

**Antimykotika modulieren die Produktion proinflammatorischer
Zytokine und das Phagozytose-Verhalten humaner Monozyten in
einem *In-vitro*-Sepsis-Modell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Sebastian Jahnert

aus Bochum

2015

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Georg Baumgarten
2. Gutachter: PD Dr. med. Oliver Dewald

Tag der Mündlichen Prüfung: 21.09.2015

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Hoeft

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	7
2.	Einleitung	9
2.1	Sepsis	9
2.1.1	Epidemiologie	9
2.1.2	Definition.....	9
2.1.3	Pathophysiologie	11
2.1.4	Therapie	13
2.2	Antimykotika	14
2.2.1	Amphotericin-B	14
2.2.2	Anidulafungin.....	15
2.2.3	Itraconazol	16
2.3	Das Immunsystem	17
2.3.1	Toll-Like Rezeptoren	18
2.3.2	Zytokine	19
2.3.3	Phagozytose.....	23
2.4	Rolle der Antimykotika bei der Immunmodulation	26
2.5	Ziel der Arbeit	28
3.	Material und Methoden	29
3.1	THP-1-Zelllinie	29
3.2	Zellkultur	29
3.3	In-vitro-Stimulation der THP-1-Zellen	30
3.3.1	Vorbereitung	30
3.3.2	Durchführung der Stimulationen.....	30
3.4	Bestimmung der mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine ..	32
3.4.1	RNA-Isolation	32
3.4.2	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	33
3.4.3	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR).....	34
3.5	Bestimmung des Proteinlevels durch Enzyme Linked Immunosorbent Assay	37
3.6	Bestimmung der Phagozytoseaktivität der THP-1-Zellen	38
3.6.1	Fluorescent-activated cell sorting (FACS).....	38
3.6.2	Phagozytose-Assay mit pHrodo-E.coli-Partikeln	38
3.6.3	Durchführung des Phagozytose-Assays	40
3.7	Statistik	41
4.	Ergebnisse	42
4.1	mRNA-Expression der Zytokine	42
4.1.1	Interleukin-1 β	42
4.1.2	Interleukin-6.....	45
4.1.3	Tumornekrosefaktor- α	47

4.2	Sekretion der Zytokine	49
4.2.1	Interleukin-1 β	50
4.2.2	Interleukin-6.....	51
4.2.3	Tumornekrosefaktor- α	52
4.3	Phagozytoserate	53
4.3.1	Phagozytoseverhalten nach 2 h.....	54
4.3.2	Phagozytoseverhalten nach 6 h.....	55
4.3.3	Phagozytoseverhalten nach 24 h.....	56
5.	Diskussion	57
5.1	Immunmodulatorische Effekte von Amphotericin-B	57
5.2	Immunmodulatorische Effekte von Anidulafungin	61
5.3	Immunmodulatorische Effekte von Itraconazol	63
5.4	Schlussfolgerung	64
6.	Zusammenfassung	66
7.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	68
8.	Literaturverzeichnis	70
9.	Danksagung	79
10.	Lebenslauf	80

1. Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
ACCP	American College of Chest Physicians
AM	Antimykotikum
AMB	Amphotericin-B
ANI	Anidulafungin
DAMB	Desoxycholat-haltiges Amphotericin-B
$\Delta\Delta$ CT	Delta-Delta-Cycle-Threshold
DNA	Desoxyribonukleinsäure
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome
CD14	Cluster of differentiation 14
cDNA	copy-DNA
CO ₂	Kohlendioxid
CT	Cycle Threshold
C.	Candida
°C	Grad Celsius
ECMM	European Confederation of Medical Mycology
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
EUR	Euro
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetales bovines Serum
FSC	Forward scatter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HKG	House-keeping Gene
IL	Interleukin
IL-1ra	IL-1 Rezeptorantagonist
ITC	Itraconazol
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
L-AMB	Liposomales Amphotericin-B
LBP	LPS-binding protein
LPS	Lipopolysaccharid
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mmHg	Millimeter Quecksilber
Mrd	Milliarden
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

NaNO ₃	Natriumnitrat
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NO	Stickstoff
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
P _a CO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
PBMCs	mononukleären Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PRR	Pattern recognition receptor
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
RQ	Relative quantity
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SEM	Standardabweichung vom Mittelwert
SERCA	Sarkoplasmatischen Retikulum-Ca ²⁺ -ATPase
SCC	Sideward scatter
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
spp.	subspecies
Tab.	Tabelle
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α

2. Einleitung

2.1 Sepsis

2.1.1 Epidemiologie

Auf deutschen Intensivstationen werden jährlich ca. 154.000 an einer Sepsis erkrankte Patienten behandelt (220 Fälle auf 100.000 Einwohner). Die Sepsis stellt damit die siebthäufigste Krankenhausentlassungsdiagnose unter den lebensbedrohlichen Erkrankungen dar (Marx et al., 2005).

Die Letalität ist mit 54 % weiterhin sehr hoch. In Deutschland sterben pro Jahr über 60.000 Menschen an der Sepsis und ihren Folgen. Damit rangiert die Erkrankung als Todesursache an dritter Stelle nach der Koronaren Herzkrankheit (KHK) und dem akuten Myokardinfarkt (Marx et al., 2005).

Die Kosten, die in Deutschland durch die Behandlung der Sepsis entstehen, betragen 30 % des gesamten Budgets für die Intensivmedizin. Die direkten Kosten, die allein für die Behandlung von Patienten mit schwerer Sepsis aufgewendet werden, betragen 1,77 Mrd. EUR; rechnet man indirekte Kosten, die durch Produktivitätsverlust entstehen, dazu, so resultieren Gesamtkosten in Höhe von 6,3 Mrd. EUR (Brunkhorst, 2006).

Der Anteil von Pilzinfektionen am Erregerspektrum der Sepsis ist beachtlich. So handelt es sich bei *Candida subspecies (Candida spp.)* um einen der am häufigsten isolierten Mikroorganismen bei Patienten mit einer Sepsis. In amerikanischen Krankenhäusern liegt die Candida-Infektionsrate auf Platz vier der nosokomialen Infektionen mit 4,6 Sepsis-Fällen pro 10.000 Patienten (Wisplinghoff et al., 2004). In 310 deutschen Kliniken waren bei jedem fünften Intensivpatienten Pilzinfektionen beteiligt (Engel et al., 2007). Eine Studie der *European Confederation of Medical Mycology (ECMM)* aus dem Jahr 2006 konnte eine Mortalitätsrate von 42 % bei Intensivpatienten mit Candidämie nachweisen (Tortorano et al., 2006).

2.1.2 Definition

Sepsis ist die systemische Wirtsreaktion auf pathogene Keime und deren Toxine, die aus einem Infektionsherd in den Blutkreislauf gelangen. Dabei stellen Sepsis, schwere

Sepsis und septischer Schock ein Krankheitskontinuum dar, das eine definierte Kombination aus Vitalparametern, Laborwerten, hämodynamischen Daten und Organfunktionen voraussetzt (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference, 1992).

Die Grundlage für eine einheitliche Sepsisdefinition wurde im Jahr 1992 auf der Konsensuskonferenz des *American College of Chest Physicians* und der *Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM)* geschaffen. Hier wurden das erste Mal die Kriterien für das *Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)* definiert. Liegen mindestens zwei der folgenden vier Kriterien vor, so spricht man von dem Vorliegen eines SIRS beim Patienten:

Körpertemperatur $\geq 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $\leq 36\text{ }^{\circ}\text{C}$

Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$

Atemfrequenz $\geq 20/\text{min}$ oder $\text{P}_a\text{CO}_2 \leq 32\text{ mmHg}$

Leukozyten $\geq 12\ 000/\mu\text{l}$ oder $\leq 4\ 000/\mu\text{l}$ oder Stabkernige / unreife Neutrophile $\geq 10\ \%$

Abb. 1: Kriterien für das Vorliegen eines *Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)*. Die Kombination aus zwei dieser Kriterien erlaubt die Diagnose *SIRS*.

Beim SIRS handelt es sich also zunächst um eine aseptische Inflammationsreaktion, die z.B. bei Patienten mit traumatischen Verletzungen, Verbrennungen oder sterilen entzündlichen Prozessen wie akuter Pankreatitis, Ischämie oder hämorrhagischem Schock auftreten kann (Bone et al., 1992).

Vom Krankheitsbild Sepsis spricht man erst, wenn zusätzlich zum SIRS ein hochgradiger Verdacht oder der Nachweis einer Infektion besteht. Erweitert sich das Krankheitsbild um mindestens ein Organversagen, so wird dies als schwere Sepsis klassifiziert. Tritt zusätzlich zur schweren Sepsis eine kardiovaskuläre Instabilität mit Hypotonie hinzu, die trotz Volumensubstitution therapierefraktär ist und den Einsatz von Vasopressoren erfordert, so ist die Rede von einem septischen Schock (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference, 1992).

Die nachfolgende Abbildung soll das Krankheitskontinuum schematisch verdeutlichen.

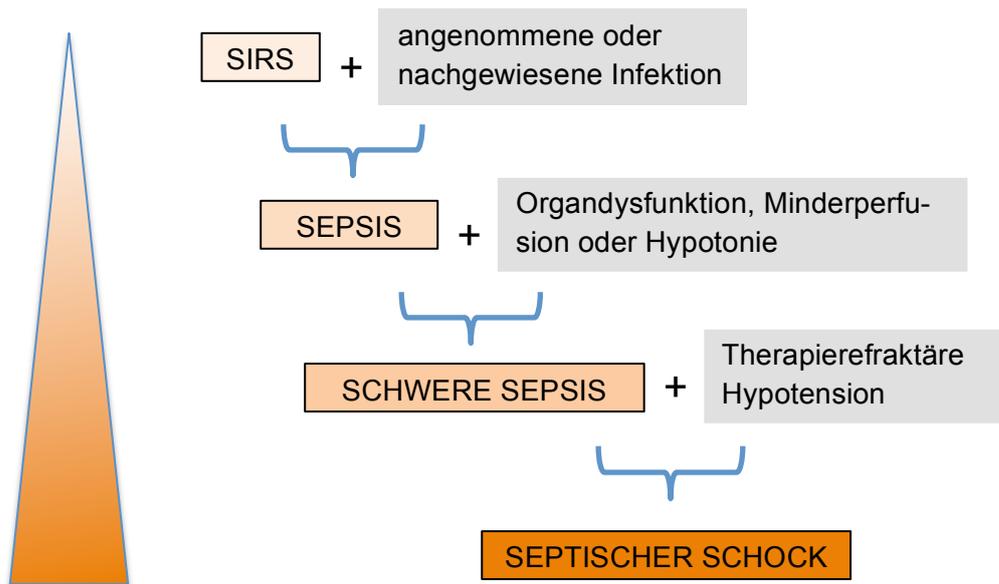


Abb. 2: Krankheitskontinuum Sepsis. Die Diagnose Sepsis basiert definitionsgemäß auf dem Vorliegen einer aseptischen Entzündungsreaktion, dem *Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)*. Besteht zudem eine Infektion durch einen Keim oder der Verdacht darauf, spricht man vom Krankheitsbild Sepsis. Erweitert sich das Krankheitsbild um Organdysfunktionen und Hypotonie, liegt eine schwere Sepsis vor. Der septische Schock ist die Maximalausprägung des Krankheitskontinuums bei schwerer Sepsis mit therapierefraktärer Hypotension.

2.1.3 Pathophysiologie

Aus dem Infektionsherd dringen pathogene Keime mitsamt ihren Toxinen in das Wirtsgewebe ein und treffen auf dort ansässige immunkompetente Zellen wie Makrophagen und Granulozyten. Mithilfe spezifischer Mustererkennungsrezeptoren werden die Pathogene erkannt und die immunologische Reaktion eingeleitet, bestehend aus Phagozytose der Partikel sowie Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin (IL)-1 β und dem Tumornekrosefaktor (TNF)- α . Die Entzündungsmediatoren werden in den Blutkreislauf des Wirtes ausgeschwemmt und induzieren die oben beschriebene systemische Inflammation (van Amersfoort et al., 2003).

Kompensatorisch werden zeitgleich antiinflammatorische Mechanismen aktiviert, um der initial hyperinflammatorischen Antwort des Organismus entgegenzuwirken. Beispiele dafür sind die Sekretion von antiinflammatorischen Partikeln wie IL-10, lösliche TNF- α -Rezeptoren und IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra) oder die Induktion eines programmierten Zelltodes (Wang und Deng, 2008; Hotchkiss und Karl, 2003). Diese Mechanis-

men sind dafür verantwortlich, dass Patienten im Anschluss an die Hyperinflammation eine hypoinflammatorische Phase durchlaufen, die auch als *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome (CARS)* bezeichnet wird (Bone, 1996).

Mittlerweile ist bekannt, dass die deletären Folgen der Sepsis nicht nur aus der unkontrollierten Hyperinflammation resultieren, sondern auch vom Verlauf des hypoimmunen Zustandes des Patienten abhängen. So sind die antiinflammatorischen Mechanismen zwar essenziell, um die immunologische Homöostase wiederherzustellen, sie können jedoch zu massiver Immunsuppression führen und sekundäre Infektionen wie z.B. mit Mykosen begünstigen. Hier liegt auch eine der Herausforderungen, der Krankheit therapeutisch zu begegnen. Vor allem immunsuppressive Therapeutika wie hochdosierte Kortikosteroide oder Zytokinantagonisten können die Überlebenschance des Patienten weiter verschlechtern (Cronin et al., 1995; Remick, 2003).

Es wird zunehmend ersichtlich, dass Sepsis-Patienten kein streng homogenes Patientengut darstellen. So hängt die individuelle Immunantwort und der Krankheitsverlauf nicht nur vom infektiösen Stimulus an sich ab, sondern auch von genetischen Prädispositionen, Komorbiditäten des Patienten und exogenen Faktoren (Medikation, Bluttransfusionen, usw.) (Wang und Deng, 2008). Abbildung 3 soll diesen Zusammenhang sowie den typisch zweiphasigen Verlauf der Krankheit verdeutlichen.

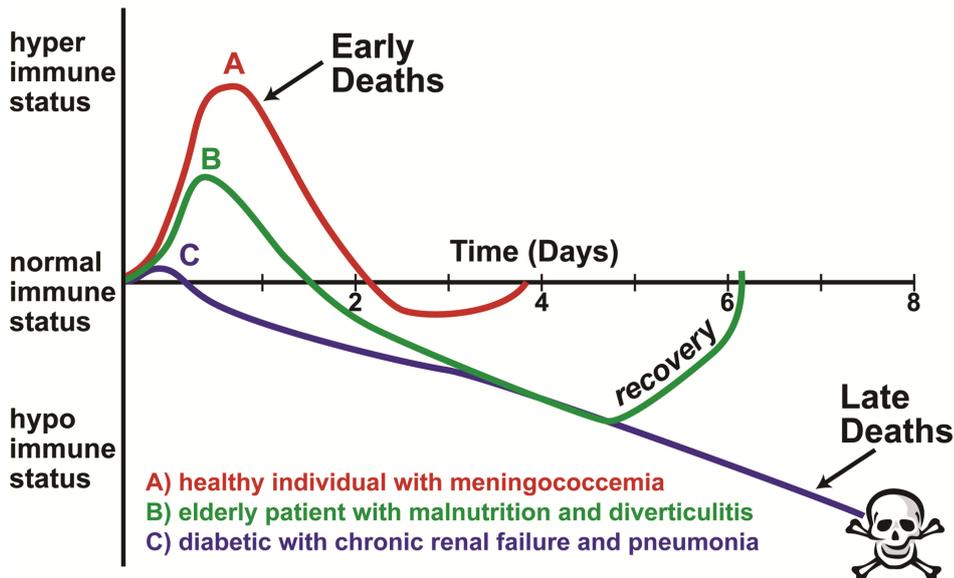


Abb. 3: Immunantwort bei drei hypothetischen Patienten mit Sepsis. Einer hyperimmunen ersten Phase der Sepsis folgt eine Phase der Suppression von inflammatorischen, autoimmunen Prozessen, die abhängig von Alter und Komorbiditäten die Langzeitmortalität steigern kann. Dies muss vor allem im Hinblick auf die Therapie mit Immunsuppressiva berücksichtigt werden. (modifiziert nach Skrupky et al., 2011)

2.1.4 Therapie

Die kausale Sepsistherapie besteht aus drei Säulen. Neben der chirurgischen Herdsanierung und supportiven Maßnahmen (Volumenmanagement, Atemwegsmanagement, Nierenersatzverfahren, Katecholamine) stellt die Einleitung einer antimikrobiellen Chemotherapie einen der Grundpfeiler jeder Sepsis-Therapie dar (Dellinger et al., 2013).

Hierbei ist zunächst die Wahl des geeigneten Antibiotikums bzw. der Antibiotika-Kombination entscheidend. Bevor Ergebnisse einer mikrobiologischen Diagnostik vorliegen, sollte in den ersten 24-48 h eine antibiotische Therapie mit einem breiten Wirkungsspektrum (*kalkulierte Therapie*) erfolgen. Sobald zuverlässige Ergebnisse der klinischen und mikrobiologischen Diagnostik vorliegen, sollte die Strategie der Antibiotika-Therapie anhand dieser Kriterien neu evaluiert werden, um mit einer gezielten Antibiotika-Wahl dem vorliegenden Erreger zu begegnen (*rationale Therapie*) (Kumar et al., 2006).

Der Zeitpunkt, zu dem die antibiotische Therapie begonnen wird, ist ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Kumar et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass bei 2.154 Patienten mit septischem Schock die Sterblichkeit mit jeder Stunde einer verspäteten AB-Verabreichung um ca. 7 % zunahm (Kumar et al., 2006). Dies gilt in ganz ähnlicher Wei-

se auch für den Einsatz von antimykotischen Substanzen bei Vorliegen einer systemischen Mykose. Die Mortalität der Pilz-Sepsis beträgt bei Einsatz der antimykotischen Substanz 2 h nach Eintritt der Hypotension 19 % - nach 12 h allerdings schon 94 %. Das bedeutet einen Anstieg der Mortalität von 8 % pro Stunde Verzögerung und verdeutlicht, wie deletär die Folgen eines verspäteten Therapiebeginns bei Pilz-Sepsis sind (Kumar et al., 2009).

2.2 Antimykotika

Antimykotika sind Medikamente, die zur Behandlung oberflächlicher oder systemischer Mykosen geeignet sind und daher aus der Therapie der Pilzsepsis nicht mehr wegzudenken sind. Das Wirkungsspektrum ist sehr unterschiedlich; ihre Angriffsziele sind meist die Zellwand und die Zellmembran des Pilzes. Vor dem Hintergrund der Sepsis werden in dieser Arbeit drei Substanzen vorgestellt, die gegen Organ- und Systemmykosen intravenös eingesetzt werden und jeweils Vertreter der drei großen, häufig eingesetzten Substanzklassen darstellen: Polyen-Antimykotika, Azol-Antimykotika und Echinocandine.

2.2.1 Amphotericin-B

Amphotericin-B ist ein fungizides Polyen-Antimykotikum, das als einziges der Polyene systemisch (*parenteral*) verabreicht werden kann. Es wird aus *Streptomyces nodosus* isoliert (Abu-Salah, 1996). Die Bestandteile der Substanz binden am Ergosterol in der Pilzzellmembran mit der Folge, dass Poren in der Membran gebildet werden und somit der Austritt von Zellmolekülen und Ionen ermöglicht wird. Dadurch kommt es anschließend zum Zelltod (Bolard, 1986).

Das Wirkspektrum dieser Substanz ist groß: Es kann bei zahlreichen Mykosen eingesetzt werden, die durch Hefen oder dimorphe Pilze hervorgerufen werden wie Kandidosen, Blastomykosen und Kryptokokkosen (Mutschler et al., 2008). Seit nunmehr 50 Jahren stellt Amphotericin-B das Therapeutikum der Wahl von systemischen, lebensgefährlichen Mykosen dar (Abu-Salah, 1996). Die Verschreibung des konventionellen Desoxycholat-haltigen Amphotericins (*DAMB*) war jedoch immer ein Kompromiss zwischen Effektivität und Toxizität, denn die Behandlung mit dem ursprünglichen Amphotericin-B

geht neben der guten Wirksamkeit mit einer schlechten Verträglichkeit und Löslichkeit einher. Hier ist vor allem die Nephrotoxizität zu nennen (Dupont, 2002). In einer Studie mit 239 an Aspergillose erkrankten Patienten, die mit Amphotericin-B behandelt wurden, kam es bei über 50 % der Patienten zu einer Verdopplung des Kreatinin-Wertes; viele von Ihnen wurden dialysepflichtig (Wingard et al., 1999). In diesem Zusammenhang kam es Anfang der 1990er Jahre zur Modifizierung des Moleküls durch die Einbettung in Liposomen, so dass die Substanz deutlich verträglicher wurde bei gleichbleibender Effektivität. Hier sind vor allem zwei Präparate zu nennen, die seit über 20 Jahren auf dem Markt erprobt sind: *AmbiSome*[®], bei dem der Wirkstoff in unilamellaren Liposomen verpackt ist (Dupont, 2002), sowie *Abelect*[®], bei dem Amphotericin-B in einem Komplex mit zwei Phospholipiden zu einer bandartigen Struktur verbunden ist (Janoff et al., 1988). Diese Formen der Fettemulsion ermöglichen die Applikationen höherer Dosierungen. Die durchschnittliche Tagesdosis beträgt bei Monotherapie mit konventionellem Amphotericin-B 0,75 – 1 mg/kg Körpergewicht (KG); bei liposomalem Amphotericin-B sind es 1 – 3 mg/kg KG (Mutschler et al., 2008). In einer randomisierten Doppelblind-Studie konnte gezeigt werden, dass unter den liposomalen Substanzen das *AmbiSome*[®] ein günstigeres Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil aufweist. Im Vergleich zum *Abelect*[®] ist es weniger nephrotoxisch und es treten weniger infusionsbedingte Komplikationen wie Schüttelfrost oder Fieber auf (Wingard et al., 2000). Die Elimination aller Formulierungen erfolgt renal. Lipidkomplex-Formulierungen werden rasch im retikuloendothelialen System aufgenommen, was zu einer geringeren Konzentration in Plasma und Nierengewebe, dafür aber zu einer höheren Konzentration in Leber und Lunge führt (Mutschler et al., 2008).

2.2.2 Anidulafungin

Seit 2007 steht das halbsynthetische Echinocandin Anidulafungin (*Ecalta*[®]) zur Verfügung. Es wirkt fungizid, indem es das Enzym β -(1,3-D)-Glucansynthase nicht-kompetitiv hemmt und damit die Bildung von β -(1,3-D)-Glucan unterbindet, einem essentiellen Bestandteil der Zellwand von Pilzzellen (Aktories et al., 2009).

