

**Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie**  
**der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**  
**Direktor: Prof. Dr. med. E. Mayatepek**

**Einfluss von antimonhaltigen Wecetin<sup>®</sup>-Streupuder auf die**  
**Vitalität,**  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion und die mikrobielle Abtötungskapazität humaner**  
**Granulozyten in vitro**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**  
**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität**  
**Düsseldorf**

**vorgelegt von**

**Sigrid Jungbluth-Opota**

**2007**

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Dekan: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Referent: Professor Dr. med. Horst Schrotten

Korreferent: Privat-Dozent Dr. med. Collin R. MacKenzie

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

1.1	Die Nabelpflege mit Wecesein <sup>®</sup> -Streupuder	1
1.2	Zeitpunkt und Faktoren, die zum Abfallen des Nabelschnurrestes führen	1
1.3	Eigenschaften neonataler Granulozyten	3
1.4	Antimon	3
1.4.1	Nomenklatur	3
1.4.2	Chemische und physikalische Eigenschaften	4
1.4.3	Vorkommen und Gewinnung	5
1.4.4	Geschichte	5
1.4.5	Verwendung	10
1.4.6	Wirkungscharakter	11
1.4.7	Stoffwechselfverhalten	11
1.4.8	Toxikologie	12
1.5	Bedeutung und Funktion humaner neutrophiler Granulozyten	13
1.5.1	Historischer Überblick	13
1.5.2	Der neutrophile Granulozyt	13
1.5.3	Der oxidative Burst	14
1.6	Leukozytenadhäsionsdefekt 1	16
1.7	Fragestellung	18

## 2. Material und Methoden

2.1	Material	19
2.1.1	Gewinnung der Granulozyten	19
2.1.2	Medien und Chemikalien	19
2.1.3	Geräte	21
2.2	Methoden	21
2.2.1	Isolierung der Granulozyten	21
2.2.2	Etablierung der Methodik mit adulten Granulozyten in den Vorversuchen	22
2.2.3	Vitalitätsprüfung	23
2.2.4	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Produktion	23
2.2.5	Abtötungsfähigkeit	25
2.2.6	Nachversuche	27
2.2.7	Statistische Berechnungen	28

## 3. Ergebnisse

3.1	Vitalitätsprüfungen	29
3.2	Vorversuche: O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Produktion	30
3.2.1	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Produktion der neutrophilen Granulozyten	31
3.2.2	Zwei O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Teste mit opsonisierten Zymosan und Puder	32
3.2.3	Zwei O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Teste mit PMA und Puder	34
3.2.4	Zwei O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Teste der neutrophilen Granulozyten isoliert aus Nabelschnurblut	35
3.2.5	Konzentrationen des Nabelpuders	36

3.3	Vorversuche: Killing	37
3.3.1	Einfluss des Puders auf das Wachstum von <i>Staphylococcus aureus</i>	37
3.3.2	Einfluss der Granulozytenzahl auf die Killingrate	39
3.4	1. Hauptversuch: Einfluss von Wecetin <sup>®</sup> -Streupuder auf die O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Generation der neutrophilen Granulozyten aus dem Nabelschnurblut	41
3.5	2. Hauptversuch: Einfluss von Wecetin <sup>®</sup> -Streupuder auf die Abtötung von <i>Staphylococcus aureus</i> durch neutrophile Granulozyten aus dem Nabelschnurblut	45
3.6	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Produktion und Killingversuche unter Einfluss von Stibium metallicum	48
3.6.1	Wachstum von <i>Staphylococcus aureus</i> unter Einfluss von Stibium metallicum	48
3.6.2	Einfluss von Stibium metallicum auf das Wachstum von <i>Escherichia coli</i>	48
3.6.3	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Produktion unter Einfluss von Stibium metallicum	49
3.6.4	Einfluss von Stibium metallicum auf die Killing-Kapazität der Granulozyten von Erwachsenen	50
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	51
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	60
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	61
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	71
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	80
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	81

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Nabelpflege mit Wecetin®-Streupuder

Unter der Nabelpflege mit Wecetin®-Streupuder, der metallisches Antimon enthält, kann ein signifikant beschleunigtes Abfallen des Nabelschnurrestes beobachtet werden: im Mittel am 4. Tag versus im Mittel am 10. Tag (Pflege mit 80%igem Alkohol und Fissan® - Silberpuder). In einer im Jahre 1992 prospektiv durchgeführten Studie traten an 204 gesunden Neugeborenen keine unerwünschten Nebenwirkungen auf (Seidler et al.). Diese Beobachtung konnte in der Filderklinik in Stuttgart, wo Wecetin®-Streupuder seit 1975 zur Nabelpflege eingesetzt wird, bestätigt werden (Zerm). Einflüsse auf die Unterschiede in den Abfallszeiten der Nabelreste zwischen den beiden Gruppen konnten für Nabelmaße, Geburtsgewicht, grünes Fruchtwasser, Geburtsmodus, Geschlecht, und Ernährungsform ausgeschlossen werden. Am 8. Tag waren alle unter Wecetin® behandelten Nabelschnurreste abgefallen, bei der Alkoholpflege erst am 22. Tag. Bis zum Abfallen blieben alle Nabelreste unter Wecetin® feucht, eine Mumifikation fand nicht statt.

Ein späteres Abfallen des Nabelschnurrestes liefert einen wichtigen diagnostischen Hinweis auf das Vorliegen eines angeborenen Granulozytendefektes, speziell eines Leukozytenadhäsionsdefektes (LFA-1- Mangel). Hayward et al. berichteten als Erste über eine mögliche Beziehung zwischen einer verspäteten Trennung des Nabelschnurrestes und einer defekten Granulozytenfunktion. Die frühe Diagnose dieses Immundefekts ist von großer Bedeutung für den weiteren Verlauf der Erkrankung.

Da funktionsfähige Granulozyten eine wesentliche Voraussetzung für das Abfallen des Nabelschnurrestes sind, ergibt sich die Frage, ob Nabelpuder, der metallisches Antimon enthält, das frühe Abfallen des Nabelschnurrestes durch Stimulation der Granulozyten bewirken kann.

### Zusammensetzung des Wecetin®-Streupuders

Wecetin®-Streupuder wird für oberflächlich abtrocknende Wunden und in der Nabelpflege bei Neugeborenen empfohlen.

100 g Wecetin®-Streupuder enthält eine Antrocknung der äthanolischen Auszüge aus:

- Arnika, Planta tota 2,5 g
- Calendula, Herba 1,65 g
- Echinacea angustifolia et purpurea, Planta tota 1,66 g
- Stibium metallicum praeparatum (Antimon) 0,1 g

Der Wirkstoffträger ist Talkum.

### 1.2 Zeitpunkt und Faktoren, die zum Abfallen des Nabelschnurrestes führen

Der Zeitpunkt des Abfallens des Nabelstumpfes ist abhängig von der Behandlungsmethode:

- 6,3 Tage in einer Studie mit 600 finnischen Neugeborenen behandelt mit Jod-Polyvinylpyrrolidon (Töttermann und Autio).
- 5,8 Tage in einer indischen Studie mit 840 Neugeborenen behandelt mit Merckurochrom oder antiseptischem Puder (Bhalla et al).
- 6,4–12 Tage bei 121 Kindern in Jerusalem, behandelt mit Triple dye, 1% Neomycin, 1% Sulphadiazinsalbe, Bismuthpuder (Arad et al.).
- 15 +/- 7,2 Tage (geometrisches Mittel: 13,7 Tage) Studie mit 245 Neugeborenen, behandelt mit Triple dye. Bei 25 Kindern fiel die Nabelschnur erst nach drei Wochen ab, ohne dass eine Omphalitis vorlag (Wilson et al.).

- Eine um 3 Tage verkürzte Nabelschnurabfallszeit wird in der prospektiven Studie von Golombek et al. mit 599 Neugeborenen beschrieben, deren Nabelschnur allein nur mit Alkohol einmal täglich behandelt wurde. Der Mittelwert lag in der nur mit Alkohol behandelten Gruppe bei 10 Tagen, im Vergleich zu der Gruppe, deren Nabelschnur zusätzlich mit Triple dye versorgt wurde bei 13 Tagen.
- Pezzati et al. vergleicht in einer randomisierten Studie mit 244 Frühgeborenen die Nabelschnurabfallszeit von zwei antiseptischen Produkten: 6 +/- 2 Tage bei einem salicylhaltigen Puder versus einer Lösung mit Chlorhexidin mit einer Nabelschnurabfallszeit von 9 +/- 2 Tage.

Aus den Niederlanden stammt eine Studie mit 911 Neugeborenen: es wurden keine Puder oder Lösungen verwendet, der Nabelstumpf wurde lediglich durch trockene Gaze bedeckt und abgeklemmt. Der MW lag bei 7,4 Tagen (SD 3,3).

Ein Zusammenhang zwischen Nabelrestabfallszeit und verschiedenen Faktoren der Perinatalperiode sind beschrieben worden: ein leichter, aber signifikant verzögerter Abfall wurde bei Frühgeborenen, bei Sectio-Geburten, niedrigem Geburtsgewicht, bei Antibiotikagabe (Sepsis) dokumentiert. Der genaue Mechanismus dieser Faktoren für die Trennung ist nicht bekannt. Von einem verzögerten Abfall wird ab dem 14. Tag gesprochen (Oudesluys-Murphy et al).

In den Studien über den verzögerten Nabelschnurabfall bei Leukozytenfunktionsdefekten ist die Abfallszeit länger als 21 Tage, in manchen Fällen musste der Nabelstumpf sogar chirurgisch entfernt werden (Hayward et al).

Hayward et al definieren den Zeitpunkt des normalen Nabelschnurabfalls zwischen den 5. bis 8. Tag. Der genaue Mechanismus des Nabelschnurabfalls ist nicht bekannt. Neben der Granulozytenaktivität, spielt die Kollagenaseaktivität, die Nekrose und die Trocknung eine Rolle (Lubec), sowie die bakterielle Kontamination.

Ronchera et al. testeten 1994 vier unterschiedliche antiseptische Nabelschnurpflegeregimes bei 76 vaginal entbundenen, gesunden Neugeborenen:

Ethanol 70 %, Chlorhexidine 0,5 %, Eosin 2 %, Jod-Polyvinylpyrrolidon 10 %.

Die Ergebnisse bestätigten, dass unterschiedliche antiseptische Pflegemittel die bakterielle Kolonisation und den Nabelschnurabfall in einem umgekehrten Verhältnis beeinflussen: Chlorhexidine, 10 %, das potenteste Mittel gegen bakterielle Kontamination (keine Besiedlung von koagulasepositiven Staphylokokken oder Streptokokken der Gruppe B) zeigte im Mittel die längste Abfallszeit. Die Hypothese, dass antiseptische Mittel, die die bakterielle Besiedelung vermindern und hiermit möglicherweise die Infiltration der Leukozyten hemmen können, ein verzögerten Abfall zur Folge hat, wird unterstützt.

Hayward et al. vermuteten, dass ein primär genetischer Defekt eines kontraktilen Proteins den Zusammenhang zwischen verspätetem Nabelschnurabfall und Leukozytendysfunktion erklären könnte. In der Literatur wird in Zusammenhang mit der Leukozytendysfunktion und wiederkehrenden Infektionen von einem Defekt der Chemotaxis (Hayward et al.), von einer verminderten oxidativen Antwort (Abramson et al.) und von einer verminderter Adhärenz (Bowen et al.) berichtet.

Abramson et al. assoziieren einen Mangel von Membranglykoproteinen in Leukozyten mit Defekten bei der Phagozytose, der Chemotaxis und der Anheftung.

### 1.3 Eigenschaften neonataler Granulozyten

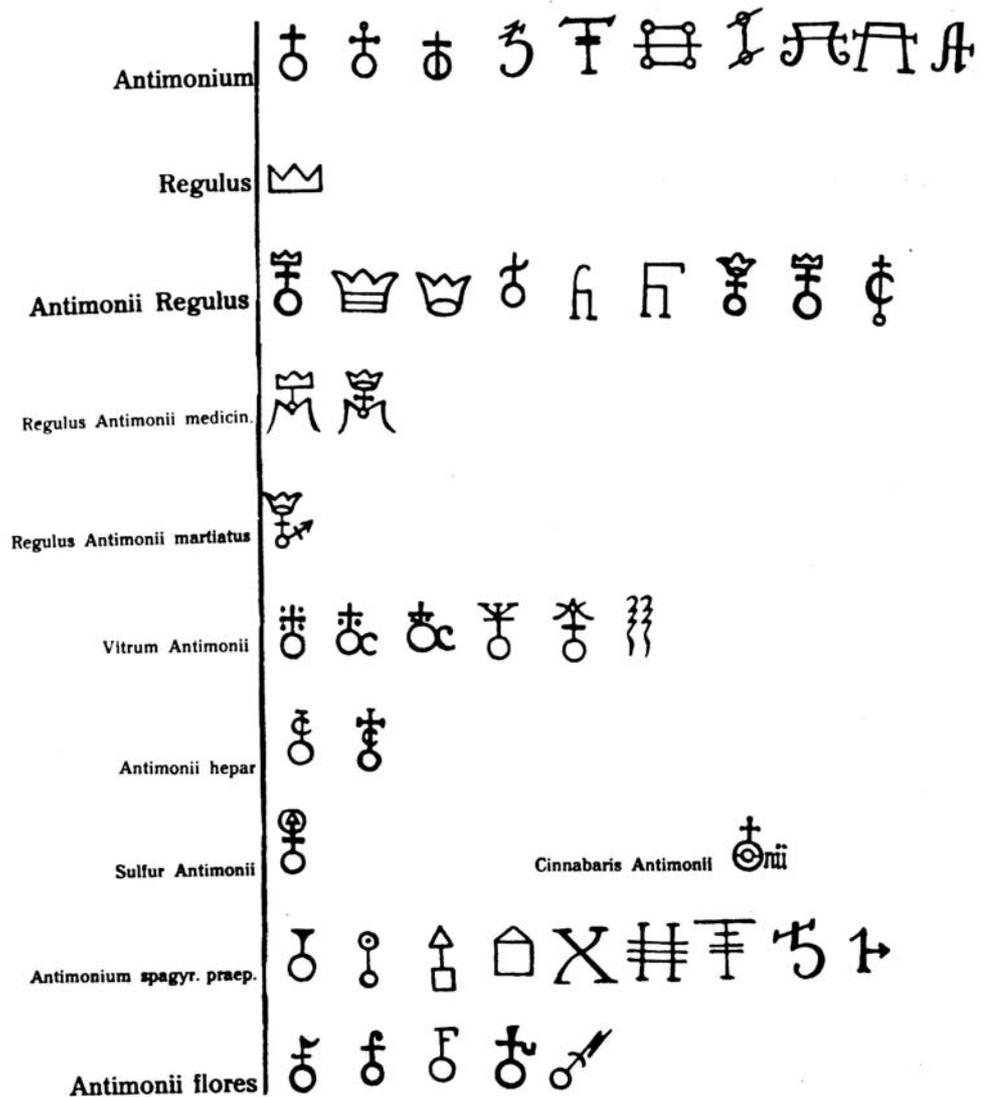
Hill zeigte, dass neonatale Neutrophile, die mit chemotaktischen Faktoren versetzt wurden keine verstärkte Motilität oder eine verstärkte „respiratory burst“ Aktivität zeigten. Ursprünglich wurde dies einer verminderten Fähigkeit Leukotrien B<sub>4</sub> zu produzieren zugeschrieben. Kikawa et al. zeigten aber, dass neonatale Neutrophile eine „normale“ Menge von Leukotrien B<sub>4</sub> bilden. Anderson et al demonstrierten, dass neonatale Neutrophile eine verminderte Adhärenz aufweisen, die in Zusammenhang mit dem Unvermögen die Oberflächenexpression von Adhäsionsglykoproteinen hochzuregulieren stehen soll. Die Chemotaxis, ebenfalls eine adhäsionsabhängige Funktion, wird auf die verminderte Expression des Adhäsionsproteins MAC-1 auf Granulozyten Neugeborener erklärt (Anderson et al.). Olson et al. wiesen auf die irreversible Aggregation der Nabelschnurgranulozyten nach Zusatz von FMLP hin. Neben der verminderten Motilität, Adhärenz, Tendenz zur irreversiblen Aggregation, werden in der Literatur noch eine verminderte Expression des Oberflächenrezeptors CR3 für den Komplementfaktor C3bi nach dem Versetzen mit Zymosan oder mit FMLP beschrieben (Bruce et al.). Die Neutrophilen von „gestressten“ Neugeborenen zeigten eine verminderte Phagozytosefähigkeit und bakterielle Aktivität (Hill).

### 1.4 Antimon

#### 1.4.1 Nomenklatur

Synonyme: Stibium metallicum, Antimon regulus.

Der Terminus Antimon wird in der Literatur sowohl für Antimonverbindungen, wie z. B. Grauspießglanz, als auch für das elementare Metall verwendet (Daems Willem F.). Das von den Ägyptern als Wimpertusche verwendete Graupießglanzpulver (Antimontrisulfid) wurde mit „Stimmi“ bezeichnet. „Stimmi“ wurde griechisch zu „Stibi“, lateinisiert zu „Stibium“. Die Römer bezeichneten sowohl den Grauspießglanz, wie auch das daraus hergestellte Metall als „Stibium“. Im ausgehenden Mittelalter wird „Stibium“ von Antimonium ersetzt. Nach der Entdeckung des reinen Metalls bezeichnete man das neue Element als Stibium purum = Regulus antimonii simplex: Spießglanzkönig, Stibium daneben bedeutete weiterhin Grauspießglanz. Neben dem „königlichen Metall“ für das Antimonmetall Regulus, existierten noch andere fantastische Bezeichnungen. In der alchemistischen Zeit wurden nach dem Verhalten von Antimon bei der Scheidung der Edelmetalle eine Reihe symbolischer Namen für das Antimon geprägt, wie „Lupus metallorum“ („Wolf der Metalle“), „feuriger Drachen“, „Sohn des Satans“, „Höchster Richter“. Diese Namen wurden in Form von Allegorien auch bildlich zur Anschauung gebracht. Das alchemistische Symbol war gleichzeitig das Zeichen der Erde (Quiring), (s.a. 1.4.4).



**Abb. 1.4.1: Auswahl aus alchemistischen und chemischen Zeichen von Antimon und Antimonpräparate, Daems 1976**

Im 19. Jh. setzte sich Stibium für das elementare Metall durch, neben Antimonium. Die Namen der chemischen Verbindungen werden seitdem von Stibium abgeleitet, später jedoch bis heute auch wieder mit dem Terminus Antimon gebildet (Daems).

#### 1.4.2 Chemische und physikalische Eigenschaften

Antimon (Stibium; Sb) ist ein halbmimetallisches Element und gehört zur Gruppe Vb im Periodensystem der Elemente. Antimon ist ein lebhaft glänzendes, sprödes Metall und leicht zu pulverisieren. Es besitzt 5 Valenzelektronen mit der Hauptquantenzahl 5: zwei sind 5s- und drei 5p- Elektroden. Das Antimon kommt sowohl positiv fünfwertig z. B. im  $\text{SbCl}_5$ , als auch positiv dreiwertig z. B. im  $\text{SbCl}_3$  vor, weniger bevorzugt negativ dreiwertig (Ullmann).

Es sind mehrere Modifikationen bekannt:

1. gewöhnliches, metallisches Antimon: einzige stabile Form, kristallisiert, rhomboedrisch, nicht allotrop, graues Sb, silberweiß glänzend,
2. zwei instabile Modifikationen: gelbes Antimon, das sich bei  $-90^\circ\text{C}$  langsam in das schwarze amorphe Antimon umwandelt, das in das metallische Antimon bei gewöhnlicher Temperatur übergeht (Ullmann).

3. Reines kompaktes Antimon verändert sich bei Zimmertemperatur nicht. Arsen und die meisten Metalle bilden Legierungen. Schwefel, Schwefelwasserstoff und Schwefeldioxyd bilden Antimontrisulfid (Ullmann).

Antimon ist chemisch und toxikologisch dem Arsen verwandt. Es ist ein relativ korrosionsfestes Metall (Daunerer).

Die wichtigsten physikalischen Parameter von Antimon sind die Ordnungszahl 51 und das relative Atomgewicht 121,75, das halbmimetische Element ist nicht sehr hart (Ritzhärte nach der Mohsschen Skala 3,0), der Schmelzpunkt liegt bei 30,3 °C und der Siedepunkt bei 1.635 °C. Das elektrische Leitvermögen 3,86 bei 0 °C (bezogen auf Silber bei 0°C=100).

#### 1.4.3 Vorkommen und Gewinnung

Mit einem geschätzten Anteil von  $10^{-4}$  Gewichts-% in der obersten Erdkruste ist Antimon ein seltenes Element, am häufigsten kommt es in Mineralien vor. Das wichtigste ist der Antimonglanz  $Sb_2S_3$  (Daunerer, Hager).

Der wichtigste Rohstoff für Antimon ist der rhombische Antimonit, Antimon(III)-sulfid,  $Sb_2S_3$ , mit 71,7 % Sb und 28,3 % S, der vielfach in großer Reinheit vorkommt. Nahe der Erdoberfläche verwittert Antimonit zu Antimonoxiden (Antimonblüten, Weißspießglanze).

Die größten Lagerstätten von Antimonerzen findet man in China, Bolivien, Südafrika und den Gebieten der ehemaligen Sowjetunion. Die Weltproduktion beträgt in etwa 70 000 t im Jahr (Merian). Antimon wird wegen seiner Sprödigkeit – außer zur Halbleiterfertigung – nur selten in reiner Form verwendet, verleiht jedoch Metallegierungen besondere Härte und wird deshalb, oft mit Blei, Zinn oder Kupfer legiert, für die Herstellung von Produkten wie Akkumulatoren, Lettern, Lagermetallen und Geschossen benutzt, sowie in der pigmentverarbeitenden Industrie (Farben, Lacke), (Gebel).

Die mit der Nahrung täglich aufgenommene geschätzte Menge von 35 µg gilt als unbedenklich (Daunerer).

Zur Herstellung werden sulfidische Antimonerze unter Luftzutritt geröstet, und das entstehende Antimonoxid wird zum Metall reduziert.

#### 1.4.4 Geschichte

##### Frühgeschichte

Eine umfassende Antimongeschichte liegt in der Literatur nicht vor. Die folgende historische Betrachtung stammt aus Sammelwerken, Handbüchern und Zeitschriften zur Geschichte der Chemie, Toxikologie und Pharmazie. Interessante historische Aspekte zum Antimon sind in der Pharmaziegeschichte in der Studie von Czech zum Ausmaß der Resorption von Antimon über die Haut zusammengefasst.

Schmucksachen aus der Spätbronzezeit aus fast reinem Sb und andere alte Funde beweisen, dass das metallische Antimon schon in sehr früher Zeit verarbeitet worden ist, jedoch nicht als ein besonderes Metall erkannt, vielmehr mit anderen Metallen verwechselt wurde. Noch im 16. Jahrhundert hielt man es für eine Art von Blei (Gmelin).

Schon vor 5000 Jahren gewann und verwendete man Antimonit ( $Sb_2S_3$ ), das wichtigste Antimonerz. Man benutzte pulverisierten und mit Fett angeriebenen Antimonit als leicht haftende schwarze Farbe zum Dunkelschminken der Augenränder, Lider, Brauen und Wimpern.

