Einfluss auf LPS hat, aber in welcher Form es auf die molekulare Struktur von LPS wirkt, ist ungeklärt.



**Abbildung 30: Verteilungskurven von reinem LPS (rot) und LPS mit Zitrat (grün) mit einem molekularen Cut-off von 0,45  $\mu\text{m}$  (links) und 0,22  $\mu\text{m}$  (rechts)**



**Abbildung 31: Verteilungskurven von LPS aus Bakterienlysat (rot) und Bakterienlysat mit Zitrat (grün) mit einem molekularen Cut-off von 0,45  $\mu\text{m}$  (links) und 0,22  $\mu\text{m}$  (rechts)**



**Abbildung 32: Verteilungskurve von ultraschallbehandeltem LPS (rot) bei Zugabe von Zitrat (grün)**



## 5. Zusammenfassung

Zitrat hat auf zahlreiche metabolische Prozesse Einflüsse, wie die Bildung von Chelatkomplexen mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  im Blut. Im Gerinnungssystem kann Zitrat durch den Entzug von Kalzium die plasmatische Gerinnungskaskade beeinflussen, die durch das Fehlen von  $\text{Ca}^{2+}$  nicht ablaufen kann. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zitrat eine Wirkung auf die Endotoxin-Aktivität im Plasma besitzt. Durch Zugabe von Zitrat vor und nach Lipopolysaccharid (LPS) Zugabe kann die Aktivität stark verringert werden. Grund dafür könnte eine Maskierung der Endotoxine durch verschiedenste Proteine im Plasma sein. Im Vollblut ist ein Anhaften der Endotoxine an Blutzellen auszuschließen. In Messungen mit FITC-markiertem LPS kann festgestellt werden, dass Erythrozyten, PBMCs und Thrombozyten Lipopolysaccharide nicht dauerhaft binden können. Die Zeit der Inkubation von LPS mit Vollblut vor der Zitratzugabe hat einen entscheidenden Einfluss auf die Zytokinausschüttung. Je länger LPS mit den Leukozyten interagieren kann, desto weniger Reduktion der Zytokinausschüttung erfolgt. Ist der Prozess der Zytokinausschüttung erst in Gang gesetzt, hat Zitrat wenig Auswirkung auf die weitere Ausschüttung. Weiters ist zu beobachten, dass die Endotoxin-Aktivität im Plasma mit der Inkubationszeit abnimmt. Eine Rekalzifizierung des LPS-gespikten Zitratbluts bewirkt keinen erneuten Anstieg der reduzierten Endotoxin-Aktivität. Eine erhöhte Ausschüttung von Zytokinen nach erfolgter Rekalzifizierung ist nicht eindeutig. Im Gegensatz zu Zitrat kann Heparin die Endotoxin-Aktivität in Plasma und Serum erhöhen. Ab 1 IU/ml Heparin ist sowohl die Aktivität der Endotoxine, als auch die Zytokinausschüttung erhöht. Ebenfalls konnte die plasmatische Gerinnung durch unterschiedliche Konzentrationen an LPS beeinflusst werden. Bereits ab 10 ng/ml LPS konnte die plasmatische Gerinnung spenderabhängig beschleunigt werden. Eine Bindung von LPS an einen Plasmaklot und an Kryopräzipitat konnte nicht gezeigt werden. Der ESP<sup>TM</sup>-Kit konnte in seiner Funktion zu Erhöhung der Wiederfindung von Endotoxinen im Zitratplasma nicht überzeugen. Herkömmliches Zitratplasma zeigt eine höhere Wiederfindung als die enzymatisch abgebauten Proben. LPS zeigt in wässrigen Lösungen keine Verringerung der Aggregatgröße durch Zitrat. Es kann gezeigt werden, dass die stabilste Aggregatgröße von LPS in wässrigen Lösungen bei ca. 100 nm liegt und Filter  $\leq 100$  kDa nicht durchdringen kann.