Anidulafungin ist zur Behandlung der invasiven Candidiasis bei erwachsenen, nicht neutropenischen Patienten zugelassen. Das Wirkspektrum umfasst die klinisch relevanten Candida (C.)-Arten wie *C. albicans*, *C. glabrata* oder *C. krusei* (Ostrosky-Zeichner et

al., 2003).

Anidulafungin wird intravenös infundiert. Am ersten Therapietag beträgt die empfohlene Tagesdosis ca. 2,7 mg/kg KG/Tag. Bei einem 75 kg schweren Patienten entspräche dies 200 mg/Tag. In den darauffolgenden Tagen wird die Dosierung auf 100 mg reduziert (Vazquez et al., 2006).

Neben der guten Verträglichkeit zeichnet sich Anidulafungin auch durch seine effektive Wirkung aus. In einer Doppelblindstudie war das Echinocandin dem Azol-Antimykotikum Fluconazol bei Patienten mit Candidämie und invasiver Candidiasis deutlich überlegen. Auch in der Überlebensrate zeigte sich ein günstigeres Resultat (Reboli et al., 2007; Boogaerts et al., 2001).

2.2.3 Itraconazol

Itraconazol ist den Azol-Antimykotika zugeordnet. Hierbei handelt es sich um ein Triazol, das zur systemischen Behandlung von Mykosen verabreicht wird. Es greift wie die anderen Substanzen dieser Gruppe in die Ergosterol-Biosynthese ein (Aktories et al., 2009). Bis 2005 war Itraconazol nur oral verfügbar. Seit 2005 existiert das Azol auch als Infusionslösung (Sempera Konzentrat[®]). Durch den Zusatz eines Cyclodextrinderivates wird die lipophile Substanz in Lösung gebracht und dient der Bekämpfung von Candidosen und Kryptokokkosen, wenn die orale Standardtherapie nicht geeignet oder nicht wirksam ist (Fachinformation Sempera, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, 2003).

Umfangreiche klinische Studien deuten darauf hin, dass Itraconazol im Vergleich zum konventionellen Amphotericin-B (Amphotericin-B[®]) wirksamer und besser verträglich ist (Boogaerts et al., 2001).

Die Elimination des Hilfsstoffes Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin erfolgt durch glomeruläre Filtration. Daraus ergibt sich eine Kontraindikation für Sempera[®] bei Patienten mit fortgeschrittener Niereninsuffizienz (Kreatinin-Clearance < 30 ml/min). Itraconazol wird intensiv über die Leber metabolisiert. Es ist zu beachten, dass Itraconazol unabhängig von der Formulierung einen Hemmstoff der Cytochrom-P450-Enzyme darstellt und somit Interaktionen mit anderen Arzneimitteln auftreten können. Die Ausscheidung erfolgt zum Großteil über die Galle; einige Metabolite werden auch renal ausgeschieden. In den ersten zwei Behandlungstagen werden 2 mal 200 mg der Substanz infundiert, ab dem dritten Behandlungstag beträgt die tägliche Dosis 200 mg (Fachinformation Sempera,

Janssen-Cilag GmbH, Neuss, 2003).

2.3 Das Immunsystem

Der menschliche Organismus hat zwei zentrale Mechanismen entwickelt, um einer Exposition mit pathogenen Mikroorganismen zu begegnen und ein infektiöses Krankheitsgeschehen zu verhindern: die phylogenetisch ältere, angeborene Immunität und das adaptive, erworbene Immunsystem (Abbas et al., 2011).

Das erworbene Immunsystem umfasst die Mechanismen von antigenspezifischen Lymphozyten (B- und T-Zellen), die Krankheitserreger gezielt angreifen. In Form von sogenannten Gedächtniszellen ist der Körper in der Lage, eine lang andauernde Immunität zu generieren, die es ermöglicht, eine erneute Infektion mit demselben Mikroorganismus gezielt abzuwehren. Es bedarf also einer gewissen Latenzzeit, bis die Mechanismen der adaptiven Immunität greifen und in der Lage sind, die große Vielfalt von Antigenen erkennen zu können. Man spricht von einer späten oder verzögerten Antwort, da es Tage dauern kann, bis genügend Antikörper gebildet und Effektor-T-Zellen differenziert sind (Abbas et al., 2011).

Das angeborene Immunsystem dagegen stellt die erste Phase der Immunabwehr dar. Es umfasst Mechanismen, die jederzeit und schnell in der Lage sind, einem Pathogen zu begegnen. Zudem dient es dazu, die gezielten adaptiven Effekte durch antigenpräsentierende Zellen einzuleiten.

Dringt ein Pathogen in das Gewebe ein, treten eine Reihe von zellulären und humoralen Mechanismen in Aktion:

Phagozyten sind mit Hilfe von Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors; PRRs*) in der Lage, Pathogene zu erkennen, aufzunehmen und zu eliminieren. Am Infektionsherd sezernieren Makrophagen Zytokine und Chemokine. Diese Entzündungsmediatoren ermöglichen über Gefäßwandveränderungen die Extravasation von chemotaktisch angelockten Leukozyten sowie den Übertritt von Plasmaproteinen und Flüssigkeit in das Gewebe. Es kommt zu den charakteristischen klinischen Entzündungszeichen wie *Calor*, *Dolor*, *Rubor* und *Tumor*. Im Falle einer überschießenden Produktion von Zytokinen kann es zu fulminanten systemischen Verläufen wie der Sepsis und dem septischen Schock kommen (s.o.).

Das Komplementsystem ist ein System von Plasmaproteinen, das durch den Kontakt mit einem Pathogen aktiviert werden kann. Es spielt eine zentrale Rolle bei der Markierung (Opsonierung) von Mikroorganismen zur Phagozytose. Zudem können einige Komplementkomponenten Pathogene selbstständig angreifen und lysieren (Murphy et al., 2009).

Auch die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) werden zum angeborenen Immunsystem gerechnet. Sie können Zellen, die mit intrazellulären Krankheitserregern infiziert sind, erkennen und töten. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Eindämmung von Virusinfektionen (Kindt et al., 2006).

Die wichtigsten Komponenten der angeborenen Immunität, die auch in dieser Arbeit vor dem Hintergrund der Sepsis untersucht werden, sollen im Folgenden näher erläutert werden.

2.3.1 Toll-Like Rezeptoren

Die angeborene Immunität detektiert pathogene Mikroorganismen durch eine phylogenetisch hochkonservierte Gruppe von Rezeptorproteinen: den *Toll-like* Rezeptoren (TLRs). Sie gehören zur Familie der Mustererkennungsrezeptoren, die konservierte Bestandteile mikrobieller Strukturen (*pathogen-associated molecular patterns; PAMPs*) erkennen (Sandor und Buc, 2005). Damit stehen sie am Anfang der Initiation einer Immunantwort.

Sie gehören zu den Typ-I-Transmembranproteinen, deren Transmembrandomäne Leucin-reiche extrazellulär gelegene Repeats am N-terminalen Ende mit einer C-terminalen, zytoplasmatischen Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne (TIR-Domäne) verbindet.

TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 sind auf der äußeren Zellmembran lokalisiert. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 befinden sich auf intrazellulären Kompartimenten. Letztere sind vor allem an der Abwehr gegen virale Mikroorganismen beteiligt. Monozyten und Makrophagen sind in der Lage, alle TLRs bis auf TLR3 zu exprimieren (Muzio et al., 2000).

Zwei der wichtigsten Vertreter sind TLR2 und TLR4. Sie erkennen ein breites Spektrum an PAMPs von Bakterien, Viren und Parasiten. TLR4 detektiert sowohl exogene Partikel wie Lipopolysaccharid (LPS) (Sandor und Buc, 2005; Poltrak et al., 1998) als Zellwand-

bestandteil gramnegativer Bakterien als auch körpereigene endogene Partikel wie z.B. extravasiertes Fibrinogen oder Proteoglykane (Smiley et al., 2001; Taylor et al., 2004). TLR2 detektiert vor allem grampositive Bakterienbestandteile sowie Bestandteile von Viren.

Die Aktivierung der TLRs durch die Bindung ihrer entsprechenden Liganden induziert intrazellulär spezifische Genexpressionsprofile. Das Resultat ihrer Aktivierung reicht von der Synthese proinflammatorischer Zytokine und Interferone über die Induktion von Phagozytose bis hin zur Produktion von Costimulatoren, die T-Zellen aktivieren und somit die angeborene und adaptive Immunität miteinander verbinden (Sandor und Buc, 2005).

2.3.2 Zytokine

Zytokine sind Proteine, die auf vielfältige Weise an den inflammatorischen Prozessen der Sepsis beteiligt sind und von Endotoxin stimulierten Immunzellen sezerniert werden können.

Die durch ein Endotoxin ausgelöste Inflammation wird durch die Aktivierung des TLR4-abhängigen Signaltransduktionsweges induziert. TLR4 und der von ihm eingeleitete Signalweg spielen daher eine herausragende Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis (Abbildung 4).

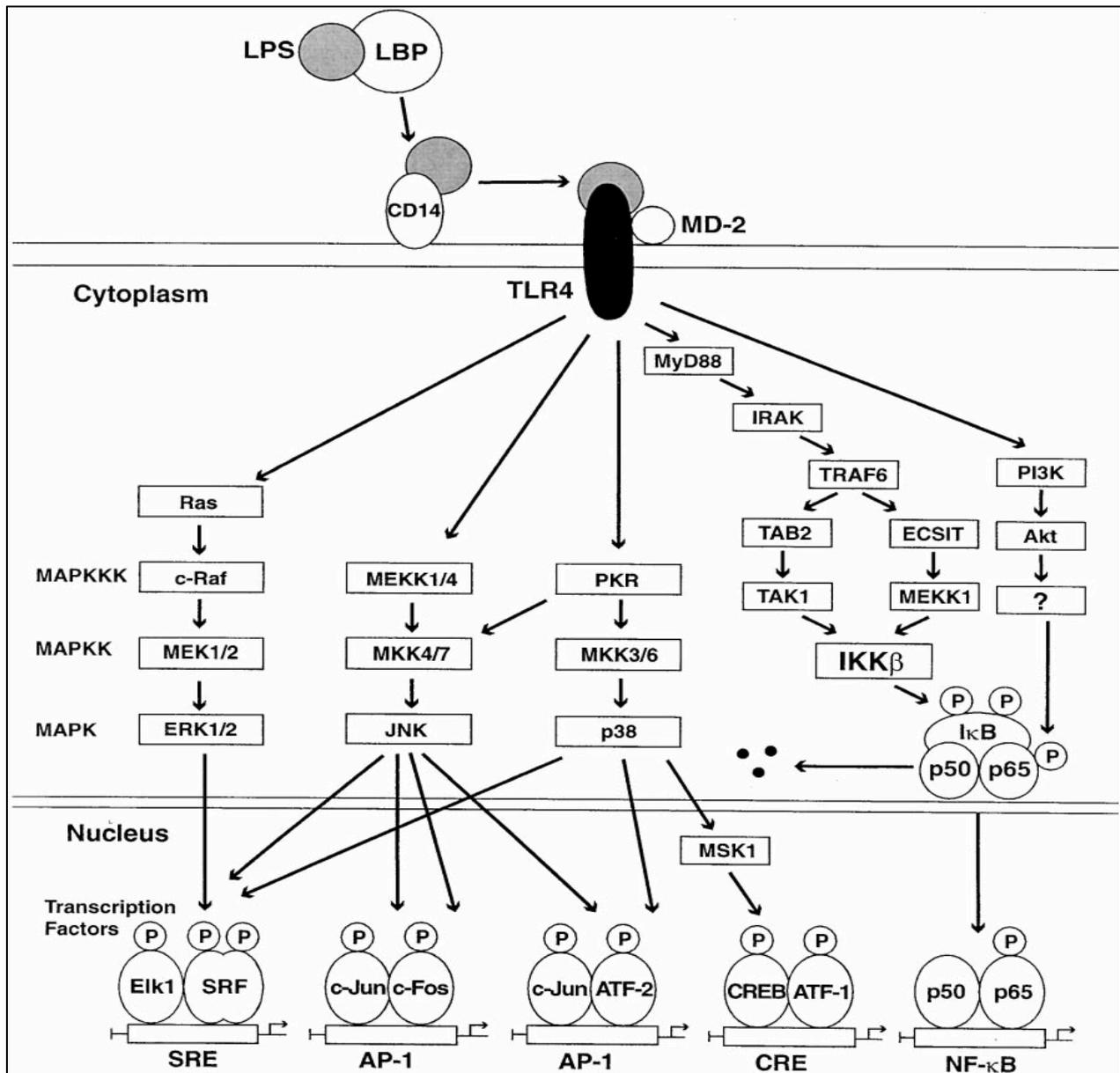


Abb. 4: Toll-Like Rezeptor (TLR) 4-abhängiger Signaltransduktionsweg. Zunächst bildet Lipopolysaccharid (LPS) mit dem ebenfalls im Blut zirkulierenden *LPS-binding-protein* (LBP) einen Komplex, der auf CD14, einem Rezeptormolekül auf der Zelloberfläche von Monozyten, transferiert wird. Dies ermöglicht die Interaktion des LPS mit TLR4 und dem assoziierten Transmembranprotein MD-2. Die Aktivierung von TLR4 leitet über Phosphorylierungsschritte verschiedener Signalmoleküle die Expression von NF-κB ein. Dabei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Produktion von Zytokinen reguliert. Er bindet an die Promotorregion der Genabschnitte, die für die Zytokine codieren und induziert damit deren Transkription. (modifiziert nach Guha et al., 2001)

Bei dem Bemühen, die pathophysiologischen Vorgänge der Sepsis molekularbiologisch zu verstehen, sind vor allem vier Zytokine in den Vordergrund gerückt, die an den inflammatorischen Prozessen vornehmlich beteiligt sind: TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-8. Abhängig von der zeitlichen Abfolge ihrer Sekretion unterscheidet man frühe oder „proximale“ von späten, „distalen“ Zytokinen. Zu den frühen Zytokinen gehören TNF α und IL-1 β . Sie sind an den meisten Vorgängen, die charakteristisch für die Sepsis sind, beteiligt. Diese proximalen Zytokine stimulieren dann die Produktion der „distalen“ Zytokine IL-6 und IL-8 (Blackwell und Christman, 1996).

In dieser Arbeit wurde den Zytokinen TNF α , IL-1 β und IL-6 besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Daher sollen diese hier kurz charakterisiert werden.

2.3.2.1 TNF- α

TNF- α ist ein 51 kDa großes Protein, das hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen produziert wird. Es stellt einen schnellen und potenten Mediator bei inflammatorischen Geschehen sowohl infektiöser als auch nicht infektiöser Genese dar. Bereits eine Stunde nach der Infusion mit *E. coli*-Endotoxin konnten im Plasma von gesunden Probanden Spitzenwerte von TNF- α detektiert werden (Michie et al., 1988). Trotz einer Halbwertszeit von nur 20 min (Lin et al., 2000) vermag es eine Vielzahl von Effekten auszulösen, die spezifisch für das septische Krankheitsgeschehen sind: Probanden, denen rekombinantes TNF- α infundiert wurde, entwickelten in kurzer Zeit SIRS-assoziierte Symptome wie Fieber, erhöhte Leberenzymwerte und eine Koagulopathie (Chapman et al., 1987; van der Poll et al., 1990). Über die Wirkung an TNF-Rezeptor I und II auf Immunzellen stimuliert es die Produktion von weiteren Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und IL-8 (Fong et al., 1989). Seinen Namen verdankt das Protein ursprünglich seiner zytotoxischen Wirkung gegen Krebszellen und der Induktion von Immunantworten, die gegen Krebszellen gerichtet sind. Es interagiert an Gefäßzellen mit Adhäsionsmolekülen wie *ICAM-1*, *VCAM-1* und *E-Selectin* und ermöglicht somit die Extravasation von Granulozyten zum Ort der Inflammation. Zudem induziert es Muskelkatabolismus und Kachexie (Commins et al., 2010). Im Herzen führt TNF- α zu einer linksventrikulären diastolischen Dysfunktion über eine Downregulation der Expression der sarkoplasmatischen Retikulum-Ca²⁺-ATPase (SERCA) (Tsai et al., 2015).

TNF- α wird bei nahezu allen Patienten mit Sepsis im Plasma detektiert und es konnte

gezeigt werden, dass die Konzentration des Zytokins im Plasma mit dem Schweregrad der Erkrankung und dem Outcome der Patienten korreliert (Endo et al., 1992).

2.3.2.2 IL-1 β

IL-1 β und IL-1 α sind strukturell miteinander verwandte Proteine, die zu IL-1 zusammengefasst werden und von mononukleären Phagozyten als Reaktion auf einen Stimulus mit Endotoxin gebildet werden (Cannon et al., 1990; Hesse et al., 1988). In ihrer immunologischen Mediatorfunktion ähneln sie dem Zytokin TNF- α und ahmen dessen proinflammatorische Eigenschaften in weiten Teilen nach (Dinarello, 1991). Bei gesunden Probanden, denen IL-1 β appliziert wurde, konnten Fieber, Anorexie, Kopfschmerzen, Arthralgien und Neutrophilie beobachtet werden. Wie TNF- α aktiviert auch IL-1 β die Produktion von IL-6, IL-8 und TNF- α (Dinarello et al., 1991). Dass IL-1 β ebenfalls eine Schlüsselrolle bei der Sepsis einnimmt, zeigen Studien, in denen Tiere mit IL-1ra vorbehandelt wurden. IL-1ra dient dem Körper als endogener Regulator der IL-1-Aktivität, da es mit dem Zytokin um die Bindung am IL-1 Rezeptor konkurriert. IL-1ra wird bei inflammatorischen Prozessen sowie nach Verletzungen als regulatorische Komponente parallel zu IL-1 β sezerniert (Lin et al., 2000). So konnte durch die Vorbehandlung mit IL-1ra bei Hasen, die mit Endotoxin behandelt wurden, eine deutliche Reduktion der Mortalität erreicht werden (Ohlsson et al., 1990).

IL-1 β kann bei Patienten mit Sepsis nur selten detektiert werden, dafür aber fast immer bei Patienten mit schwerer Sepsis (Endo et al., 1992). So kann mithilfe dieses Zytokins eine Aussage über den Schweregrad der Sepsis getroffen werden, es besteht jedoch keine Korrelation zwischen dem Plasmaspiegel von IL-1 β und der Mortalität der Patienten (Casey et al., 1993).

2.3.2.3 IL-6

IL-6 ist ein 21 kDa großes Glykoprotein, das von Monozyten, Lymphozyten und Fibroblasten sezerniert wird. Es weist eine Reihe von biologischen Effekten auf wie die Aktivierung von B- und T-Lymphozyten, die Induktion der Akute-Phase-Protein-Produktion in der Leber und die Modulation der Hämatopoese (Borden und Chin, 1994). Zudem aktiviert IL-6 das Gerinnungssystem und es fungiert als endogenes Pyrogen (van der

Poll et al., 1994; Dinarello, 1989).

In der Zytokinkaskade wird IL-6 im Anschluss an TNF- α und IL-1 β sezerniert. Der IL-6-Spiegel im Plasma gesunder Patienten, die zuvor eine Injektionsdosis Endotoxin erhalten haben, folgt dabei einer langsameren Anstiegskinetik. Nach vier Stunden werden entsprechende Spitzenwerte erreicht (Kuhns et al., 1995). Die beiden proximalen Zytokine bewirken zuvor synergistisch eine vermehrte IL-6-Produktion. Dieser Zusammenhang konnte in einem murinen *in vivo*-Modell belegt werden: durch den Einsatz von TNF- α Antikörpern und IL-1ra wurde die IL-6-Produktion signifikant gesenkt (Shalaby et al., 1989). Umgekehrt supprimiert IL-6 im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus die Produktion von TNF- α und IL-1 β (Aderka et al., 1989; Schindler et al., 1990).

Somit stellt IL-6 einen integralen Bestandteil in der Zytokinkaskade dar, dessen genaue Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis allerdings unklar ist. So bleiben in tierexperimentellen Studien Sepsis-ähnliche Symptome nach Infusion mit IL-6 aus (Preiser et al., 1991). Auch die Vorbehandlung mit IL-6-Antikörpern und die Blockade von IL-6-Rezeptoren brachte keine Vorteile im Krankheitsverlauf (Libert et al., 1992).

Dagegen korrelieren IL-6-Konzentrationen im Plasma von Sepsis-Patienten stärker als die aller anderen Zytokine mit dem Schweregrad der Sepsis und dem Outcome der Patienten (Blackwell und Christman, 1996). IL-6 wird daher auch als diagnostischer Marker in der Sepsis eingesetzt (Damas et al., 1992).

2.3.3 Phagozytose

Schon im 19. Jahrhundert propagierte der Immunologe Elie Metchnikoff die Fähigkeit von Immunzellen, krankheitserregende Partikel aufnehmen und eliminieren zu können (Stossel, 1974). Seitdem gilt der Mechanismus der Phagozytose als ein klassisches Modell der angeborenen Immunität. Man weiß heute, dass die Phagozytose ein hochkomplexes Netzwerk darstellt, das durch eine Vielzahl von Rezeptoren und Signalwegen reguliert wird.

Phagozytose ist ein energieverbrauchender Prozess und umfasst die Erkennung eines Partikels, dessen Invagination ins Zellinnere und die anschließenden Eliminationsmechanismen. Zu den Phagozyten des menschlichen Organismus gehören Granulozyten,

dendritische Zellen sowie Makrophagen, die aus zirkulierenden Monozyten heranreifen, nachdem sie den Blutkreislauf verlassen haben und in das Gewebe eingewandert sind (Abbas et al., 2011).

Treffen sie dort auf einen pathogenen Mikroorganismus, stehen eine Vielzahl von Rezeptoren zur Verfügung, die das schädliche Agens erkennen und den Phagozytoseprozess einleiten. Scavenger-Rezeptoren binden sowohl ganze Bakterien als auch Bakterienwandbestandteile wie LPS und Lipoteichonsäure (Hughes et al., 1995; Dunne et al., 1994). CD14 wird vor allem auf Monozyten und Makrophagen exprimiert und bindet ebenfalls LPS. Neben Rezeptoren, die direkt an Strukturen des Pathogens binden, gibt es auch Rezeptoren, die vor allem auf opsonierte Moleküle spezialisiert sind wie Fc-Rezeptoren und spezifische Komplement-Rezeptoren (Underhill und Ozinsky, 2002).