Diese kosmetische Verwendung breitete sich im ganzen Orient und in Afrika aus. Als Augenschminke wird Antimonit in der Bibel (II. Buch der Könige IX 30, Ezechiel XXIII 40) genannt.

Die altsumerischen Kupfer-Antimon-Bronzen werden als Versuche angesehen, das Gebrauchsmetall Kupfer durch Zusatz von Antimonit härter und leichter flüssig zu machen. In neusumerischer Zeit (– 2198 bis –2015 v. Chr.) fertigte man Gefäße aus reinem Antimon. Ein in Tello-Lagesh gefundener Napf bezeugt, dass den Sumerern im 3. Jahrtausend das zur Verhüttung von Antimonit und zur Darstellung von Antimon im Altertum verwendete Röst- und Reduktionsverfahren bekannt war, weil gediegenes Antimon in der Natur nur selten vorkommt. Erst 1748 wurde es bei Sala in Schweden durch Swab entdeckt.

Auch in Ägypten diente Antimonit als dunkle Schminke vom 3. Jahrtausend v. Chr. an und auch als Mittel gegen Augenerkrankungen (Papyrus Ebers), z. B. zur Behandlung von einem Trachom (Quiring, Issekutz). In den damals beherrschten Gebieten von Ägypten lag kein Antimonit vor und das Schminkmineral wurde aus Vorderasien und Arabien eingeführt und hoch bezahlt. Aus der Pyramidenzeit (6. Dyn.–2420 bis –2270 v. Chr.) sind kupferne Wasserkannen und Becken mit einem Antimonüberzug bekannt. Man vermutet, dass durch den Sb-Überzug die giftige Grünspanbildung verhindert werden sollte. Bleiantimoniat diente im Neuen Reich (19. Dyn. – 1320 v. Chr.) als färbender Bestandteil von Glaswaren. An Hand von Funden konnte nachgewiesen werden, dass schon sehr früh Antimonverbindungen (wie Bleiantimoniat) als keramischer Farbstoff diente.

Mit zunehmender Gewinnung von Zinn zur Legierung von Kupfer verschwanden die Kupfer-Antimon-Bronze in der Bronzezeit (–2050 bis –1200 v. Chr.) und Eisenzeit (nach –1200 v. Chr.).

Im griechischen und römischen Altertum diente Antimonit (Spießglanz, Antimontrisulfid) vor allem als Schönheits- und Heilmittel. Die Vorschriften zur Verarbeitung des stimmi oder stibi, ägyptisch stim (Grauspießglanz, Schwefelantimon), stammen von den griechisch-römischen Klassikern Pedanios Dioskorides und C. Plinius Secundus, die den Grauspießglanz auch Platyophthalmon = Augenvergrößerer, Kallyblepharon = Augenverschönerer oder Gynaikion = Weibchen nannten (Ullmann). Sie erwähnten den Gebrauch des Antimonglanzes für alte und neue Wunden verschiedener Art. Dioskorides beschreibt die Pocula emetica: Wein, der in aus Antimonmetall gefertigten Kelch gestanden hat, wurde als Brechmittel benutzt (Issekutz). Oribasius (326 – 403) verwendete Antimonit als allgemeines Prophylaktikum und zur Wundbehandlung an. Hieronymus, christlicher Schriftsteller, nannte Antimonit Teufelsmittel (Issekutz).

Aus der altrömischen Zeit sind Weißmetall-Legierungen mit Sb-Gehalt als Spiegelbelag bekannt. In der römischen Kaiserzeit läßt sich der Gebrauch von Antimonglanz für therapeutische Zwecke in der Ophthalmologie, sowie als Prophylaktikum nachweisen (Gmelin).

Bis zur Merowingerzeit wurden Weißmetallwaren gefertigt.

Durch den Reichtum Chinas und Japans an Antimonerzen verwendete man in Ostasien im Altertum Antimonlegierungen zur Herstellung von Glocken, Pauken, Schwertern, Pfeilspitzen und Spiegeln.

In frühmittelalterlichen Werken wird das  $Sb_2S_3$ , nun wohl richtig erkannt als trocknende, blutstillende, fäulniswidrige Substanz in den Heilmitteln der arabischen Ärzte und deren europäischen Nachfolger, zuerst bei Constantinus Africanus im 11. Jahrhundert. Constantinus Africanus soll um 1050 als erster den Namen Antimonium für Antimonit ( $Sb_2S_3$ ) verwendet haben (Gmelin).

Antimonit diente weiter zur Herstellung von Schönheits- und Heilmitteln. Es galt, wie den Altägyptern schon bekannt, als trocknende, blutstillende, fäulniswidrige Substanz, die v.a. bei Augenerkrankungen angewendet wurde.

Die Kenntnis des metallischen Sb wird den Alchemisten und Hüttenleuten des ausgehenden Mittelalters zugeschrieben, die bewußt aus dem Spießglanzerz den „Regulus“ schmolzen.

Bei den Alchemisten spielte Antimonit eine Rolle bei der Scheidung von Gold und Silber. Die dadurch eifrigen Untersuchungen bewirkten, dass das Antimonmetall und viele Antimonverbindungen bis zum 15. Jahrhundert dargestellt waren (Quiring). Die Alchemisten verwendeten Antimonit im 11. Jh. häufig in Salben, Lösungen und Pflastern. Es wurde zur Räucherung gegen Geschlechtskrankheiten, Pocken und Pest angewendet (Issekutz).

Die Verhüttung von Antimonit (Spießglas, Antimonium crudum) wird bereits ausführlich von Lazarus Ercker (1574) und Georg Agricola (1621) beschrieben (Ullmann).

Bis zum Ausgang des Mittelalters wurden das Antimonit und seine Verbindungen nur äußerlich als Heilmittel angewendet.

Theophrastus von Hohenheim, genannt Paracelsus (1493/94–1541) führte die innerliche Antimontherapie ein und wird als Begründer der Antimontherapie bezeichnet (Walden). Die Antimonpräparate betrachtete Paracelsus als Kräftigungs- und Verjüngungsmittel, verordnete sie aber gegen einzelne Krankheiten, meist mit anderen Heilmitteln zusammen.

In der zweiten Hälfte des 16. Jahrhunderts gewann das Antimon die Stellung eines Allheilmittels. Es erschienen zahlreiche Schriften und Bücher allein über das Antimon. Das Antimon sollte die Krankheit im Körper an der Stelle aufsuchen, an der sie angreift und dort vernichten (Gmelin). In seinen Schriften aus den Jahren 1526 bis 1541 berichtete er über die Experimente der Antimonverbindungen, sowie über die medizinische Verwendung. Er schrieb Antimon eine Verjüngungswirkung zu und pries es in der „Großen Wundarzney“ (1536) als Mittel, das den Körper von allen Verunreinigungen reinigt (Issekutz). Der Grundgedanke der paracelsischen Antimontherapie geht auf die rein anorganische Erfahrung zurück, dass das Spießglas zur Läuterung des Goldes verwendet wurde (Gmelin). Die Wirkungsweise der Antimonpräparate wird in der „Großen Wundarzney“, als eine Purgation ohne Stuhl, als ein innerer Vorgang bezeichnet. Die giftigen Eigenschaften des Antimons waren Paracelsus gut bekannt. Unter den Handwerkern, die durch Metaldämpfe gefährdet sind, werden auch diejenigen aufgezählt, die Spießglas gießen (Gmelin). In den Schriften von Paracelsus werden die Merkmale einer Antimonvergiftung mit folgenden Worten beschrieben: „dan so das gift antimonii eingenommen wird, so gibt es einen trocknen, durren husten, vil stich in den Seiten und hauptwehe, vil ausderung der stül, vil Milzgeschwer, hitzig blut, reudig und krezig, dorret aus und meret die Gelsucht“(Paracelsus).

Der erste Schritt zur Bereitung des eigentlichen Heilmittels ist die Herstellung eines „antimonium praeperatum“ aus dem Spießglas. Dieses „antimonium praeperatum“ kann chemisch sehr verschiedenartig sein, z.B. als Oxyd oder Chlorid (Gmelin). Er pries die Antimonpräparate vorbeugend als Kur an. Auch zur Behandlung von Tuberkulose eignen sich nach Paracelsus Antimonheilmittel, sowie als Heil- und Vorbeugungsmittel gegen Nerven- und Geisteskrankheiten. Das „antimonium praeperatum“ hergestellt aus Spießglanzglas, geglühtem Weinstein und Alkohol diente zur Heilung von Wunden. Zur äußeren Behandlung von Lepra wurde rotes Antimonöl, dessen Zusammensetzung unklar ist, eventuell Antimonchlorid enthaltend, verwendet (Gmelin). Paracelsus betonte, dass für jede Krankheit eine für den besonderen Zweck hergestellte Antimonzubereitung verwendet wird.

### Der Antimonstreit

Die Schüler von Paracelsus verordneten die Mittel kritiklos und in toxisch wirkender Dosis. Die Pariser Universität erließ daraufhin in der „*Medicamenta spagyrica*“ 1566 ein Verbot der Antimonpräparate (Issekutz), das 1666 wiederrufen wurde, nachdem *Vinum Stibiatum* 1638 in der Pariser Pharmakopöe aufgenommen wurde und der an Scharlach leidende Ludwig XIV 1657 auf Anordnung des Kardinals Mazarin erfolgreich mit *vinum emeticum* behandelt wurde (Issekutz). Daems betont in seiner substanzhistorischen Betrachtung, dass unter Antimon als solches immer noch der Grauspießglanz gemeint war und in dem Dekret aus dem Jahre 1615 der Verkauf und die Anwendung von Brechweinstein, und nicht Antimon, als solches noch unbekanntes Metall gemeint ist.

Die Karthäusermönche in Frankreich besaßen das berühmte Geheimmittel „*Poudre chartreux*“. Dieses Pulver, ein Gemisch aus Antimonsulfiden und Antimonoxyden, erwarb 1720 der französische Staat. Man nannte dieses Pulver später Kermes minerale (Issekutz). Der Kermes wurde als „brechenmachendes, harntreibendes und schweißbeförderndes Heilmittel“ eingesetzt.

Die „*Pilula aeterna*“ war ein aus Antimonmetall hergestelltes Kügelchen und verursachte Durchfall. Nach der Darmpassage wurde es aus dem Stuhl herausgenommen, gewaschen und wiederholt verwendet (Issekutz).

### Brechweinstein : Tartarus stibiatus

Die wichtigste Antimonverbindung stellte 1531 v. Mysith dar. Nach Husemann (1875) war es gegen Pneumonie, Pleuritis, akuten Rheumatismus, Kindbettfieber, Lungenblutung und als Sedativum gegen spastische Schmerzen gebräuchlich.

Bei der „Ekelkur“ wurden täglich 0,03 bis 0,12 g verabreicht, der Patient litt unter einem ständigen Brechreiz und unter Speichelfluß.

Die Authenriethsche „Pockensalbe“, die pockenähnliche Blasen an der Haut verursachte, galt als wichtiges ableitendes Mittel und wurde bei Pertussis, Geisteskrankheiten und als Abhärtungsmittel verwendet (Issekutz). Die Bedeutung des Brechweinsteins als Emeticum und Expectorans ging verloren und er gewann als Therapeutikum von Trypanosomeninfektion, zuerst 1906 von Mesnil und Nicolle empfohlen, ein neues Indikationsgebiet. Vianna berichtete 1913 von der heilenden Wirkung des Brechweinsteins bei Granulom venereum und der Leishmaniose der Haut. Di Cristina und Caronia erzielten 1915 Heilerfolge bei Kala-Azar. Ferner wurde er von Christophersen 1918 als Mittel bei Bilharziose empfohlen. Schmidt (1920-1950) stellte das Stibophen her, das durch Kopplung von 6 Molekülen entstandene Kolloidpräparat Neostibosan hat sich in der Therapie der Leishmaniose und der Kala-Azar bewährt (Issekutz).

### Der Triumph-Wagen Antimonii, Leipzig 1604

In dieser wahrscheinlich ersten Antimonmonographie wird ausführlich über die Herstellung von Antimon und seinen Verbindungen und deren Verwendung als Arzneimittel eingegangen.

Als Verfasser des großen Erfolgs des „Triumphwagens“ wird der Erfurter Benediktinermönch und Alchemist namens Basilius Valentinus bezeichnet. Durch Gmelin (1797), H. Kopp (1875) und durch den Paracelsus-Forscher K. Sudhoff (gest. 1934) gilt es als gesichert, daß es diesen Benediktinermönch Basilius Valentinus in Erfurt um 1413 nicht gegeben hat.



**Abb. 1.4.2: Titelblatt des „Triumph-Wagen Antimonü“  
(Ausgabe Nürnberg 1676)**

Johann Thölde, Frankenhausener Ratskämmerer, veröffentlichte 1604 unter den Namen Basilius Valentinus das Buch „Triumph-Wagen Antimonii“ (Issekutz). Er empfiehlt Antimon gegen Lues, Lepra und Krebs. Thölde betrachtete Regulus Antimonii (Antimonmetall) als eine Abart des Bleis und empfiehlt Glocken, Spiegel und Lettern unter Zusatz von Antimonmetall zur Härtung herzustellen. Ferner beschreibt er durch das Zusammenschmelzen von reinem Antimonit (Antimonium crudum) und seines Röstproduktes („Flores Antimonii“) entstehende rote Antimonglas (Vitrum Antimonii), das zur Grundlage für die Verwendung des Antimons in der Färberei wurde. Basilius Valentinus erwähnt eine Vielzahl von Antimonverbindungen, wie den Brechweinstein, die Antimonsäure und das Karthäuserpulver, auch Kermes genannt, die als Heilmittel verwendet wurden (Quiring).

Der Grundsatz von Paracelsus „separio purum ab impuro“, die reinen Substanzen darzustellen, findet man wörtlich bei Basilius Valentinus wieder. Das Ausgangsmaterial ist bei beiden das gleiche Naturprodukt: Antimonsulfid, bezeichnet als Antimonium oder Spießglas.

Vom Antimon schreibt Basilius Valentinus, dass dieses „den Leib durchgeheth und reiniget, wie das Gold durch das Spießglas gereiniget wird von seiner Unsaubrigkeit“ und berichtet weiter, dass „keinem Menschen wohl möglich ist, im Antimonio auszulernen, dieweil die Zeit des menschlichen Lebens kurz“.

Basilius Valentinus schreibt den Antimonpräparaten eine Verjüngungswirkung zu: „erjünet den Menschen, und entlediget ihn von aller Schwermüthigkeit als wäre er neu geboren, und alles was da am menschlichen Körper ein Zunehmens hat der Wachsung an Haaren und Nägeln, verändern sich, fallen ab und aus, und erjüngern sich wie der Phoenix“ (Walden).

Die Anerkennung der Antimonpräparate als Brech-, Abführ- und Schwitzmittel und die Anwendung gegen zahlreiche Krankheiten, neben dem äußerlichen Gebrauch bleibt bis zum Beginn des 19. Jahrhundert üblich. Mit der starken Ausweitung des Anwendungsgebietes und der Unklarheit über die richtige Dosierung nahmen die unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu. Im Laufe des 19. Jahrhunderts geht dann der Gebrauch der Antimonpräparate schnell zurück (Gmelin). In der beginnenden Neuzeit entdeckte man das Antimon als Legierungsmetall wieder. Mitte des 19. Jahrhunderts, bedingt durch den verstärkten Eisenbahnbau und der Erfindung des Britanniametalls mit 5- 25 % Sb- Gehalt, stieg die Nachfrage für mit Antimon legierten harten Antifriktions- und Lagermetallen.

Seit der Entdeckung des Triethylstibins 1850 sind über 3000 organische Antimonverbindungen beschrieben worden (Merian).

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts erfolgte der Nachweis, dass insbesondere die Bilharziose, aber auch andere Tropenkrankheiten, auf die Behandlung mit Brechweinstein ansprechen.

Die weltwirtschaftliche und kriegswirtschaftliche Bedeutung des Antimons für die Geschossherstellung, das mit Hartblei gefüllte Schrapnell, bewirkte eine ansteigende Antimonerzförderung: die Weltförderung von 1915–1918 betrug 550.000 t Erz (220.000 t Antimon). Die bis 1913 eingenommene Stellung Europas als Produktions- und Verbrauchszentrum verlagerte sich nach China und Bolivien.

Weitere Verwendung fand Antimon in der Akkumulatoren- und Textilindustrie als Imprägnationsmittel gegen Brand und Fäulnis.

#### 1.4.5 Verwendung

Industrie: Antimonmetall für Halbleiter und Legierungen (Antimon verleiht eine besondere Härte z. B. mit Blei, Zinn, Kupfer), Antimonverbindungen für feuerfeste Textilien, Farben, Glasuren, zur Gummierstellung wird Antimonpentasulfid ( $\text{Sb}_2\text{S}_5$ ) als Vulkanisierungshilfe gebraucht (Merck Index).

Medizin: Antimonpräparate werden therapeutisch zur Behandlung der Bilharziose eingesetzt (Elinder). Antimonelektroden werden zur pH-Bestimmung verwendet. Mit Technetium<sup>99m</sup>-Antimon-Schwefel-Kolloid wurden in der Lymphoszintigraphie Lymphknotenmetastasen nachgewiesen.

Organische Antimonverbindungen (z.B. Pentostam<sup>®</sup>, Neostibosan<sup>®</sup>) sind heute für die Behandlung von Leishmaniose von Bedeutung. Murray et al. berichten von einem T-Zellen abhängigen Mechanismus in einem experimentellen viszeralen Leishmaniasemodell, in dem Gewebsmakrophagen eingesetzt wurden. Mäuse ohne Interferon- $\gamma$ - Gen wurden mit *Leishmania donovani* infiziert. Fünfwertiges Antimon (Sodium stibogluconate, Pentostam<sup>®</sup>) fand in zwei Dosierungen Verwendung: 500 mg/kg und 100 mg/kg.

Bei Mäusen ohne Interferon- $\gamma$ -Gen inhibierte das Antimonpräparat zwar, tötete aber nicht intrazellulär *Leishmania donovani*. In Anwesenheit von aktivierten Makrophagen konnte die Wirksamkeit von Antimon gesteigert werden (Murray et al.).

#### 1.4.6 Wirkungscharakter

Lokal: Antimonialsalze wirken ätzend und können lokal Hautschädigungen verursachen (Elinder).

Systemisch: Nach p.o. Aufnahme von Antimonialsalzen (kontaminierte Nahrungsmittel) wurden anhaltendes Erbrechen, Leibschmerzen, Diarrhoe und Kreislaufschocks beobachtet. Nach i. v. Injektion antimonhaltiger Arzneimittel können Husten, metallischer Geschmack im Mund, gelegentlich Erbrechen, Diarrhoe, Kollaps und Apnoe beobachtet werden. Bei längerer Anwendungsdauer im Rahmen einer kurmäßigen Behandlung können EKG-Veränderungen, die sich nach ca. 1-2 Monaten nach Beendigung bessern auftreten (Harvey). Ferner werden Muskel- und Gelenkschmerzen, Eosinophilie, anaphylaktische Reaktionen, hämolytische Anämien, sowie Pneumonien beschrieben.

Inhalativ: Bei der beruflichen Exposition gegen antimonhaltigen Staub hängt die Wirkung von der Art der Antimonverbindung ab: nach Inhalation von antimonhaltigem Rauch treten neben uncharakteristischen Allgemeinsymptomen, wie Kopfschmerzen, Müdigkeit, Appetitlosigkeit und Gliederschmerzen, auch Nasenbluten, Entzündungen der Atemwege, der Augen und der Haut auf. Es können ein Lungenemphysem, eine symptomlose Pneumokoniose, Erbrechen, sowie EKG-Veränderungen auftreten. Es wurden Myocard- und Leberschäden beobachtet (Hager).

- a) Antimonstaub: Schleimhautreizungen der Atemwege, Pneumokoniose, Leber- und Myokardschäden, gastrointestinale Beschwerden, Spontanaborte.
- b) Antimontrichlorid: Entzündungen der oberen Luftwege.
- c) Antimonpentachlorid: Reizerscheinungen bis hin zur Pneumonitis.
- d) Antimontrisulfid: schwere Vergiftungserscheinungen bis hin zum Herztod (Henschler).
- e) Antimontrioxid: Hautveränderungen, symptomlose Pneumokoniosen, ein erhöhtes Krebsrisiko beim Menschen ist nicht eindeutig nachgewiesen, im Tierversuch kanzerogen.
- f) Antimonwasserstoff (Stibin):  $\text{Sb H}_3$ , wirkt wie Arsenwasserstoff, ist ein farblos, unangenehm riechendes Gas, verursacht Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Fieber, hämolytischer Ikterus, bei schwerem Verlauf auch massive Hämolyse. Es wird leicht über die Lunge resorbiert (Hager, Dauderer).

#### 1.4.7 Stoffwechselverhalten

Nach p.o. Aufnahme von Antimonverbindungen wird Antimon nur langsam im Gastrointestinaltrakt resorbiert. Aus den organischen Antimonverbindungen bei der Therapie wird Antimon nur in Spuren freigesetzt. Die höchsten Werte findet man in den ersten Tagen in stark durchbluteten Organen, wie in Leber, Nieren und Schilddrüse (Haager, Gebel).

Dreiwertiges Antimon wird schnell aus dem Plasma in die Zellen, v.a. in Erythrozyten eingeschleust und zeigt eine Tendenz zu akkumulieren (Gebel). Eine Speicherung findet in Knochen, Zähnen und Haaren statt (Hager). Fünfwertiges Antimon wird nicht an Erythrozyten gebunden. Die Ausscheidung erfolgt für fünfwertiges Antimon hauptsächlich über den Urin, dreiwertiges v.a. mit den Faeces. Fünfwertiges Antimon ist weniger reaktionsfähig, wird rascher ausgeschieden (Elimination nach Einzelinjektion innerhalb von 24 h zu 50 bis 80 %) (Seeger).

Dreiwertiges Antimon reagiert in vivo leicht mit Sulfhydrylgruppen unter Bildung von Thioantimoniten (Stemmer). Im Gegensatz zu Arsen verändert sich die Wertigkeit nach Aufnahme von Antimon nur gering. Nur ca. 5 – 10 % des fünfwertigen Antimons werden zu dreiwertigem Antimon reduziert.

Etwa zu dem gleichen Prozentsatz werden dreiwertige Verbindungen zu fünfwertige oxidiert (Gebel).

#### 1.4.8 Toxikologie

Über das Antimon liegen in der Literatur nur vergleichsweise wenig Basisdaten aus der Toxikologie vor. In der Arbeitsmedizin wurde die maximale Arbeitsplatzkonzentration für Antimon (Gesamtstaub) auf 0,5 mg/m<sup>2</sup> begrenzt. Antimontrioxid gilt als karzinogen im Tierversuch (Greim). Der Nachweis erfolgt durch Atomabsorptionsspektrophotometrie und Neutronenaktivierungsanalyse. Die Normalwerte betragen im Blut: 3 µg/l, im Serum: 8 µg/l und im Urin 0,5 – 2,6 µg/24 Stunden (Elinder und Friberg).

Die gefundenen Werte für die Belastung des menschlichen Körpers schwanken zwischen 1 mg (Elinder) und 9 mg (Luckey). Organe mit retikuloendothelialen Zellen speichern Antimon (Stemmer). Akute Antimonvergiftungen sind relativ selten (Hager). Die Mengenangaben für die tödliche Dosis schwanken in der Literatur zwischen 30 mg und 300 mg (Moeschlin) für Kinder, für Erwachsene 125 – 1200 mg (v. Mühlendahl et al.).