## 6. Abstract

Citrate has an impact on various processes in the human organism, such as the formation of chelat complexes with sodium and magnesium in the bloodstream. Citrate can influence the plasmatic coagulation cascade due to removal of ionized calcium. Experiments showed that citrate has an influence on the endotoxin activity in plasma. The activity can be decreased dramatically by adding citrate before and after the LPS spike. Further it was demonstrated that endotoxins do not adhere to blood cells in whole blood. Erythrocytes, PBMCs and thrombocytes are not able to bind LPS permanently in experiments with FITC-LPS. The incubation time of LPS in whole blood before the addition of citrate has an impact on the secretion of cytokines. The longer LPS interacts with leukocytes, the smaller the reduction in cytokine secretion. Once the process has started, citrate has little influence on the secretion. The activity of endotoxin decreases the longer it is incubated with plasma. Restoring the  $\text{Ca}^{2+}$ -concentration of citrate-spiked blood to the physiological concentration does not increase endotoxin activity any further. Unlike citrate, heparin can increase endotoxin activity in plasma and serum. Endotoxin activity and cytokine secretion are increased by heparin concentrations of 1 IU/ml and above. Furthermore, LPS can affect the plasmatic coagulation in various concentrations. Plasmatic coagulation increases at endotoxin concentrations of 10 ng/ml and higher. In experiments with FITC-LPS, LPS does not bind to plasma clots and cryoprecipitates. The ESP<sup>TM</sup>-Kit does not increase endotoxin recovery in citrate-treated plasma. Conventionally citrated plasma shows greater recovery than enzymatically digested samples. Citrate cannot decrease the aggregate size of LPS in aqueous solutions. The most stable conformation is formed at a size of 100 nm and it do not pass a 100 kDa filter.



## 7. Literaturverzeichnis

1. [www.sepsis-hilfe.org/de/informationen-zur-sepsis/haeufigkeit.html](http://www.sepsis-hilfe.org/de/informationen-zur-sepsis/haeufigkeit.html). 2016.
2. Gorbet, M.B. and M.V. Sefton, *Endotoxin: the uninvited guest*. Biomaterials, 2005. **26**(34): p. 6811-7.
3. Daneshian, M., et al., *In vitro pyrogen test for toxic or immunomodulatory drugs*. J Immunol Methods, 2006. **313**(1-2): p. 169-75.
4. Freudenberg, P.D.m.M., <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de>, 2016.
5. Kastowsky, M., T. Gutberlet, and H. Bradaczek, *Molecular modelling of the three-dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide*. J Bacteriol, 1992. **174**(14): p. 4798-806.
6. Ingalls, R.R., et al., *Lipopolysaccharide recognition, CD14, and lipopolysaccharide receptors*. Infect Dis Clin North Am, 1999. **13**(2): p. 341-53, vii.
7. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
8. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 801-10.
9. Brandtzaeg, P., *Significance and pathogenesis of septic shock*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **216**: p. 15-37.
10. Werdan K., M.-W.U., Schuster H.P., Brunkhorst F.M., *Sepsis und MODS*. 2016.
11. Petsch, D. and F.B. Anspach, *Endotoxin removal from protein solutions*. J Biotechnol, 2000. **76**(2-3): p. 97-119.
12. Magalhaes, P.O., et al., *Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review*. J Pharm Pharm Sci, 2007. **10**(3): p. 388-404.
13. Corriveau, C.C. and R.L. Danner, *Endotoxin as a therapeutic target in septic shock*. Infect Agents Dis, 1993. **2**(1): p. 35-43.
14. Harris, H.W., et al., *Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death*. J Clin Invest, 1993. **91**(3): p. 1028-34.
15. Schindler, M. and M.J. Osborn, *Interaction of divalent cations and polymyxin B with lipopolysaccharide*. Biochemistry, 1979. **18**(20): p. 4425-30.
16. Sweadner, K.J., M. Forte, and L.L. Nelsen, *Filtration removal of endotoxin (pyrogens) in solution in different states of aggregation*. Appl Environ Microbiol, 1977. **34**(4): p. 382-5.

17. Rietschel, E.T., et al., *Lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity*. Prog Clin Biol Res, 1987. **231**: p. 25-53.
18. Li, L., *Use of Ca<sup>2+</sup> to re-aggregate lipopolysaccharide (LPS) in hemoglobin solutions and the subsequent removal of endotoxin by ultrafiltration*. Biotechnology Techniques 1998. **12**: p. 119-122.
19. Galanos, C., et al., *Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities*. Eur J Biochem, 1985. **148**(1): p. 1-5.
20. Mueller, M., et al., *Aggregates are the biologically active units of endotoxin*. J Biol Chem, 2004. **279**(25): p. 26307-13.
21. Ribi, E., et al., *Reaction of endotoxin and surfactants. I. Physical and biological properties of endotoxin treated with sodium deoxycholate*. J Bacteriol, 1966. **92**(5): p. 1493-509.
22. Takayama, K., et al., *Physicochemical properties of the lipopolysaccharide unit that activates B lymphocytes*. J Biol Chem, 1990. **265**(23): p. 14023-9.
23. Rudbach, J.A. and A.G. Johnson, *Restoration of Endotoxin Activity Following Alteration by Plasma*. Nature, 1964. **202**: p. 811-2.
24. Kulabukhov, V.V., *Use of an endotoxin adsorber in the treatment of severe abdominal sepsis*. Acta Anaesthesiol Scand, 2008. **52**(7): p. 1024-5.
25. Harm, S., D. Falkenhagen, and J. Hartmann, *Endotoxin adsorbents in extracorporeal blood purification: do they fulfill expectations?* Int J Artif Organs, 2014. **37**(3): p. 222-32.
26. Zavascki, A.P., et al., *Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review*. J Antimicrob Chemother, 2007. **60**(6): p. 1206-15.
27. Vesentini, S., et al., *Multi-scale analysis of the toraymyxin adsorption cartridge. Part I: molecular interaction of polymyxin B with endotoxins*. Int J Artif Organs, 2006. **29**(2): p. 239-50.
28. Cohen, J., et al., *Protection from endotoxemia: a rat model of plasmapheresis and specific adsorption with polymyxin B*. J Infect Dis, 1987. **155**(4): p. 690-5.
29. Shoji, H., et al., *Extracorporeal endotoxin removal by polymyxin B immobilized fiber cartridge: designing and antiendotoxin efficacy in the clinical application*. Ther Apher, 1998. **2**(1): p. 3-12.
30. Breiterman-White, R., *Sodium citrate use for anticoagulation in hemodialysis*. ANNA J, 1995. **22**(6): p. 607-9.