Das gebundene Pathogen wird von der Zellmembran des Phagozyten umhüllt und dann in ein Vesikel aufgenommen, das als Phagosom bezeichnet wird. Im Phagosom kommt es zu einem Absinken des pH-Wertes, wodurch bereits Krankheitserreger abgetötet werden. Lysosome sind intrazelluläre Granula, die antimikrobielle Enzyme, Proteine und Peptide enthalten. Sie verschmelzen mit dem Phagosom und bilden das Phagolysosom, in dem der Inhalt des Lysosoms entladen wird und weitere toxische Produkte zum Abtöten des Pathogens gebildet werden. Hierzu zählen neben Stickoxid vor allem toxische Sauerstoffderivate (Murphy et al., 2009).

Der Prozess der Phagozytose ist bei weitem nicht so simpel wie es nach der hier schematischen Darstellung scheinen mag. In Wirklichkeit ist er mit vielen unterschiedlichen intrazellulären Signalwegen und –molekülen assoziiert, die ihn auf hochdifferenzierte Weise zu modulieren vermögen (Abbildung 5). So ist die Phagozytose auch mit der Zytokinproduktion durch intrazelluläre TLRs gekoppelt, die an die Membranen von Phagolysosomen rekrutiert werden (Underhill et al., 1999). Die inflammatorische Antwort hat sowohl autokrine als auch parakrine Effekte auf die Phagozytoseeffizienz. Zytoskelettveränderungen, Membranumbau, Apoptoseinduktion sowie Prozessierung der Antigene sind weitere Vorgänge, die mit der Phagozytose einhergehen und durch Signalproteine wie PI3-Kinase, Phospholipase C, Rho GTPase und Proteinkinase C ausgelöst werden (Underhill und Ozinsky, 2002).

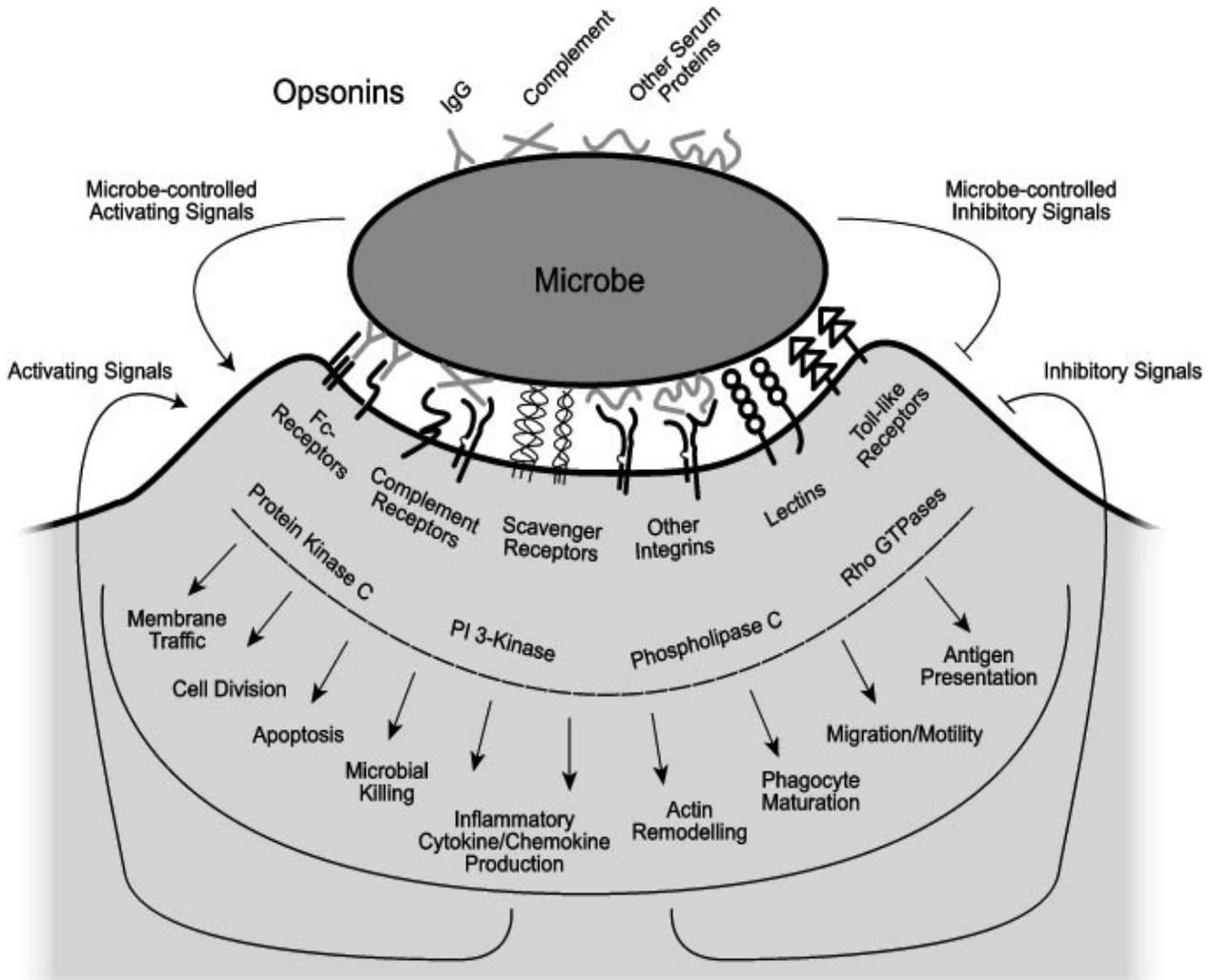


Abb. 5: Überblick über die zahlreichen intrazellulären Kaskaden, die durch die Bindung eines opsonierten Pathogens an den jeweiligen Rezeptor initiiert werden. (modifiziert nach Underhill und Ozinsky, 2002)

2.4 Rolle der Antimykotika bei der Immunmodulation

Zahlreiche Studien belegen, dass antimykotische Substanzen in der Lage sind, mit Mechanismen des Immunsystems zu interagieren.

Amphotericin-B besitzt abhängig von der Formulierung die Eigenschaft, direkte immunologische Effekte auszulösen. So hat das konventionelle Desoxycholat-haltige Amphotericin-B proinflammatorische Eigenschaften. *In vitro* stimuliert es in Makrophagen und Neutrophilen die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , die Sekretion von Prostaglandinen, Chemokinen, NO, reaktiven Sauerstoffspezies sowie die Produktion von intrazellulären Adhäsionsmolekülen (Cleary et al., 1992; Wilson et al., 1990; Stein et al., 1987; Wolf et al., 1991). Diese inflammatorischen Vorgänge werden über die Bindung der Substanz an TLR2 mit dem darauffolgenden NF- κ B – Signalweg (s.o.) ausgelöst (Sau et al., 2003). Liposomales Amphotericin-B scheint dagegen eine TLR-4 vermittelte Down-Regulation der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen *in vitro* zu bewirken (Simitopoulou et al., 2005). Dies spiegelt sich auch klinisch wider, als dass Patienten, denen konventionelles Desoxycholat-haltiges Amphotericin-B infundiert wurde, Nebenwirkungen wie Fieber, Schüttelfrost und Myalgien zeigten (Arning et al., 1995).

Bei beiden Substanzgruppen der Azole und Echinocandine konnte zwar eine derartige direkte Interaktion mit dem Immunsystem bisher nicht gezeigt werden, so doch zumindest ein indirekter Effekt: Echinocandine wie Caspofungin spalten die Mannoproteine der äußeren Pilzschicht und erlauben somit Immunzellen und Antikörpern den Zugang zum immunreaktiven β -Glucan (Lamaris et al., 2008). Für Azol-Antimykotika konnte gezeigt werden, dass sie die Phagozytose von Pilzen erleichtern, indem sie die Anfälligkeit des Pilzes für NO erhöhen und die Transformation des Pilzes zum phagozytoseresistenten Hyphenstadium verhindern (Shimokawa und Nakayama, 1992; Ha und White, 1999).

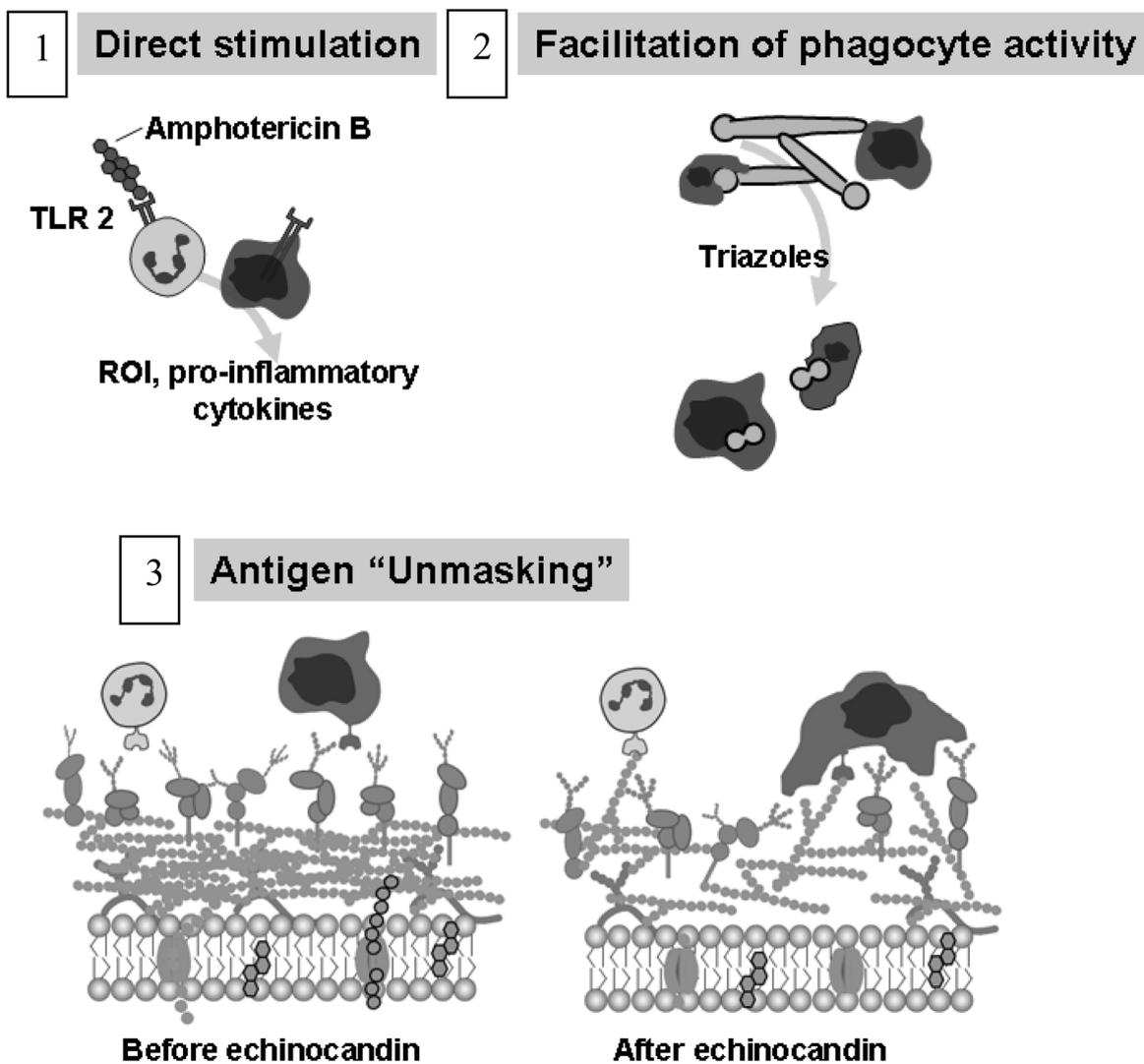


Abb. 6: Immunmodulation durch Amphotericin-B, Triazole und Echinocandine. 1. Direkte proinflammatorische Eigenschaften von Amphotericin-B über Bindung an *Toll-Like* Rezeptor 2 (TLR2). 2. Erleichterung der Phagozytose durch Triazole 3. Antigen-Zugänglichkeit durch Echinocandine. (modifiziert nach Ben-Ami et al., 2008)

2.5 Ziel der Arbeit

Mykosen spielen eine zentrale Rolle in der Ätiologie der Sepsis, entweder als primäre Erreger oder als sekundäre Superinfektion bei der bakteriellen Sepsis. Dies führt zu einem breiten Einsatz von Antimykotika bei septischen Patienten. Dass Antimykotika neben dem antiinfektiven Wirkmechanismus auch immunmodulatorische Wirkungen haben, konnte in zahlreichen Studien belegt werden. In diesen Untersuchungen wurden nur die Effekte von Antimykotika alleine oder in Ko-Stimulation mit Pilzerregern auf Zellen der innate Immunität untersucht. Die Immunmodulation von Antimykotika bei gleichzeitiger Anwesenheit von bakteriellen Stimuli ist bisher unvollständig verstanden. In dieser Arbeit soll systematisch untersucht werden, ob drei der im klinischen Alltag häufig angewandten antimykotischen Substanzen in der Lage sind, in humanen Monozyten definierte Mechanismen der angeborenen Immunität zu beeinflussen, die im Rahmen der Sepsis maßgeblich den Krankheitsverlauf beeinflussen: Zytokinexpression und -sekretion sowie das Phagozytoseverhalten von Immunzellen. Zur Stimulation einer bakteriellen Sepsis erfolgt die Untersuchung anhand eines *in vitro* LPS-Modells, in dem humane Monozyten mit dem Bakterienbestandteil LPS stimuliert werden. Folgende Fragen sollen hier beantwortet werden:

1. Hat die Anwesenheit von Antimykotika bei LPS-aktivierten Monozyten einen Einfluss auf die mRNA-Expression und Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α über einen Zeitraum von 2 h, 6 h und 24 h?
2. Weisen die mit Antimykotika stimulierten Monozyten ein anderes Phagozytoseverhalten auf als unstimulierte Zellen über den Beobachtungszeitraum von 2 h, 6 h und 24 h?
3. Gibt es Unterschiede zwischen den drei untersuchten Substanzen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Phagozytoserate und die Zytokinexpression der Monozyten zu regulieren?

Die potenziell immunmodulatorische Komponente der innate Immunität von Antimykotika bei gleichzeitiger Anwesenheit eines bakteriellen Virulenzfaktors könnte in Zukunft den Einsatz dieser Substanzen im klinischen Alltag maßgeblich beeinflussen und das therapeutische Konzept grundlegend ändern.

3 Material und Methoden

3.1 THP-1-Zelllinie

Die Untersuchung der immunmodulatorischen Effekte erfolgte an THP-1-Zellen (ATCC-TIB-202, American Type Culture Collection; Manassas, Virginia, USA). Hierbei handelt es sich um eine monozytäre Zelllinie, deren Zellen ursprünglich aus dem Blut eines an akuter monozytärer Leukämie erkrankten einjährigen Jungen isoliert wurden. Sie weisen typische monozytäre Eigenschaften auf wie die Fähigkeit zur Phagozytose (Wang et al., 2010) und die Expression von Zytokinen (Dasu et al., 2007). Damit stellen sie eine etablierte Zelllinie für *in vitro*-Sepsismodelle dar.

3.2 Zellkultur

Die Zellen wurden in Suspension in Zellkulturflaschen (Nunclon, 5 cm², Thermofisher; Waltham, MA, USA) bei einer Zelldichte von 1x10⁶ Zellen/ml ausgesät. Als Nährmedium diente RPMI-40 (PAA; Cölbe, Germany). Diesem wurde zuvor fetales Kälberserum (FBS superior, Biochrome; Berlin, Germany) zugefügt, das Wachstumsfaktoren enthält, sowie Penicillin/Streptomycin (Gibco 15140, Invitrogen; Carlsbad, Kalifornien, USA), um eine bakterielle Kontamination der Suspension zu vermeiden. Die Zellen wurden konstant in einer feuchten Umgebung bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (CO₂-Inkubator C150, Binder; Tuttlingen, Germany). Alle 2-3 Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 gesplittet und das Nährmedium erneuert. Hierfür wurde der Inhalt aus der Zellkulturflasche in ein 50 ml-Falcontube (Cellstar, Greiner bio-one; Frickenhausen, Germany) überführt und für 5 min bei 1.800 Umdrehungen/Minute (rpm) zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf AG; Hamburg, Germany). Das verbrauchte Nährmedium wurde abgesaugt (Vacuu Hand Control, Vacuubrand; Mönchengladbach, Germany) und das am Boden des Tubes resultierende Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die frische Zellsuspension wurde dann im Anschluss auf zwei neue Zellkulturflaschen verteilt.

Die Zellviabilität wurde regelmäßig durch Trypanblaufärbung (Trypan Blue Standard, Fluka, Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) kontrolliert. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer improved (Neubauer, Brand; Wertheim, Ger-

many). Alle Arbeitsschritte mit den Zellen erfolgten unter einer Sterilbank (HeraSafe, Heraeus Instruments; Hanau, Germany).

3.3 In-vitro-Stimulation der THP-1-Zellen

3.3.1 Vorbereitung

Den eigentlichen Stimulationsversuchen ging eine 48-stündige Vorinkubationsphase der Zellen voran. Hierfür wurde das oben beschriebene Nährmedium durch reines RPMI-40-Medium ersetzt, das weder fetales Kälberserum noch Penicillin/Streptomycin enthielt. Damit sollte gewährleistet werden, dass es keine Beeinflussung der immunmodulatorischen Effekte durch diese Substanzen gibt. Alle Versuche wurden auf Grundlage des hier beschriebenen Mediums durchgeführt. Die Inkubation erfolgte wie zuvor bei 37 °C und 5 % CO₂.

Nach Ablauf der Vorinkubation wurde die Zelldichte in den einzelnen Zellkulturflaschen bestimmt. Die Kenntnis der Zellzahl/ml gewährleistete, dass später in einem definierten Volumen Stimulationsansatz immer gleich viele Zellen vorlagen. Die Auszählung erfolgte unter dem Mikroskop (Telaval 31, Zeiss; Oberkochen, Germany), nachdem unter die Deckplatte der Neubauer-Zählkammer vorsichtig 10 µl der Zellsuspension pipettiert wurden.

3.3.2 Durchführung der Stimulationen

Die Stimulation erfolgte mit vier unterschiedlich zusammengesetzten Stimulationsmedien. Als Grundlage zur Herstellung diente für jeden Ansatz RPMI-1640-Medium. Ein Ansatz enthielt lediglich RPMI-40-Medium mit PBS (Phosphate-buffered Saline, Gibco by life-technologies; Carlsbad, Kalifornien, USA) und diente als Negativkontrolle. Einem weiteren Ansatz wurde nur das jeweilige Antimykotikum zugegeben, um den Effekt der Substanz auf die Zellen unter nicht septischen Bedingungen zu untersuchen. Dem dritten Ansatz wurde LPS mit einer Konzentration von 10 µg/ml hinzugefügt, um Sepsisbedingungen zu simulieren. Vorversuche aus der eigenen Arbeitsgruppe ergaben, dass diese Konzentration eine zufriedenstellende Immunantwort der Zellen auslöst (Bode et al., 2015). Einem vierten Ansatz wurde zusätzlich zum LPS das jeweilige Antimykotikum

zugegeben, um zu untersuchen, wie sich die immunmodulatorischen Effekte unter Ko-Stimulation mit der Substanz verhalten (Tabelle 1).

Tab. 1: Zusammensetzung der unterschiedlichen Stimulationsmedien. LPS: Lipopolysaccharid, AM: Antimykotikum, PBS: Phosphate-buffered Saline

	LPS (10 µg/ml)	Antimykotikum	PBS
w/o (Kontrolle)	-	-	ja
AM	-	ja	-
LPS	ja	-	-
AM+LPS	ja	ja	-

Die gewählten Konzentrationen der Antimykotika entsprechen der maximalen Plasmakonzentration bei Patienten nach intravenöser gewichtsadaptierter Applikation. Die Konzentrationen wurden den Produktinformationen der jeweiligen Hersteller entnommen (Tabelle 2).

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Antimykotika mit ihren Zielkonzentrationen im Stimulationsansatz

Substanz	Handelsname	Hersteller	C _{max}
Amphotericin-B (73)	AmBisome	Gilead	7,3 µg/ml
Anidulafungin (29)	Eraxis	Pfizer	7 µg/ml
Itraconazol (ITC)	Sempera	Janssen-Cilag	2 µg/ml

Nach Ablauf der 48-stündigen Vorinkubation wurden die Zellsuspensionen zentrifugiert, das alte Medium entfernt und die Zellen in die jeweiligen Stimulationsmedien aufgenommen. Die so erhaltenen Suspensionen wurden zur weiteren Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) auf Six-Well-Platten (Cellstar, Greiner bio-one) verteilt. Jedes Well enthielt am Ende 3 ml Stimulationsansatz bei einer Zelldichte von 1 x 10⁶ Zellen/ml. Die Inkubation

erfolgte für jede Gruppe zu jeweils 2 h, 6 h und 24 h, um den Effekt der Inkubationsdauer auf die Cytokinexpression und die Phagozytoserate der Zellen zu demonstrieren (Abbildung 7). Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen isoliert und standen zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung.

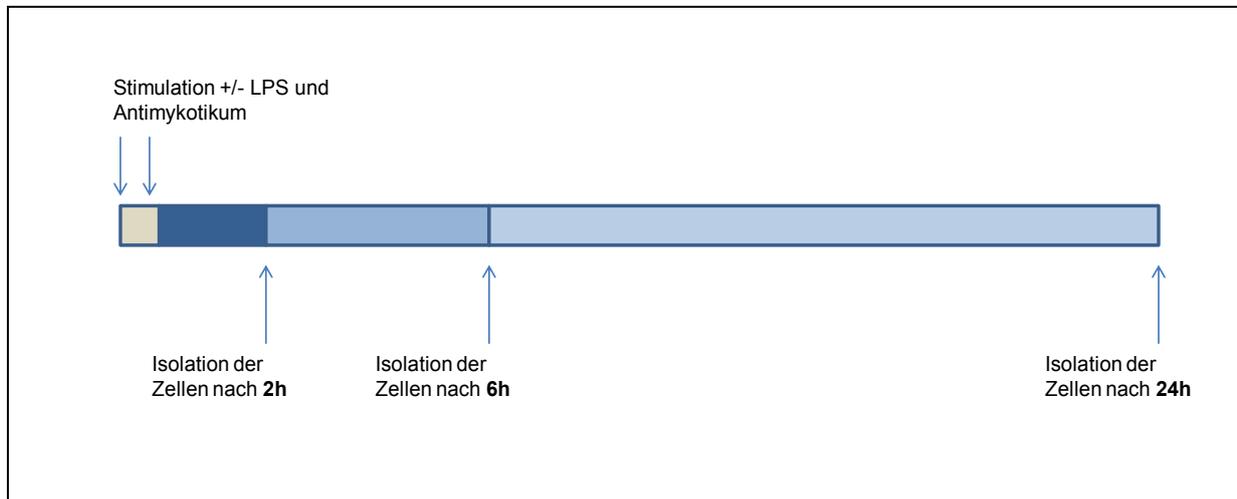


Abb. 7: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs für die Stimulationsversuche. Zunächst erfolgte die Aufnahme der Zellen in das Stimulationsmedium mit oder ohne LPS und Antimykotikum. Die Inkubationen erfolgten für 2 h, 6 h, und 24 h. Nach den jeweiligen Inkubationsintervallen wurden die Zellen geerntet und den weiteren molekularbiologischen Untersuchungen zugeführt.