Bei oraler Aufnahme kommt es zu heftigem Erbrechen, Magenkrämpfen, Durchfälle und Kreislaufchock. An systemischen Giftwirkungen steht die Kardiotoxizität im Vordergrund.

Antimon ist mutagen, Antimontrioxid im Tierversuch krebserzeugend (Hager). Berufsepidemiologische Studien konnten nicht den Beweis erbringen, ob Antimon karzinogen ist (Gebel).

Nach welchem Mechanismus Antimon toxisch wirkt ist unklar. Möglicherweise hängt es mit der hohen Affinität des Stoffes zu Sulfhydryl-Gruppen zusammen, die für die Struktur und Funktion von Proteinen notwendig sind (De Wolff, Hager). Die verantwortlichen Mechanismen für die Genotoxizität von Antimon sind unklar (Gebel). Nach Exposition gegen Antimonstaub wurden gehäuft Spontanaborte beobachtet (Seeger).

Der Zusatz des Wecetin<sup>®</sup>-Streupuders „metallicum praeparatum“ bezeichnet eine besondere Zubereitungsweise anthroposophischer metallischer Pharmaka. Das Metall wird einem besonderen Verarbeitungsprozess unterzogen. Nach Isolation aus seinen Verbindungen wird metallisches Antimon geschmolzen, verdampft und der entstehende Dampf an einer kalten Retortenwand re-sublimiert. Der so entstandene Metallspiegel wird dann zerstoßen und gesiebt. Vierkant wies in den Untersuchungen zum Einfluss auf die Nabelheilung mit Wecetin<sup>®</sup>-Streupuder auf die antimikrobielle Wirkung des Puders hin. Aufgrund der Ergebnisse in der Studie von Czech zum Ausmaß der Resorption von Antimon über die intakte Haut bei der bestimmungsgemäßen Anwendung der Salbe Stibium metallicum praeparatum 0,4 % der Firma Weleda AG wurde die Verschreibung der Salbe als toxikologisch unbedenklich eingestuft.

## 1.5 Bedeutung und Funktion humaner Granulozyten

### 1.5.1 Historischer Rückblick

Paul Ehrlich benannte die PMN zunächst als polynukleäre Zellen. Nach besserer Fixierung und Färbung erkannte er, dass die anscheinend separaten Nuclei in Wirklichkeit große Lappen eines einzelnen Nucleus waren, die durch feine Stege in Verbindungen stehen. 1898 bestätigte Ehrlich diesen Fehler und nannte diese Zellen nun Zellen mit polymorphen Kernen.

Der Nobelpreisträger Metchnikoff verwendete für diesen Zelltypus den Namen polymorphe nukleäre Leukozyten. Daneben bevorzugte er, die heute als Neutrophilen bekannten Zellen entsprechend ihrer Phagozytenfunktion auch Microphage zu nennen. Während der zu den Phagozyten gehörende Terminus Macrophage überlebte, verschwand der Terminus Microphage für die polymorphkernigen Granulozyten.

### 1.5.2 Der neutrophile Granulozyt

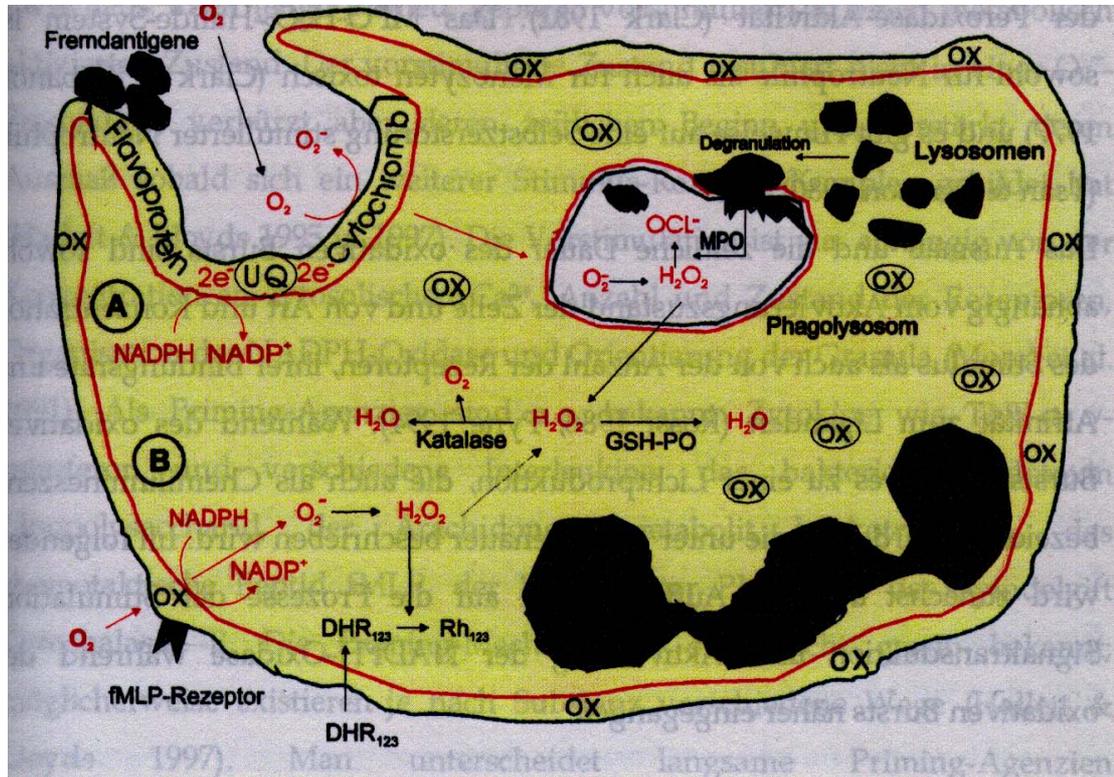
Aufgrund der histologischen Anfärbbarkeit werden die polymorphkernigen Granulozyten in Neutrophile, Eosinophile und Basophile unterteilt. Die PMN werden im Knochenmark mit einer Rate von 80 Millionen pro Minute produziert und überleben 2–4 Tage. Sie sind durchschnittlich 10–20  $\mu\text{m}$  groß. Granulozyten stellen c.a. 60–70 % der gesamten Blutleukozyten dar. Sie können sich an Endothelzellen entlang der Blutgefäße anlagern (marginaler Pool) und diese durch einen chemotaktischen Reiz durchdringen (Diapedese). Ihre Hauptaufgabe bei der Abwehr von Mikroorganismen ist die Phagozytose und die Zerstörung der Fremdkörper. Hierzu steht Ihnen sowohl ein sauerstoffabhängiger Mechanismus, der sogenannte oxidative Burst, als auch sauerstoffunabhängige Mechanismen zur Verfügung (Herabsetzen des pH-Wertes, Einsatz von Enzymen). Die Neutrophilen besitzen zwei Haupttypen von Granula:

1. Die primären oder azurophilen Granula treten entwicklungsgeschichtlich zuerst auf. Sie enthalten saure Phosphatasen,  $\beta$ -Glucuronidase, kationische Proteasen, Lysozym und Myeloperoxidase.
2. Die sekundären oder spezifischen Granula bilden die Mehrzahl und enthalten alkalische Phosphatase, Lysozym, Laktoferrin, Vitamin B-Bindungsprotein und verschiedene Hydrolasen, aber keine Myeloperoxidase.

Die Zelloberflächenrezeptoren der PMN dienen zur gerichteten Fortbewegung (Chemotaxis), zur Adhäsion an die Blutgefäßwände oder an Mikroben und zur Phagozytose. Die neutrophile Zelle reagiert auf verschiedene Stimuli, indem sie einem Konzentrationsgradienten für den chemotaktischen Stoff folgt. Beispiele für diese Substanzen sind von Bakterien gebildete Peptide, von Leukozyten hervorgebrachte Zytokine oder aktivierte Komplementfaktoren. Im Knochenmark befinden sich c.a. 90 % der Neutrophilen als neu differenzierte Zellen. Der Rest verteilt sich auf Blut und Gewebe. Die PMN reifen im Knochenmark aus Stammzellen unter Einfluss von Zytokinen heran. Bei einem gesunden Erwachsenen treten täglich ungefähr 100 Milliarden PMN in die Blutzirkulation ein, wo sie auch als marginale Pools an der Gefäßendothelwand anhaften und sie wieder verlassen. Bei der Diapedese zwängen sich die PMN durch zwei benachbarte Endothelzellen durch die Gefäßwand und können so ins Gewebe gelangen. Die Verweildauer im Blut beträgt nur ca. 6–7 Stunden, in Geweben allerdings 1–4 Tage. Die Neutrophilen verteilen sich auf Milz, Leber und Lunge. In der Milz konzentrieren sie sich besonders und werden wahrscheinlich dort zerstört.

Man vermutet, dass die PMN einem programmierten Zelltod (Apoptose) unterliegen und anschließend von Makrophagen weggeräumt werden (Savill) bzw. mit dem respiratorischen oder intestinalen Material in die Außenwelt gelangen. Watson et al. stellten fest, dass Adhäsionsmoleküle eine regulative Rolle bei der Aktivierung des endogenen Zelltodprogramms spielen.

### 1.5.3 Der oxidative Burst



**Abb. 1.5.3: Schema einiger Hauptmechanismen bei der Stimulierung**

Neutrophile Granulozyten werden als Teil der unspezifischen Immunabwehr durch eine Vielzahl von Signalen in ihrer Funktion beeinflusst. Wesentlicher Bestandteil ihres toxischen Arsenal bilden reaktive Sauerstoffmetabolite, welche durch eine membranassoziierte NADPH-Oxidase, Peroxidasen und Stickstoffmonoxidsynthetasen produziert werden. NADPH-Oxidasen (Granulozyten, Monozyten, Makrophagen) werden durch verschiedene Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-8, granulozyten-stimulierende Faktoren), Bakterienbestandteile (Endotoxin), (fMLP), Komplementfaktoren, Lipidmediatoren (Leukotriene, PAF) und Phorbolster (z.B. PMA) zur Bildung von Superoxidradikalen stimuliert. Aus diesen bildet sich spontan oder SOD-katalysiert Wasserstoffperoxid, welches als Substrat der phagozytären Myeloperoxidase dient. Diese tritt in die Phagolysosomen oder den Extrazellulärraum nach Aktivierung ein und bildet hochtoxische und bakterizide hypochlorige Säure (Jackson).

Die NADPH-Oxidase neutrophiler Granulozyten besteht aus verschiedenen zytoplasmatischen (p47-phox, p67-phox, rac) und membranären Komponenten (Cytochrom b<sub>558</sub>, G-Protein rap1A), die im Ruhezustand dissoziiert sind. Im Ruhezustand beinhaltet die Plasmamembran nur etwa 10-25% des Cytochromb<sub>558</sub>-Komplexes, der aus den beiden Untereinheiten gp22-phox und gp91-phox besteht (Rotrosen).

Wird der Granulozyt durch ein Signal wie z.B. das fMLP-abhängige Ca<sup>2+</sup> Signalsystem aktiviert, verbinden sich die spezifischen Cytochrom b<sub>558</sub> enthaltenden Granula mit den Membranen der Phagosomen und bilden ein Phagolysosom.

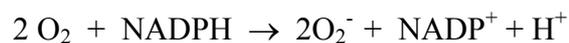
Damit wird die Membran des Phagolysosoms mit Cytochrom  $b_{558}$  angereichert und stellt sicher, dass die gebildeten Superoxidradikale in das Phagolysosom abgegeben werden. Parallel zu diesem Prozeß wandern die zytosolischen Bestandteile der Oxidase zur Plasmamembran und werden zum integralen Bestandteil der Phagolysosom umgebenden Membran. Die komplett assoziierte Oxidase ist nun in der Lage, Sauerstoff zu Superoxidradikalen zu reduzieren (respiratory burst) (Clark, Bellavite). Bei starker Aktivierung verbinden sich die spezifischen Granula ebenfalls mit der Plasmamembran, die dann mit Cytochrom  $b_{558}$  und Integrinen angereichert wird und eine extrazelluläre Superoxidfreisetzung ermöglichen. (Gallin et al.).

Die Aktivierung der NADPH-Oxidase unterliegt u.a. der Kontrolle eines komplizierten Signalmechanismus, der durch fMLP nach Interaktion mit seinem Rezeptor induziert wird. fMLP ist ein Bakterienwandtripeptid und führt zu einer gesteigerten Superoxid-anion-Produktion *in vitro*, wenn die neutrophilen Granulozyten zuvor *in vivo* und *in vitro* durch ein Signal geprägt wurden. Unter Prägung oder Priming versteht man die Potenzierung der Oxidase-Aktivität durch einen sekundären Aktivator (z.B. fMLP) unter der Voraussetzung, dass der Granulozyt durch prägende Primingmediatoren bereits sensibilisiert wurde. Eine gesteigerte PMN Superoxidanion-Produktion nach *in vitro* Stimulation mit dem fMLP gibt somit darüber Auskunft, ob *in vivo* ein Priming der Granulozyten stattgefunden hat (Botha et al.). Bei entsprechend hoher Mediatorenkonzentration oder auch bei Einwirken eines sekundären Aktivators am Bestimmungsort zeigt der geprimte Granulozyt dann eine maximale Ausschüttung proteolytischer Enzyme und toxischer Sauerstoffmetabolite (Walker, Ward).

Neben der rezeptor-abhängigen Aktivierung der NADPH-Oxidase, besteht die besondere Bedeutung von Phorbolestern (z. B. PMA) darin, die intrazelluläre Proteinkinase C direkt zu aktivieren. Stimuliert man PMN mit PMA *in vitro* hängt somit die folgende Aktivierung der NADPH-Oxidase nicht von der Expression oder Funktionalität von Membranrezeptoren oder dem Funktionieren der vorgeschalteten Signalwege ab. D.h. jede eingeschränkte Superoxidanion-Produktion nach PMA-Aktivierung beruht auf einem Defekt distal der Proteinkinase C. Die *in vitro* Quantifizierung der Superoxidanion-Produktion neutrophiler Granulozyten nach Stimulation mit PMA stellt somit ein aussagekräftiges Diagnosesystem der Funktion zirkulierender Granulozyten *in vivo* dar. In den Testreihen wurde die Superoxidanion-Produktion mit einer photometrischen Cytochrom C Reduktionsmethode erfasst. Hiermit verfügt man über eine gute reproduzierbare und standardisierte Technik (Botha et al.).

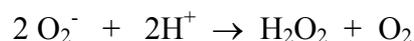
#### Aktivierung und Toxizität der Sauerstoffradikale

1. In der Aktivierungsphase katalysiert die NADPH-Oxidase die Bildung von dem Superoxidanion  $O_2^-$  aus  $O_2$ . Das Superoxidanion kann sowohl als Oxidans, als auch als Reduktionsmittel wirken:



Nach der Bildung von  $O_2^-$ , das in wässriger Lösung sehr instabil ist, entstehen in verschiedenen Folgereaktionen weitere aktive Metabolite.

2. Bildung von Wasserstoffperoxid durch spontane Dismutation von  $O_2^-$  oder von der Superoxiddismutase katalysiert :

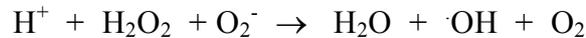


Der spontanen Dismutation, die bei saurem pH maximal ist, unterliegen ca. 80 % des erzeugten  $O_2^-$ , der Rest diffundiert durch die Membran ins Zytosol.

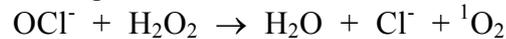
Damit es dort keinen Schaden zufügt, wird es durch eine enzymatisch katalysierte Dismutation (SOD) und anschließende Spaltung in  $H_2O$  und  $O_2$  unschädlich gemacht.

Das Superoxidanion besitzt nur eine schwache antimikrobielle Wirkung. Es dient in erster Linie als Ausgangsmaterial für die Bildung von Wasserstoffsuperoxid, von Singulett-Sauerstoff und von Hydroxy-Radikalen.  $\text{H}_2\text{O}_2$  wirkt antimikrobiell.

3. Bildung von Hydroxylradikalen über die Haber-Weiss Reaktion (Haber, Weiss). Diese Reaktion läuft im Phagosom ab und wird durch Eisensalze  $\text{Fe}^{2+}$  katalysiert.

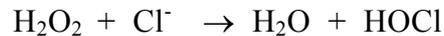


4. Bildung von Singulett Sauerstoff



Die Produktion der reaktiven Sauerstoffmetaboliten  $\text{OCl}^-$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  ${}^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (in Reihenfolge abnehmender Reaktivität) findet sowohl im intrazellulären Phagosom, als auch extern auf der Zelloberfläche statt. Das Superoxidanion ist aber wohl nicht an der Abtötung von Fremdkörpern beteiligt, weil es zu schnell umgewandelt wird. Die Aktivität von Wasserstoffperoxid wird durch eine Myeloperoxidase-katalysierte Reaktion mit Halogeniden wie Chlor noch beträchtlich erhöht.

5. Myeloperoxidase katalysiert in den Neutrophilen die Bildung von Hypochlorid ( $\text{HOCl}$ ).



Der Gehalt an Myeloperoxidase steigt in stimulierten Neutrophilen an. Das Myeloperoxidase- $\text{H}_2\text{O}_2$ -Halogenidsystem wird als das reaktivste angesehen und tötet u.a. Bakterien, Pilze; Viren und auch Tumorzellen ab. Solange  $\text{H}_2\text{O}_2$  zur Verfügung steht, werden bei Anwesenheit von Chlorid auf diese Weise alle oxidierbaren Zielsubstanzen angegriffen. Wenn danach kein  $\text{HOCl}$  mehr verbraucht wird, kommt es durch deren Akkumulation zur Inaktivierung der Myeloperoxidase (Pyne).

## 1.6 Leukozytenadhäsionsdefekt 1 (LAD I)

LAD-1 ist eine autosomal rezessive Erkrankung verursacht durch Mutationen des CD18 Gens auf dem langem Arm des Chromosoms 21 (Kishimoto et al). Der LAD II ist ein seltener, vererbter Immundefekt mit Störung des Fucosemetabolismus. Die molekulare Basis des LAD I-Defekts ist in der Literatur nur für einige Patienten beschrieben. Allende et al. identifizieren bei einem einjährigen Jungen mit schweren Leukozytenadhäsionsdefekt eine Deletion von 171 Nukleotiden, in der sequenzierten cDNA. Der Leukozytenadhäsionsdefekt zeigt eine variable Expression der defekten Adhäsionsmoleküle, wobei es zu mildereren Verlaufsformen der Erkrankung kommen kann. Der Phänotyp mit den Adhäsionsdefekten spiegelt den Grad der Anzahl der gebildeten  $\beta_2$ -Integrine (LFA-1, Mac-1, p150,95) wieder. Anderson et al. beschreiben entsprechend dem Grad der Expression der  $\beta_2$ -Integrine den schweren und den mäßigen Phänotyp. Patienten mit  $< 1\%$  Expression der  $\beta_2$ -Integrine leiden an lebensbedrohliche Infektionen und benötigen eine Knochenmarkstransplantation. Nach erfolgreicher Stammzelltransplantation kann mit einer weitgehend normalen Lebenserwartung gerechnet werden. Bei einer Expression von 1-10% der Antigene auf den Leukozyten führen eine defekte Leukozytenmobilität, Adhärenz und Endozytose zu rezidivierenden Hautinfektionen, zu einer verzögerten Wundheilung mit dysplastischer Narbenbildung. Klinisch unauffällig werden Patienten mit einem Niveau von 40 bis 60% der normalen Anzahl der  $\beta_2$ -Integrine beschrieben (Anderson et al.).

Hogg et al. zeigen einen Leukozytenadhäsionsdefekt bei einem fünfzehnjährigen Patienten mit einer Expression von 40-60 % der normalen Anzahl der  $\beta_2$ -Integrine LFA-1 (Lymphozytenfunktion-assoziiertes Molekül) und Mac-1. Diese Anzahl sollte für eine adäquate normale Integrinfunktion ausreichen, wie bei LAD-Heterozygoten mit ca. der Hälfte der Expression der Antigene auf den Leukozyten es der Fall ist.

Der Patient zeigte aber klinisch die Merkmale eines schweren Phänotyps von LAD: Die Integrine waren zwar exprimiert, aber funktionsuntüchtig: weder das Adhäsionsprotein Mac-1 auf den neutrophilen Granulozyten, noch LFA-1 auf den T-Zellen konnten Liganden wie das Fibrinogen und das interzelluläre Adhäsionsmolekül binden. Es wurden zwei neue Mutationen; S138P und G273R, auf den CD18 Allelen identifiziert. Bei dem LAD-1 Mangel ist der verzögerte Abfall der Nabelschnur ein häufiges, aber nicht obligates Merkmal. Obwohl der oben beschriebene Patient die Merkmale eines mittelschweren Phänotyps mit beispielsweise rezidivierenden Hautinfektionen, Periodontitis, Gingivitis, Otitis media, Granulozytose aufwies, war der Nabelschnurabfall nicht verzögert.

Ursprünglich wurde LFA-1 als wichtiges Antigen auf der Membran von zytotoxischen T-Lymphozyten definiert, aber dieser Rezeptor findet sich auch auf ruhenden T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Mac-1 kommt auf den Membranen von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und natürlichen Killerzellen vor (Fischer et al.). Als molekularer Defekt bei LAD wurden Veränderungen in einer gemeinsamen Komponente verschiedener Leukozytenadhäsionsmoleküle (Leukozytenintegrine) nachgewiesen. Diese Adhäsionsproteine sind Glykoproteine, die aus einer alpha- und einer  $\beta$ -Kette zu Heterodimeren zusammengesetzt sind:

1. LFA-1:  $\alpha$ L $\beta$ 2, CD11a/CD18
2. Mac-1:  $\alpha$ M $\beta$ 2, CD11b/CD18
3. p150,95:  $\alpha$ X $\beta$ 2, CD11c/CD18.

Der CD11/CD18 Komplex ist die Hauptkomponente für die Adhäsion und transendotheliale Migration der Neutrophilen (Harlan).

Alle Proteine befinden sich normalerweise an den Zelloberflächen, können aber nur dorthin gelangen, wenn die variable alpha-Kette und die konstante  $\beta$ -Kette intrazellulär assoziiert sind. Die  $\beta$ -Kette der Leukozytenadhäsionsproteine kommt bei anderen Zellarten identisch vor, während die alpha-Kette dieses Heterodimers für bestimmte Leukozytenarten spezifische Modifikationen aufweist. Die Heterodimere korrespondieren mit entsprechenden Liganden auf Endothelzellen oder Bestandteilen des Komplementsystems. Beispielsweise ist ein auf Endothelzellen vorkommendes Adhäsionsmolekül-1 (ICAM) der Ligand für das LFA-1 (Lymphozytenfunktionsantigen). Der Ligand für das Adhäsionsprotein Mac-1 ist das Komplementspaltprodukt C3bi. Bei dieser angeborenen, insgesamt seltenen Granulozytenfunktionsstörung wandern die Granulozyten verzögert in das Entzündungsgebiet aus, binden schlechter an Endothelzellen und zeigen eine verminderte Chemotaxis, weil auch diese Zellfunktion adhäsionsbedingt ist. Ebenfalls ist die Phagozytose von opsonierten Partikeln vermindert, bei der rezeptorunabhängige Stimulation mit Phorbol ester ist die Phagozytose normal (Anderson et al.).