31. E., D., *Zitrat-Antikoagulation bei intensivmedizinischer Nierenersatztherapie*. [http://ferronfred.eu/onewebmedia/Nierenersatztherapie\\_Prismaflex%20citrate.pdf](http://ferronfred.eu/onewebmedia/Nierenersatztherapie_Prismaflex%20citrate.pdf) 2016.
32. Heinz Lüllmann, K.M., Lutz Hein, Martin Wehling, *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen-Medikamente gezielt einsetzen*. ISBN: 978-3-13-368517-7, 2016.
33. Nakamura, S., et al., *A clotting enzyme associated with the hemolymph coagulation system of horseshoe crab (Tachypleus tridentatus): its purification and characterization*. J Biochem, 1982. **92**(3): p. 781-92.
34. Ohki, M., et al., *A new endotoxin sensitive factor associated with hemolymph coagulation system of horseshoe crab (Limulidae)*. FEBS Lett, 1980. **120**(2): p. 217-20.
35. [www.era-bio.com/a/PRODUCTS/BacteriaEndotoxinTest/20150417/9.html](http://www.era-bio.com/a/PRODUCTS/BacteriaEndotoxinTest/20150417/9.html). 2016.
36. Frank, T., *Systemische Inflammationsmarker und Koronarkalzifizierungen im Mehrzeilenspiral-Computertomographen bei Patienten mit Verdacht auf koronare Herzkrankheit*. <https://opus4.kobv.de/opus4-fau/files/1039/ThomasFrankDissertation.doc.pdf+&cd=12&hl=de&ct=clnk&gl=a>t, 2009.
37. BioDtech, I., *Accurate Endotoxin Detection in Human Plasma*. [http://cellon.lu/wa\\_files/ESPT\\_Application\\_Note\\_5B1\\_5D.pdf](http://cellon.lu/wa_files/ESPT_Application_Note_5B1_5D.pdf), 2011.
38. Malvern, *Dynamische Lichtsreuund (DLS)*. <http://www.malvern.com/de/products/technology/dynamic-light-scattering/>, 2016.
39. Levin, J., P.A. Tomasulo, and R.S. Oser, *Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor*. J Lab Clin Med, 1970. **75**(6): p. 903-11.
40. al., K.R.e., *Identification of major heparin-binding proteins in plasma using electrophoresis and mass spectroscopy*. International Journal of Experimental Pathology. **85**, **A45-A77**.
41. William Francis, G., *Medzinische Physiologie: Kurzgefasstes Lehrbuch der Physiologie des Menschen für Studierende der Medizin und Ärzte*. 2013.
42. Gerok, H., Meinertz, Zeidler, *Die Innere Medizin, Referenzwerk für den Facharzt*. 2007.
43. Gert Müller-Berghaus, B.P., *Hämostaseologie: Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik*. 2013.
44. Santos, N.C., et al., *Evaluation of lipopolysaccharide aggregation by light scattering spectroscopy*. Chembiochem, 2003. **4**(1): p. 96-100.



## 8. Abkürzungsverzeichnis und Akronyme

LPS	Lipopolysaccharid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
BPI	Bacterial-permeability-increasing Protein
iCa	Ionisiertes Kalzium
IL-6	Interleukin 6
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL-8	Interleukin 8
IL-17A	Interleukin 17A
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
LAL-Test	Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test
ESP-Kit	Endotoxin Sample Preparation Kit
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
kDa	Kilodalton
NaD	Natriumdesoxychelate
AT III	Antithrombin III
OD	Optische Dichte
PPP	Plättchenarmes Plasma
PRP	Plättchenreiches Plasma
Ery	Erythrozyten