3.4 Bestimmung der mRNA-Expression der proinflammatorischen Cytokine

Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden die Zellsuspensionen aus den Wells der 6-Well-Platte entnommen und bei 1.100 rpm für 10 min in sterilen 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen zentrifugiert. Die Überstände wurden entfernt und die resultierenden Zellpellets bis zum Zeitpunkt der RNA-Isolation bei -80 °C gelagert.

3.4.1 RNA-Isolation

Die Gewinnung der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen; Hilden, Germany) und dem zugehörigen QIAshredder (Quiagen) nach Angaben des Herstellers.

In einem ersten Schritt wurden die Zellen durch Zugabe einer Guanidin-Thiocyanat-haltigen Pufferlösung lysiert, um Nukleinsäuren von restlichen Zellbestandteilen zu separieren. Das Lysat wurde durch Zentrifugieren in der QIAshredder-Säule homogeni-

siert. Zu dem homogenisierten Lysat wurde 70 % Ethanol zugegeben, um im nächsten Schritt optimale Bindung der RNA an die Silikat-Membran zu gewährleisten. Die Proben wurden für 15 Sekunden (s) bei 10.000 rpm zentrifugiert (Biofuge pico Heraeus, Kendro Laboratory Products), so dass die RNA selektiv an der Silikat-Membran haften blieb und die restlichen Bestandteile des Lysats ausgewaschen wurden. Es folgten drei Waschschriffe der Membran durch Zentrifugation mit den zum Kit zugehörigen Pufferlösungen. Im Anschluss an die Zentrifugationsschritte wurde die RNA in 60 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Nach der Isolation erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung der gewonnenen Gesamt-RNA (Biophotometer, Eppendorf AG).

3.4.2 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die isolierten Proben mussten, bevor sie für einen Einsatz in der PCR zur Verfügung standen, zunächst in copy-DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies erfolgte mit dem High Capacity Kit (Applied Biosystems by life-technologies), das RT-Puffer, Desoxyribonukleotide, Random Primers, RNase-freies Wasser sowie das Enzym Multiscribe Reverse Transkriptase enthält. Der Master-Mix wurde aus diesen Komponenten selbst hergestellt und zur isolierten RNA in gleich großem Volumen zugegeben. Direkt im Anschluss wurden die Ansätze in den Thermocycler (T-Gradient, Biometra) gestellt und unter einem definierten Programmablauf für 2 Stunden und 10 Minuten inkubiert (Tabelle 3).

Tab. 3: Programmablauf der Reversen-Transkriptase-PCR im Thermocycler

Schritt	Zeitdauer	Temperatur
1	10 min	25 °C
2	120 min	37 °C
3	5 s	85 °C
4	∞	4 °C

3.4.3 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

3.4.3.1 Prinzip der qRT-PCR

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, die Nukleinsäuren zu quantifizieren, die für die gesuchten Proteine codieren. Im Gegensatz zur klassischen PCR bietet die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) den Vorteil, dass die Amplifikation der DNA-Sequenzen in Echtzeit abläuft („real time“). Dabei arbeitet die qRT-PCR im Prinzip wie eine klassische PCR mit den Schritten der Denaturierung, um den Doppelstrang zu trennen, der Hybridisierung der Primer sowie der Elongation durch die DNA-Polymerasen. Die Amplifikation bei der qRT-PCR wird jedoch durch Fluoreszenzsignale gemessen, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Das Prinzip soll im Folgenden erläutert werden:

Zusätzlich zu den Oligonukleotiden, die der Elongation der Stränge dienen, werden den Ansätzen Oligonukleotide beigefügt, die spezifisch zwischen den Primern hybridisieren, sogenannte Hybridisierungssonden. Das 3'-Ende dieser Nukleotide ist durch eine Phosphatgruppe blockiert, so dass sie nicht selbst als Primer fungieren. An diese Moleküle ist zudem ein Fluoreszenzfarbstoff (Reporter) gebunden, der durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird (hier: 6-FAM-phosphoramidit $\lambda = 488$ Nanometer (nm)) und die Energie in Form von Licht einer anderen Wellenlänge an ein direkt in der Nähe gebundenes Molekül (Quencher) abgibt. Die in der qRT-PCR eingesetzten TaqMan-Polymerasen besitzen eine 5'-3'-Exonuclease-Aktivität. Treffen sie während der Neustrang-Synthese auf die beschriebenen Oligonukleotide, werden diese abgebaut und es kommt zur räumlichen Trennung von Quencher und Reporter. Das emittierte Licht des Quenchers, das zuvor durch die Nähe zum Reporter unterdrückt wurde, wird nun frei emittiert und von Detektoren der PCR-Maschine registriert. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto mehr Reporter-Moleküle werden freigesetzt und entsprechend steigt die Signalstärke (Abbildung 8).

Die Anzahl der Zyklen, die notwendig ist, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen, wird als Cycle Threshold (CT)-Wert angegeben. Je niedriger der CT-Wert desto eher wird das optische Signal detektiert und umso mehr DNA lag folglich als Ausgangsmenge vor.

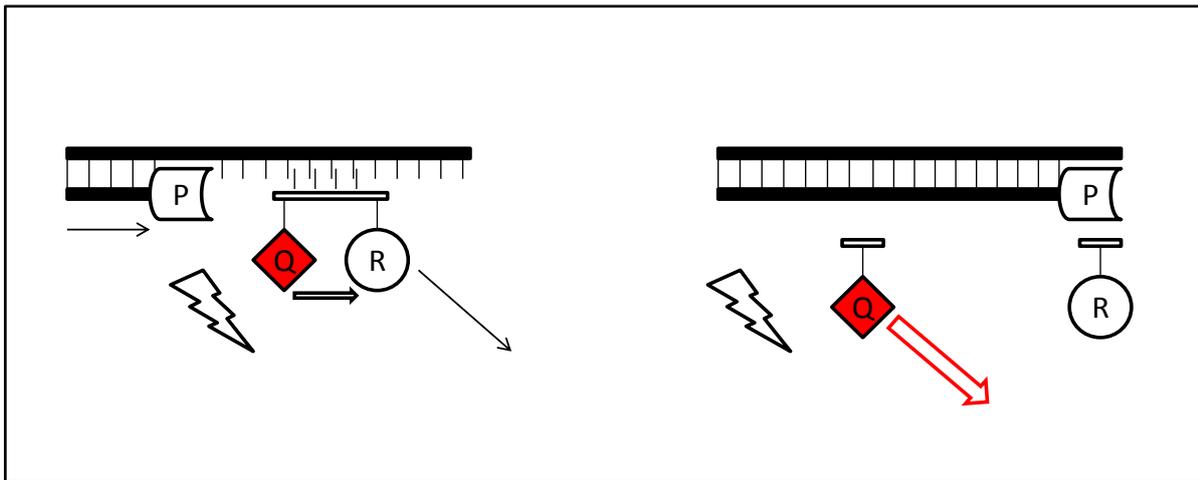


Abb. 8: Darstellung des Funktionsprinzips der qRT-PCR. Q: Quencher, R: Reporter, P: Taq-Polymerase. Die Taq-Polymerase spaltet die Hybridisierungssonde während der Neustrang-Synthese. Es kommt durch die Trennung von Quencher und Reporter zur Emission des Quencher-Lichtes, das durch Detektoren der PCR-Maschine registriert wird. Dementsprechend steigt die Signalstärke, je mehr DNA synthetisiert wird.

3.4.3.2 Relative Quantifizierung

Für die relative Quantifizierung wird eine interne Kontrolle benötigt, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. Man bedient sich dafür idealerweise einem Kontrollgen, das einfach zu detektieren ist und dessen Expression homogen und ubiquitär erfolgt und nicht während des Zellzyklus, zwischen Zelltypen oder als Antwort auf die experimentelle Intervention variiert. Hierfür eignet sich das House-Keeping-Gen (HKG) Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welches für ein Enzym der Glykolyse kodiert.

Zusätzlich wird eine unbehandelte Standardprobe gewählt, die als Kalibrator fungieren soll und zu der die Quantifizierung relativ erfolgt.

Mit Hilfe der CT-Werte der Kontrollgene und der Kalibratorproben, die in der PCR-Maschine gemessen werden, kann durch die Delta-Delta-CT-Methode ($\Delta\Delta CT$) ein Quotient errechnet werden, die die unterschiedlichen Expressionen als n-fache Expression abbildet.

In einem ersten Schritt wird der CT-Wert des Referenzgenes (GAPDH) vom CT-Wert des Zielgenes (z.B. IL-6) subtrahiert. Man erhält den ΔCT -Wert:

$$(1) \quad \Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Referenzgen}$$

In einem weiteren Schritt wird der $\Delta\Delta CT$ -Wert gebildet, indem der ΔCT -Wert der unbehandelten Kalibratorprobe (hier: w/o) vom ΔCT -Wert der behandelten Probe (hier: Antimykotikum und/oder LPS) abgezogen wird:

$$(2) \quad \Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Behandlung} - \Delta CT \text{ Kalibrator}$$

Im Allgemeinen kann eine unter Idealbedingungen ablaufende PCR, bei der sich pro Zyklus die DNA verdoppelt, durch folgende Exponentialfunktion ausgedrückt werden:

$$(3) \quad 2^N \quad (N = \text{Zyklenzahl})$$

Ersetzt man den Exponenten durch den $\Delta\Delta CT$ -Wert, erhält man die „Relative Quantity“ (4), die den relativen Expressionsunterschied zwischen zwei Proben abzubilden vermag, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe.

$$(4) \quad RQ = 2^{-\Delta\Delta CT} \quad RQ = \text{Relative Quantity}$$

3.4.3.3 Durchführung der qRT-PCR

Die Reaktionsansätze wurden auf eine PCR-Platte mit 384 Wells verteilt. Das Gesamtvolumen in einem Well betrug 10 μl bestehend aus 1,5 μl verdünnter cDNA (5,5 ng/ μl) sowie 8,5 μl Mastermix. So wurden zur Sicherheit 6 μl cDNA mit 34 μl Mastermix in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt und im Anschluss mit Hilfe einer Mehrkanal-Pipette (Impact2, Matrix Technologies, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) auf die Platte pipettiert, wobei jede Probe als Triplet aufgetragen wurde.

Der Mastermix wurde aus den Komponenten RNase-freiem sterilen Wasser, den TaqMan-Gensonden (humanes GAPDH, humanes IL-1 β , humanes IL-6, humaner Tumornekrosefaktor- α , alle Applied Biosystems by life-technologies; Carlsbad, Kalifornien, USA) und vorgefertigtem TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems by life-technologies) im Verhältnis 6:1:10 hergestellt.

Der TaqMan Gene Expression Master Mix enthält AmpliTaq Gold DNA Polymerase, Pufferkomponenten, Desoxyribonukleotide inklusive dUTP und Uracil-DNA Glykosylase.

Die Wells der PCR-Platte wurden mit einer durchsichtigen Kunststoffolie beklebt, um ein Verdampfen der Ansätze während der Heizschritte im TaqMan zu verhindern.

Im Anschluss an die hier beschriebenen Schritte konnten die Real-Time-PCRs am TaqMan (ABI PRISM 7700, Sequence Detection Systems, Applied Biosystems by life-technologies) unter Verwendung der Software SDS 2.2 (7900 HT, Applied Biosystems by life-technologies) durchgeführt werden. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Inkubationsschritte im TaqMan.

Tab. 4: Überblick über die einzelnen Inkubationsschritte der quantitativen real-time PCR (qRT-PCR). Schritt 3 und 4 stellen die Amplifikationsschritte dar und laufen in 40 Zyklen ab.

Schritt	Zeitdauer	Temperatur
1	2 min	50 °C
2	10 min	95 °C
3	15 sek	95 °C
4	1 min	60 °C

3.5 Bestimmung der Proteinlevels durch Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Die Proteinkonzentrationen von TNF- α , IL1- β und IL-6 in den Zellkulturüberständen wurden mit Hilfe eines kommerziell erwerblichen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Kits (BD OptiEIA, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) quantifiziert. Die Arbeitsschritte wurden streng nach Gebrauchsanweisungen des Herstellers durchgeführt.

3.6 Bestimmung der Phagozytoseaktivität der THP-1-Zellen

3.6.1 Fluorescent-activated cell sorting (FACS)

Durch die FACS-Analyse ist es möglich, Zellen nach physikalischen Parametern zu charakterisieren. Das Prinzip beruht auf der Emission von optischen Signalen, die entstehen, wenn eine Zelle einen Laserstrahl passiert. Hierbei wird die Probenflüssigkeit in einen Hüllstrom (sheath fluid) injiziert, der die Zellen im Zentrum der Messzelle fokussiert. Die Zellen werden in der Messzelle nacheinander von dem Laserstrahl getroffen und sie streuen einen Teil des Lichtes, welches von Detektoren nachgewiesen wird. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichtes im flachen Winkel und hängt von dem Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sideward Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichtes im rechten Winkel und gibt Auskunft über die Granularität/Komplexität der Zelle. Mit diesen beiden Parametern lassen sich einzelne Zellpopulationen in einer Probe nach Größe und Granularität unterscheiden.

Zugleich ist es möglich, im Durchflusszytometer Fluoreszenzfarben zu messen. Man verwendet dafür Farbstoffe, die an bestimmte Bestandteile der Zellen binden und bei der Aktivierung durch den Laserstrahl Licht einer bekannten Wellenlänge emittieren. Die im Gerät installierten Filter trennen die Fluoreszenzsignale auf verschiedene Detektoren auf, die das optische Signal verstärken und in digitale Signale umwandeln, die am Computer weiterverarbeitet werden können. Die Messung kann linear oder logarithmisch erfolgen. Häufig bedient man sich Antikörpern, die das Fluorochrom gebunden haben und selektiv an Strukturen der Zelle binden. Durch die Markierung kann dann eine Sortierung nach den zu untersuchenden Merkmalen erfolgen. Durch Einsatz von verschiedenfarbigen Lasern und vor allem Filtern kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden.

3.6.2 Phagozytose-Assay mit pHrodo-E.coli-Partikeln

Um die Phagozytose-Aktivität der THP-1-Zellen zu messen, bediente man sich den pHrodo-Biopartikeln (pHrodo BioParticles Conjugates for Phagocytosis, Invitrogen by life-technologies). Es handelt sich dabei um hitzeinaktivierte E.coli-Bakterien, die mit einem Farbstoff (Rhodamin) gelabelt sind. Rhodamin hat die Eigenschaft, in saurer

Umgebung rot zu leuchten, wenn Licht einer bestimmten Wellenlänge zur Anregung auf die Partikel trifft. Außerhalb der Zelle ist der pH-Wert neutral. Die Fluorochrome emittieren dann kein Licht. Durch Phagozytose gelangen die Partikel in das Phagolysosom der Zelle. In diesem Kompartiment existiert ein saures Milieu, so dass die Fluorochrome beginnen, zu leuchten (Abbildung 9). Je mehr Zellen phagozytieren, desto intensiver fällt das optische Signal aus, das durch die Detektoren im FACS-Gerät registriert wird.

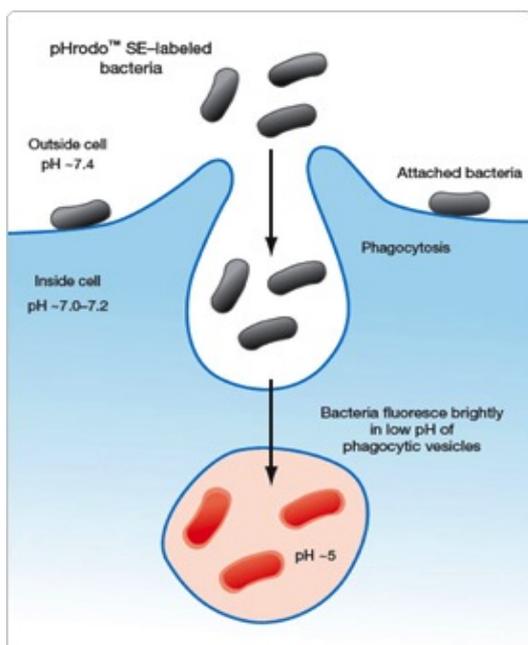


Abb. 9: Schematische Darstellung der Phagozytose-Messung. Die mit Farbstoff markierten Bakterien werden phagozytiert. Im Phagolysosom beginnen die Partikel im sauren Milieu zu fluoreszieren. Das emittierte Licht wird über Detektoren im FACS-Gerät registriert.

Die Anregung erfolgt durch einen Argon-Laser bei Licht einer Wellenlänge von 560 nm. Das Emissionsspektrum liegt bei 585 nm und wird im DS-Red-Detektor des FACS-Gerätes detektiert (Abbildung 10).

Die pH-abhängigen Eigenschaften der pHrodo-Partikel bieten den Vorteil, dass auch nur wirklich phagozytierte Partikel Licht emittieren. Somit entfallen Waschschrte, durch die an der Zelloberfläche haftende Partikel entfernt würden.

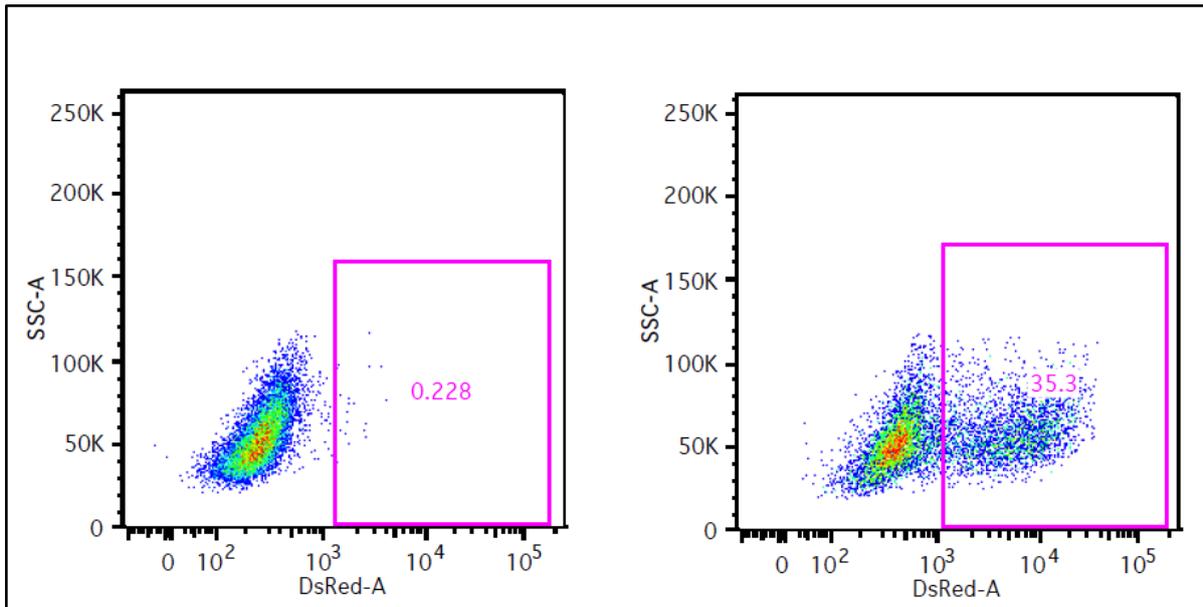


Abb. 10: Detektion von DsRed-positiven Zellen im FACS-Gerät. Links ist eine unbehandelte Gruppe von Zellen dargestellt, rechts ein Ansatz mit 120 minütiger pHrodo-Koinkubation. Es ist eine neue Zellpopulation zu erkennen, die vermehrt E.coli-Partikel phagozytiert hat. Die phagozytierten Partikel emittieren hier Licht der Wellenlänge von 585 nm, was im DS-Red-Detektor des FACS-Gerätes detektiert und quantifiziert wird.

3.6.3 Durchführung des Phagozytose-Assays

Nach der oben beschriebenen Inkubation der Zellen mit LPS und Antimykotika wurden die Zellsuspensionen nach 2 h, 6 h und 24 h Inkubationsdauer zu jeweils 200 µl auf die Wells einer 96-Well-Platte verteilt (Cellstar, Greiner bio-one). In die Wells wurden 10 µl pHrodo-Partikel dazugegeben. Eine Gruppe diente als Kontrollgruppe und enthielt stattdessen 10 µl HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, Gibco), um das zusätzliche Volumen zu simulieren.

pHrodo-E.coli-Bakterien liegen ursprünglich in Pulverform vor. Nach Angaben des Herstellers wurde das Pulver eines Tubes in 2 ml HBSS-Puffer aufgenommen und anschließend für 10 min im Ultraschallbad gelagert, damit sich die einzelnen Partikel aus ihren Konglomeraten lösen. Vor der Verwendung wurde die Suspension für 30 s durch einen Vortexer gemischt.

Die Zellen wurden jeweils für 60 min, 90 min und 120 min mit pHrodo-Partikeln koinkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurde die 96-Well-Platte zentrifugiert, die

Überstände in den Wells entfernt und die Zellpellets in FACS-Puffer aufgenommen. Der FACS-Puffer wurde selbstständig hergestellt und enthält PBS versetzt mit fetalem Kälberserum und NaNO_3 (Sigma-Aldrich). Durch die Aufnahme in die Pufferlösung werden die Zellen inaktiviert und können bis zum Einlesen im FACS-Gerät bedenkenlos für einige Stunden bei 2 °C gelagert werden.

Die Ansätze wurden zum Messen in Röhrchen speziell für Durchflusszytometrie (Flow Cytometry Tubes, Sarstedt) gegeben und am FACS-Gerät (Canto II, BD Science; Franklin Lakes, New Jersey, USA) unter Verwendung der Gerätesoftware FACS-Diva (BD Science) eingelesen. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der Software FlowJo (Tree Star; Ashland, OR, USA).

3.7 Statistik

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Softwareprogrammes GraphPad Prism (Version 6, Graph Pad Software Inc.; La Jolla, CA, USA) ausgewertet und graphisch aufgetragen. Um die Unterschiede in Gen-Expression, Protein-Level und Phagozytose auszuwerten, kam ein Mann-Whitney U Test zur Anwendung. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) angegeben, falls nicht anders notiert.