In einem beschriebenen Fallbericht wird von einem verzögerten (über drei Wochen) Nabelschnurabfall als erster diagnostischer Hinweis auf das Vorliegen einer Granulozytenfunktionsstörung berichtet, bevor schwere bakterielle Infektionen auftreten.

Die Diagnose lässt sich anhand der Flowzytometrie nachweisen (Fehlen von CD 11a, CD18).

Akbari dokumentiert den Fall eines elf Monate alten Jungen, dessen erstes klinisches Zeichen beim LAD I der verzögerte Nabelschnurabfall war (30 Tage nach der Geburt). Anschließend dominierten rezidivierende Pneumonien, Otitiden und nekrotisierende Lokalinfekte. Hoeck et al. beschreibt eine therapieresistente Omphalitis, extreme Wundheilungsstörungen und eine Leukozytose.

Der Nabelschnurrest hatte sich im Alter von vier Wochen noch nicht abgestoßen und musste chirurgisch entfernt werden. Fischer et al. dokumentieren ebenso einen nicht spontan nach vier Wochen abgestoßenem Nabelschnurrest, gefolgt von einer chirurgischen Entfernung, anschließend entwickelten sich eine Omphalitis, schwere rezidivierende bakterielle Infektionen, sowie eine Leukozytose. Bei einem türkischen Jungen wird der Nabelschnurabfall am zwanzigsten Tag beschrieben, gefolgt von nekrotischen Weichteilinfektionen, Granulozytose, gestörter Wundheilung, mit niedrigen Werten für CD11b und CD 18. Bevor die geplante Knochenmarkstransplantation durchgeführt werden konnte, ist er an den Folgen der Sepsis verstorben (Güneser et al.). Als häufige Erreger der Omphalitis sind *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* und *Aspergillus* beschrieben. Die Anzahl der Granulozyten ist extrem erhöht (über 50 000  $\mu$ l). Virale Infektionen werden problemlos überstanden (Gahr et al.). Der verzögerte Abfall des Nabelschnurrestes und die häufig überschießende Narbenbildung werden auf funktionelle Störung der Makrophagen zurückgeführt (Anderson et al.). Eine aktuelle Klassifikation der Adhäsionsproteindefekte stammt von der internationalen Union der immunologischen Gesellschaften. Dieses internationale Komitee beschreibt in der neuesten Version zusätzlich einen Leukozytenadhäsionsdefekt Typ 3 (Notarangelo et al.).

### 1.7 Fragestellung

Wecetin<sup>®</sup>-Streupuder wird als Mittel zur Nabelpflege empfohlen mit dem Ziel, ein möglichst frühes Abfallen des Nabelschnurrestes zu fördern. In der prospektiv durchgeführten Studie fiel der Nabelschnurrest unter Wecetin<sup>®</sup>-Streupuder im Mittel bereits am 4. Tag ab (n=204). Bei den 243 Neugeborenen, deren Nabelschnurreste mit 80%igen Alkohol und Fissan<sup>®</sup>-Silberpuder gepflegt wurden, betrug die mittlere Abfallszeit 10 Tage (Seidler et al.). Ein verspätetes Abfallen des Nabelschnurrestes dient als erster diagnostischer Hinweis auf das Vorliegen eines Leukozytenadhäsionsdefekts. Die frühe Diagnose dieses Immundefekts ist aber essentiell für die weitere Prognose der Erkrankung. Da funktionstüchtige Granulozyten eine wesentliche Voraussetzung für das Abfallen der Nabelschnur sind, stellt sich die Frage ob Streupuder, der metallisches Antimon enthält, das frühe Abfallen der Nabelschnur durch Stimulation der Granulozytenfunktion bewirkt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen des Nabelpuders Wecetin<sup>®</sup>, der Antimon enthält, auf folgende Parameter der Zellfunktion zu untersuchen:

1. Oxidativer Burst und 2. Abtötungsfähigkeit. Zu Beginn der Untersuchungen stellten sich folgende Fragen: Welchen Einfluss hat Wecetin<sup>®</sup>-Streupuder auf die Vitalität der Granulozyten? Bestehen signifikante Unterschiede in der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion der Granulozyten unter Einfluss von antimonhaltigem Puder im Vergleich zu Puder ohne Antimon? Wird die Abtötung von Bakterien durch Granulozyten unter Einfluss von Wecetin<sup>®</sup>-Streupuder gesteigert?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Gewinnung der Granulozyten

Die in der vorliegenden Arbeit zur PMN-Isolation verwendeten venösen Blutproben stammten für die Vorversuche von gesunden Personen im Alter von 20-40 Jahren. Es wurden jeweils 50 bis 100 ml Blut von erwachsenen Probanden in eine mit Heparinlösung (10 units Heparin-Lösung/ml Blut; Heparin-Lösung: Liquemin N 25.000 von Hoffmann-La Roche AG Grenzach-Whylen) benetzte Perfusorspritze entnommen.

Für die Hauptversuche wurde heparinisiertes Nabelschnurblut gesunder Neugeborener untersucht. Trotz des größeren organisatorischen Aufwandes im Vergleich zur Verwendung von Granulozyten gesunder erwachsener Blutspender wurden PMN aus dem Nabelschnurblut verwendet, um vivo nahe Bedingungen zu schaffen, weil die Granulozyten von Neugeborenen im Vergleich zu PMN von Erwachsenen eine eingeschränkte Funktion aufweisen.

Für die Hauptversuche wurden insgesamt sechzehn venöse Blutproben unmittelbar nach der Abnabelung von gesunden Neugeborenen nach unkomplizierter Schwangerschaft und Geburt entnommen, hiervon zehn Proben ausgewertet. Es wurde ausschließlich Nabelschnurblut von spontan entbundenen Neugeborenen entnommen, da bekannt ist, dass der Geburtsmodus nicht nur Einfluss auf die Anzahl der Neutrophilen hat, sondern auch auf deren Funktion (Thilaganathan et al., Kinoshita et al.). Die Neugeborenen kamen nach einer Schwangerschaftsdauer zwischen der 38. und 41. Wochen zur Welt.

Die Apgarwerte lagen im Bereich 7 - 9 nach einer Minute, 9- 10 nach fünf und zehn Minuten.

#### 2.1.2 Medien und Chemikalien

##### PBS-Puffer

Phosphate Buffer Saline, pH 7,3; Zusammensetzung: NaCl 8,0 g; KCl 0,20 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,25 g;  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  1,35 g ad 1000 ml Aqua dest. (Apotheke der Medizinischen Einrichtungen der Universität Düsseldorf).

##### BSA

Bovine Serum Albumine, 5 mg BSA in 1 l PBS-Puffer (Fa. Sigma, St. Louis USA).

##### MPRM

Mono-Poly-Resolving Medium zur Zelltrennung (Fa. Flow Laboratories, Irvine, Scotland).

##### Histopaque-1077

Trennmedium bestehend aus Polysaccharose 5,7 g/l und Natriumdiatrizoat 9,0 g/l (Fa. Sigma).

##### Ammoniumchlorid-Lösung isotonisiert

$\text{NH}_4\text{Cl}$  0,3 g;  $\text{KHCO}_3$  1,0 g;  $\text{EDTA-Na}_2$  0,0375 g ad 1000 ml, zur Lyse der Erythrozyten (Apotheke der Medizinischen Einrichtungen der Universität Düsseldorf).

##### Celloton-Lösung

zur Zellzählung (Fa. mölab, Hilden).

## NEM (N-Ethylmaleimid)

126 mg NEM ad 1 l 0,9 % NaCl unterbricht den oxidativen Stoffwechsel (Fa. Sigma No. E-3876, 5 g).

## Inkubationsmedium (Fa. Merck)

	Stammlösungen:	Gebrauchslösungen:
KCL	0,5 mol/l	10 ml
NaCl	1,46 mol/l	10 ml
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 mol/l	1 ml
MgSO <sub>4</sub>	0,05 mol/l	1 ml
Glucose	0,5 mol/l	1 ml

Die angegebenen Mengen wurden in einen 100 ml Meßkolben gegeben, dieser zu 2/3 mit Aqua dest. gefüllt, gemischt, dann wurden 1ml 0,1 mol/l CaCl<sub>2</sub> zugegeben, gemischt und anschließend mit 100 ml Aqua dest. aufgefüllt.

Das Inkubationsmedium wurde zu je 10 ml Falcon-Tubes aliquotiert, bei -76 °C gelagert, unmittelbar vor dem Gebrauch aufgetaut und bis zum Einsatz in dem Versuch bei + 4 °C aufbewahrt.

FCS: 10%-iges, hitzeinaktiviertes, fetales Kälberserum (Fa. Biochrom, Berlin).

Quick-Differentialfärbung (Fa. Baxter Dade AG Düdingen, CH), eine Differentialblutbild-Schnellfärbung, zusammengesetzt aus:

1. Fixierlösung: Fast Green in Methanol (Cat.No. 130833)
2. Färbelösung 1 : Eosin G in Phosphatpuffer, pH 6,6 (Cat. No. 130834)
3. Färbelösung 2 : Thiazin-Farbstoff in Phosphatpuffer, pH 6,6 (Cat. No. 130835).

## Enzyme

1. Cytochrom (Fa. Sigma, No. C-7752, 1g)

15 mg Cytochrom/ml IM

2. SOD (Fa.Sigma, No.S-2515, 30.000 units)

1 mg Superoxiddismutase/ml IM

## Stimuli

nicht opsonisiertes Zymosan A (Fa. Sigma)

ein proteinfreies Hydrolysat aus Zellwandbestandteilen von *Saccharomyces cerevisiae*; 1 x 10<sup>7</sup> Partikel in 50 µl fertig eingestellt

mit NHS (gepooltes Normalserum) opsonisiertes Zymosan A: 1 x 10<sup>7</sup> Partikel in 50 µl fertig eingestellt.

PMA (Fa. Sigma, No.P-8139)

Phorbolmyristataacetat: Stammlösung: 1 mg/ml DMSO, Lagerung bei - 76°C

Gebrauchslösung: 1:200 mit IM verdünnt.

## NHS

sterilfiltriertes Serum von 25 gesunden, erwachsenen Spendern wurde gepoolt, bei -76 °C aufbewahrt und unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut.

### Wecesin<sup>®</sup>-Streupuder

Der Hersteller empfiehlt den Wecesin<sup>®</sup>-Streupuder zur Nabelpflege bei Neugeborenen und zur trockenen Wundbehandlung bei Schürfwunden (Zerm).

#### 1. Wecesin<sup>®</sup>-Streupuder mit Antimon (Weleda AG, Schwäbisch Gmünd)

100 g enthalten: eine Antrocknung der äthanolischen Auszüge aus: Arnika, Planta tota 2,5 g; Calendula, Herba 1,65 g; Echinacea angustifolia et purpurea, Planta tota 1,66 g; Quarz 0,1 g; Stibium metallicum praeparatum 0,1 g ad 100 g Talkum.

#### 2. Wecesin<sup>®</sup>-Streupuder ohne Antimon (Weleda AG, Schwäbisch Gmünd)

diente als Kontrolle bei den Granulozytenfunktionstesten. 50 g enthalten: eine Antrocknung der äthanol. Auszüge aus: Arnika, Planta tota 1,25 g; Calendula, Herba 0,82 g; Echinacea angustifolia et purpurea, Planta tota 0,83 g; Quarz 0,05 g ad 50 g Talkum.

Materialien für die Untersuchung der antimikrobiellen Abtötungsfähigkeit:

*Staphylococcus aureus* strain 502A: Stammlösung enthält  $10^9$  Keime in 100  $\mu$ l Müller-Hinton-Brühe (Difco 0757.02.3), (Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Düsseldorf)

*Escherichia coli* eingestellt auf  $10^7$  Keime/ml Trypton-Soja Brühe und auf Nähragarplatten ausplattiert (Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Düsseldorf)

RPMI 1640: ein Kulturmedium (Fa. Seomed-Biochrom, Berlin)

FCS: fötales Kälberserum (Fa. Gibco)

Kunststoffröhrchen: Falcon Tubes Bluemax 15 und 50 ml (Fa. Falcon), Sarstedt 5ml (Fa. Sarstedt).

### 2.1.3 Geräte

Zellcounter : Mexxem BC1 (Fa. Mexxon)

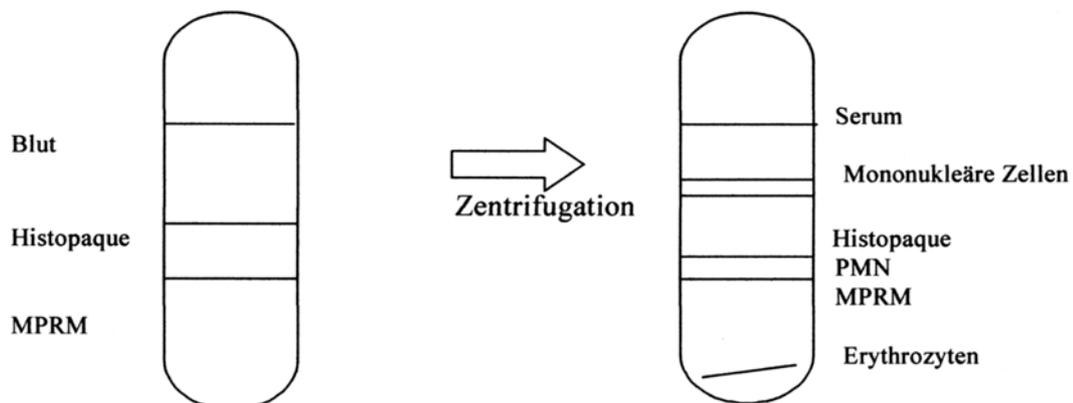
Die Zellzählung erfolgt nach dem Widerstandsprinzip.

Spektralphotometer: Serie DU 600 (Fa. Beckmann).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolierung der Granulozyten

Die PNM-Isolierung erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation über Monopoly / Histopaque (Abb.2.2.1).



**Abb. 2.2.1: Isolierung der Granulozyten**

Zuerst wurde das frische Vollblut in 50 ml Falcon-Tubes abgefüllt und im Verhältnis 1: 1 mit PBS -Puffer verdünnt. Zur Isolierung wurde ein Gradient aus 3 ml MPRM, der mit 2 ml gekühltem Histopaque überschichtet wurde, hergestellt. Über diesen Gradienten wurden ca. 5 ml verdünntes Vollblut vorsichtig geschichtet.

Nach einer Zentrifugation von 30 min bei 20 °C mit 350 g befinden sich die Granulozyten in der Interphase zwischen den beiden Trennmedien. Serum, mononukleäre Phase und Medium wurden mit einer Pasteur-Pipette entnommen. Die Granulozytenphase in sterile Falcon-Tubes pipettiert, um sie anschließend in PBS zu waschen (350 g, 20 °C, 10 min). Die Lyse der evt. noch im Pellet vorhandenen Erythrozyten erfolgte mit 10 ml Ammoniumchlorid, um nach 5 Minuten Einwirkungszeit erneut einen Waschvorgang vorzunehmen. Nach dem erneuten Verwerfen des PBS, wurden die im Sediment befindlichen PMN mit PBS aufgenommen, wiederholt abzentrifugiert (10 min, 300g, 4 °C), der Überstand verworfen und die Zellen in IM resuspendiert.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer 1:10 verdünnten Zellprobe (80 µl), die mit 20 ml einer isotonischen Verdünnungslösung (Mexxoton) zur Messung am Zellcounter gemischt wurde. Nach dreifacher Messung errechnete man das arithmetische Mittel und stellte die gewünschte Zellzahl ein:

1. für die  $O_2^-$ -Produktion auf  $10^7$ /ml IM
2. für das Killing auf  $5 \times 10^6$ /ml RPMI 1640 und  $10^6$ /ml RPMI 1640.

### 2.2.2 Etablierung der Methodik mit adulten neutrophilen Granulozyten in den Vorversuchen

Da die Nabelschnurgranulozyten im Vergleich zu adulten PMN eine eingeschränkte Funktion aufweisen, wurden die Versuche zwecks Etablierung der Untersuchungsmethodik mit neutrophilen Granulozyten Erwachsener durchgeführt.

Die Versuche beinhalteten:

1. Untersuchung des Einflusses des Wecesin-Streupuders<sup>®</sup> auf die Zellvitalität der PMN
2. Untersuchung der  $O_2^-$ -Produktion
3. Untersuchung der Abtötungsfähigkeit.

Mittels Trypanblaumethode wurde der Einfluss des Puders auf die Zellvitalität untersucht. Die Auswahl der verwendeten Puderkonzentrationen richtete sich nach diesen Ergebnissen und der Stimulierbarkeit der Granulozyten. Das Ziel der Vorversuche war es auch die verwendeten Methoden zu überprüfen und für die folgenden Experimente mit Nabelschnurblut zu etablieren. Die Vorversuche dienen der Erkennung und Berücksichtigung möglicherweise auftretender, spezifischer und unspezifischer Beeinflussungen der Testsysteme durch die Puderapplikation (z. B. Phagozytose von Puderpartikeln). Parallel zu den im Methodenteil beschriebenen Versuche wurden, wie auch später bei der Untersuchung von Granulozyten aus Nabelschnurblut, Ansätze mit verschiedenen Puderkonzentrationen untersucht.

Um unspezifische Stimulationseffekte auszuschließen, wurden bei allen beschriebenen Tests Ansätze mit einem Puder ohne Antimonzusatz als doppelte Kontrollen mitgeführt.

### 2.2.3 Vitalitätsprüfung

Zur Messung des Einflusses des Nabelschnurpuders (mit und ohne Antimon) und von Stibium metallicum auf die Lebensfähigkeit der Granulozyten wurde der Farbausschlußtest mit Trypanblau eingesetzt.

Die Methode basiert auf dem Prinzip, dass lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen, während bei toten oder geschädigten Zellen sowohl das Cytoplasma, als auch der Kern angefärbt werden.

Testansatz : Verdünnung der Zellsuspension	1:10
Trypanblaulösung (Böhringer Mannheim)	1,8 ml
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	2,7 ml
Zellsuspension	<u>0,5 ml</u>
	5,0 ml

Nach einer Vorinkubation der Zellen von vier Stunden mit Puder (5 mg/ml) und mit Stibium metallicum (0,5 mg Sb/ml) wurde durch Auszählen von 200 PMN der prozentuale Anteil trypanblaugefärbter Zellen mikroskopisch bestimmt.

1. Testreihe: Einfluss von Wecetin<sup>®</sup>-Streupuder (mit und ohne Antimon) auf die Vitalität der adulten PMN
2. Testreihe: Einfluss von Wecetin<sup>®</sup>-Streupuder (mit und ohne Antimon) auf die Vitalität der Nabelschnurgranulozyten
3. Testreihe: Einfluss von Stibium metallicum auf die Vitalität von adulten PMN.

### 2.2.4 O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion

Mit dieser Methode wird die Stimulation des oxidativen Stoffwechsels der PMN quantifiziert bestimmt. Die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Messung beruht auf dem Prinzip der photometrischen Endpunktmessung der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-bedingten, SOD-kontrollierten Cytochrom C-Reduktion. Diese Reduktion ist ein Maß für die Menge der Sauerstoffradikale.

Der oxidative Stoffwechsel wird durch folgende Stimuli (partikulär und löslich) ausgelöst:

1. phagozytische Hefebestandteile (Zymosan), die mit 50%igem NHS opsonisiert wurden,
2. PMA, eine lösliche Substanz, die über Proteinkinase direkt Granulozyten stimulieren kann.

Die versuchsfertigen Lösungen von Zymosan und PMA wurden, wie folgend beschrieben, angefertigt. Zwecks Herstellung von opsoniertem Zymosan wurden je 30 mg Zymosan A mit 3,75 ml 0,9 % NaCl in Glasröhrchen gelöst, gründlich suspendiert, mit Aluminiumkappen verschlossen und 30 min bei 100 °C im Wasserbad schüttelnd gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Suspension in Falcon Tubes überführt.

Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 4 °C und 1500 g für 10 min. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Zur Herstellung von 50%igem Zymosan wurde der Bodensatz in 3,75 ml NHS und 3,75 ml PBS resuspendiert. Zur Herstellung von nicht opsoniertem Zymosan wurde nur PBS, kein NHS verwendet. Die Opsonisierung ereignete sich bei der Inkubation im 37 °C temperierten Wasserbad unter ständigem Schütteln für 30 min. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 1500 g und bei 4 °C. Der Überstand wurde abgesaugt. Im weiteren Verlauf wurde der Bodensatz mit PBS resuspendiert und zweimal mit PBS gewaschen. Dieser wurde in 1 ml PBS resuspendiert.

Anhand einer 1: 100 Verdünnung (30  $\mu$ l Zymosansediment und 2970  $\mu$ l PBS) wurde die Zymosanpartikelzahl im Counter bestimmt und durch Zugabe von PBS diese auf  $2 \times 10^5$  Partikel/ $\mu$ l eingestellt (entspricht  $10^7$  Partikel/50  $\mu$ l).

Die Proben wurden in Eppendorfhütchen bei - 76 °C aufbewahrt und bis zum Einsatz in den Versuchen bei + 4 °C aufgetaut.

Zwecks Herstellung von PMA wurden die nach Herstellervorschrift hergestellte Stammlösung (1mg/ml DMSO) bei -76 °C aufbewahrt und unmittelbar vor Einsatz im  $O_2^-$ -Test aufgetaut.

Pro Ansatz wurden 100  $\mu$ l einer 1 : 200 Verdünnung (3,98 ml IM und 20  $\mu$ l Stammlösung) eingesetzt.

Folgende Testansätze fanden Verwendung:

1. Ansatz : enthält kein Stimulus, zur Überprüfung der Vorstimulation der Granulozyten durch Abnahme, Transport und Lagerung
2. Ansatz : nicht opsonisiertes Zymosan
3. Ansatz : opsonisiertes Zymosan
4. Ansatz : PMA
5. Ansatz : Puder mit Antimon (0,5 g/ml IM)
6. Ansatz : Puder ohne Antimon (0,5 g/ml IM).

Verdünnungsreihen zur  $O_2^-$  Messungen mit Wecetin<sup>®</sup>-Streupuder

Ausgehend von einer Stammkonzentration des Puders mit und ohne Antimon (0,5 g/ml IM) sind folgende Verdünnungen in den Vorversuchen mit Erwachsenenblut eingesetzt worden:

1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128
-------	-------	-------	--------	--------	--------	---------

**Tab. 2.2.4 –1: Verdünnungsreihe des Puders für die Vorversuche (n=6).**

Die Auswahl der verwendeten Puderkonzentrationen für die Hauptversuche richtete sich nach den Ergebnissen der Vorversuche mit isolierten PMN aus dem Erwachsenenblut.

Für die Hauptversuche mit isolierten PMN aus dem Nabelschnurblut wurden folgende Verdünnungen der Stammkonzentration von 0,5 g/ml IM gewählt:

1 : 4	1 : 16	1 : 64	1 : 256
-------	--------	--------	---------

**Tab. 2.2.4 – 2: Verdünnungsreihe des Nabelschnurpuders für die Hauptversuche (n=10).**

Die  $O_2^-$ -Produktion wird in Anwesenheit und Abwesenheit der verschiedenen Stimuli gemessen. Jedes Reagenzröhrchen enthält das chromogene Substrat Cytochrom C. Die Bindung des Sauerstoffs an Cytochrom C führt zur Substratreduktion. Diese geht mit einem Farbumschlag einher, der anschließend photometrisch gemessen wird. Der Ansatz B enthält zusätzlich das Enzym SOD, das die entstandenen Sauerstoffradikale abfängt und es bildet sich  $H_2O_2$ , so dass die Bindung des Sauerstoffs an Cytochrom verhindert wird. Die  $O_2^-$ -Produktion ergibt sich aus der Differenz zwischen der photometrisch gemessenen Menge an reduziertem Cytochrom C im Ansatz A und Ansatz B.