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Lipopolysaccharids .....	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der LAL-Kaskade .....	19
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Trennung des Vollbluts .....	23
Abbildung 4: Versuchsablauf der Verarbeitung von plättchenreichem Plasma, PBMCs, plättchenarmem Plasma und Erythrozyten .....	24
Abbildung 5: Versuchsablauf der Verarbeitung des Vollbluts bis zur LAL-Messung und Zytokin-Messung .....	27
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Demaskierung von Endotoxinen durch enzymatischen Verdau. © BioDtech's ESP™ .....	30
Abbildung 7: Ionisierte Kalziumkonzentration in Abhängigkeit von der Zitratzugabe	34
Abbildung 8: Ionisierte Kalziumkonzentration [mM] in Abhängigkeit von der Konzentration der zugegebenen Kalzium/Magnesiumchlorid-Lösung (500/250 mM)	35
Abbildung 9: Endotoxin-Wiederfindung im LAL-Test in Abhängigkeit von der Ca <sup>2+</sup> - Konzentration .....	36
Abbildung 10: Wiederfindung der Endotoxine im LAL-Test bei unterschiedlicher Reihenfolge der Zitratzugabe .....	37
Abbildung 11: Wiederfindung von Endotoxinen im LAL-Test.....	38
Abbildung 12: Endotoxin-Aktivität von LPS-gespiktem Plasma nach 1, 2, 3 und 4 Stunden Inkubation mit Erythrozyten im LAL-Test.....	39
Abbildung 13: Endotoxin-Wiederfindung im LAL-Test nach Inkubation in PRP-, PBMC-, erythrozyten- und PPP-reichem Plasma .....	40
Abbildung 14: Fluoreszenzmessung von FITC-LPS .....	41
Abbildung 15: Unterschiede in der Endotoxin-Wiederfindung in Plasma, Serum und Mischungen aus Plasma und Serum im LAL-Test.....	42
Abbildung 16: Endotoxin-Aktivität im LAL-Test in Abhängigkeit von der Heparinkonzentration .....	43
Abbildung 17: Endotoxin-Aktivität in Abhängigkeit von steigender Fondaparinux- Konzentration im LAL-Test .....	44
Abbildung 18: Endotoxin-Aktivität in Abhängigkeit von verschiedenen Antikoagulantien im LAL-Test.....	45
Abbildung 19: Konzentrationen der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17A und TNF- $\alpha$ nach Stimulation mit 0,5 ng/ml LPS in Abhängigkeit des Zeitpunkts der Zitrat-Zugabe ....	46

Abbildung 20: Wiederfindung von Endotoxinen bei sofortiger Verarbeitung und nach 3 Stunden .....	49
Abbildung 21: Konzentration der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17A und TNF- $\alpha$ nach Zugabe von Zitrat und nach anschließender Rekalzifizierung .....	50
Abbildung 22: Konzentration der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL8, IL-17A und TNF- $\alpha$ in Abhängigkeit von steigender Heparinkonzentration .....	53
Abbildung 23: Mikroskopische Abbildung eines Fibrinklots mit eingeschlossenem FITC-LPS.....	55
Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Fibrinklots .....	56
Abbildung 25: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Kryopräzipitats.....	57
Abbildung 26: Mikroskopische Abbildung eines Kryopräzipitats mit eingeschlossenem FITC-LPS.....	57
Abbildung 27: Wiederfindung von Endotoxinen in Heparinplasma, Heparin-Kryoplasma, Zitratplasma und Zitrat-Kryoplasma im LAL-Test.....	58
Abbildung 28: Aktivierung der Gerinnung durch unterschiedliche Konzentrationen von LPS.....	59
Abbildung 29: Endotoxinwiederfindung in Heparinplasma mit und ohne ESP™-Kit .	59
Abbildung 30: Verteilungskurven von reinem LPS (rot) und LPS mit Zitrat (grün) mit einem molekularen Cut-off von 0,45 $\mu$ m (links) und 0,22 $\mu$ m (rechts) .....	59
Abbildung 31: Verteilungskurven von LPS aus Bakterienlysat (rot) und Bakterienlysat mit Zitrat (grün) mit einem molekularen Cut-off von 0,45 $\mu$ m (links) und 0,22 $\mu$ m (rechts) .....	59
Abbildung 32: Verteilungskurve von ultraschallbehandeltem LPS (rot) bei Zugabe von Zitrat (grün).....	59

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Zugabe von Zitrat und die daraus resultierende Absenkung des iCa-Wertes (n=3).....	35
Tabelle 2: Absolutwerte der Zytokinmessung von 3 Spendern.....	47
Tabelle 3: Absolutwerte der Zytokininduktion in Abhängigkeit der Inkubationszeit von Endotoxin und der Rekalzifizierung in pg/ml von 3 Spendern.....	52
Tabelle 4: Zytokininduktion durch LPS in Abhängigkeit der Heparinkonzentration ...	54