4. Ergebnisse

4.1 mRNA-Expression der Zytokine

Um zu untersuchen, ob drei klinisch häufig eingesetzte Antimykotika die Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen modulieren, wurden Monozyten mit den Substanzen L-AMB, ANI und ITC in An- oder Abwesenheit von LPS inkubiert, um einen Immunstatus unter bakteriellen Sepsis-Bedingungen zu simulieren. Nach 2 h, 6 h und 24 h Inkubation wurden qRT-PCR-Untersuchungen durchgeführt, um die Zytokin-mRNA-Genexpressions-Levels zu messen. Als Referenz-Gen diente das House-Keeping-Gen GAPDH. Für signifikante Ergebnisse wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ definiert.

4.1.1 Interleukin-1 β

In Zellen, die kein LPS erhielten, zeigten die drei Substanzen unterschiedliche Einflüsse auf die IL-1 β -Expression. Durch die Monoinkubation mit L-AMB wurde die Expression nach 6 h herunterreguliert (L-AMB 6 h: $0,5283 \pm 0,145$; * = $p < 0,05$). ANI zeigte dagegen einen stimulierenden Effekt erst nach 24 h Inkubationszeit (ANI 24 h: $1,367 \pm 0,109$; * = $p < 0,05$). Während ITC die Expression zu Beginn hochregulierte (ITC 2 h: $1,27 \pm 0,134$; * = $p < 0,05$), konnte nach 6 h eine deutliche Suppression ausgemacht werden (ITC 6 h: $0,353 \pm 0,086$; * = $p < 0,05$) (Abbildung 11 A-C).

In LPS-stimulierten Zellen zeigten alle drei Substanzen verglichen mit den Monoinkubationen deutlich ausgeprägtere immunmodulatorische Eigenschaften. Zu den beiden frühen Zeitpunkten erhöhte L-AMB die IL-1 β -Expression (L-AMB+LPS 2 h: $2,025 \pm 0,195$; L-AMB+LPS 6 h: $2,727 \pm 0,376$; + = $p < 0,05$), um nach 24 h das mRNA-Level signifikant unterhalb des Kontrollniveaus zu senken (L-AMB+LPS 24 h: $0,473 \pm 0,112$; + = $p < 0,05$). ANI regulierte die Expression zu den frühen Zeitpunkten noch deutlich stärker als L-AMB hoch (ANI+LPS 2 h: $7,872 \pm 0,602$; + = $p < 0,05$) und übertraf nach 6 h mit einem Peak von 13,5facher Expression das Level der LPS-Kontrollen (ANI+LPS 6 h: $13,51 \pm 1,598$; + = $p < 0,05$). Nach 24 h supprimierte ANI ähnlich wie L-AMB die IL-1 β -Expression (ANI+LPS 24 h: $0,662 \pm 0,177$; + = $p < 0,05$). ITC zeigte im zeitlichen Verlauf nach 2 h und 6 h ebenfalls deutlich proinflammatorische Eigenschaften (ITC+LPS 2 h:

9,353±0,607, ITC+LPS 6 h: 9,592±2,237; + = p<0,05). Nach 24 h sank das mRNA-Level in ITC-stimulierten Zellen fast wieder auf das mRNA-Niveau der LPS-Kontrolle (Abbildung 11 A-C).

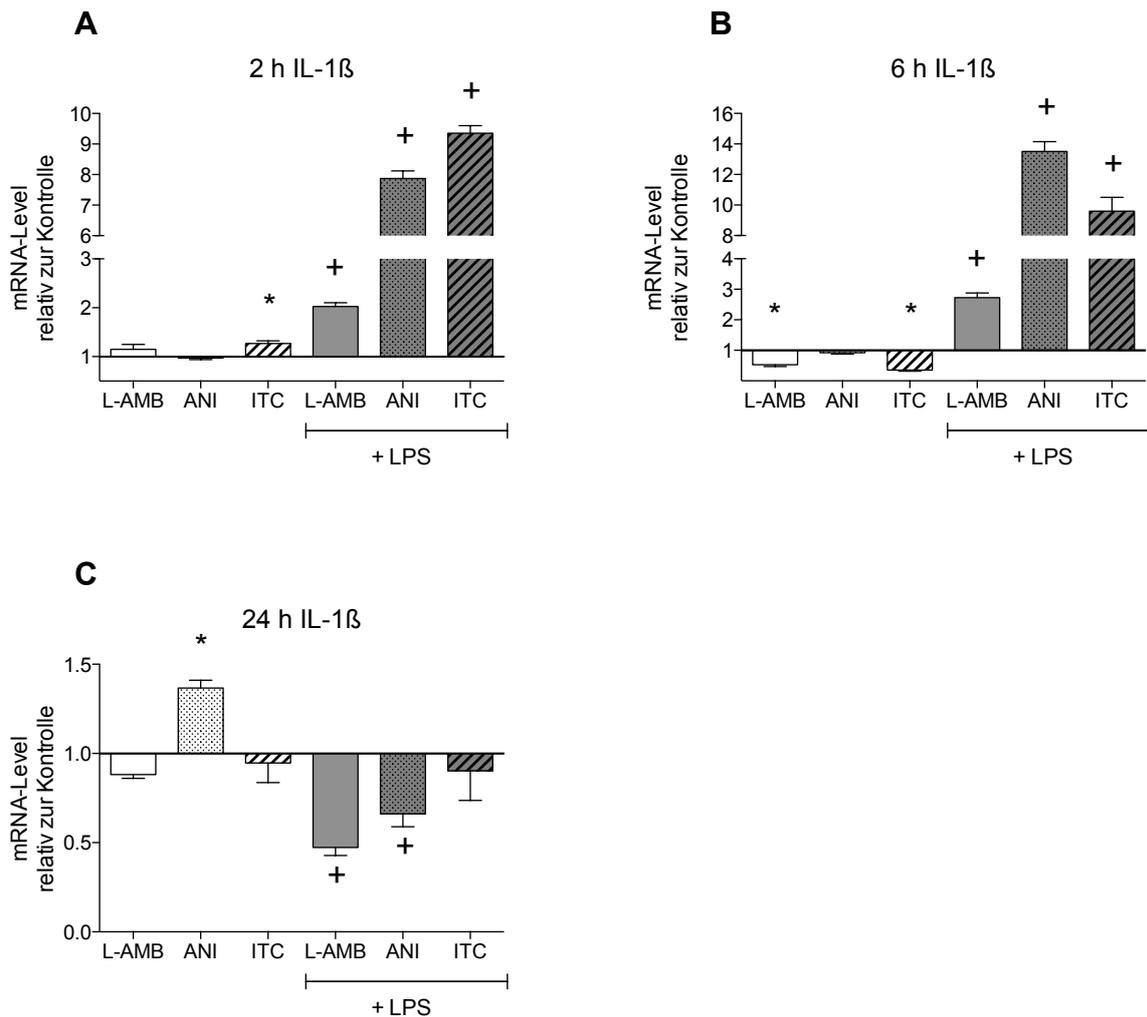


Abb. 11: mRNA-Expression von IL-1 β unter Stimulation mit L-AMB, ANI und ITC in An- und Abwesenheit von LPS relativ zur unstimulierten und stimulierten Kontrolle (+LPS) zu den Messzeitpunkten 2 h, 6 h und 24 h.

(A) 2 h ITC-Monoinkubation erhöhte signifikant die IL-1 β -Genexpression gegenüber der unstimulierten Kontrolle (* = $p < 0,05$), während die Expression durch Ko-Inkubation mit LPS bei allen drei untersuchten Substanzen gegenüber der LPS Kontrolle signifikant erhöht war (+ = $p < 0,05$).

(B) Monoinkubation von L-AMB bzw. ITC erniedrigte die Genexpression gegenüber der unstimulierten Kontrolle (* = $p < 0,05$). Im Gegensatz dazu waren die IL-1 β -Levels nach 6 h Ko-Inkubation bei allen drei Antimykotika signifikant höher verglichen mit der LPS-Kontrolle (+ = $p < 0,05$).

(C) 24 h ANI-Monoinkubation erhöhte signifikant die IL-1 β -Genexpression gegenüber der unstimulierten Kontrolle (* = $p < 0,05$). Die Ko-Inkubation mit LPS bei L-AMB und ANI bewirkte eine signifikante Reduktion der IL-1 β -Genexpression verglichen mit der LPS-Kontrolle (+ = $p < 0,05$).

4.1.2 Interleukin-6

Die Monoinkubation mit L-AMB hatte zu allen Zeitpunkten eine signifikante Reduktion der IL-6-Expression zur Folge, wobei der supprimierende Effekt nach 6 h am deutlichsten ausgeprägt war (L-AMB 6 h: $0,235 \pm 0,08$; * = $p < 0,05$). ANI-stimulierte Zellen folgten diesem Expressionsmuster ebenfalls. Auch hier war nach 2 h und 6 h eine deutliche Suppression der IL-6-Expression auszumachen (ANI 2 h: $0,323 \pm 0,128$, ANI 6 h: $0,193 \pm 0,047$; * = $p < 0,05$). Nach 24 h war das mRNA-Level durch ANI weiterhin etwas niedriger als das in unstimulierten Kontrollzellen. Hier unterschied sich die Wirkung durch ITC von den beiden anderen Substanzen. Während ITC zu Beginn keinerlei Modulation der IL-6-Expression zeigte, stimulierte die Substanz nach 6 h die IL-6-Expression signifikant (ITC 6 h: $1,778 \pm 0,23$; * = $p < 0,05$). Nach 24 h blieb das mRNA-Level weiterhin oberhalb des Kontrollniveaus (Abbildung 12 A-C).

In der LPS-Gruppe zeigte L-AMB deutliche antiinflammatorische Eigenschaften: Zu den Zeitpunkten 2 h und 24 h war die IL-6-Expression signifikant supprimiert (L-AMB+LPS 2 h: $0,425 \pm 0,042$, L-AMB+LPS 24 h: $0,438 \pm 0,05$; + = $p < 0,05$). Auch ANI zeigte eine Reduktion der IL-6-mRNA zum frühen Zeitpunkt (ANI+LPS 2 h: $0,148 \pm 0,03$; + = $p < 0,05$), während nach 6 h und 24 h keine signifikanten Unterschiede auszumachen waren. ITC hob sich zu den beiden frühen Messzeitpunkten deutlich von den anderen Substanzen ab. Es zeigte sich nach 2 h (ITC+LPS 2 h: $1,668 \pm 0,176$; + = $p < 0,05$) und vor allem nach 6 h (ITC+LPS 6 h: $4,167 \pm 0,311$; + = $p < 0,05$) eine deutliche Hochregulierung der Zytokinexpression. Nach 24 h lag das IL-6-mRNA-Level durch ITC-Ko-Inkubation jedoch signifikant unterhalb des Levels der LPS-Kontrolle (ITC+LPS 24 h: $0,455 \pm 0,103$; + = $p < 0,05$) (Abbildung 12 A-C).

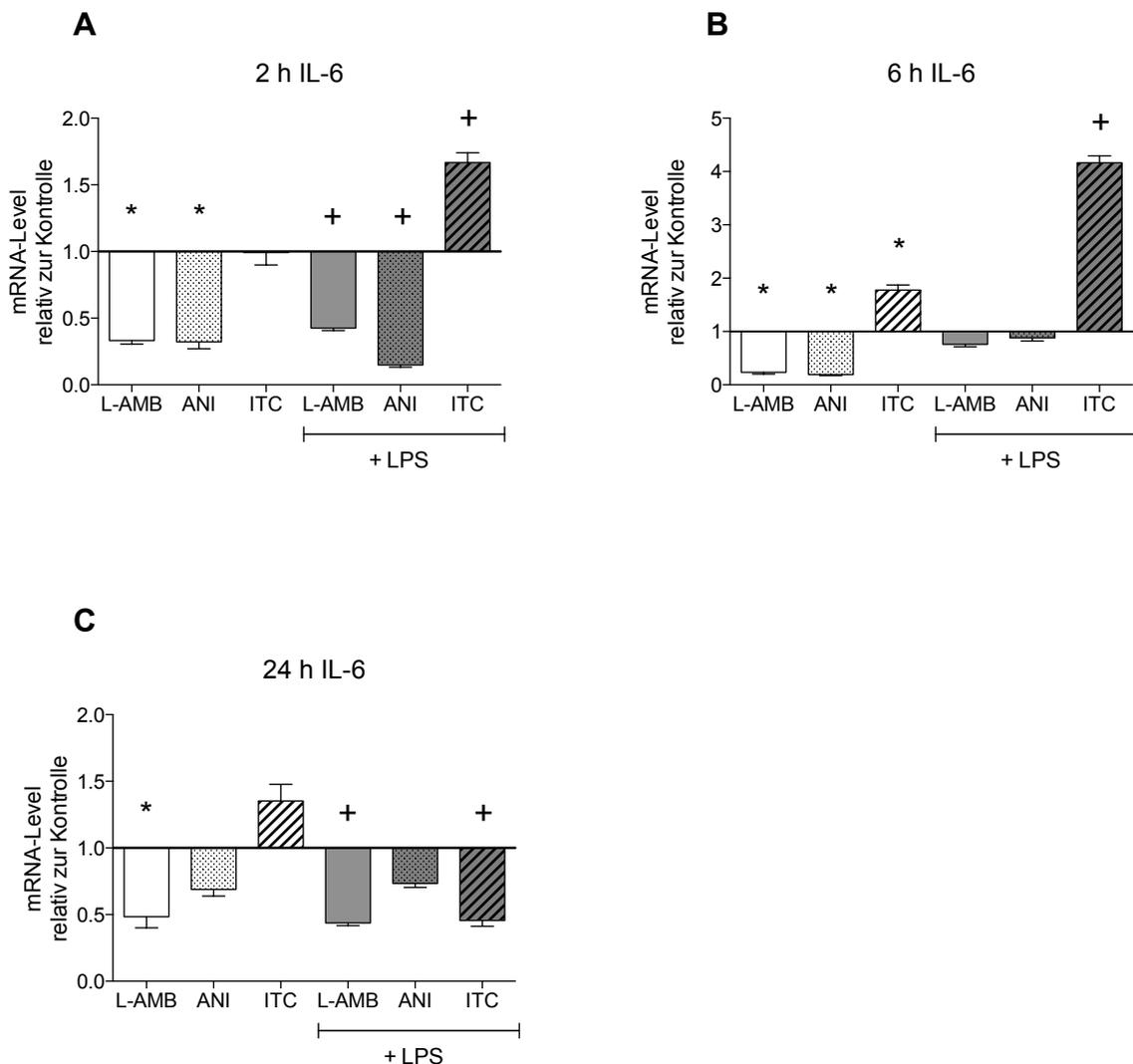


Abb. 12: mRNA-Expression von IL-6 unter Stimulation mit L-AMB, ANI und ITC in An- und Abwesenheit von LPS relativ zur unstimulierten und stimulierten Kontrolle (+LPS) zu den Messzeitpunkten 2 h, 6 h und 24 h.

(A) 2 h Monoinkubation mit L-AMB und ANI reduzierte die IL-6-Genexpression gegenüber der unstimulierten Kontrolle (* = $p < 0,05$). Auch in LPS-Ko-Stimulation wurde durch L-AMB und ANI die Expression signifikant gegenüber der LPS-Kontrolle herunterreguliert, während sie durch ITC-Ko-Stimulation signifikant gesteigert wurde (+ = $p < 0,05$).

(B) Monoinkubationen von L-AMB und ANI erniedrigte die IL-6-Genexpression gegenüber der unstimulierten Kontrolle nach 6 h, wohingegen sie durch ITC erhöht wurde (* = $p < 0,05$). In LPS-Ko-Stimulation steigerte ITC nach 6 h die Expression gegenüber der LPS-Kontrolle (+ = $p < 0,05$).

(C) 24 h L-AMB-Monoinkubation reduzierte signifikant die IL-6-Genexpression gegenüber der unstimulierten Kontrolle (* = $p < 0,05$). Die Ko-Inkubation mit LPS bei L-AMB und ITC bewirkte eine signifikante Reduktion der IL-6-Genexpression verglichen mit der LPS-Kontrolle (+ = $p < 0,05$).

4.1.3 Tumornekrosefaktor- α

Durch Monoinkubation mit L-AMB wurde die TNF- α -Expression in den THP-1-Monozyten supprimiert. Ein signifikanter Effekt war hier nach 6 h nachweisbar (L-AMB 6 h: $0,57 \pm 0,051$; * = $p < 0,05$). Die Inkubationen mit ANI und ITC bewirkten dagegen eine Steigerung der TNF- α -mRNA im zeitlichen Verlauf. Während nach 2 h für ANI-stimulierte Zellen noch kein eindeutig proinflammatorischer Effekt auszumachen war, stieg die Expression von TNF- α nach 6 h (ANI 6 h: $1,573 \pm 0,15$; * = $p < 0,05$) und schließlich nach 24 h auf ein Maximum (ANI 24 h: $2,695 \pm 0,676$; * = $p < 0,05$). Bei ITC war eine ähnliche Kinetik messbar. Hier wurde die TNF- α -Expression zu allen Zeitpunkten im Verlauf nach 24 h auf das nahezu 3fache gesteigert (ITC 2 h: $1,163 \pm 0,128$, ITC 6 h: $1,298 \pm 0,178$, ITC 24 h: $2,668 \pm 0,493$; * = $p < 0,05$) (Abbildung 13 A-C).

In LPS-stimulierten Zellen hatte L-AMB zu allen Zeitpunkten eine signifikant inhibierende Wirkung auf die mRNA-Expression von TNF- α , wobei sie nach 6 h am stärksten ausgeprägt war (L-AMB+LPS 2 h: $0,758 \pm 0,058$, L-AMB+LPS 6 h: $0,503 \pm 0,088$, L-AMB+LPS 24 h: $0,6 \pm 0,053$; + = $p < 0,05$). ANI hatte im Verhältnis zu ITC nur einen moderaten Einfluss auf die Expressionsrate: nach 24 h war eine signifikant gesteigerte TNF- α -Expression durch ANI nachweisbar (ANI+LPS 24 h: $1,648 \pm 0,613$; + = $p < 0,05$). ITC hatte dagegen durchgehend einen deutlichen proinflammatorischen Einfluss auf die LPS-stimulierten Monozyten mit einem Peak nach 24 h (ITC+LPS 2 h: $1,515 \pm 0,164$, ITC+LPS 6 h: $1,497 \pm 0,191$, ITC+LPS 24 h: $3,68 \pm 1,209$; + = $p < 0,05$) (Abbildung 13 A-C).

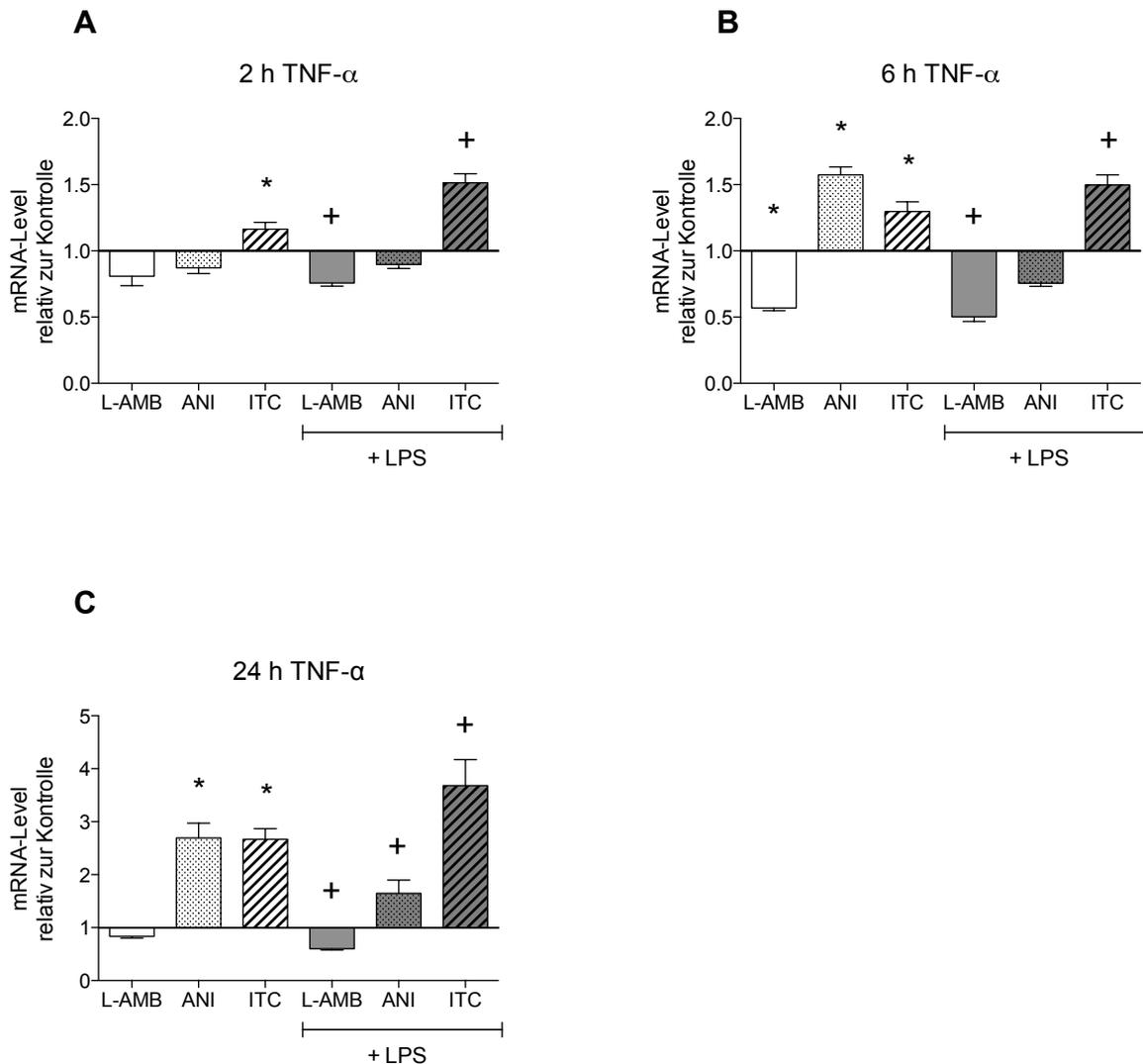


Abb. 13: mRNA-Expression von TNF- α unter Stimulation mit L-AMB, ANI und ITC in An- und Abwesenheit von LPS relativ zur unstimulierten und stimulierten Kontrolle (+LPS) zu den Messzeitpunkten 2 h, 6 h und 24 h.

(A) 2 h ITC-Monoinkubation erhöhte signifikant die TNF- α -Genexpression gegenüber der unstimulierten Kontrolle (* = $p < 0,05$), während die Expression durch Ko-Inkubation mit LPS bei L-AMB gegenüber der LPS Kontrolle signifikant erniedrigt, bei ITC dagegen signifikant erhöht war (+ = $p < 0,05$).