Pipettierschema für den  $O_2^-$  -Test

Ansatz	A	B	
Cytochrom C	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	Ansatz 1-6
SOD	—	50 $\mu$ l	Ansatz 1-6
Stimuli und Puder ( je nach o. a. Ansatz )			
nicht opson. Zymosan	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	Ansatz 2
opson.Zymosan	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	Ansatz 3
PMA	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	Ansatz 4
Puder ohne Antimon	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	Ansatz 5
Puder mit Antimon	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	Ansatz 6
Inkubationsmedium	ad 400 $\mu$ l	ad 400 $\mu$ l	Ansatz 1-6
Inkubation aller Röhrrchen im Wasserbad bei 37 °C für 5 min (Äquilibrierungszeit)			
PMN ( $10^6/100 \mu$ l PBS	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	Ansatz 1-6

Die Inkubation der Röhrrchen im Schüttelwasserbad erfolgte bei 37 °C für 30 min. Der oxidative Stoffwechsel wurde mit je 2 ml eiskaltem NEM gestoppt. Bei der Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 1500 g kam es zur Freisetzung des intrazellulären  $O_2^-$ . Die photometrische Messung des zellfreien Überstandes fand bei 550 nm statt.

Zur Berechnung des Endergebnisses wurde die Extinktion des Ansatzes B von der des Ansatzes A subtrahiert, um die sauerstoffunabhängige Reduktion des Enzyms zu korrigieren. Als Maß für die Menge reduzierten Cytochrom C dient die Extinktion  $E_{550}$  bei  $\lambda = 550$  nm. Die Extinktionsdifferenz zwischen Ansatz A und Ansatz B ist direkt proportional der im Ansatz A gebildeten Menge von  $O_2^-$ . Zur Berechnung der  $O_2^-$ -Menge wurde der Verdünnungsfaktor des Blutes (2,9) und der molare Extinktionskoeffizient für reduzierte Cytochrom C ( 0,0245 ) berücksichtigt:

$$\frac{\text{Extinktion A} - \text{Extinktion B} \times 2,9}{0,0245} = \text{nmol } O_2^-/10^6 \text{ PMN}$$

## 2.2.5 Abtötungsfähigkeit

Die Fähigkeit der PMN aufgenommene Mikroorganismen abzutöten, gehört neben der Chemotaxis, der Opsonisierung, der Aufnahme und dem Degranulierungsprozeß zu einer vollständigen Infektabwehr. Den Phagozyten wurde zur Aufnahme und Abtötung (Killing) *Staphylococcus aureus* angeboten.

Für die Vorversuche wurden PMN aus dem Erwachsenenblut isoliert, in den Hauptversuchen Granulozyten aus dem Nabelschnurblut verwendet. In den Vorversuchen fanden unterschiedliche Puderkonzentrationen mit und ohne Antimon Verwendung. Die Auswahl der verwendeten Puderkonzentrationen richtete sich nach den Ergebnissen der Vorversuche: 1. Durchführbarkeit der Experimente (gleichmäßiges pipettieren der Pudersuspensionen mit und ohne Antimon, sicheres Ausplattieren der Bakteriensuspension, einzeln wachsende Kolonien ohne Puderartefakte). 2. Einfluss des Puders auf das Bakterienwachstum. Es fanden zwei unterschiedliche Konzentrationen des Streupuders Verwendung:

1. RPMI/A: 5 mg Puder mit Antimon/ml RPMI (Ansatz 3 und 4)
- RPMI/K: 5 mg Puder ohne Antimon/ml RPMI (Ansatz 5 und 6)

2. RPMI/a: 0,8 mg Puder mit Antimon/ml Antimon (Ansatz 7 und 8)  
 RPMI/k: 0,8 mg Puder ohne Antimon/ml RPMI (Ansatz 9 und 10)  
 (siehe Tab.2.2.5).

Es wurden aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche mit zwei unterschiedlichen Zellzahlen der PMN gearbeitet:

1.  $5 \times 10^6$ /ml RPMI
2.  $1 \times 10^6$ /ml RPMI.

10 Ansätze der Killing- Hauptversuche mit Nabelschnurblut:

1. Ohne Puder	100 $\mu$ l PMN ( $5 \times 10^6$ /ml RPMI)
	50 $\mu$ l <i>Staph.aureus</i>
	350 $\mu$ l RPMI
2. Wachstumskontrolle zum 1. Ansatz	50 $\mu$ l <i>Staph.aureus</i>
	450 $\mu$ l RPMI
3. Puder mit Antimon	100 $\mu$ l PMN ( $5 \times 10^6$ /ml RPMI)
	50 $\mu$ l <i>Staph. aureus</i>
	350 $\mu$ l RPMI/A
4. Wachstumskontrolle zum 3. Ansatz	50 $\mu$ l <i>Staph. aureus</i>
	450 $\mu$ l RPMI/A
5. Puder ohne Antimon	100 $\mu$ l PMN ( $5 \times 10^6$ /ml RPMI )
	50 $\mu$ l <i>Staph.aureus</i>
	350 $\mu$ l RPMI/K
6. Wachstumskontrolle zum 5. Ansatz	50 $\mu$ l <i>Staph. aureus</i>
	450 $\mu$ l RPMI/K
7. Puder mit Antimon	100 $\mu$ l PMN
	50 $\mu$ l <i>Staph. aureus</i>
	350 $\mu$ l RPMI/a
8. Wachstumskontrolle zum 7. Ansatz	50 $\mu$ l <i>Staph. aureus</i>
	450 $\mu$ l RPMI/a
9. Puder ohne Antimon	100 $\mu$ l PMN
	50 $\mu$ l <i>Staph.aureus</i>
	350 $\mu$ l RPMI/k
10. Wachstumskontrolle zum 9. Ansatz	50 $\mu$ l <i>Staph.aureus</i>
	450 $\mu$ l RPMI/k

**Tab. 2.2.5: Pipettierschema für die Killing-Hauptversuche (n=10)**

Testdurchführung: Zu den vorbereitenden Arbeiten gehörte die Vermehrung des *Staphylococcus. aureus* Stammes 502 A über 18 Stunden in 100 ml Trypton-Soja Brühe bei 37 °C. Dieser Ansatz wurde nach der Inkubation im Wasserbad für 30 min bei 1500 G zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet zweimal in PBS gewaschen. Die Bakterien wurden in 1 ml PBS aufgenommen. Diese Portionen wurden in sterile Kunststoffröhrchen bei - 76 °C eingefroren.

Am nächsten Tag wurden drei Röhrchen aufgetaut, verdünnt und auf Nähragarplatten ausplattiert, um die Anzahl lebender Bakterien/Röhrchen zu bestimmen. Diese Stammlösung enthielt  $10^8$  Keime/ml Trypton-Soja Brühe. Für jeden Test wurde ein neues Röhrchen für eine Stunde im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und auf  $10^7$  Keime/ml Trypton-Soja Brühe eingestellt.

Die gereinigten Granulozyten wurden auf  $5 \times 10^6$ /ml RPMI und auf  $10^6$ /ml RPMI 1640 plus 10 % FCS eingestellt.

In Falcon Röhrchen wurden 100  $\mu\text{l}$  Granulozyten, 350  $\mu\text{l}$  RPMI ohne FCS und 50  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension pipettiert. Für die Zeitpunkte 0, 60 und 120 Minuten wurden je 2 Röhrchen angesetzt. Pro Zeitpunkt (0, 60, 120 Minuten) ferner als Kontrolle ein Röhrchen nur mit 450  $\mu\text{l}$  Medium und 50  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension. Die fertig beschickten Röhrchen wurden bei  $37^\circ\text{C}$  ins Schüttelwasserbad und 250 Rotationen gestellt. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden die Röhrchen aus dem Wasserbad genommen und auf Eis gestellt.

Zum Ausplattieren wurden Röhrchen mit 900  $\mu\text{l}$  NaCl 0,9 % für 6 Verdünnungsstufen (je 1: 10) vorbereitet.

Von den Röhrchen, 3, 4, 5 und 6 wurden je 100  $\mu\text{l}$  ausplattiert. Nach einer Inkubation von 18 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  im Wärmeschrank wurde die Anzahl lebender Bakterienkolonien (colony-forming units = CFU) auf den Agarplatten durch manuelles Auszählen bestimmt. Ausgewertet wurden die Platten, die zwischen 40 und 400 CFU aufwiesen. Anschließend wurden die CFU der mit und ohne Puder behandelten Platten mit denen der Wachstumskontrollen verglichen. Der prozentuale Anteil der getöteten Bakterien nach 60 min und 120 min wurde nach der folgenden Formel bestimmt:

Killingrate zum Zeitpunkt T (60, 120 min) =  $100 -$  dem prozentualen Anteil der CFU zum Zeitpunkt T.

#### 2.2.6 Nachversuche

Aufgrund der Ergebnisse der Vor- und Nachversuche schlossen sich folgende Versuchsreihen mit adulten PMN an:

1. der Einfluss von Stibium metallicum auf die Vitalität von adulten PMN,
2. das Bakterienwachstum (*Staphylococcus aureus* n=4, *Escherichia coli* n=5) unter Einfluss von Stibium metallicum,
3. der Einfluss von Stibium metallicum auf die Sauerstoffradikalproduktion, n=5. In den Nachversuchen wurde Stibium metallicum in einer Stammkonzentration von 0,5 mg/ml Inkubationsmedium eingesetzt und entsprechend den Hauptversuchen verdünnt,
4. der Einfluss von Stibium metallicum auf die mikrobielle Abtötungsfähigkeit, n=5. Analog zu den Konzentrationen des Antimons im Streupuder wurden in den Nachversuchen die Stammkonzentration von 0,5 mg/ml 1:100 und 1:700 verdünnt.

Jede Versuchsreihe wurde mit Doppelansätzen durchgeführt.

### 2.2.7 Statistische Berechnungen

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 9.0 (Brosius, Brace et al.). Die Ergebnisse der doppelten Ansätze einer Probe sind im Ergebnisteil jeweils mit a und b gekennzeichnet.

Die Entscheidung über signifikante Unterschiede bei einem Stichprobenumfang  $n \geq 6$  wurde mit Hilfe des nichtparametrischen Wilcoxon-Tests für zwei verbundene Stichproben getroffen. Die Nullhypothese lautete: Die  $O_2^-$  -Werte bzw. Killingrate der Granulozyten unter Einfluss vom Puder mit Antimon unterscheiden sich nicht signifikant von den Ergebnissen der Zellen, die mit Puder ohne Antimon behandelt worden sind. Berechnet wurde der p- Wert, der die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der man das vorliegende Testergebnis unter der Nullhypothese erhält. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf  $\alpha=0,05$  festgelegt.

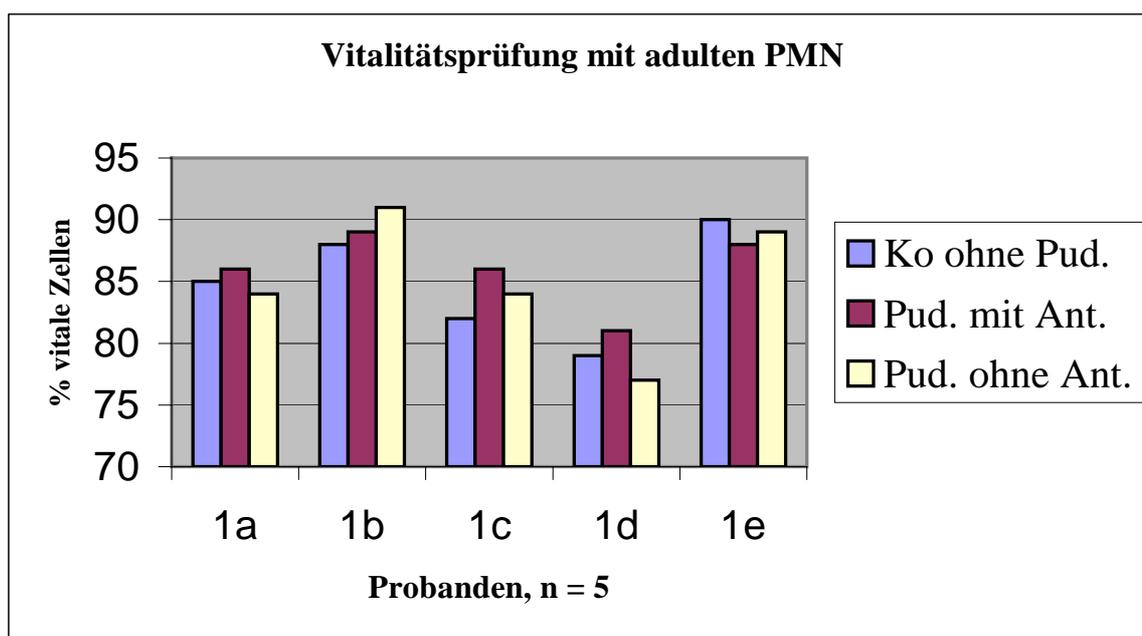
Die Signifikanzberechnungen für die Vitalitätsversuche, für den Vorversuch Killing 3.3.1 und für die Versuche mit einem geringeren Stichprobenumfang ( $n \leq 5$ ) erfolgten mit dem Student t-Test für zwei verbundene Stichproben. Als signifikant wurde  $p \leq 0,05$  angenommen. Eine Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Test nach Kolmogorav-Smirnov (Weiß).

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik, Direktor Prof. Dr. Uwe Feldmann, Universitätskliniken des Saarlandes, mit Unterstützung von Dipl.- Math. T. Georg.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Vitalitätsprüfungen

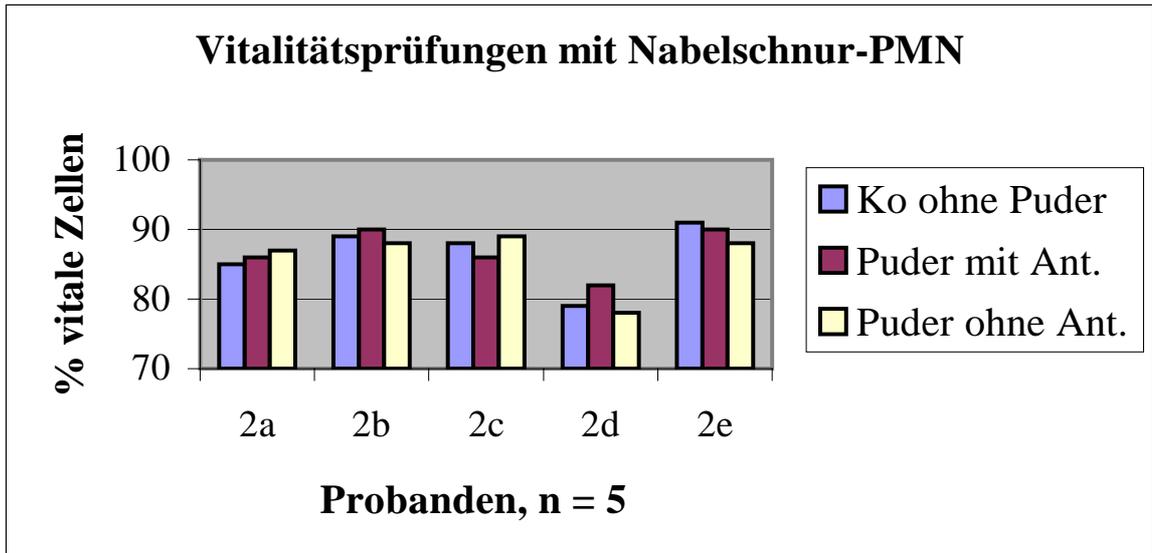
Der Einfluss des Wecesin<sup>®</sup>-Puders auf die Zellvitalität wurde mittels der Trypanblauexklusionsmethode untersucht. Die Vitalitätsprüfungen fanden während der Vorversuche mit Erwachsenengranulozyten (**Abb. 3.1-1**) und in den Hauptversuchen mit PMN aus dem Nabelschnurblut statt (**Abb. 3.1-2**). Zusätzlich wurde der Einfluss von Stibium metallicum allein auf die Vitalität von Erwachsenengranulozyten in fünf Proben untersucht (**Abb. 3.1-3**). Die PMN wurden jeweils vier Stunden mit einer Puderkonzentration von 0,5 g/ml bzw. 0,5 mg Stibium metallicum /ml Inkubationsmedium inkubiert. In diesem Zeitraum waren die Funktionsprüfungen mittels O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Test und Abtötungsfähigkeit abgeschlossen. Weder das Puder mit Antimon, noch das Puder ohne Antimon wirkten toxisch auf die Granulozyten. PMN, die mit Stibium metallicum inkubiert wurden, zeigten im Vergleich zu der Kontrolle ohne Puder in der Vitalität keine signifikanten Unterschiede. Puder mit Antimon und Puder ohne Antimon beeinflussten die Vitalität im Untersuchungszeitraum in den untersuchten Konzentrationen nicht. Die Einzelwerte im Durchschnitt von den Erwachsenengranulozyten und Nabelschnurgranulozyten, jeweils mit Puder mit bzw. ohne Antimon, wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (**Anhang Tab. 6.1-1, Tab. 6.1-2, Tab. 6.1-3**).



**Abb. 3.1-1: Ergebnisse der Vitalitätsprüfungen mit adulten PMN, n=5 (1a–1e)**

Kontrolle ohne Puder (Ko ohne Pud.); Puder mit Antimon (Pud. mit Ant.);  
Puder ohne Antimon (Pud. ohne Ant.)

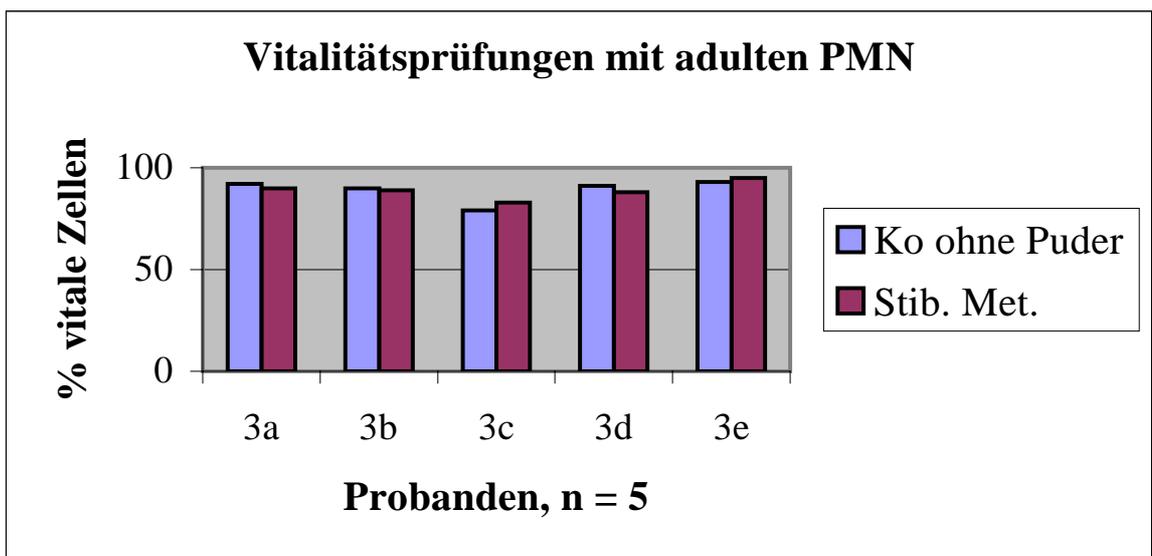
(Die Signifikanzberechnungen mit MW und SD befinden sich im **Anhang Tab. 6.1-1, Tab. 6.1-2 und Tab. 6.1-3**)



**Abb. 3.1-2: Ergebnisse der Vitalitätsprüfungen mit Nabelschnur-PMN, n=5 (2a-2e)**

Kontrolle ohne Puder (Ko ohne Pud.); Puder mit Antimon (Pud. mit Ant.);  
Puder ohne Antimon (Pud. ohne Ant.).

(MW und SD im Anhang Tab.6.1-1, Tab.6.1-2, Tab.6.1-3)



**Abb. 3.1-3: Ergebnisse der Vitalitätsprüfungen mit adulten PMN, n= 5 (3a – 3e)**

Ansatz ohne Puder (Ko ohne Puder); Ansatz mit Stibium metallicum (Stib. Met.)

(MW und SD im Anhang Tab.6.1-1, Tab.6.1-2, Tab.6.1-3)

### 3.2 Vorversuche: O<sub>2</sub><sup>-</sup>- Produktion

Die Vorversuche mit Erwachsenenblut dienten der Optimierung der Versuchsabläufe und der Festlegung der optimalen Puderkonzentrationen für die folgenden Experimente mit Nabelschnurblut in den Hauptversuchen. Unter 3.2.4 sind zwei Vorversuche mit PMN isoliert aus Nabelschnurblut beschrieben. Durch mehrere Experimente wurde ein Konzentrationsbereich des Puders mit und ohne Antimon festgelegt. Die Teströhrchen wurden regelmäßig aufgeschüttelt, um die Puderpartikel in Suspension zu halten.

