

Markus Verch
Dr.med.

Etablierung und Validierung einer neuen Methodik zur Differenzierung der Leukozyten-Endothel-Interaktion in vivo

Geboren am 17.04.1965 in Metzingen
Reifeprüfung am 22.05.1985 in Karlsbad
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1989 bis SS 1996
Physikum am 17.09.1991 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Bruchsal
Staatsexamen am 14.5.1996 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Medizin
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. C.F. Vahl

Die bisherigen Methoden zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der Leukozyten-Endothel-Interaktion waren limitiert durch eine auf wenige Stunden begrenzte Beobachtungszeit und durch eine mangelnde Diskriminierbarkeit von Leukozytensubpopulationen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer Fluoreszenzfarbstoff mit längerer Halbwertszeit verwendet, der sich durch seine geringe Zytotoxizität bei uneingeschränkter Visualisierung auszeichnete. In einem ersten Versuchsabschnitt gelang es, die optimale Färbekonzentration zu erarbeiten als Voraussetzung für die in vitro Anfärbung der separierten Zellpopulationen. Um reine Subpopulationen der Gesamtleukozyten zu erhalten, wurde ein magnetisches Zelltrennverfahren verwendet, das bereits klinisch etabliert war. Am Beispiel der CD4⁺ Lymphozytenpopulation gelang es, die Methode am Modell der lokalen Endothelzellschädigung zu validieren. Die Versuchsergebnisse zeigten eine diskrete Aktivierung der separierten und fluoreszenzmarkierten Zellen. Dabei kam es zu einem Verlust von einem Teil der Zellen in vivo. Die restlichen, nicht aktivierten Zellen, ließen sich über mindestens 12 Stunden mittels der Intravitalmikroskopie beobachten. Diese im peripheren Blut verbliebenen Zellen zeigten in ihrer Interaktion mit dem entzündlich veränderten Endothel ein mit der Literatur übereinstimmendes Verhalten.

Mit der hier vorgestellten Methode steht nun erstmals ein Instrument zur Verfügung, das eine differenzierte intravitalmikroskopische Untersuchung von reinen Leukozytensubpopulationen und ihrer Interaktion mit dem Endothel über einen Zeitraum von mindestens 12 Stunden zulässt.

Die Möglichkeiten der Methode gehen über die Intravitalmikroskopie hinaus. Die separierten und fluoreszenzmarkierten Zellen können für eine lange Beobachtungszeit in vivo verbleiben um dann mittels FACS oder einem Fluoreszenzmikroskop in Gewebeschnitten nachgewiesen zu werden. Die Separation anderer Subpopulationen ist durch den Einsatz spezieller Mikrobeatcocktails fast beliebig erweiterbar.

Besonders geeignet ist die Methode für Fragestellungen, die sich mit Eigenschaften einer bestimmten Zellpopulation befassen, wie z. B. Diapedese, Ischämie-Reperfuptionsverhalten und Sepsis.