(B) Monoinkubation von L-AMB erniedrigte die Genexpression, die Monoinkubation mit ANI und ITC erhöhten dagegen die Genexpression gegenüber der unstimulierten Kontrolle (* = $p < 0,05$). In der LPS-Ko-Inkubation waren die TNF- α -Levels nach 6 h bei L-AMB signifikant niedriger und bei ITC signifikant höher verglichen mit der LPS-Kontrolle (+ = $p < 0,05$).

(C) 24 h ANI- und ITC-Monoinkubation erhöhte signifikant die TNF- α -Genexpression gegenüber der unstimulierten Kontrolle (* = $p < 0,05$). Die Ko-Inkubation mit LPS bei L-AMB bewirkte eine signifikante Reduktion, bei ANI und ITC jedoch eine signifikante Steigerung der TNF- α -Genexpression verglichen mit der LPS-Kontrolle (+ = $p < 0,05$).

4.2 Sekretion der Zytokine

Nach 24-stündiger Inkubation der THP-1-Monozyten mit den drei Antimykotika L-AMB, ANI und ITC in Kombination oder ohne LPS wurden die Zellkulturüberstände entnommen und darin durch ELISA-Untersuchungen die Proteinkonzentrationen (pg/ml) der drei Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α gemessen. Bei den in den Graphen angegebenen Werten handelt es sich um die absoluten Zytokinkonzentrationen (pg/ml).

4.2.1 Interleukin-1 β

Alle drei getesteten Antimykotika zeigten keinen Einfluss auf die Ausschüttung von IL-1 β in unstimulierten Zellen. Die Zugabe von LPS stellte für Monozyten einen potenten Stimulus für die IL-1 β -Sekretion dar ((-): 31,25 \pm 33,09 vs. (-)+LPS: 183 \pm 22,1; # = p<0,05). Bei der Ko-Stimulation mit den drei Antimykotika zusätzlich zu LPS hatten lediglich L-AMB und ITC einen Einfluss auf die Zytokinsekretion. L-AMB vermochte die Sekretion zu reduzieren ((-)+LPS: 183 \pm 22,1 vs. L-AMB+LPS: 135,8 \pm 13,85; + = p<0,05), während durch ITC deutlich erhöhte IL-1 β -Levels nach 24 h nachweisbar waren ((-)+LPS: 183 \pm 22,1 vs. ITC+LPS: 399,2 \pm 133,6; + = p<0,05). ANI hatte hier keinen signifikanten Einfluss.

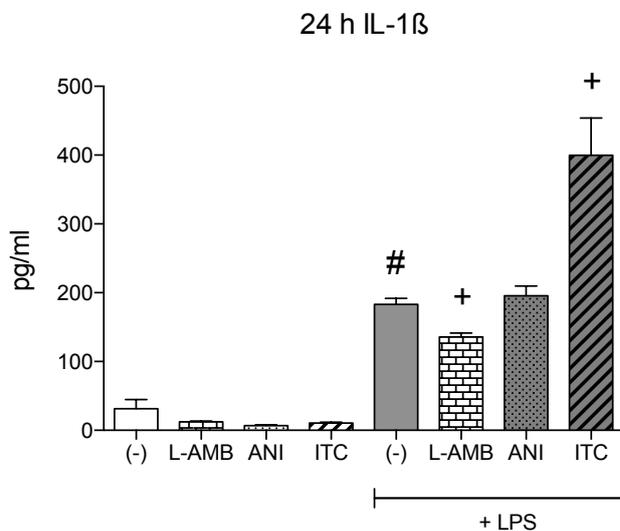


Abb. 14: Proteinkonzentration von IL-1 β in den Überständen von Monozyten, die mit L-AMB, ANI und ITC mit oder ohne LPS für 24 h inkubiert wurden verglichen mit unstimulierten Zellen (-) und LPS-stimulierten Zellen.

Nur in Ko-Inkubation mit LPS zeigten unstimulierte Zellen eine erhöhte IL-1 β -Sekretion (# = p<0,05). Die LPS-Ko-Inkubation bewirkte bei L-AMB und ITC signifikant erhöhte IL-1 β -Zytokinlevel verglichen mit der LPS-Kontrolle (+ = p<0,05).

4.2.2 Interleukin-6

Auch für IL-6 war keine signifikant veränderte Proteinkonzentration durch die Monoinkubation mit den Antimykotika im Überstand der Zellen nachweisbar. Erst die Zugabe von LPS löste eine erhöhte, jedoch nicht signifikante Proteinsekretion im Vergleich zu unbehandelten Zellen nach 24 h aus ((-): $5,495 \pm 10,84$ vs. (-)+LPS: $14,35 \pm 13,18$; ns). In der LPS-Gruppe regulierte die Ko-Inkubation mit L-AMB die IL-6-Ausschüttung deutlich herunter ((-)+LPS: $14,35 \pm 13,18$ vs. L-AMB+LPS: $3,328 \pm 3,65$; + = $p < 0,05$). LPS in Verbindung mit ANI oder ITC erbrachte keine signifikante Veränderung der Konzentration von IL-6 im Überstand.

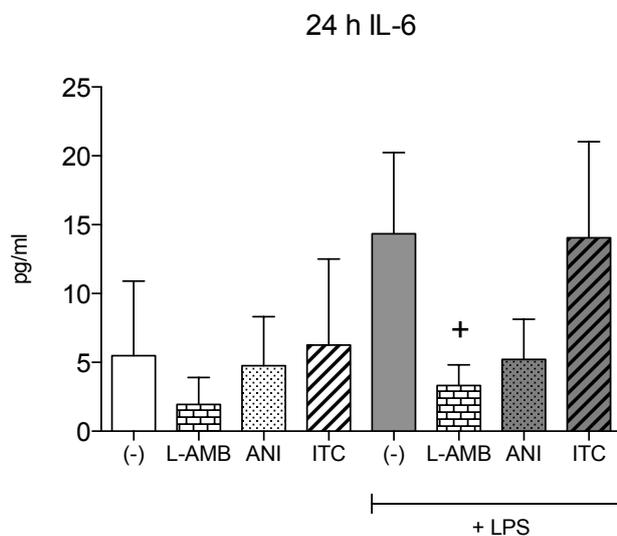


Abb. 15: Proteinkonzentration von IL-6 in den Überständen von Monozyten, die mit L-AMB, ANI und ITC mit oder ohne LPS für 24 h inkubiert wurden verglichen mit unstimulierten Zellen (-) und LPS-stimulierten Zellen.

Die LPS-Ko-Inkubation bei L-AMB zeigte eine signifikant reduzierte IL-6-Sekretion verglichen mit der LPS-Kontrolle (+ = $p < 0,05$).

4.2.3 Tumornekrosefaktor- α

Keines der untersuchten Antimykotika löste eine signifikante TNF- α -Sekretion durch unstimulierte Zellen aus. Die Proteinkonzentration war durch L-AMB- und ANI-Monoinkubation lediglich moderat erhöht. Die Zugabe von LPS zu den Monozyten bewirkte eine signifikant höhere Ausschüttung von TNF- α in das Medium ((-): $1,594 \pm 3,564$ vs. (-)+LPS: $105,4 \pm 91,94$; # = $p < 0,05$). In Kombination mit den Antimykotika ließen sich durch die Ko-Inkubation mit ANI und vor allem mit ITC deutlich erhöhte Zytokinpiegel verglichen mit der LPS-Kontrolle nachweisen ((-)+LPS: $105,4 \pm 91,94$ vs. ANI+LPS: $218,2 \pm 75,18$; + = $p < 0,05$ und ((-)+LPS: $105,4 \pm 91,94$ vs. ITC+LPS: $1289 \pm 186,4$; + = $p < 0,05$). Durch die Ko-Stimulation mit L-AMB dagegen lagen die Proteinkonzentrationen hier leicht unterhalb des LPS-Kontrollniveaus.

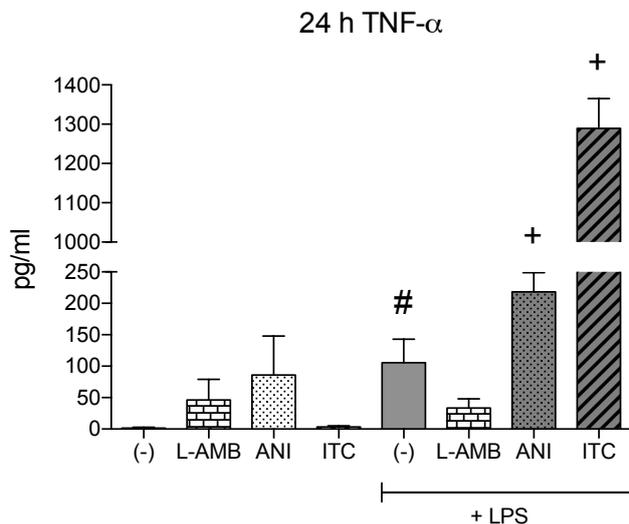


Abb. 16: Proteinkonzentration von TNF- α in den Überständen von Monozyten, die mit L-AMB, ANI und ITC mit oder ohne LPS für 24 h inkubiert wurden verglichen mit unstimulierten Zellen (-) und LPS-stimulierten Zellen.

Nur in Ko-Inkubation mit LPS zeigten unstimulierte Zellen eine erhöhte IL-1 β -Sekretion (# = $p < 0,05$). Die LPS-Ko-Inkubation bewirkte bei ANI und ITC signifikant erhöhte TNF- α -Zytokinlevel verglichen mit der LPS-Kontrolle (+ = $p < 0,05$).

4.3 Phagozytoserate

Um die Phagozytoseaktivität der THP-1-Monozyten zu quantifizieren, kam ein spezieller Phagozytose-Assay zum Einsatz (s.o.). Es wurde untersucht, ob die Phagozytose-Eigenschaften der Zellen durch die Inkubation mit den drei untersuchten Antimykotika L-AMB, ANI und ITC sowohl in LPS-stimulierten Zellen als auch in unstimulierten Zellen zu den gemessenen Zeitpunkten 2 h, 6 h und 24 h moduliert wurden. Die folgenden Graphen sowie die im Text angegebenen Werte beinhalten den jeweils gemessenen Anteil der phagozytoseaktiven Zellen an der Gesamtzellzahl in Prozent gegliedert nach den drei verwendeten Substanzen zu den drei Messzeitpunkten 2 h, 6 h und 24 h.

4.3.1 Phagozytoseverhalten nach 2 h

Zellen, die weder mit LPS noch mit AM behandelt wurden, zeigten nach zweistündiger Inkubation mit pHrodo-Partikeln eine basale Phagozytoserate von $34,22 \pm 10,49$ %. Die alleinige Ko-Inkubation mit den Antimykotika L-AMB, ANI und ITC hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Phagozytoseverhalten. Der LPS-Stimulus veränderte das Phagozytoseverhalten ebenfalls nicht signifikant. In Anwesenheit von LPS hatte lediglich ITC einen signifikant supprimierenden Effekt auf die Phagozytoserate ((-)+LPS: $29,68 \pm 3,226$ % vs. ITC+LPS: $16,12 \pm 3,321$ %; + = $p < 0,05$).

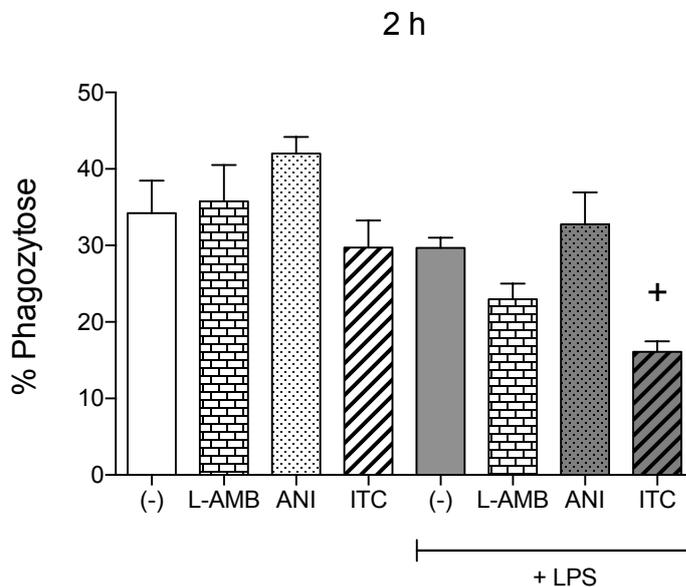


Abb. 17: Phagozytoseaktive Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl nach Inkubation mit L-AMB, ANI und ITC in Anwesenheit und Abwesenheit von LPS nach 2 h.

Allein durch Zugabe von ITC bewirkte die Ko-Inkubation mit LPS eine signifikante Reduktion der Phagozytose verglichen mit der LPS-Kontrolle (+ = $p < 0,05$).

4.3.2 Phagozytoseverhalten nach 6 h

Nach 6 h betrug die basale Phagozytoserate bei unstimulierten Zellen $21,35 \pm 4,342$ %. Durch die Monoinkubation mit L-AMB wurde der Anteil der phagozytoseaktiven Zellen verringert ((-): $21,35 \pm 4,342$ % vs. L-AMB: $16,3 \pm 3,204$ %; * = $p < 0,05$). ANI und ITC zeigten keine Modulation der Phagozytose nach 6 h. LPS-stimulierte Zellen phagozytierten verglichen mit unstimulierten Zellen signifikant mehr pHrodo-Partikel ((-): $21,35 \pm 4,342$ % vs. (-)+LPS: $38,58 \pm 7,694$ %; # = $p < 0,05$). Keine der drei Substanzen hatte einen Einfluss auf die Phagozytoseaktivität von LPS-stimulierten THP-1-Zellen.

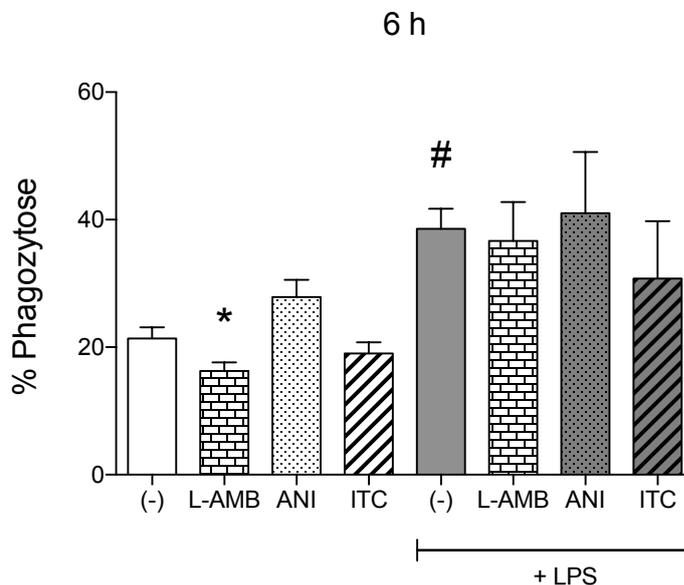


Abb. 18: Phagozytoseaktive Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl nach Inkubation mit L-AMB, ANI und ITC in Anwesenheit und Abwesenheit von LPS nach 6h.

6 h Monoinkubation mit L-AMB bewirkten in Zellen ohne LPS eine signifikante Reduktion der Phagozytoseaktivität im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle (* = $p < 0,05$). Zellen, die 6 h mit LPS stimuliert wurden, zeigten eine signifikante Steigerung der Phagozytose gegenüber der LPS-Kontrolle (# = $p < 0,05$).

4.3.3 Phagozytoseverhalten nach 24 h

Zum Messzeitpunkt 24 h waren die ausgeprägtesten phagozytosemodulierenden Effekte der getesteten Substanzen auszumachen. Zu diesem Zeitpunkt betrug die basale Phagozytoserate unstimulierter Zellen $18,41 \pm 8,14$ %. Durch ANI konnte der Phagozytoseanteil signifikant gesteigert werden ((-): $18,41 \pm 8,14$ % vs. ANI: $32,63 \pm 10,89$ %; * = $p < 0,05$). L-AMB und ITC hatten zu diesem Zeitpunkt keinen Effekt auf die Phagozytose. LPS-stimulierte Zellen wiesen eine deutlich höhere Phagozytoseaktivität auf als unstimulierte Monozyten ((-): $18,41 \pm 8,14$ % vs. (-)+LPS: $50,07 \pm 10,66$ %; # = $p < 0,05$). L-AMB reduzierte die Phagozytose unter Sepsisbedingungen signifikant ((-)+LPS: $50,07 \pm 10,66$ % vs. L-AMB+LPS: $32,68 \pm 10,87$ %; + = $p < 0,05$), um noch von ITC übertroffen zu werden ((-)+LPS: $50,07 \pm 10,66$ % vs. ITC+LPS: $10,34 \pm 2,213$ %; + = $p < 0,05$). Hier hatte ANI in Kombination mit LPS keinen signifikanten Effekt mehr auf die Phagozytoserate.

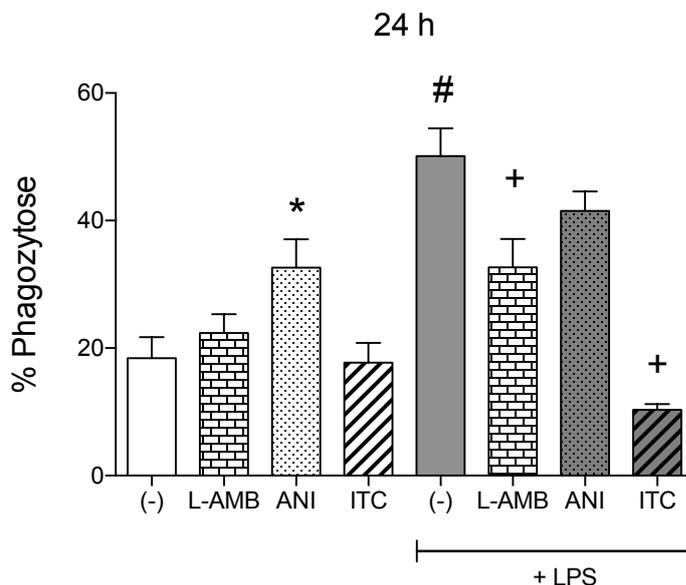


Abb. 19: Phagozytoseaktive Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl nach Inkubation mit L-AMB, ANI und ITC in Anwesenheit und Abwesenheit von LPS nach 24 h.

Die Monoinkubation mit ANI bewirkte eine signifikant erhöhte Phagozytoserate gegenüber der unstimulierten Kontrolle (* = $p < 0,05$). Die Zugabe von LPS erhöhte die Phagozytoseaktivität gegenüber unstimulierten Zellen (# = $p < 0,05$). Die zusätzliche Inkubation mit L-AMB und ITC reduzierte die Phagozytoserate gegenüber der LPS-Kontrolle signifikant (+ = $p < 0,05$).

5. Diskussion

Im Rahmen der Sepsis nehmen Pilzinfektionen einen wachsenden Stellenwert ein. Invasive Mykosen treten gehäuft bei Patienten auf Intensivstationen und sind häufig die Folge einer systemischen Bakteriämie (Chow et al., 2008; Eggimann et al., 1999). Bei diesen Patienten ist entweder ein exzessiver pro- oder antiinflammatorischer Immunstatus zu beobachten, wenn es zu einer Therapie mit antimykotischen Substanzen kommt. Eine mögliche Modulation des Immunsystems des Patienten durch Antimykotika könnte eine vielversprechende Strategie in der Behandlung der fungalen Sepsis darstellen. Betrachtet man die gegenwärtige Datenlage, wird schnell ersichtlich, dass antimykotische Substanzen einen direkten immunmodulatorischen Effekt auf Zellen des angeborenen Immunsystems ausüben. Im Fokus stand dabei hauptsächlich die Beeinflussung der Zytokinexpression auf Proteinebene – die Wirkung der Antimykotika auf übergeordnete Teilschritte der Genexpressionskaskade ist dagegen weitestgehend unbekannt. So soll die genauere Betrachtung der Zytokinexpression auf mRNA- und Proteinebene diesem Umstand Rechnung tragen. Neben Zytokinen, die als zelluläre Botenstoffe Entzündungsprozesse lenken, trägt auch das Phagozytoseverhalten der Immunzellen zur Stärke der Immunantwort bei. Das Ziel dieser Studie bestand daher in der Klärung der Fragestellung, ob bestimmte Antimykotika sowohl in Monoinkubation als auch innerhalb eines gram-negativen *in-vitro*-Sepsismodells durch Aktivierung mit LPS eine Modulation der Zytokinexpression und -sekretion bewirken sowie andererseits einen Einfluss auf das Phagozytoseverhalten der Monozyten haben.

5.1 Immunmodulatorische Effekte von Amphotericin-B

Die Substanz Amphotericin-B besitzt proinflammatorisches Potential: zahlreiche *in vitro*-Studien belegen, dass das früher häufig verwendete konventionelle, desoxycholathaltige Amphotericin-B (DAMB) in Immunzellen die Zytokinproduktion von IL-1 β und TNF- α (Vonk et al., 1998) sowie in Fibroblasten die Produktion von IL-6 erhöht (Tamai et al., 2012). Arning et al. konnten in ihrer Studie anhand von sechs Patienten mit systemischer Pilzinfektion zeigen, dass die durch intravenöse Behandlung mit DAMB induzierte

Erhöhung von proinflammatorischen Zytokinen im Plasma der Patienten mit den typischen klinischen Symptomen (s.o.) korreliert und für die Toxizität der Substanz verantwortlich ist (Arning et al., 1995). Es ist mittlerweile bekannt, dass AMB seine Wirkung hauptsächlich über eine TLR2-vermittelte Signalkaskade auslöst, die in Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B mündet (Sau et al., 2003). Im klinischen Gebrauch wurde DAMB größtenteils durch liposomale Formulierungen wie AmBisome (L-AMB) abgelöst. Sie weisen durch geringere Toxizität bei gleich bleibender Effektivität eine deutlich bessere Toleranz auf (Moen et al., 2009). Über die immunmodulatorischen Eigenschaften dieser neuen pharmazeutischen Formulierungen ist bisher wenig bekannt. Sie scheinen jedoch immunmodulatorische Effekte auszulösen, die denen von DAMB teilweise gegensätzlich sind.