3.2.1  $O_2^-$ -Produktion der neutrophilen Granulozyten

In diesen sechs Vorversuchen wurden die ersten beiden Versuche mit Puder einfach durchgeführt (Test 1 und Test 2), alle anderen Teste als doppelten Ansatz (Ansatz a und b) mit isolierten PMN von jeweils einem gesunden, erwachsenen Probanden (Proband 1 bis 6), entsprechend dem Pipettierschema in 2.2.4. Als Kontrolle diente jeweils der Testansatz ohne Puder.

ohne Puder					Test mit Puder							
Test	LW	ohne St.	nicht oZ	oZ	PMA	0,5 g/ml mit Ant.	0,5 g / ml ohne Ant.	1 : 2 mit Ant.	1 : 2 ohne Ant.	1 : 4 mit Ant	1 : 4 ohne Ant.	
1a	0,29	5,66	n.d.	87,19	94,64	17,37	8,17	14,06	19,51	15,91	18,37	
1b	0,37	n.d.	n.d.	89,45	97,18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
2a	0,33	1,42	n.d.	59,55	94,41	15,41	9,7	15,62	11,73	12,99	14,01	
2b	0,34	3,69	n.d.	53,09	97,37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
3a	0,47	10,86	10,88	88,01	97,98	28,65	20,05	27,38	23,06	19,34	28,44	
3b	0,49	5,46	8,39	89,2	98,22	28,86	23,72	27,44	n.d.	21,7	31,13	
4a	0,25	5,05	25,03	60,99	85,2	27,48	16,82	27,97	15,87	23,07	18,21	
4b	0,27	n.d.	24,72	62,76	85,74	15,64	15,89	24,98	16,51	23,21	16,89	
5a	0,36	2,69	3,15	80,81	88,37	17,78	13,88	16,42	7,34	16,97	5,69	
5b	0,38	2,27	4,79	76,54	85,06	12,22	11,42	12,09	11,48	11,71	9,01	
6a	0,35	2,38	5,93	70,88	93,63	23,75	13,69	18,43	11,24	16,05	20,59	
6b	0,38	2,25	4,95	73,96	92,86	24,39	17,5	19,81	14,98	26,06	12,45	
MW	0,36	4,37	10,98	74,37	92,56	20,5	14,06	19,49	15,5	17,99	17,27	
SD	7,19	2,34	9,57	13,42	5,25	5,28	4,99	6,06	5,11	4,12	7,32	

Test	Test mit Puder									
	1 : 8 mit Ant.	1:8 ohne Ant.	1 : 16 mit Ant.	1 : 16 ohne Ant.	1 : 32 mit Ant.	1 : 32 ohne Ant.	1: 64 mit Ant.	1 : 64 ohne Ant.	1 : 128 mit Ant.	1 : 128 ohne Ant.
1	8,72	13,62	9,85	14,49	8,22	10,28	5,54	8,59	5,36	6,84
2	10,16	12,48	8,72	10,78	6,28	11,05	6,05	8,88	4,65	9,4
3a	17,45	31,68	14,79	18,81	14,6	14,6	9,69	5,33	9,13	4,45
3b	14,85	25,87	15,49	20,25	15,47	15,47	10,23	3,99	14,67	6,41
4a	17,75	16,36	12,36	13,28	8,56	8,53	5,52	6,27	2,58	2,65
4b	17,12	14,64	12,72	12,1	7,88	n.d.	5,51	n.d.	3,06	1,83
5a	8,35	3,87	6,84	6,71	3,7	1,79	6	4,96	1,34	1,89
5b	6,62	5,84	2,63	2,43	8,79	2,18	6,31	1,95	1,15	2,04
6a	12,54	7,06	7,26	12,15	4,96	2,84	2,35	3,96	3,72	3,72
6b	10,09	5,31	11,51	2,05	7,56	1,06	2,92	1,32	7,09	1,45
MW	11,88	13,57	10,06	11,38	8,37	7,5	5,98	5,75	5,23	4,75
SD	4,04	8,56	3,54	5,5	3,4	4,38	2,34	2,61	3,65	3

Tab. 3.2.1:  $O_2^-$ -Test: n = 6, Puder mit und ohne Antimon, n. d. = nicht durchgeführt,  $O_2^-$ -Menge in nmol  $O_2^-/10^6$  PMN, Vorversuch

Es wurden nicht opsonisiertes, opsonisiertes Zymosan (mit 50%igem NHS) und PMA als Stimulus verwendet. Der MW der  $O_2^-$ -Produktion der Granulozyten ohne Stimulus lag bei 4,37. Die höchsten Werte wurden nach Stimulation mit PMA erreicht mit einem MW von 92,56, im Vergleich zu nicht opsoniertem Zymosan mit einem MW von 74,37 und opsoniertem Zymosan mit einem MW von 7,32. Anhand der Kontrolle ohne Puder konnte gezeigt werden, dass in allen sechs Vorversuchen die Zellen funktionstüchtig sind.

Der Ansatz ohne Stimulus unterscheidet sich signifikant von den  $O_2^-$ -Werten von Puder mit Antimon bis zur der Verdünnung 1:64, beim Ansatz ohne Puder bis zu der Verdünnung von 1:32. Die  $O_2^-$ -Produktion der PMN wurde durch die Verwendung von Puder konzentrationsabhängig gesteigert, unabhängig vom Antimon-gehalt. Die höchsten Werte ergaben sich bei der Stammkonzentration von 0,5 g Puder/ml IM mit einem MW für Puder mit Antimon von 20,50 und einen MW für Puder ohne Antimon von 14,06. Bei der Verdünnung 1:2 betrug der MW mit Antimon 19,49 und der MW ohne Antimon 15,50. In den folgenden Verdünnungsstufen von 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, und 1:64 nahm die Produktion von Sauerstoffradikalen ab und die niedrigsten Werte wurden bei einer Verdünnung von 1:128 mit einem MW von 5,23 für Antimon und 4,74 ohne Antimon erreicht (**Tab. 3.2.1**).

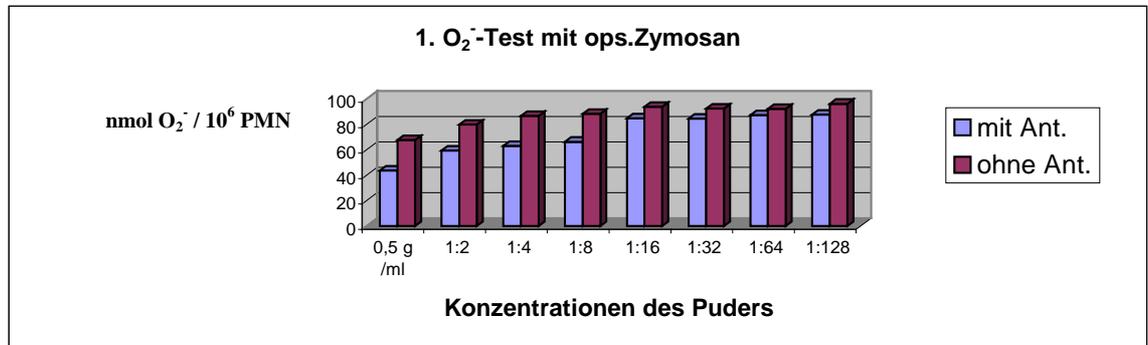
Die Nullhypothese, dass sich die  $O_2^-$ -Werte von Puder mit Antimon, verglichen mit den  $O_2^-$ -Werte von Puder ohne Antimon nicht signifikant unterscheiden, wird bei der Konzentration von 0,5 g/ml verworfen. Bei allen anderen Konzentrationen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Puder mit und Puder ohne Antimon festgestellt werden. Die Signifikanzberechnungen dieser Vorversuche sind im Anhang in der **Tab. 6.2-1** dargestellt. Der Einfluss von Stibium metallicum allein auf die  $O_2^-$ -Produktion wurde in den Nachversuchen getestet (vgl. **3.6.3**).

### 3.2.2 Zwei $O_2^-$ -Teste mit opsoniertem Zymosan als Stimulus und Puder mit und ohne Antimon

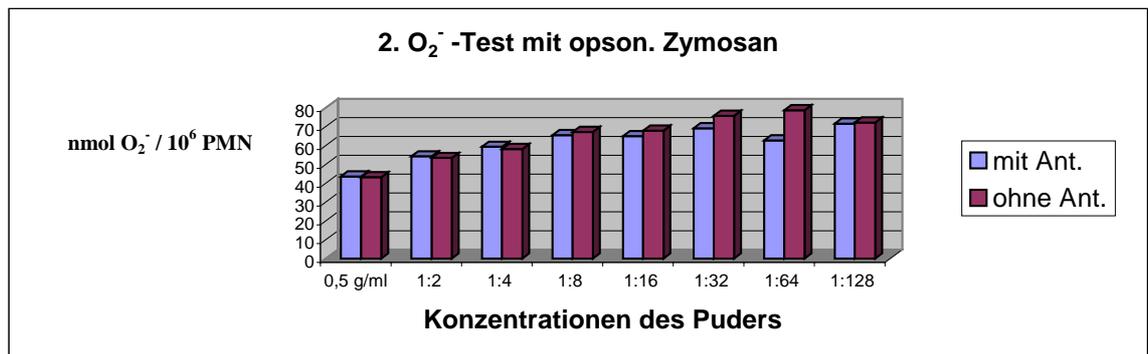
Untersucht wurde der Einfluss des Puders mit der Stammkonzentration von 0,5 g/ml und 7 Verdünnungsstufen (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) auf den oxidativen Metabolismus von PMN von Erwachsenen, indem den Ansätzen mit opsoniertem Zymosan verschiedenen Puderkonzentrationen zugegeben wurden und die resultierende  $O_2^-$ -Produktion gemessen wurde. Dieser Vorversuch umfaßte zwei  $O_2^-$ -Teste unter Zugabe von opsoniertem Zymosan (mit NHS, 50 %).

Die absoluten Werte für opsoniertes Zymosan allein lagen bei 68,66 im ersten Versuch und im zweiten Versuch bei 94,55 nmol  $O_2^-/10^6$  PMN. Die  $O_2^-$ -Produktion war mit opsoniertem Zymosan plus höheren Puderkonzentrationen (unabhängig vom Antimon Gehalt) deutlich geringer als mit opsoniertem Zymosan allein. Die höchsten Werte der  $O_2^-$ -Produktion mit Puder ergaben sich unter dem Einfluss von opsoniertem Zymosan bei dem ersten Test ab einer Verdünnung von 1:16, bei dem zweiten Test ab einer Puderkonzentration von 1:32. Oberhalb dieser Verdünnungen fielen die Werte insgesamt, sowohl für Puder mit, als auch ohne Antimon, niedriger aus, als die Kontrolle mit opsoniertem Zymosan allein.

Zwischen den  $O_2^-$  Werten Puder mit Antimon plus oZ und den  $O_2^-$  Werten Puder ohne Antimon plus oZ bestehen keine signifikanten Unterschiede. Die detaillierten Ergebnisse sind in den **Tab. 6.2-2 und 6.2-3**, sowie in den dazugehörigen **Abb. 3.2.2-1 und 3.2.2-2** dargestellt.



**Abb. 3.2.2-1: Ergebnisse des ersten  $O_2^-$ - Vorversuchs mit opsonierten Zyosan als Stimulus und Puder mit Antimon und ohne Antimon, n = 2**



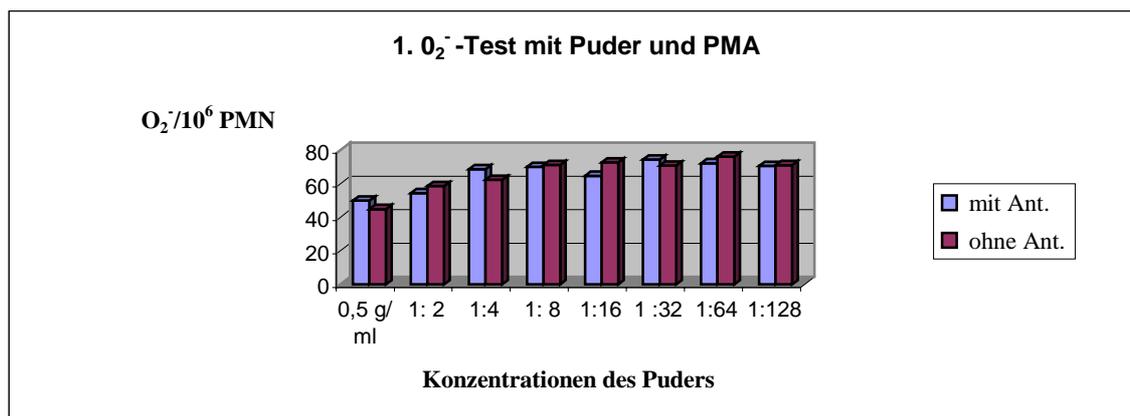
**Abb. 3.2.2-2: Ergebnisse des zweiten  $O_2^-$  Vorversuchs mit opsonierten Zyosan als Stimulus und Puder mit und ohne Antimon, n = 2**

### 3.2.3 Zwei $O_2^-$ -Teste mit PMA als Stimulus und Puder mit und ohne Antimon

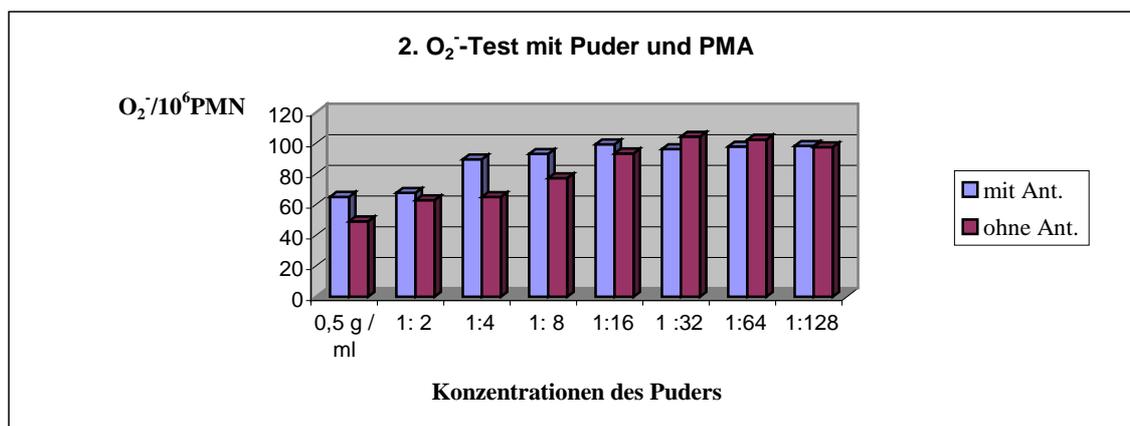
In dieser Testreihe wurde die  $O_2^-$ -Produktion unter dem gleichzeitigen Einfluss von PMA und Puder bestimmt.

Die absoluten Werte für PMA lagen bei 69,91 im ersten Test und 92,41  $nmol O_2^-/10^6$  PMN im zweiten Test.

Der hemmende Einfluss des Puders zusammen mit PMA auf die Sauerstoffradikalproduktion zeigte sich unabhängig vom Antimongehalt. Ab einer Verdünnung der Stammkonzentration des Puders von 1:16 erreichten die  $O_2^-$ -Werte das Niveau derjenigen Werte von PMA allein (Tab. 6.2-4 und Tab. 6.2-5 und Abb. 3.2.3-1 und Abb. 3.2.3-2).



**Abb. 3.2.3-1: Ergebnisse des ersten  $O_2^-$ - Vorversuchs mit PMA als Stimulus und Puder mit und ohne Antimon, n = 2**



**Abb. 3.2.3-2: Ergebnisse des zweiten  $O_2^-$ -Vorversuchs mit PMA als Stimulus und Puder mit und ohne Antimon, n = 2**

### 3.2.4 Zwei $O_2^-$ -Teste mit Granulozyten isoliert aus Nabelschnurblut

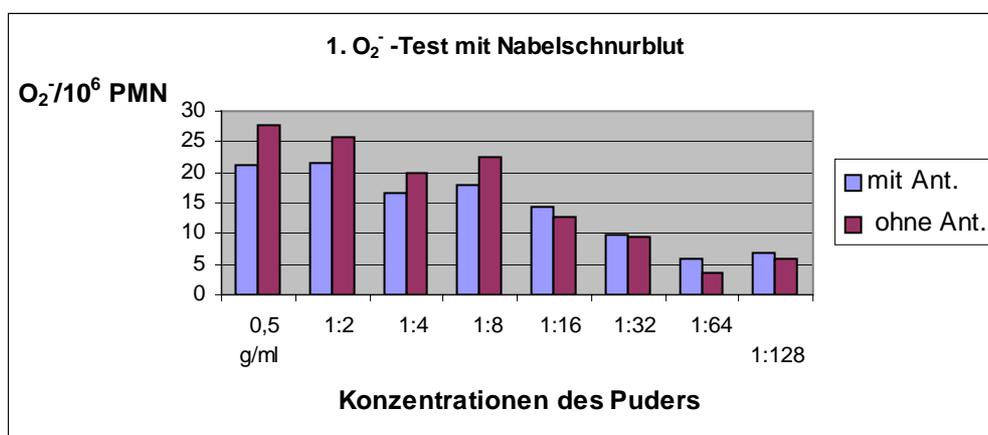
Dieser Vorversuch umfasste zwei  $O_2^-$ -Tests mit PMN aus Nabelschnurblut der gesunden Neugeborenen.

Die  $O_2^-$ -Produktion von Granulozyten wird durch die Puderzugabe gesteigert, unabhängig vom Antimongehalt, im Vergleich zur Kontrolle ohne Puder.

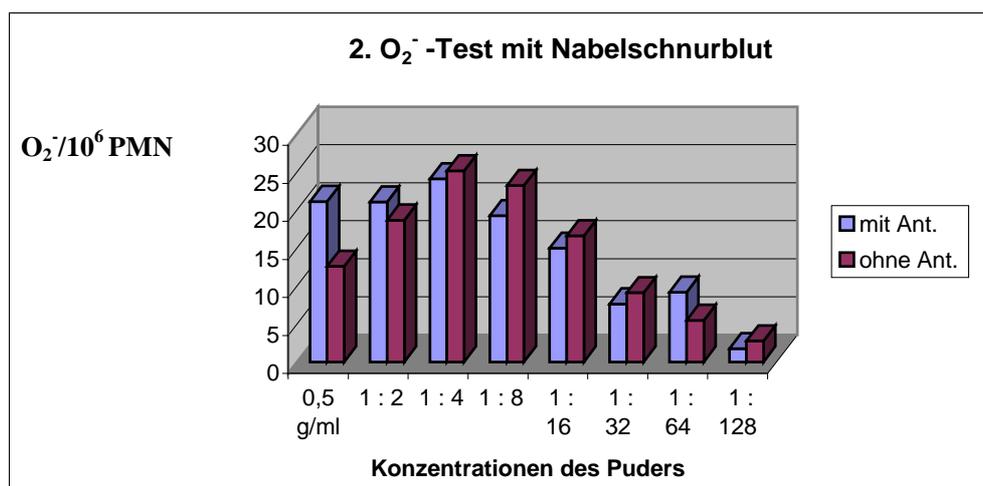
In der Stammkonzentration und in den folgenden drei Verdünnungsstufen schwankten die Werte sowohl für Puder mit Antimon, als auch für Puder ohne Antimon.

Die  $O_2^-$ -Werte unter Puderzugabe liegen alle höher als die Werte von nicht oZ.

Die detaillierten Ergebnisse sind in den **Tab. 6.2-6 und Tab. 6.2-7** und **Abb. 3.2.4-1** und **3.2.4-2** dargestellt, vgl.  $O_2^-$ -Produktion der Erwachsenengranulozyten (**Tab. 3.2.1**) und der Nabelschnurgranulozyten in dem Hauptversuch **3.4**.



**Abb. 3.2.4-1: Ergebnisse des ersten  $O_2^-$ -Vorversuchs mit PMN aus Nabelschnurblut und Puder mit und ohne Antimon, n = 2**



**Abb. 3.2.4-2: Ergebnisse des zweiten  $O_2^-$ -Vorversuchs mit PMN aus Nabelschnurblut und Puder mit und ohne Antimon, n=2**

### 3.2.5 Konzentrationen des Nabelpuders

Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche wurde für den Hauptteil der Arbeit mit Nabelschnurblut ein Konzentrationsbereich des Puders festgelegt, in dem die Zellen bei der Stammkonzentration maximal stimuliert werden bis zu einer Verdünnungsstufe, bei der der Puder (mit/ohne Antimon) keinen Einfluss mehr auf die  $O_2^-$  - Produktion hat und die Werte für die Sauerstoffradikalproduktion im Bereich der Kontrollzellen ohne Stimulation liegen.

Stammkonz. 0,5 g/ml	mit den Verdünnungen	1:4	1:16	1:64	1:256
---------------------	----------------------	-----	------	------	-------

### 3.3 Vorversuche: Killing

Die Puderapplikation bei den Vorversuchen, die die Phagozytose von *Saccaromyces cerevisiae* und die Abtötung dieser Hefezellen durch die Granulozyten beinhalteten, verhinderte vor allem bei der Stammkonzentration eine eindeutige lichtmikroskopische Auswertung zur Bestimmung des Phagozytoseindex und der Killingrate. Somit wurde für die Aufnahme und Abtötung (Killing) den Granulozyten *Staphylococcus aureus* angeboten. Dieser Granulozytenfunktionstest konnte nach einer Inkubation von 18 Stunden auf Agarplatten durch manuelles Auszählen ohne Puderartefakte ausgewertet werden.

#### 3.3.1 Einfluss des Puders auf das Wachstum von *Staphylococcus aureus*, n = 8

Bevor man die Abtötungsfähigkeit der PMN unter Einfluss des Puders testete, wurde die Wirkung des Puders allein (mit und ohne Antimon) auf das Bakterienwachstum untersucht. Puder mit Antimon wirkt hemmend auf die Vermehrung von *Staphylococcus aureus*, Puder ohne Antimonzusatz hat *keine* bakteriostatische Wirkung auf diese Mikroorganismen (Tab. 3.3.1 –1).

Test	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	min
<b>Kontrolle</b>	60	85	100	42	38	44	39	45	0
450 µl RPMI	105	230	270	140	160	156	140	220	60
50 µl Staph.	1800	1990	2800	1200	1700	1300	1200	1900	120
<b>Puder mit Ant.</b>	76	91	61	56	76	52	36	56	0
450 µl RPMI / A	54	111	82	37	52	31	23	47	60
50 µl Staph.	55	82	60	30	48	41	22	21	120
<b>Puder ohne A.</b>	54	95	92	55	66	46	29	60	0
450 µl RPMI / K	190	280	320	130	200	170	150	210	60
50 µl Staph.	1700	1700	3100	1300	1900	1500	1100	1600	120
Ergebnisse: Anzahl der Keime x 10.000									

**Tab. 3.3.1-1: Einfluss des Puders auf das Wachstum von *Staphylococcus aureus***

In den nächsten drei Versuchen wurde durch Titration des Puders mit Antimon die Konzentration bestimmt, bei der dieses Puder keinen Einfluss mehr auf das Bakterienwachstum hat.

1. Test	Kontrolle	Puder mit Antimon				
	450 µl RPMI 50 µl Staph.	450 µl RPMI (A) 50 µl Staph				
		0,5g / ml	1:8	1:32	1:128	1:512
0 min	27	36	31	37	29	28
60 min	170	34	75	65	93	180
120 min	900	21	74	89	151	1100
2. Test		1:100	1:250	1:500		
0 min	51	59	65	46		
60 min	210	90	116	160		
120 min	1750	114	560	1500		
3. Test		1:400	1:500	1:600		
0 min	27	24	29	33		
60 min	130	90	140	150		
120 min	1100	900	110	1300		
Ergebnisse: Anzahl der CFU x 10.000						

**Tab. 3.3.1-2: Titration des Puders mit Antimon**

Bei einer Verdünnung der Stammkonzentration (0,5 g/ml RPMI) von 1:500 wirkt der Puder mit Antimon nicht mehr bakteriostatisch, vgl. **Tab. 3.3.1-2**.

Im vierten Versuch wurde bei dieser Puderkonzentration von 0,1 mg/ml die Abtötungsfähigkeit der Granulozyten untersucht und der prozentuale Anteil der getöteten Bakterien ermittelt. Die Killingrate lag nach einstündiger Inkubation für die Kontrolle bei 63 % und für den Puder mit Antimon bei 61 %, nach 120minütiger Testdauer betrug die Killingrate 88 % für die Kontrolle, für den Puder mit Antimon 93 %, vgl. **Tab. 3.3.1-3**.

4. Test	Kontrolle		Puder mit Antimon	
	350 µl RPMI 100 µl PMN 50 µl Staph	450 µl RPMI / 50 µl Staph	350 µl RPMI (A) 100 µl PMN 50 µl Staph	450 µl RPMI (A) / 50 µl Staph
0 min	30	25	34	30
60 min	51	140	58	150
120 min	160	1300	135	1800
Ergebnisse: Anzahl der CFU x 10.000				

**Tab. 3.3.1-3: Killing unter Einfluss von Antimon mit Puder, n=1**

Die drei folgenden Vorversuche mit Erwachsenenblut, mit Puder ohne Antimon dienten ebenfalls zur Auswahl der Puderkonzentrationen für die Hauptversuche mit Nabelschnurblut. Bei einer Puderkonzentration von 5 mg/ml erreicht das Testsystem mit Puder ohne Antimon im 3. Test eine Killingrate von 95 %, verglichen mit 91 % des Kontrollansatzes. Bei höheren Puderkonzentrationen wurden keine reproduzierbaren Killingraten erreicht, vgl. **Tab. 3.3.1-4**.