In unseren Experimenten konnte gezeigt werden, dass L-AMB in Monostimulation die Genexpression von TNF- α und IL-1 β insgesamt reduzierte. Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Studien (Simitsopoulou et al., 2005; Arning et al., 1995). Vor allem für IL-6 lag das mRNA-Level zu allen drei Zeitpunkten deutlich unterhalb des Kontrollniveaus. Insgesamt zeigten sich auf Proteinebene keine Unterschiede für die untersuchten Zytokine durch die L-AMB-Monostimulation, was dafür spricht, dass die Substanz keinen wesentlichen Einfluss auf die übergeordneten Translationsprozesse ausübt. Es konnte hier gezeigt werden, dass die antiinflammatorischen Eigenschaften von L-AMB jedoch deutlich gesteigert werden, wenn LPS als Ko-Stimulans zur Aktivierung der Monozyten benutzt wird. Gerade diese Erkenntnisse könnten von großer Relevanz bei Sepsis-Patienten sein: Die TNF- α - und IL-6-Genexpression wurde durch L-AMB in LPS-aktivierten Monozyten signifikant reduziert. Die nach 24 h gemessenen Proteinkonzentrationen korrelierten mit dem Transkriptionsverhalten und waren entsprechend erniedrigt gegenüber den LPS-Kontrollen. Interessanterweise war die Genexpression von IL-1 β durch Ko-Stimulation mit LPS und L-AMB zu den frühen Zeitpunkten 2 h und 6 h signifikant erhöht gegenüber der Expression der LPS-Kontrollen, um nach 24 h unterhalb des Kontrollniveaus zu fallen. Auf Proteinebene zeigte sich nach 24 h eine signifikant erniedrigte IL-1 β -Konzentration durch die Ko-Stimulation mit L-AMB und LPS im Vergleich zur LPS-Kontrolle. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die L-AMB induzierte Steigerung des IL-1 β -mRNA-Levels zu den frühen Zeitpunkten nur Kurzeiteffekte sind und nicht zu einem anschließenden IL-1 β -Anstieg führen.

Dass mRNA- und Proteinsynthese nicht automatisch miteinander korrelieren und transkriptionelle, postranskriptionelle und translationale Mechanismen differentiell reguliert werden, konnten Schindler et al. in ihrer Studie anhand von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) für IL-1 β zeigen: So akkumulierte IL-1 β -mRNA durch einen Stimulus wie Zelladhärenz am Glas eines Inkubationsgefäßes ohne detektierbare Proteinsynthese. Erst durch den zusätzlichen Stimulus LPS erfolgte die Proteinsynthese und der Nachweis von IL-1 β im Medium (Schindler et al., 1990).

Gerade von IL-1 β ist bekannt, dass nicht nur die absolute Menge des Proteins sondern auch das Verhältnis zwischen IL-1 β und dessen natürlichem Gegenspieler IL-1 β -Rezeptor-Antagonist (IL-1ra), der die potente biologische Aktivität von IL-1 β hemmt, ein weiterer ausschlaggebender Faktor in der Initiation einer inflammatorischen Reaktion ist (Vonk et al., 1998; Arondel et al., 1999; Goodwin et al., 1995). So weiß man, dass nicht nur IL-1 β sondern auch IL-1ra durch DAMB, ebenso wie durch LPS, hochreguliert wird (Rogers et al., 1998). Um hier eine Aussage über die Ratio IL-1 β /IL-1ra zu treffen und eine mögliche Regulierung durch L-AMB herauszuarbeiten, wäre eine zusätzliche Messung des Genexpressionsprofils und der Proteinkonzentration von IL-1ra hilfreich.

Auch wenn insgesamt wenig über die genauen zu Grunde liegenden Mechanismen der Immunmodulation durch L-AMB gesagt werden kann, so bleibt jedoch festzuhalten, dass L-AMB einen Einfluss auf die Zytokinexpression in einem Sepsis-Modell besitzt und dass dieser Einfluss sich von dem anderer Amphotericin-B-Formulierungen wie DAMB unterscheidet. Da sich die antimikrobielle Komponente in den Formulierungen nicht verändert, liegt die Vermutung nahe, dass die Liposomen, in denen AMB „verpackt“ ist, ein antiinflammatorisches Potential besitzen. Hier liefern Studien anderer Arbeitsgruppen tiefere Erkenntnisse:

Es konnte gezeigt werden, dass Liposomen, die im *in vitro*-Modell mit LPS aktivierten Monozyten oder Neutrophilen ko-inkubiert wurden, antiinflammatorische Eigenschaften besaßen. Durch die Liposomen wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht und dadurch Ca²⁺-abhängige Kinasen inhibiert, die für die Initiierung einer proinflammatorischen Antwort verantwortlich sind. Auch *in vivo* reduzierte die Infusion von Liposomen bei Ratten die Endotoxin-induzierte Mortalität signifikant (Eierman et al., 1995). Bellocchio et al. fanden heraus, dass L-AMB seine antiinflammatorische Wirkung über einen Signal-Shift von TLR2 zu TLR4 ausübt. L-AMB induziert über den TLR4-vermittelten

Signalweg vermehrt die Synthese von dem antiinflammatorischen Zytokin IL-10 und supprimiert die Synthese von TNF- α (Abbildung 20). L-AMB ist zudem in der Lage, die Genexpression von TLR4 in Immunzellen zu triggern (Bellocchio et al., 2005). Diese Erkenntnisse tragen zur Bestätigung der allgemeinen Hypothese bei, dass die TLR4-Aktivierung eher mit der Induktion antiinflammatorischer Mechanismen assoziiert ist und stellen eine mögliche Erklärung für die potenten antiinflammatorischen Eigenschaften von L-AMB in LPS-aktivierten Monozyten dar, entweder durch ein konkurrierendes Verhalten von L-AMB und dem TLR4-Liganden LPS oder durch synergistische Bindungseffekte von L-AMB und LPS.

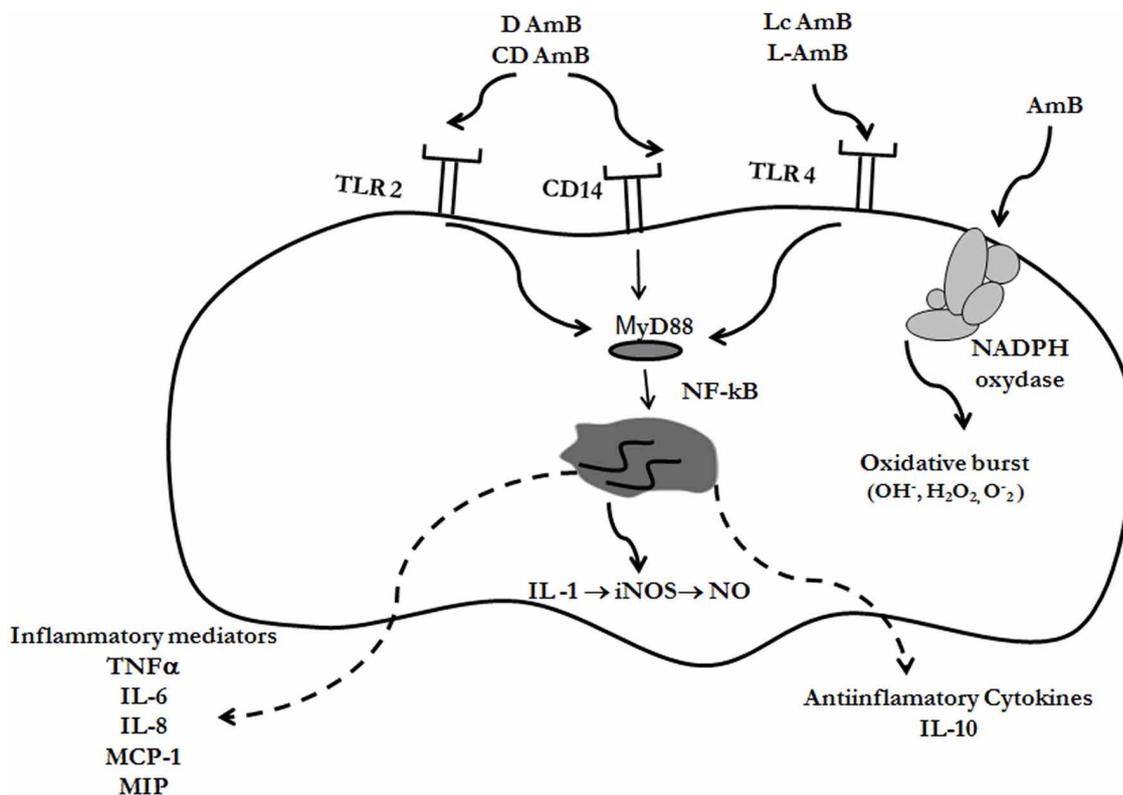


Abb. 20: Die antiinflammatorische Wirkung von liposomalem Amphotericin-B (LAMB) ist Toll-like Rezeptor 4 (TLR4)-vermittelt. Desoxycholathaltiges Amphotericin-B (DAMB) induziert dagegen über die Bindung an TLR2 die Initiierung proinflammatorischer Kaskaden mit der vermehrten Produktion inflammatorischer Mediatoren wie TNF- α und IL-6. (modifiziert nach Bellocchio et al., 2005)

Es gibt Hinweise auf eine erhöhte Eliminierungsaktivität von Monozyten durch die Ko-stimulation mit Amphotericin-B (Dotis et al., 2008). Auch andere Studien konnten einen Trend zur erhöhten Phagozytoserate durch AMB nachweisen. Unsere Daten zeigten für L-AMB-stimulierte Monozyten lediglich einen Trend hin zur gesteigerten Phagozytoseaktivität. In LPS-stimulierten Monozyten dagegen wurde durch L-AMB das Phagozytoseverhalten inhibiert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass L-AMB die Phagozytose von Pathogenen in einer bakteriellen Sepsis reduziert.

5.2 Immunmodulatorische Effekte von Anidulafungin

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Anidulafungin einen Einfluss auf das Expressions- und Sekretionsverhalten der getesteten proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β ausübt. Allerdings liegt hier kein einheitliches proinflammatorisches bzw. antiinflammatorisches Muster vor, sondern eher eine differentielle Regulierung der Zytokine:

Verneinbar mit unseren Daten konnten auch andere Arbeitsgruppen demonstrieren, dass die Ko-Inkubation von ANI mit *Candida albicans* die TNF- α -Proteinproduktion in THP-1-Zellen steigert. In unseren Ergebnissen zeigte sich zudem, dass erhöhte TNF- α -mRNA-Level mit erhöhten TNF- α -Proteinkonzentrationen im Überstand korrelieren. Vor allem in LPS-stimulierten Zellen war durch die Zugabe von ANI signifikant mehr TNF- α im Zellüberstand nach 24 h gegenüber der LPS-Kontrollen nachweisbar, während sich durch die ANI-Monoinkubation lediglich ein Trend zu einer vermehrten Zytokinausschüttung im Vergleich zu unstimulierten Zellen zeigte. Dies lässt verstärkte proinflammatorische Eigenschaften der Substanz bei gleichzeitiger Anwesenheit einer Endotoxämie vermuten und könnte für Patienten mit Sepsis eine entscheidende Rolle für das Therapieregime darstellen.

Die Ko-Stimulation der Monozyten mit ANI und LPS zeigte einen signifikanten Anstieg der IL-1 β -mRNA zu den frühen Zeitpunkten 2 h und 6 h. ANI-Monostimulation zeigte ähnliche Effekte lediglich nach 24 h. Für IL-6 war eine gegensätzliche Regulation durch ANI nachweisbar. Hier supprimierte die Monostimulation mit ANI die IL-6-Genexpression nach 2 h und 6 h signifikant und auch in Kombination mit LPS war signifikant weniger IL-6-mRNA nachweisbar gegenüber den Kontrollen. Trotz des unterschiedlichen Expressionsmusters der beiden Zytokine zeigte sich weder für IL-1 β noch für IL-6 ein signifikan-

ter Effekt auf die Proteinkonzentration nach 24 h. Dies deckt sich mit Daten anderer Studien (Baltch et al., 202). Autoren unterschiedlicher Arbeitsgruppen vermuten, dass die Kombination einer Infektion (LPS) und einem Echinocandin wahrscheinlich zu inhibitorischen Effekten auf das endoplasmatische Retikulum der Zellen und somit auf die Sekretion der Zytokine führt (Rapp und Kaufmann, 2003; Rutkowski und Kaufman, 2004). Eine andere Möglichkeit für die Diskrepanz zwischen Zytokin-mRNA und Proteinkonzentration besteht in einem negativen Feedback-Mechanismus der Proteine auf die intrazelluläre Translation (Chakrabarti et al., 2011; Hotamisligil et al., 2010).

In vitro - Studien anderer Arbeitsgruppen konnten eine deutlich reduzierte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, unter anderem auch TNF- α , IL-1 β und IL-6, in LPS stimulierten Makrophagen nach Zugabe von ANI nachweisen (Baltch et al., 2012; Baltch et al., 2012). Ein solch eindeutiger antiinflammatorischer Trend war in unseren Untersuchungen nicht nachweisbar, im Gegenteil hatte ANI hier durch die erhöhten TNF- α -Konzentrationen eher proinflammatorischen Charakter. Allerdings wurden in den erwähnten, vergleichbaren Studien Makrophagen-Monolayer untersucht, die aus Mäusen kultiviert wurden und somit eine andere Zellintegrität sowie eine differentielle Kommunikation der Zellen untereinander bieten. Studien mit Fokus auf THP-1-Zellen und TNF- α konnten einen eher antiinflammatorischen Effekt durch die Ko-Stimulation mit einem Echinocandin nachweisen (Kinoshita et al., 2006). Hier handelte es sich jedoch um Micafungin, das zwar zur selben Substanzklasse wie ANI gehört, jedoch in seiner chemischen Struktur unterschiedlich ist. Es kann nur spekuliert werden, über welche Bindungsstellen des Moleküls ein immunmodulatorischer Effekt ausgelöst wird. Zum anderen wurde nicht das Endotoxin LPS verwendet, sondern *Candida albicans*, das im Gegensatz zu LPS nicht selektiv TLR4-abhängig wirkt. Bei *Candida albicans* wird die Inflammationskaskade sowohl durch TLR4 als auch durch TLR2, in der Hauptsache aber durch TLR2, induziert (Gil und Gozalbo, 2006; Gil und Gozalbo 2009).

Die Datenlage zur Beeinflussung des Phagozytoseverhaltens durch Echinocandine ist sehr dünn und widersprüchlich. Frank et al. konnten nachweisen, dass die Monoinkubation mit ANI die intrazelluläre Elimination von *Candida albicans* in humanen Phagozyten stimuliert (Frank et al., 2004). In der hier vorliegenden Studie ließ sich eine erhöhte Phagozytoseaktivität nach Monoinkubation mit ANI nachweisen, während bei LPS-Ko-Stimulation keine Unterschiede im Phagozytoseverhalten zu beobachten waren. Dies

legt die Vermutung nahe, dass potenziell gesteigerte immunmodulatorische Effekte nach Zugabe von ANI unter septischen Bedingungen abgeschwächt werden.

5.3 Immunmodulatorische Effekte von Itraconazol

Das Azol-Antimykotikum ITC, das zunehmend häufiger in der Therapie der systemischen Aspergillose Verwendung findet (Zonios et al., 2008), unterschied sich hier deutlich in seiner Wirkung auf die THP-1-Monozyten von den Substanzen AMB und ANI.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten signifikant erhöhte Proteinkonzentrationen für TNF- α und IL-1 β nach 24 h Ko-Stimulation mit ITC und LPS gegenüber den LPS-Kontrollen. Der erhöhte Zytokingehalt korrelierte hier mit ebenfalls deutlich erhöhten mRNA-Levels. Zunächst wurde auch die IL-6-Genexpression unter LPS-Aktivierung und ITC-Ko-Stimulation hochreguliert, um nach 24 h jedoch signifikant unterhalb des LPS-Kontrollniveaus zu fallen. Auf Proteinebene zeigte sich für IL-6 nach der Ko-Stimulation mit ITC und LPS kein Unterschied im Vergleich zur LPS-Kontrolle. Insgesamt sind nach unseren Beobachtungen deutliche proinflammatorische Effekte durch ITC in LPS-aktivierten Monozyten auszumachen. Fehlte der LPS-Stimulus, so war keine eindrucksvolle Modulation der Zytokinproduktion zu beobachten. Die Ergebnisse dieser Studie ließen sich auch durch andere Arbeitsgruppen nachweisen: Kato et al. berichteten von vermehrter IL-1 β - und TNF- α -Produktion in Mausimmunzellen durch ITC- und LPS-Ko-Stimulation *in vitro* (Kato et al., 2010).

Frey et al. konnten in ihrer Studie aus dem Jahr 2009 zeigen, dass ITC in Makrophagen die Expression von CD14 auf der Zelloberfläche erhöht. CD14 dient als membranständiges Glykoprotein der Bindung von LPS und konsekutiv der Aktivierung intrazellulärer Transkriptionsfaktoren, die für die Synthese zahlreicher proinflammatorischer Zytokine verantwortlich sind. Die erhöhte CD14-Expression korrelierte mit einer gesteigerten TNF- α -Produktion dieser Zellen nach Zugabe von LPS und ITC (Frey et al., 2009). Diese Resultate decken sich mit denen dieser Arbeit und liefern möglicherweise einen wichtigen Einblick in die immunmodulatorischen Mechanismen von ITC. Die Substanz scheint schon direkt zu Beginn der Signalkaskade der Inflammation anzusetzen, was sich in dem hier dargestellten Zytokinmuster widerspiegelt: Die gesteigerte Genexpression zieht konsekutiv auch eine erhöhte Zytokinproduktion nach sich. Bei den beiden

anderen Substanzen L-AMB und ANI war eine differentielle Regulierung von Transkription und Zytokinproduktion zu sehen, was ein Eingreifen dieser beiden Substanzen in nachgeschaltete intrazelluläre Prozesse der Signalwege vermuten lassen könnte.

Schon früh war bekannt, dass ITC auch immunsuppressive Wirkung besitzt. So hemmt es z.B. die T-Lymphozyten-Proliferation *in vitro* (Pawelec et al., 1991; Pawelec et al., 1991). Die Eigenschaft der Glykosylierung durch ITC führt zu einer Akkumulation von High-Mannose-Glykoproteinen auf der Zelloberfläche von Makrophagen mit der Folge einer deutlichen Abnahme der Phagozytosefähigkeit dieser Zellen (Nino et al., 2014). Auch in dieser Studie hatte ITC bei Zellen unter Sepsis-ähnlichen Bedingungen eine signifikante Abnahme der Phagozytoserate sowohl zum frühen Zeitpunkt nach 2 h als auch im Langzeitverlauf nach 24 h zur Folge. Die hier erhobenen Daten zeigen zum ersten Mal, dass die Inkubation von LPS-aktivierten Monozyten mit ITC die Phagozytoseaktivität dieser Zellen deutlich reduziert gegenüber LPS-Kontrollen. Diese Erkenntnis könnte von großer, klinischer Wichtigkeit bei kritisch kranken Patienten sein.

Die Betrachtungen in dieser Arbeit legen nahe, dass ITC in der Lage ist, das Muster von Oberflächenproteinen auf Monozyten und Makrophagen zu alterieren. Damit übt die Substanz einen deutlichen Effekt auf Immunzellen aus. Vor dem Hintergrund, dass ITC vor allem bei immunkompromittierten Patienten eingesetzt wird, bedarf es hier weiterführende Untersuchungen zu den zugrunde liegenden Mechanismen.

5.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die in der Einleitung skizzierten Aussagen experimenteller Studien, dass Antimykotika zu einer direkten immunmodulatorischen Einflussnahme auf Zellen der angeborenen Immunität fähig sind. Aus der Gegenüberstellung der eigenen Resultate mit Forschungsergebnissen anderer Publikationen ergaben sich teils Übereinstimmungen, teils auch deutliche Differenzen. In diesem Zusammenhang ist festzuhalten, dass die systematische Untersuchung einer Monozyten-Zelllinie hinsichtlich ihrer Reaktion auf unterschiedliche Antimykotika in einem Sepsis-Modell in dieser Form einzigartig ist. Die Untersuchung der Zytokine sowohl auf Tran-

skriptionsebene als auch auf Proteinebene bot die Möglichkeit, teilweise auf die jeweilige vermutete Lokalisation der Wirkung der untersuchten Antimykotika zu schließen. So zeigte sich, dass ITC seine proinflammatorische Wirkung vermutlich durch eine Alterierung der membranständigen Proteine und somit zu Beginn der Inflammationskaskade ausübt. Auch die verringerte Phagozytoserate, die vor allem bei ITC und L-AMB beobachtet werden konnte, scheint auf diesen Mechanismus zurückzuführen zu sein. Bei L-AMB scheint die Umhüllung des Moleküls in Liposomen einen wesentlichen Einfluss darauf zu haben, über welchen TLR (TLR2 oder TLR4) die Zytokinexpression und -sekretion induziert wird. Gerade am Beispiel der Substanz ANI wurde deutlich, dass Zytokinexpression und -sekretion durch unterschiedliche Stimuli reguliert werden.

Insgesamt sind die gewonnenen Erkenntnisse als Beleg dafür zu werten, dass die untersuchten Antimykotika entsprechend ihrer strukturellen Heterogenität auch ein vielfältiges Spektrum an immunmodulatorischen Eigenschaften besitzen. Zudem machten die Ergebnisse dieser Studie deutlich, dass der regulatorische Effekt von Amphotericin, Anidulafungin und Itraconazol vor allem in LPS-aktivierten Monozyten zu beobachten war. Diese Erkenntnis stellt explizit die Rolle von im klinischen Alltag angewandten Antiinfektiva in der Beeinflussung der systemischen Inflammation unabhängig vom konventionellen antiinfektiven Wirkungsmechanismus heraus. Die Sepsis ist ein kompliziertes Krankheitsbild, das durch eine entgleiste systemische Entzündungsreaktion gekennzeichnet ist. Der differenzierte Einsatz von Antimykotika, die in der etablierten Sepsistherapie häufig einen festen Platz einnehmen, könnte zusätzlich eine Steuerung des Immunstatus zu Gunsten des septischen Patienten ermöglichen. Um ein vielschichtigeres Verständnis der immunmodulatorischen Wirkungsweise der untersuchten Antimykotika zu erlangen und so auch das Konzept der Antimykotika-vermittelten Immunmodulation langfristig auf klinische Anwendbarkeit zu überprüfen, wäre eine weitere Vertiefung der hier gewonnenen Ergebnisse im Rahmen von *in vivo*-Experimenten sowie zellulären Inhibitorstudien wünschenswert.