	1. Ansatz	2. Ansatz	3. Ansatz	4. Ansatz
	350 µl RPMI 100 µl PMN 50 µl Staph	450 µl RPMI / 50 µl Staph	350 µl RPMI (I/K) 100 µl PMN 50 µl Staph	450 µl RPMI (I/K) / 50 µl Staph
<b>1. Test</b>	Kontrolle		Puderkonzentration: 0,1 g/ml Stammlösung 1:5 verdünnt	
0 min	2	2	3	2
60 min	1	11	20	10
120 min	8	115	290	100
<b>2. Test</b>	Kontrolle		Puderkonzentration: 50 g/ml Stammlösung 1:10 verdünnt	
0 min	2	2	3	2
60 min	1	13	18	14
120 min	9	140	190	170
<b>3. Test</b>	Kontrolle		Puderkonzentration: 5 g/ml Stammlösung 1:100 verdünnt	
0 min	2	2	2	2
60 min	1	13	1	14
120 min	10	117	8	175
Ergebnisse: Anzahl der CFU x 10.000				

**Tab. 3.3.1-4: Titration des Puders ohne Antimon**

### 3.3.2 Einfluss der Granulozytenzahl auf die Killingrate

In dieser Testreihe wurden  $2,5 \times 10^5$  Granulozyten isoliert aus Nabelschnurblut eingesetzt. Die entspricht einem Zell-Bakterien-Verhältnis von 1:2.

Zwei Puderkonzentrationen wurden verwendet :

1. 5 mg Puder (mit und ohne Antimon) / ml RPMI (Stammkonzentration 1:100 verdünnt)
2. 0,83 mg Puder (mit und ohne Antimon) / ml RPMI (Stammkonzentration 1:600 verdünnt).

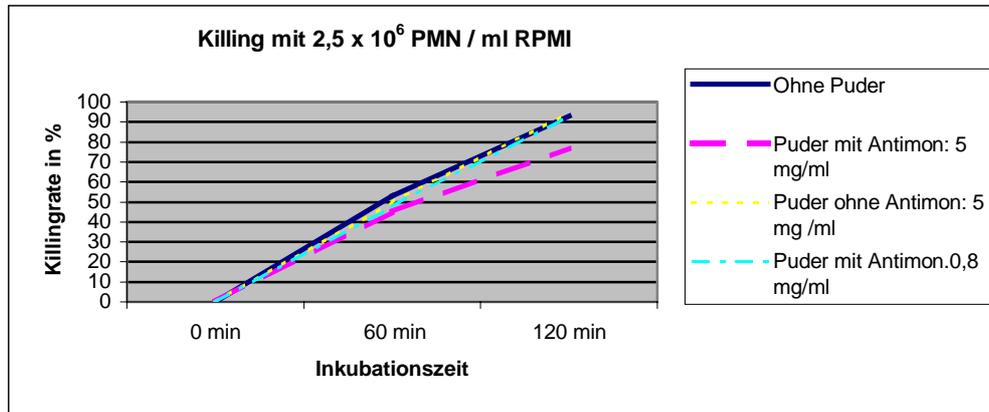
Die einzelnen Ansätze mit der absoluten Anzahl der Bakterien sind der **Tab. 3.3.2** zu entnehmen.

Inkubationszeiten		0 min	60 min	120 min	
1. Ansatz	350 µl RPMI 100 µl PMN 50 µl Staph	40	90	150	<b>Ohne Puder</b>
2. Ansatz	350 µl RPMI 100 µl PMN / F 50 µl Staph	36	190	2100	
3. Ansatz	350 µl RPMI / A 100 µl PMN 50 µl Staph	37	22	10	<b>Puder mit Antimon 5 mg/ml RPMI</b>
4. Ansatz	350 µl RPMI / A 100 µl PMN / F 50 µl Staph	42	40	44	
5. Ansatz	350 µl RPMI / K 100 µl PMN 50 µl Staph	47	109	135	<b>Puder ohne Antimon 5 mg/ml RPMI</b>
6. Ansatz	350 µl RPMI / K 100 µl PMN / F 50 µl Staph	45	220	2500	
7. Ansatz	350 µl RPMI / A 100 µl PMN 50 µl Staph	30	89	150	<b>Puder mit Antimon 0,83 mg/ml RPMI</b>
8. Ansatz	350 µl RPMI / A 100 µl PMN / F 50 µl Staph	33	170	2000	
9. Ansatz	350 µl RPMI / K 100 µl PMN 50 µl Staph	33	n.d.	n.d.	<b>Puder ohne Antimon 0,83 mg/ml RPMI</b>
10. Ansatz	350 µl RPMI / K 100 µl PMN / F 50 µl Staph	39	n.d.	n.d.	
Ergebnisse: Anzahl der Keime x $10^4$					

**Tab. 3.3.2: Ergebnisse des Vorversuchs mit  $2,5 \times 10^6$  PMN/ml RPMI**

Puder mit Antimon erreicht in nicht bakteriostatischer Konzentration mit 93 % keine höhere Killingrate wie die Kontrolle, vgl. **Abb. 3.3.2**.

Die durchschnittliche Killingrate aller Ansätze lag bei 90 % nach zweistündiger Inkubation. Zur Feststellung eines möglichen signifikanten Unterschieds bei einer eventuellen Steigerung der Killingrate zwischen antimonhaltigem Puder und Puder ohne Antimon wurde für den Hauptversuch die Granulozytenzahl auf  $10^6/\text{ml}$  festgelegt.



**Abb. 3.3.2: Killingraten des Vorversuchs mit Nabelschnurblut**

### 3.4 1. Hauptversuch: Einfluss von Wecetin<sup>®</sup>- Streupuder auf die

#### $O_2^-$ -Generation der neutrophilen Granulozyten aus dem Nabelschnurblut

In diesem Hauptversuch wurde der Einfluss von Wecetin<sup>®</sup>-Streupuder mit und ohne Antimonzusatz auf die  $O_2^-$ -Produktion neutrophiler Granulozyten aus dem Nabelschnurblut untersucht. Der erste Hauptversuch umfaßte zehn  $O_2^-$ -Teste, bei denen nicht opsonisiertes Zymosan, opsonisiertes Zymosan und PMA als Stimuli und zur Kontrolle des Testsystems eingesetzt wurden. Aufgrund der Vorversuche wurde der Puder mit und ohne Antimon mit der Stammkonzentration 0,5 g/ml eingesetzt, mit den folgenden Verdünnungen: 1 : 4, 1 : 16, 1 : 64, 1 : 256.

Die Ergebnisse der doppelten Ansätze aller zehn Versuche sind in der **Tab. 3.4.1** mit a und b gekennzeichnet. Nach einer Inkubationsdauer von exakt 30 min, der photometrischen Messung bei 550 nm und der Berechnung der Menge an nmol  $O_2^-/10^6$  PMN ergab sich folgendes Bild:

#### $O_2^-$ -Test ohne Puder

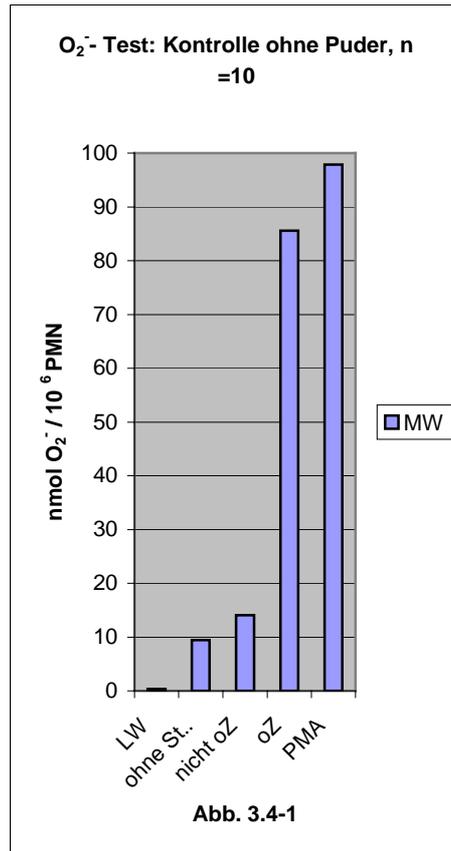
- Der Leerwert lag durchschnittlich bei 0,37 nmol  $O_2^-/10^6$  PMN, der MW für die Zellen ohne Stimulation betrug 9,41 nmol  $O_2^-/10^6$  PMN, wobei im Laufe der Testreihe vom ersten bis zum zehnten Versuch die Tendenz zu niedrigeren Werten besteht. Die stärkste Stimulation mit einem MW von 97,88 nmol  $O_2^-/10^6$  PMN wurde unter Einfluss der Zellen von PMA erreicht, verglichen mit dem MW von oZ mit 85,57 nmol  $O_2^-/10^6$  PMN.

#### $O_2^-$ -Test mit Puder

- Die  $O_2^-$ -Produktion wird unabhängig vom Antimongehalt durch Puderzugabe gesteigert.
- Die Werte bei der Stammkonzentration variieren vom niedrigsten Wert für Antimon von 16,13 nmol  $O_2^-/10^6$  PMN bis zum höchsten Wert mit 31,89 nmol  $O_2^-/10^6$  PMN. Ebenso stark schwanken die Ergebnisse für die Ansätze ohne Antimon von 15,75 bis 33,48 nmol  $O_2^-/10^6$  PMN.
- Die Stimulation der Zellen ist abhängig von der Puderkonzentration: die niedrigsten Werte mit dem MW von 12,26 nmol  $O_2^-/10^6$  PMN für Antimon (SD: 4,7) und dem MW von 11,02 für Puder ohne Antimon (SD: 2,9) bei der Verdünnung 1:256 liegen knapp über den Ergebnis der Zellen ohne Stimulation.
- Die höchste Stimulation der Granulozyten wird durchschnittlich bei der Verdünnung von 1: 4 sowohl für Puder mit Antimon (MW=27,42 nmol  $O_2^-/10^6$ , SD: 5,4), als auch für Puder ohne Antimon (MW=30,25 nmol  $O_2^-/10^6$ , SD: 5,7) erreicht.

Vgl. mit Tab. 3.4-1, 3.4-2 und die Abb. 3.4-1 – 3.4-5.

	LW	ohne St..	nicht oZ	oZ	PMA
1a	0,37	16,27	25,17	88,57	89,93
1a	0,37	16,27	25,17	88,57	89,93
2a	0,39	11,61	16,01	98,87	99,04
2b	0,37	9,65	17,84	97,77	99,75
3a	0,35	9,76	14,77	92,51	98,08
3b	0,35	10,27	14,25	95,17	97,66
4a	0,38	7,09	10,68	85,27	103,2
4b	0,39	7,82	10,07	86,74	101,1
5a	0,39	9,17	14,15	84,54	103
5b	0,41	8,26	15,34	86,54	106,9
6a	0,36	11,43	13,64	79,81	96,56
6b	0,38	8,85	14,48	82,81	94,47
7a	0,36	9,07	11,74	80,47	91,32
7b	0,35	8,67	10,77	79,34	93,64
8a	0,35	5,99	12,89	76,45	95,34
8b	0,36	7,45	11,34	81,45	98,73
9a	0,35	5,76	10,56	84,34	97,91
9b	0,34	6,48	12,95	80,23	98,89
10a	0,39	8,46	11,25	79,45	99,73
10b	0,41	9,84	12,23	83,23	102,5
MW	0,37	9,41	14,07	85,57	97,88



**Tab. 3.4-1: O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Test: Kontrolle ohne Puder, n = 10**

n=10	0,5 g		1:4		1:16		1:64		1:256	
	mit	ohne								
1a	17,4	26,03	31,95	34,83	34,75	36,04	33,25	24,02	21,88	16,23
1b	17	25,53	29,06	30,44	34,11	34,18	33,64	18,87	25,87	16,23
2a	21,3	24,92	30,64	27,72	27,99	23,65	21,7	21,57	15,75	16,36
2b	21,1	20,87	29,76	24,81	27,16	21,92	13,09	16,52	11,96	15,05
3a	24	29,83	26,71	31,33	27,52	19,89	19,75	16,26	12,88	14,83
3b	20,9	27,01	32,61	26,72	30,59	21,87	19,09	12,24	15,59	9,84
4a	17,8	29,67	20,83	29,53	26,02	24,78	14,41	16,86	10,51	12,15
4b	29,8	25,84	18,85	35,52	23,68	24,21	15,68	13,46	9,78	8,45
5a	18,3	18,92	19,08	30,75	38,97	34,82	24,17	18,88	15,26	9,88
5b	17,7	24,52	24,08	32,33	30,64	27,49	16,92	23,54	10,67	10,23
6a	16,1	30,36	39,95	41,63	28,24	26,77	16,41	14,01	12,45	12,82
6b	20,1	15,75	35,75	39,49	21,44	25,48	13,67	13,96	11,58	9,47
7a	25,6	23,54	26,64	33,71	27,42	30,51	14,13	19,96	8,85	13,01
7b	16,9	27,81	26,27	34,36	27,91	27,92	13,67	17,56	7,98	8,45
8a	26,6	28,48	25,38	24,55	21,36	19,68	18,04	14,81	9,64	12,64
8b	31,9	33,48	24,78	23,96	17,56	19,74	17,34	10,86	11,61	7,81
9a	23,4	29,41	21,68	20,83	12,88	11,28	8,98	8,65	6,91	4,79
9b	27,7	30,54	22,98	19,67	16,21	10,65	6,34	9,78	5,98	7,43
10a	22,6	26,66	28,65	31,78	26,54	24,11	15,81	13,64	12,33	9,27
10b	23,7	30,62	32,63	31,08	25,94	27,05	12,67	14,94	9,64	10,74
MW	22	26,49	27,42	30,25	26,35	24,6	17,44	16,01	12,36	11,02
SD	3,67	3,17	5,42	5,65	6,13	5,65	6,66	3,96	4,70	2,93

**Tab. 3.4-2: Hauptversuch mit Puder (mit und ohne Antimon), n=10**

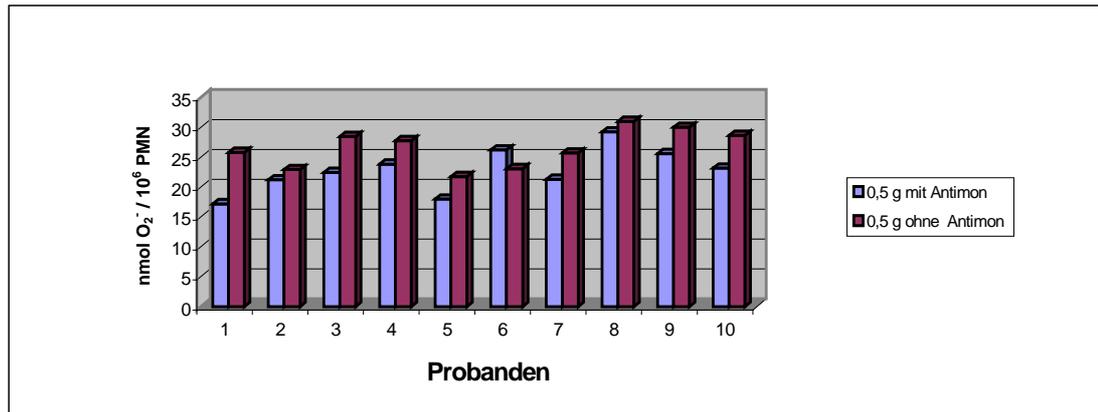


Abb. 3.4-2:  $O_2^-$ -Test: Puder mit und ohne Antimon, Stammkonzentration,  $n=10$  (Ansatz a und b)

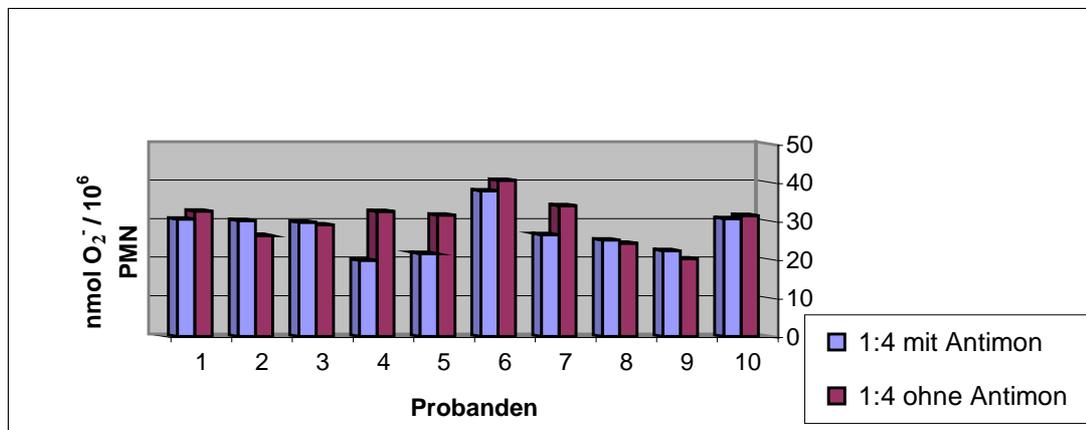


Abb. 3.4-3:  $O_2^-$ -Test: Puder mit und ohne Antimon, 1:4 verdünnt,  $n=10$  (Ansatz a und b)

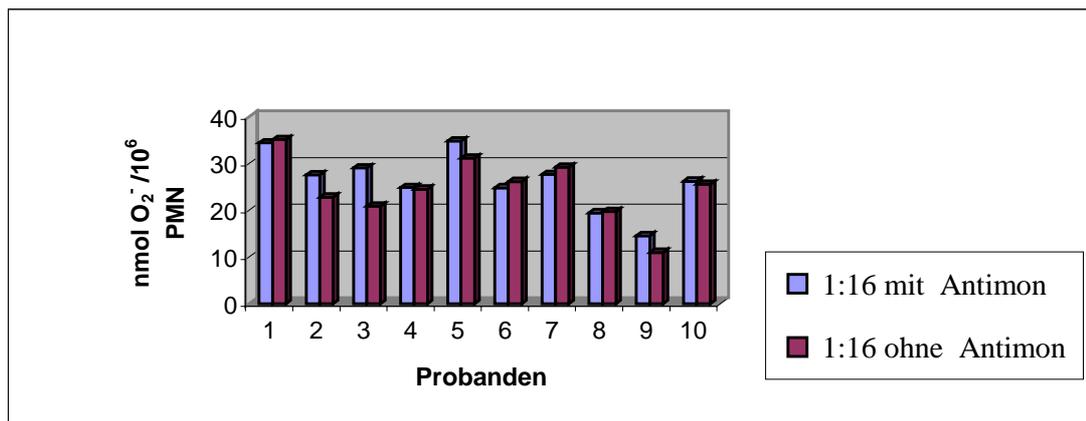
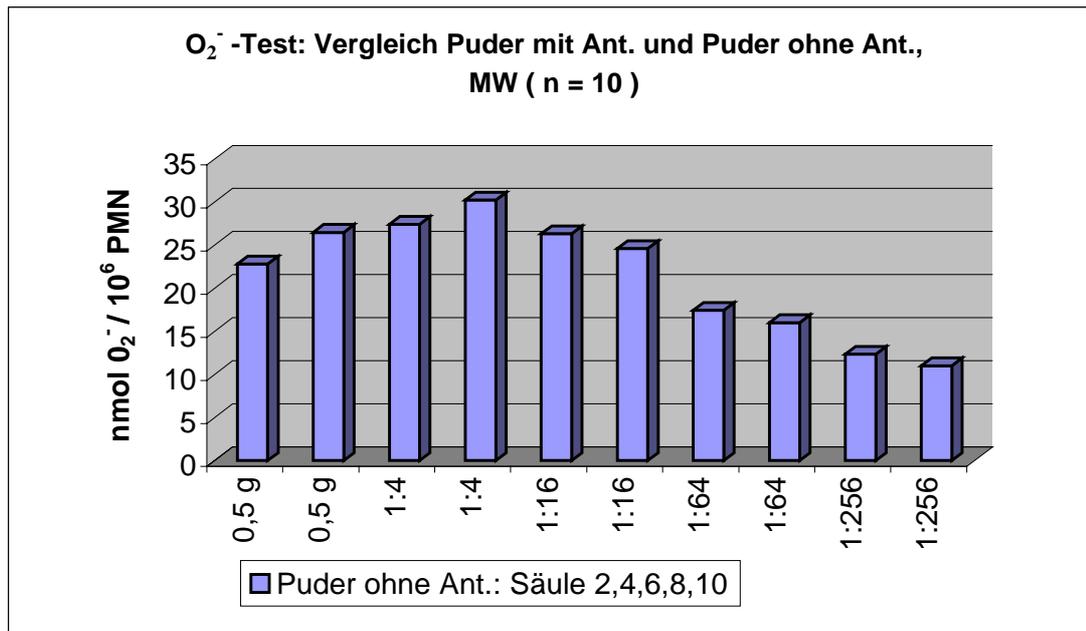


Abb. 3.4-4:  $O_2^-$ -Test: Puder mit und ohne Antimon, 1:16 verdünnt,  $n=10$  (Ansatz a und b)



**Abb. 3.4-5: MW der zehn O<sub>2</sub><sup>-</sup> Teste . Puder mit Antimon : Säulen 1, 3, 5, 7, 9  
vgl. mit Puder ohne Antimon : Säulen 2, 4, 6, 8, 10**

Die Dosis-Wirkungs-Beziehung des Puders mit und ohne Antimon, sowie die Signifikanzberechnungen befinden sich im **Anhang 6.3**.

### 3.5 2. Hauptversuch: Einfluss von Wececin<sup>®</sup>-Streupuder auf die Abtötung von *Staphylococcus aureus* durch neutrophile Granulozyten aus dem Nabelschnurblut

In diesen zehn Versuchen mit PMN, isoliert aus Nabelschnurblut wurde der Einfluss des Puders mit und ohne Antimonzusatz auf die Abtötungsfähigkeit der Granulozyten untersucht. Hierbei wurden zwei unterschiedliche PMN-Zahlen eingesetzt:

**Versuchsreihe a:**  $1 \times 10^6$  PMN/ml

**Versuchsreihe b:**  $5 \times 10^6$  PMN/ml.

Aufgrund der Vorversuche fanden zwei Puderkonzentrationen Verwendung:

1. 5mg Puder (mit und ohne Antimon)/ml RPMI (Antimon wirkt in dieser Konzentration bakteriostatisch) für die Ansätze: 3,4,5,6
2. 0,83 mg Puder (mit und ohne Antimon)/ml RPMI für die Ansätze: 7,8,9,10.