6. Zusammenfassung

Die Sepsis bleibt trotz intensivmedizinischer Maximaltherapie ein Krankheitsbild mit hoher Letalität. Neben supportiven intensivmedizinischen Maßnahmen ist die Gabe von Antiinfektiva die zentrale Säule in der Therapie der systemischen Infektion. Es ist mittlerweile allgemein bekannt, dass Antibiotika modulierend in die unterschiedlichsten Immunzellfunktionen wie Chemotaxis, Phagozytose und Zytokinproduktion eingreifen können und somit einen potenziellen neuen Behandlungsansatz darstellen. Zunehmend stellen bei der Sepsis neben bakteriellen Erregern auch Pilzerreger eine große Gefahr für die Patienten dar, häufig im Rahmen einer sekundären Superinfektion oder einer reinen Pilzsepsis. So erweitert sich auch das antimikrobielle Spektrum der Pharmaka um den Einsatz von Antimykotika. Zu dieser Substanzgruppe ist zurzeit nur sehr wenig über potenzielle Interaktionen mit der angeborenen Immunität bekannt.

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob drei im klinischen Alltag häufig verwendete Antimykotika unterschiedlicher Substanzklassen (L-AMB, ANI und ITC) in der Lage sind, in LPS-stimulierten und unstimulierten THP-1-Zellen die Expression und Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α über den zeitlichen Verlauf von 2 h, 6 h und 24 h zu regulieren. Zudem wurde der Effekt der drei Substanzen auf die Phagozytoserate der Zellen im zeitlichen Verlauf untersucht.

In Anwesenheit von LPS war L-AMB als hauptsächlich antiinflammatorisch wirkende Substanz zu identifizieren. Es reduzierte die Sekretion aller drei Zytokine verglichen mit LPS-Kontrollen. Größtenteils erfuhren auch die entsprechenden mRNA-Levels von TNF- α , IL-1 β und IL-6 eine Downregulation durch die Ko-Inkubation mit LPS und L-AMB im Langzeitverlauf. ITC dagegen zeigte unter Sepsisbedingungen eindeutig proinflammatorisches Potential, indem es die Ausschüttung von IL-1 β und TNF- α signifikant steigerte. Auch auf Genexpressionsebene war hier ein signifikanter Anstieg der mRNA aller drei Zytokine zu den meisten Messzeitpunkten zu beobachten. ANI vermochte auf Genexpressionsebene die drei Zytokine differentiell zu regulieren, während im Zellüberstand lediglich TNF- α erhöht messbar war. Die Substanzen hatten in Monoinkubation unterschiedliche Einflüsse auf die Zytokin-mRNA-Produktion, jedoch ohne konsekutiven Ein-

fluss auf die Proteinausschüttung. Hier zeigten sich keine Unterschiede gegenüber den unstimulierten Kontrollen.

Auf das Phagozytoseverhalten hatten vor allem L-AMB und ITC einen Einfluss. Beide Substanzen reduzierten die Phagozytoseaktivität in LPS-stimulierten Monozyten.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass drei strukturell nicht miteinander verwandte Antimykotika in mit LPS stimulierten humanen Monozyten einen differentiellen Einfluss auf die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und auch auf deren Sekretion ausüben. Ein Einfluss auf das Phagozytoseverhalten konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Bestätigen sich die unter *in vitro*-Bedingungen erzielten Ergebnisse auch in weiterführenden *in vivo*-Studien, besteht die Möglichkeit, durch Ausnutzung der immunmodulatorischen Eigenschaften der Antimykotika das Muster der Immunantwort bei septischen Patienten zu steuern und auf diese Weise die Mortalitätsrate beeinflussen zu können.

7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

	Titel	Seite
Tab. 1:	Zusammensetzung der unterschiedlichen Stimulationsmedien	31
Tab. 2:	Übersicht über die verwendeten Antimykotika mit ihren Zielkonzentrationen im Stimulationsansatz	31
Tab. 3:	Programmablauf der Reversen-Transkriptase-PCR im Thermocycler	33
Tab. 4:	Überblick über die einzelnen Inkubationsschritte der qRT-PCR	37
Abb. 1:	Kriterien für das Vorliegen eines <i>SIRS</i>	10
Abb. 2:	Krankheitskontinuum Sepsis	11
Abb. 3:	Immunantwort bei drei hypothetischen Patienten mit Sepsis	13
Abb. 4:	TLR4-abhängiger Signaltransduktionsweg	20
Abb. 5:	Überblick über die zahlreichen intrazellulären Kaskaden, die durch die Bindung eines opsonierten Pathogens an den jeweiligen Rezeptor initiiert werden	25
Abb. 6:	Immunmodulatorische Eigenschaften durch Amphotericin-B, Triazole und Echinocandine	27
Abb. 7:	Schematische Darstellung des Versuchsablaufs für die Stimulationsversuche	32
Abb. 8:	Darstellung des Funktionsprinzips der qRT-PCR	35
Abb. 9:	Schematische Darstellung der Phagozytose-Messung	39
Abb. 10:	Detektion von DsRed-positiven Zellen im FACS-Gerät	40

Abb. 11:	mRNA-Expression von IL-1 β	44
Abb. 12:	mRNA-Expression von IL-6	46
Abb. 13:	mRNA-Expression von TNF- α	48
Abb. 14:	Proteinkonzentration von IL-1 β	50
Abb. 15:	Proteinkonzentration von IL-6	51
Abb. 16:	Proteinkonzentration von TNF- α	52
Abb. 17:	Phagozytoseaktive Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl nach Inkubation mit L-AMB, ANI und ITC in Anwesenheit und Abwesenheit von LPS nach 2 h	54
Abb. 18:	Phagozytoseaktive Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl nach Inkubation mit L-AMB, ANI und ITC in Anwesenheit und Abwesenheit von LPS nach 6 h	55
Abb. 19:	Phagozytoseaktive Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl nach Inkubation mit L-AMB, ANI und ITC in Anwesenheit und Abwesenheit von LPS nach 24 h	56
Abb. 20:	Antiinflammatorische Wirkung von LAMB durch TLR-4-vermittelt im direkten Vergleich zum DAMB induzierten TLR-2-vermittelten Signalweg	60

8. Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, USA: Elsevier Saunders; 2011

Abu-Salah KM. Amphotericin B: an update. *Br J Biomed Sci* 1996; 53: 122-133

Aderka D, Le JM, Vilcek J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *J Immunol* 1989; 143: 3517-3523

Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH 2009.

American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-874

Arning M, Kliche KO, Heer-Sonderhoff AH, Wehmeier A. Infusion-related toxicity of three different amphotericin B formulations and its relation to cytokine plasma levels. *Mycoses* 1995; 38: 459-465

Aronel J, Singer M, Matsukawa A, Zychlinsky A, Sansonetti PJ. Increased interleukin-1 (IL-1) and imbalance between IL-1 and IL-1 receptor antagonist during acute inflammation in experimental Shigellosis. *Infect Immun* 1999; 67: 6056-6066

Baltch AL, Lawrence DA, Ritz WJ, Andersen NJ, Bopp LH, Michelsen PB, Carlyn CJ, Smith RP. Effects of echinocandins on cytokine/chemokine production by human monocytes activated by infection with *Candida glabrata* or by lipopolysaccharide. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 72: 226-233

Baltch AL, Lawrence D, Ritz WJ, Andersen N, Bopp LH, Michelsen PB, Carlyn CJ, Smith RP. Effects of anidulafungin and voriconazole, singly and in combination, on cytokine/chemokine production by human monocyte-derived macrophages infected with *Candida glabrata* or activated by lipopolysaccharide. *Chemotherapy* 2012; 58: 146-151

Bellocchio S, Gaziano R, Bozza S, Rossi G, Montagnoli C, Perruccio K, Calvitti M, Pitzurra L, Romani L. Liposomal amphotericin B activates antifungal resistance with reduced toxicity by diverting Toll-like receptor signalling from TLR-2 to TLR-4. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 214-222

Ben-Ami R, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Immunocompromised hosts: immunopharmacology of modern antifungals. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 226-235

Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 1996; 77: 110-117

- Bode C, Muenster S, Diedrich B, Jahnert S, Weisheit C, Steinhagen F, et al. Linezolid, vancomycin and daptomycin modulate cytokine production, Toll-like receptors and phagocytosis in a human in vitro model of sepsis. *J Antibiot (Tokyo)* 2015
- Bolard J. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim Biophys Acta* 1986; 864: 257-304
- Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996; 24: 1125-1128
- Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992; 101: 1481-1483
- Boogaerts M, Winston DJ, Bow EJ, Garber G, Reboli AC, Schwarzer AP, Novitzky N, Boehme A, Chwetzoff E, De Beule K. Intravenous and oral itraconazole versus intravenous amphotericin B deoxycholate as empirical antifungal therapy for persistent fever in neutropenic patients with cancer who are receiving broad-spectrum antibacterial therapy. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2001 Sep; 135: 412-422
- Borden EC, Chin P. Interleukin-6: a cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles. *J Lab Clin Med* 1994; 123: 824-829
- Brunkhorst FM. [Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2006; 41: 43-44
- Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, Michie HR, Stanford GG, van der Meer JW, Endres S, Lonnemann G, Corsetti J, Chernow B. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis* 1990; 161: 79-84
- Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 1993; 119: 771-778
- Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD. A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng* 2011; 108: 2777-2793
- Chapman PB, Lester TJ, Casper ES, Gabrilove JL, Wong GY, Kempin SJ, Gold PJ, Welt S, Warren RS, Starnes HF. Clinical pharmacology of recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 1987; 5: 1942-1951
- Chow JK, Golan Y, Ruthazer R, Karchmer AW, Carmeli Y, Lichtenberg DA, Chawla V, Young JA, Hadley S. Risk factors for albicans and non-albicans candidemia in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2008; 36: 1993-1998
- Cleary JD, Chapman SW, Nolan RL. Pharmacologic modulation of interleukin-1 expression by amphotericin B-stimulated human mononuclear cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 977-981

Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 53-72

Cronin L, Cook DJ, Carlet J, Heyland DK, King D, Lansang MA, et al. Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med* 1995; 23: 1430-1439

Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P, Lamy M. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg* 1992; 215: 356-362

Dasu MR, Devaraj S, Jialal I. High glucose induces IL-1beta expression in human monocytes: mechanistic insights. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E337-346

Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock 2012. *Intensive Care Med* 2013; 39: 165-228

Dinarello CA. The endogenous pyrogens in host-defense interactions. *Hosp Pract* 1989; 24: 111-5, 8, 21 passim.

Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991; 77: 1627-1652

Dinarello CA, Thompson RC. Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today* 1991; 12: 404-410

Dotis J, Simitsopoulou M, Dalakiouridou M, Konstantinou T, Panteliadis C, Walsh TJ, Roilides E. Amphotericin B formulations variably enhance antifungal activity of human neutrophils and monocytes against *Fusarium solani*: comparison with *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 810-817

Dunne DW, Resnick D, Greenberg J, Krieger M, Joiner KA. The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 1863-1867

Dupont B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 31-36

Eggimann P, Francioli P, Bille J, Schneider R, Wu MM, Chapuis G, Chiolerio R, Pannatier A, Schilling J, Geroulanos S, Glauser MP, Calandra T. Fluconazole prophylaxis prevents intra-abdominal candidiasis in high-risk surgical patients. *Critical Care Med* 1999; 27: 1066-1072

Eierman DF, Yagami M, Erme SM, Minchey SR, Harmon PA, Pratt KJ, Janoff AS. Endogenously opsonized particles divert prostanoid action from lethal to protective in models of experimental endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 2815-2819

Endo S, Inada K, Inoue Y, Kuwata Y, Suzuki M, Yamashita H, Hoshi S, Yoshida M. Two types of septic shock classified by the plasma levels of cytokines and endotoxin. *Circ Shock* 1992; 38: 264-274

Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007; 33: 606-618

Fong Y, Tracey KJ, Moldawer LL, Hesse DG, Manogue KB, Kenney JS, Lee AT, Kuo GC, Allison AC, Lowry SF. Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *J Exp Med* 1989; 170: 1627-1633

Frank U, Greiner M, Engels I, Daschner FD. Effects of caspofungin (MK-0991) and anidulafungin (LY303366) on phagocytosis, oxidative burst and killing of *Candida albicans* by human phagocytes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 729-731

Frey T, De Maio A. The antifungal agent itraconazole induces the accumulation of high mannose glycoproteins in macrophages. *J Biol Chem* 2009; 284: 16882-16890

Gil ML, Gozalbo D. Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections. *Front Biosci* 2009; 14: 570-582

Gil ML, Gozalbo D. TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to *Candida albicans* yeasts and hyphae. *Microbes Infect* 2006; 8: 2299-2304

Goodwin SD, Cleary JD, Walawander CA, Taylor JW, Grasela TH, Jr. Pretreatment regimens for adverse events related to infusion of amphotericin B. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 755-761

Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001; 13: 85-94

Ha KC, White TC. Effects of azole antifungal drugs on the transition from yeast cells to hyphae in susceptible and resistant isolates of the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 763-768

Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, Manogue KR, Palladino MA, Jr., Cerami A, Shires GT, Lowry SF. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg Gynecol Obstet* 1988; 166: 147-153

Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 2010; 140: 900-917

Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348: 138-150

Hughes DA, Fraser IP, Gordon S. Murine macrophage scavenger receptor: in vivo expression and function as receptor for macrophage adhesion in lymphoid and non-lymphoid organs. *Eur J Immunol* 1995; 25: 466-473

Janoff AS, Boni LT, Popescu MC, Minchey SR, Cullis PR, Madden TD, Taraschi T, Gruner SM, Shyamsunder E, Tate MW. Unusual lipid structures selectively reduce the toxicity of amphotericin B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 6122-6126

Kato T, Horie N, Hashimoto K, Satoh K, Shimoyama T, Kaneko T, Kusama K, Sakagami H. Effect of itraconazoles on the production of pro-inflammatory substances in mouse macrophage-like cells. *In vivo* 2010; 24: 709-713

Kindt TJ, Osborne BA, Goldsby RA. *Immunology*. New York: W. H. Freeman & Company; 2006.

Kinoshita K, Iwasaki H, Uzui H, Ueda T. Candin family antifungal agent micafungin (FK463) modulates the inflammatory cytokine production stimulated by lipopolysaccharide in THP-1 cells. *Transl Res* 2006; 148: 207-213

Kuhns DB, Alvord WG, Gallin JI. Increased circulating cytokines, cytokine antagonists, and E-selectin after intravenous administration of endotoxin in humans. *J Infect Dis* 1995; 171: 145-152

Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, Dodek P, Wood G, Kumar A, Simon D, Peters C, Ahsan M, Chateau. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* 2009; 136: 1237-1248

Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34: 1589-1596

Lamaris GA, Lewis RE, Chamilos G, May GS, Safdar A, Walsh TJ, Raad II, Kontoyiannis DP. Caspofungin-mediated beta-glucan unmasking and enhancement of human polymorphonuclear neutrophil activity against *Aspergillus* and non-*Aspergillus* hyphae. *J Infect Dis* 2008; 198: 186-192

Libert C, Vink A, Coulie P, Brouckaert P, Everaerd B, Van Snick J, Fiers W. Limited involvement of interleukin-6 in the pathogenesis of lethal septic shock as revealed by the effect of monoclonal antibodies against interleukin-6 or its receptor in various murine models. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2625-2630

Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery* 2000; 127: 117-126

Marx G, Schuerholz T, Reinhart K. [New approaches to intensive care for sepsis]. *Chirurg* 2005; 76: 845-855

Michie HR, Spriggs DR, Manogue KR, Sherman ML, Revhaug A, O'Dwyer ST, Arthur K, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. *Surgery* 1988; 104: 280-286

Moen MD, Lyseng-Williamson KA, Scott LJ. Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs* 2009; 69: 361-392

Murphy KM, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie*. Wiesbaden: Spektrum Akademischer Verlag; 2009

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M. *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart; 2008

Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164: 5998-6004

Nino DF, Cauvi DM, De Maio A. Itraconazole, a commonly used antifungal, inhibits Fc γ receptor-mediated phagocytosis: alteration of Fc γ receptor glycosylation and gene expression. *Shock* 2014; 42: 52-59

Ohlsson K, Bjork P, Bergenfeldt M, Hageman R, Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature* 1990; 348: 550-552

Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, Hamill RJ, Larsen RA, Horowitz HW, Powderly WG, Hyslop N, Kauffman CA, Cleary J, Mangino JE, Lee J. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3149-3154

Pawelec G, Ehninger G, Rehbein A, Schaudt K, Jaschonek K. Comparison of the immunosuppressive activities of the antimycotic agents itraconazole, fluconazole, ketoconazole and miconazole on human T-cells. *Int J Immunopharmacol* 1991; 13: 299-304

Pawelec G, Jaschonek K, Ehninger G. The anti-fungal agent itraconazole exerts immunosuppressive effects on alloreactivity but not on natural immunity in vitro. *Int J Immunopharmacol* 1991; 13: 875-379

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Riccardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998; 282: 2085-2088

Preiser JC, Schmartz D, Van der Linden P, Content J, Vanden Bussche P, Buurman W, Sebald W, Dupont E, Pinsky MR, Vincent JL. Interleukin-6 administration has no acute hemodynamic or hematologic effect in the dog. *Cytokine* 1991; 3: 1-4

Rapp UK, Kaufmann SH. Glucose-regulated stress proteins and antibacterial immunity. *Trends Microbiol* 2003; 11: 519-526

Reboli AC, Rotstein C, Pappas PG, Chapman SW, Kett DH, Kumar D, Betts R, Wible M, Goldstein BP, Schranz J, Krause DS, Walsh TJ. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *N Engl J Med* 2007; 356: 2472-2482

Remick DG. Cytokine therapeutics for the treatment of sepsis: why has nothing worked? *Curr Pharm Des* 2003; 9: 75-82

Rogers PD, Jenkins JK, Chapman SW, Ndebele K, Chapman BA, Cleary JD. Amphotericin B activation of human genes encoding for cytokines. *J Infect Dis* 1998; 178: 1726-1733

Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 2004; 14: 20-28

Sandor F, Buc M. Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands. *Folia Biol* 2005; 51: 148-157

Sau K, Mambula SS, Latz E, Henneke P, Golenbock DT, Levitz SM. The antifungal drug amphotericin B promotes inflammatory cytokine release by a Toll-like receptor- and CD14-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2003; 278: 37561-37568

Schindler R, Clark BD, Dinarello CA. Dissociation between interleukin-1 beta mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 10232-10237

Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 1990; 75: 40-47

Shalaby MR, Waage A, Aarden L, Espevik T. Endotoxin, tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 53: 488-498

Shimokawa O, Nakayama H. Increased sensitivity of *Candida albicans* cells accumulating 14 alpha-methylated sterols to active oxygen: possible relevance to in vivo efficacies of azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1626-1629

Simitsopoulou M, Roilides E, Dotis J, Dalakiouridou M, Dudkova F, Andreadou E, Walsh TJ. Differential expression of cytokines and chemokines in human monocytes induced by lipid formulations of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1397-1403

Skrupky LP, Kerby PW, Hotchkiss RS. Advances in the management of sepsis and the understanding of key immunologic defects. *Anesthesiology* 2011; 115: 1349-1362

Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001; 167: 2887-2894

Stein SH, Little JR, Little KD. Parallel inheritance of tissue catalase activity and immunostimulatory action of amphotericin B in inbred mouse strains. *Cell Immunol* 1987; 105: 99-109

Stossel TP. Phagocytosis (first of three parts). *N Engl J Med* 1974; 290: 717-723

Tamai R, Sugamata M, Kiyoura Y. Amphotericin B up-regulates lipid A-induced IL-6 production via caspase-8. *J Dent Res* 2012; 91: 709-714

Taylor KR, Trowbridge JM, Rudisill JA, Termeer CC, Simon JC, Gallo RL. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem* 2004; 279: 17079-17084

Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 359-366

Tsai CT, Wu CK, Lee JK, Chang SN, Kuo YM, Wang YC, Lai LP, Chiang FT, Hwang JJ, Lin JL. TNF-alpha down-regulates sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase expression and leads to left ventricular diastolic dysfunction through binding of NF-kappaB to promoter response element. *Cardiovasc Res* 2015; 105: 318-329

Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999; 401: 811-815

Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 825-852

Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 379-414

van der Poll T, Buller HR, ten Cate H, Wortel CH, Bauer KA, van Deventer SJ, Hack CE, Sauerwein HP, Rosenberg RD, ten Cate JW. Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N Engl J Med* 1990; 322: 1622-1627

van der Poll T, Levi M, Hack CE, ten Cate H, van Deventer SJ, Eerenberg AJ, de Groot ER, Jansen J, Gallati H, Büller HR. Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J Exp Med* 1994; 179: 1253-1259

Vazquez JA, Sobel JD. Anidulafungin: a novel echinocandin. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 215-222

Vonk AG, Netea MG, Denecker NE, Verschueren IC, van der Meer JW, Kullberg BJ. Modulation of the pro- and anti-inflammatory cytokine balance by amphotericin B. *The J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 469-474

Wang N, Gates KL, Trejo H, Favoreto S, Jr., Schleimer RP, Sznajder JI, et al. Elevated CO₂ selectively inhibits interleukin-6 and tumor necrosis factor expression and decreases phagocytosis in the macrophage. *FASEB J* 2010; 24: 2178-2190

Wang TS, Deng JC. Molecular and cellular aspects of sepsis-induced immunosuppression. *J Mol Med* 2008; 86: 495-506

Wilson E, Thorson L, Speert DP. Enhancement of macrophage superoxide anion production by amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 796-800

Wingard JR, Kubilis P, Lee L, Yee G, White M, Walshe L, Bowden R, Anaissie E, Hiemenz J, Lister J. Clinical significance of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1402-1407

Wingard JR, White MH, Anaissie E, Raffalli J, Goodman J, Arrieta A, L Amph/ABLC Collaborative Study Group. A randomized, double-blind comparative trial evaluating the safety of liposomal amphotericin B versus amphotericin B lipid complex in the empirical treatment of febrile neutropenia. L Amph/ABLC Collaborative Study Group. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1155-1163

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 309-317

Wolf JE, Stein SH, Little KD, Abegg AL, Little JR. Amphotericin B selectively stimulates macrophages from high responder mouse strains. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1991; 13: 221-235

Zonios DI, Bennett JE. Update on azole antifungals. *Semin Respir Crit Care Med* 2008; 29: 198-210

9. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Georg Baumgarten für die Überlassung der Themen, die außerordentlich intensive Betreuung sowie seine Unterstützung in jeglichen Fragen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und auch manchmal darüber hinaus. Für seine Motivation und seine aufmunternden Worte bin ich sehr dankbar.

Herrn Professor Dr. Andreas Hoeft danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes an der von ihm geleiteten Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin.

Für die Unterstützung und das sehr angenehme Arbeitsklima im Labor danke ich Frau Dr. Stilla Frede und Frau Susanne Schulz. Auch danke ich allen anderen Mitarbeitern der gesamten Klinik für die stetige Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Herrn Dr. Stefan Münster für die geduldige und konstruktive Begleitung sowie die allzeit positive Unterstützung, die in besonderer Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.