Die einzelnen Ansätze:

#### 1. Ansatz: Ohne Puder

1a :  $1 \times 10^6$  PMN/ml

1b:  $5 \times 10^6$  PMN/ml

2. Ansatz: Wachstumskontrolle

zum 1. Ansatz (ohne Granulozyten)

#### 3. Ansatz: Puder mit Antimon (bakteriostatisch wirkend)

3a:  $1 \times 10^6$  PMN/ml

3b:  $5 \times 10^6$  PMN/ml

4. Ansatz: Wachstumskontrolle

zum 3. Ansatz (ohne Granulozyten)

#### 5. Ansatz: Puder ohne Antimon

5a:  $1 \times 10^6$  PMN/ml

5b:  $5 \times 10^6$  PMN/ml

6. Ansatz: Wachstumskontrolle

zum 5. Ansatz (ohne Granulozyten)

#### 7. Ansatz: Puder mit Antimon (nicht bakteriostatische Konzentration)

8. Ansatz: Wachstumskontrolle

zum 7. Ansatz (ohne Granulozyten)

#### 9. Ansatz: Puder ohne Antimon

10. Ansatz: Wachstumskontrolle

zum 9. Ansatz (ohne Granulozyten)

Das Pipettierschema für diese zehn Hauptversuche ist in **Tab. 2.2.5** dargestellt. Die absoluten Zahlen der zehn Killingversuche mit den CFU befinden sich im Anhang in der **Tab. 6.4.3-1 und Tab. 6.4.3-1**. Puder mit Antimon wirkt in der Konzentration von 5 mg/ml RPMI hemmend auf das Bakterienwachstum, vgl. **Tab. 3.5.1**. In den folgenden **Abb. 3.5-1, Abb. 3.5-2** und **Abb. 3.5-3** sind die Killingraten in % aufgezeichnet. Wie in den **Abb. 3.5-1** und **Abb. 3.5-2** zu erkennen ist, schwanken die Killingraten nach einstündiger Inkubation sowohl im ersten Ansatz ohne Puder, als auch im fünften Ansatz (Puder ohne Antimon). Puder ohne Antimon hat keinen Einfluss auf die Killing-Kapazität der Granulozyten. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Abtötungsfähigkeit zwischen den Ansätzen ohne Puder verglichen mit Puder ohne Antimon. Die Signifikanzberechnungen erfolgten mit dem Rangsummentest nach Wilcoxon im Anhang unter **Abb. 6.4.1** und **Abb. 6.4.2**, sowie die Zusammenfassung der Ränge des nichtparametrischen Tests in der **Tab. 6.4-3**. Das Puder ohne Antimon erhöht nicht die Abtötungsfähigkeit. Puder in nicht bakteriostatischer Konzentration hat keinen Einfluss auf die Killing-Kapazität der Granulozyten vgl. **Abb. 3.5-3**. Auch hier lässt sich kein signifikanter Unterschied nachweisen.

Ansätze	Ohne Puder Kein Puder				Puder mit Ant. 5mg/ml RPMI				Puder ohne Ant. 5mg/ml RPMI				Puder mit Ant. 0,83 mg/ml		Puder ohne Ant. 0,83 mg/ml			
	1a	1b	1a	1b	3a	3b	3a	3b	5a	5b	5a	5b	7	7	9	9		
	10 <sup>6</sup> PMN/ml	5 x 10 <sup>6</sup> PMN/ml	10 <sup>6</sup> PMN/ml	5 x 10 <sup>6</sup> PMN/ml	10 <sup>6</sup> PMN/ml	5 x 10 <sup>6</sup> PMN/ml	10 <sup>6</sup> PMN/ml	5 x 10 <sup>6</sup> PMN/ml	10 <sup>6</sup> PMN/ml	5 x 10 <sup>6</sup> PMN/ml	10 <sup>6</sup> PMN/ml	5 x 10 <sup>6</sup> PMN/ml	10 <sup>6</sup> PMN/ml		10 <sup>6</sup> PMN/ml	10 <sup>6</sup> PMN/ml		
min	60	60	120	120	60	60	120	120	60	60	120	120	60	120				
1	n.d.	51	n.d.	95	n.d.	56	n.d.	93	n.d.	63	n.d.	97	55	96			57	96
2	53	n.d.	92	n.d.	58	n.d.	78	n.d.	48	n.d.	92	n.d.	47	92			42	91
3	53	73	91	96	50	55	83	93	58	63	90	94	58	94			54	93
4	35	52	87	93	37	48	75	87	39	44	86	92	46	89			42	87
5	35	52	86	91	32	71	65	89	49	58	88	91	48	88			53	88
6	52	41	89	93	43	68	60	85	44	52	90	93	48	91			44	90
7	41	49	88	96	34	47	80	86	40	52	85	97	48	86			45	87
8	39	47	87	95	24	32	87	80	35	52	87	96	37	85			42	84
9	41	50	93	95	25	59	63	75	42	50	91	95	43	92			44	92
10	37	45	85	93	5	38	33	53	45	50	88	96	46	91			43	90

Tab. 3.5.1: Killingraten in % der Hauptversuche, Probanden n=10

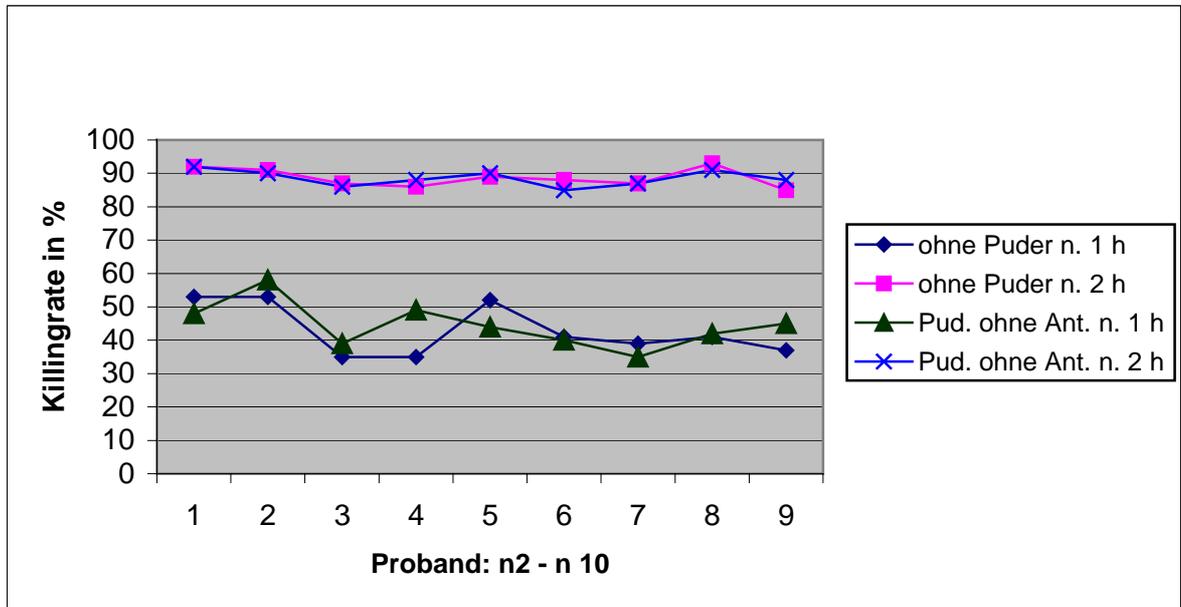


Abb. 3.5-1: Killingversuch: 1. Ansatz (ohne Puder) vgl. mit 5. Ansatz (Puder ohne Ant. mit 1x10<sup>6</sup> PMN/ml RPMI

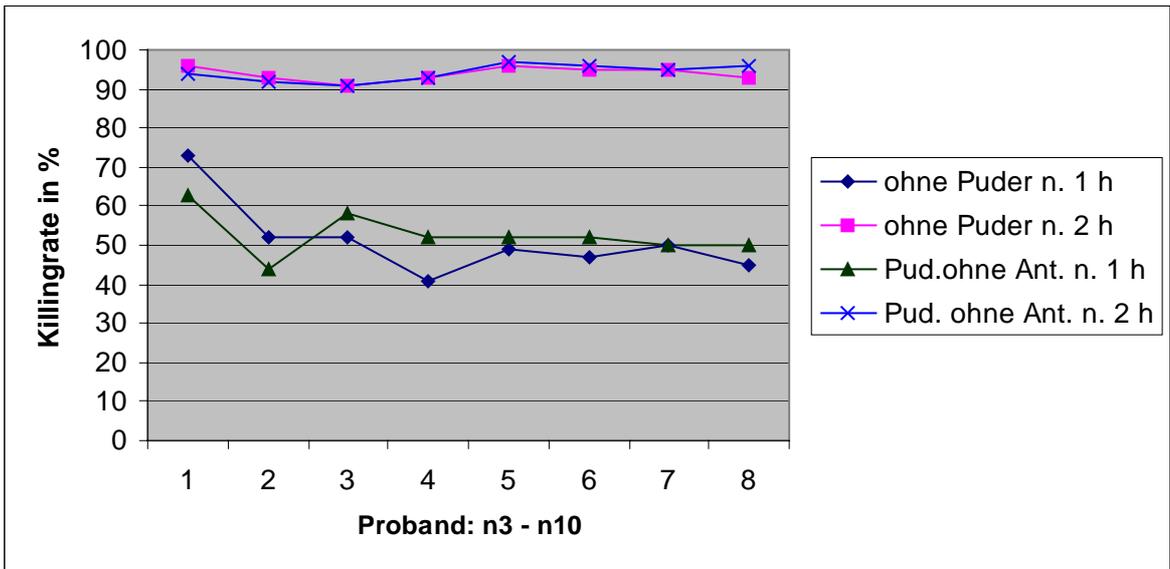


Abb. 3.5-2: Killingversuch: 1. Ansatz (ohne Puder) vgl. mit 5. Ansatz (Puder ohne Ant.) mit  $5 \times 10^6$  PMN/ml RPMI

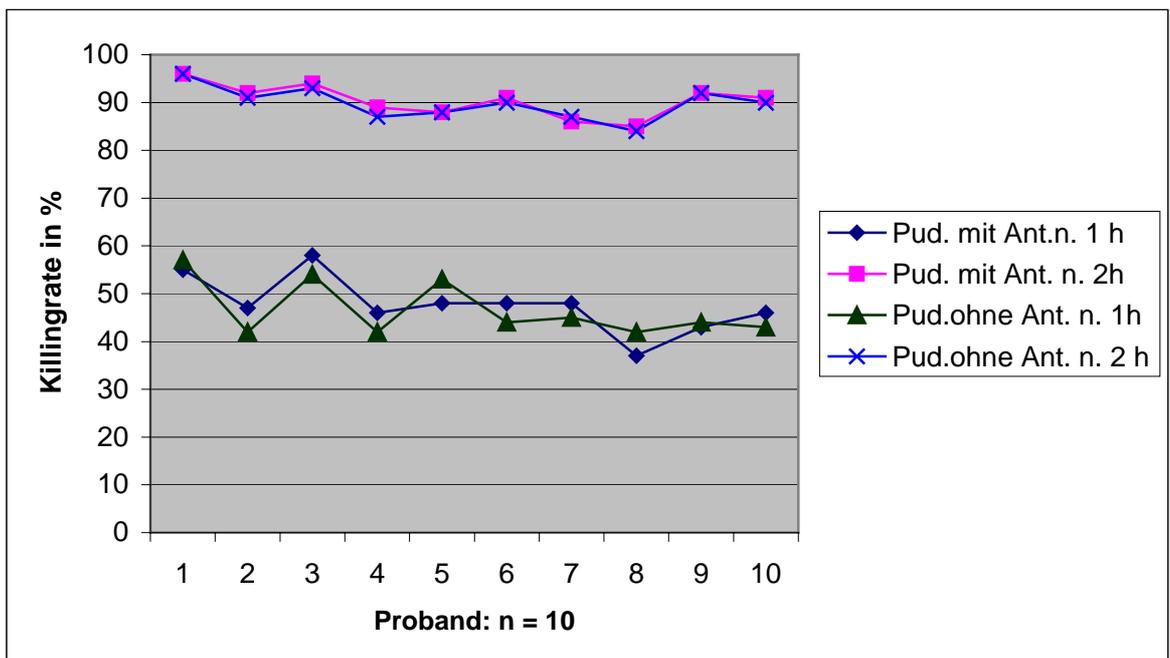


Abb. 3.5-3: Killingversuch: 7. Ansatz (Puder mit Ant.) vgl. mit 9. Ansatz (Puder ohne Ant. ) mit  $10^6$  PMN/ml RPMI

### 3.6 O<sub>2</sub><sup>-</sup> -Produktion und Killingversuche unter Einfluss von Stibium metallicum

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss von Stibium metallicum allein, d.h. ohne Puderzugabe, auf das Bakterienwachstum von *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*, sowie die O<sub>2</sub><sup>-</sup> -Produktion und die Killingkapazität der Granulozyten von gesunden, erwachsenen Probanden getestet.

#### 3.6.1 Wachstum von *Staphylococcus aureus* unter Einfluss von Stibium metallicum

1. Versuch				2. Versuch			
Inkubationszeit (min)	0	60	120	Inkubationszeit (min)	0	60	120
Kontrolle ohne Puder	22	180	1700	Kontrolle ohne Puder	25	185	1900
450 µl RPMI + 50 µl Staph.							
Puder mit Antimon	19	20	21				
0,5 g Streupuder/ml mit							
0,5 mg Stib. met./ml				Stibium metallicum			
1:10	17	32	29	Stammkonzentration:			
1:100	19	40	53	1:100	22	29	17
1:500	20	165	1800	1:250	24	75	590
1:600	17	154	1600	1:500	25	140	1300
1:700	18	176	1700	1:750	26	170	1800
Antimon				1:1000	28	195	1900
5 mg Stib. Met./ml	14	18	12				
0,5 mg Stib. met./ml							
= Stammkonzentration							
1:10	17	14	9				
1:100	18	19	12				
3. Versuch				4. Versuch			
Kontrolle ohne Puder	19	170	1800	Kontrolle ohne Puder	20	155	1600
Stib. met. 1:300	22	82	600	Stib. met. 1:100	18	30	28
1:400	28	105	900	1:400	17	110	950
1:500	30	150	1600	1:500	18	135	1200
1:600	23	190	1700	1:600	18	160	1600
1:700	32	210	1900	1:700	20	140	1500
Anzahl lebender Keime x 10 <sup>4</sup>				1:800	22	175	1700

**Tab. 3.6.1: Verdünnungsreihe von Stibium metallicum, n=4**

Stibium metallicum wirkt hemmend auf das Wachstum von *Staphylococcus aureus*.

In der **Tab. 3.6.1** sind die vier Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen dargestellt, vgl. mit **Tab. 3.3.1-1**, **3.3.1-2** und **3.3.1-3**.

Ab einer Verdünnung von 1 : 800, ausgehend von einer Stammkonzentration von 0,5 mg Stibium metallicum/ml hat Stibium metallicum keinen Einfluss mehr auf das Bakterienwachstum.

#### 3.6.2 Einfluss von Stibium metallicum auf das Wachstum von *Escherichia coli*

In diesen fünf Versuchen konnte gezeigt werden, dass Stibium metallicum auch das Wachstum von *Escherichia coli* hemmt. Ab einer Konzentration von 5 µg Stibium metallicum/ml IM (entspricht einer Verdünnung der Stammkonzentration von 1 :100) hat das Metall keinen Einfluss mehr auf das Wachstum von *Escherichia coli*, vgl. **Tab. 3.6.2**.

1. Versuch				2. Versuch			
Inkubationszeit (min)	0	60	120	Inkubationszeit (min)	0	60	120
Ko: ohne Antimon	10	80	700	Ko: ohne Antimon	26	165	1100
5 mg Stib. met./ml	11	12	15	0,5 mg Stib. met./ml	24	17	19
0,5 mg Stib. met./ml	10	12	18	= Stammkonzentration			
				1:100	27	150	1000
3. Versuch				4. Versuch			
Ko: ohne Antimon	20	150	1600	Ko: ohne Antimon	14	130	1100
0,5 mg Stib. met./ml	19	27	30	5 mg Stib. met./ml	23	29	32
1:10	20	90	700	0,5 mg Stib. met./ml	21	30	40
1:100	26	160	1600	1:10	24	100	600
1:500	24	150	1700	1:100	27	160	1300
5. Versuch							
Ko: ohne Antimon	14	110	900				
0,5 mg Stib. met./ml	17	32	16				
1:10	21	80	400				
1:100	27	160	1300				
Anzahl lebender Keime x 10 <sup>4</sup>							

**Tab. 3.6.2: Wachstum von *Escherichia coli* unter Einfluss von Stibium metallicum, n=5**

### 3.6.3 O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion unter Einfluss von Stibium metallicum

In diesen fünf Versuchen wurde Stibium metallicum in einer Stammkonzentration von 0,5 mg/ml und den Verdünnungen 1:4, 1:16, 1:64 und 1:256 eingesetzt. Dies entspricht der im Puder vorhandenen Konzentration. Die Ergebnisse sind in der **Tab. 3.6.3** dargestellt. Sb erhöht nicht die Sauerstoffradikalproduktion der Granulozyten, isoliert aus Erwachsenenblut. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen der O<sub>2</sub><sup>-</sup> Produktion der Kontrolle und der Versuchsreihe mit Stibium metallicum (vgl. T-Test in der **Tab. 6.5.1-1 und 6.5.1-2** im Anhang).

O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Test	Kontrolle					Mit Stibium metallicum				
	LW	ohne St.	nicht oZ	oZ	PMA	0,5 mg/ml	1:4	1:16	1:64	1:256
Ansatz 1a	0,37	4,87	10,93	85,29	99,28	9,95	4,33	5,02	3,52	4,23
Ansatz 1b	0,37	5,67	12,44	84,36	97,28	8,41	2,38	4,98	3,87	5,11
Ansatz 2a	0,35	2,68	9,27	84,38	92,91	3,57	2,42	1,83	3,15	2,71
Ansatz 2b	0,36	1,65	10,86	82,94	99,41	1,29	3,44	1,74	6,44	5,79
Ansatz 3a	0,38	2,73	8,78	80,78	96,56	2,91	3,52	2,64	5,98	3,46
Ansatz 3b	0,37	3,89	10,56	78,45	98,74	6,48	5,64	6,78	4,36	4,01
Ansatz 4a	0,34	5,78	12,76	77,98	93,74	5,55	3,13	8,45	5,32	7,34
Ansatz 4b	0,36	6,45	14,65	78,56	95,67	4,78	2,64	4,54	4,33	5,44
Ansatz 5a	0,37	9,67	13,88	80,86	101,80	7,45	6,34	9,34	7,86	5,84
Ansatz 5b	0,38	8,65	16,45	84,34	98,45	6,75	7,45	6,45	8,65	9,65
MW	0,37	5,20	12,06	81,79	97,38	5,71	4,13	5,17	5,34	5,36
SD	0,01	2,60	2,44	2,82	2,73	2,64	1,77	2,63	1,86	2,01

**Tab. 3.6.3 O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion durch PMN mit verschiedenen Antimonkonz.**

### 3.6.4 Einfluss von Stibium metallicum auf die Killing-Kapazität der Granulozyten von Erwachsenen

In den fünf Versuchen wurde Sb in zwei Konzentrationen eingesetzt:

S1: 5 µg/ml (Stammkonzentration 1:100 verdünnt)

S2: 0,7 µg/ml (Stammkonzentration 1:700 verdünnt).

Die ersten beiden Ansätze dienten zur Kontrolle des Testsystems, im Ansatz drei und vier wurde Sb in bakteriostatisch wirksamer Konzentration eingesetzt.

	Ohne Antimon 1. Ansatz 350 µl RPMI 100 µl PMN 50 µl Staph.					2. Ansatz 350 µl RPMI 100 µl RPMI/F 50 µl Staph. Kontrolle			Mit Stibium metallicum 3. Ansatz 350 µl RPMI/S1 100 µl PMN 50 µl Staph.					4. Ansatz 350 µl RPMI/S2 100 µl RPMI/F 50 µl Staph. Kontrolle		
min	0	60	60	120	120	0	60	120	0	60	60	120	120	0	60	120
Test																
1	22	60	90	110	205	24	220	2100	18	8	10	5	8	17	14	10
% kill		73	59	95	90											
2	10	80	100	71	170	18	160	1900	17	12	20	8	15	22	15	21
% kill		50	38	96	91											
3	18	60	75	25	50	16	120	750	15	10	12	5	10	17	19	15
% kill		50	38	96	93											
4	17	70	88	70	140	20	170	1600	16	11	12	8	9	19	16	11
% kill		59	48	96	91											
5	19	90	100	75	145	24	185	1600	18	16	17	9	10	15	17	11
% kill		53	50	96	92											
MW		58	46,6	95,8	91,4				5. Ansatz 350 µl RPMI/S2 100 µl RPMI/F 50 µl Staph.					6. Ansatz 350 µl RPMI/S2 100 µl RPMI/F 50 µl Staph. Kontrolle		
SD		9,67	8,88	0,44	1,14											

RPMI / S1 : 5µg Sb / ml (Stammkonz. 1:100 verdünnt)
RPMI / S2 : 0,7µg Sb / ml
RPMI / F : RPMI + 10% FCS

min	0	60	60	120	120	0	60	120
Test								
1	22	56	65	70	140	26	195	1800
% kill		71	67	96	92			
2	19	80	105	70	205	20	170	1800
% kill		53	38	96	89			
3	20	60	80	35	60	17	130	850
% kill		53	39	96	93			
4	22	60	90	60	140	23	180	1500
% kill		53	50	96	91			
5	21	90	95	76	150	23	190	1700
% kill		53	50	96	92			
MW		56,6	48,8					
SD		8,05	11,7					

**Tab. 3.6.4: Killingrate unter Einfluss von Sb**

Sb eingesetzt in nicht bakteriostatischer Konzentration hat keinen Einfluss auf die Killingkapazität der Granulozyten. Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede in der Killingkapazität zwischen den Ansätzen 1 und 2 ohne Antimon und Stibium metallicum allein (Ansatz 5 und 6) nachweisen (vgl. T-Test in der **Tab. 6.5.2-1 und 6.5.2-2** im Anhang).

#### 4. Diskussion

Das Ziel der Untersuchungen war es, den Einfluss von antimonhaltigen Wecetin<sup>®</sup>-Streupuder auf die Vitalität und die Funktionstüchtigkeit von PMN Erwachsener und von Nabelschnurgranulozyten zu erforschen. Hierzu wurden PMN aus heparinisiertem Vollblut gesunder, erwachsener Probanden und aus Nabelschnurblut isolierte Granulozyten auf ihre Fähigkeit, unter dem Einfluss von antimonhaltigen Streupuder, Sauerstoffradikale zu produzieren, untersucht. Als Stimuli dienten nicht opsonisiertes Zymosan, opsonisiertes Zymosan und PMA. Der zweite Funktionsversuch des bakteriellen Killings, untersuchte die Fähigkeit, *Staphylococcus aureus*, inkubiert mit zwei unterschiedlichen Puderkonzentrationen, innerhalb zweier Zeitintervalle (60 min, 120 min) abzutöten. Um unspezifische Stimulationseffekte auszuschließen, wurden bei allen Versuchsreihen Puder ohne Antimonzusatz als Kontrollen mitgeführt.

##### Abfallen des Nabelschnurrestes

Das Abfallen des Nabelschnurstranges wird in der Literatur zwischen dem 5. und 22. Tag angegeben (Arad et al., Bhalla et al., Hayward et al., Novack et al., Oudesluis et al., Sarwano et al., Töttermann und Autio, Wilson et al.). Die Literaturangaben über den Zeitpunkt der Abstoßung des Nabelstranges schwanken auch bei übereinstimmenden Nabelpflegemethoden. Im allgemeinen variieren die Methoden der Nabelpflege auch heute noch infolge der sozialen, kulturellen, ökonomischen und geographischen Umstände.

In einer prospektiven Studie mit 318 Neugeborenen betrug die durchschnittliche Zeit bis zum Abfallen des Nabelschnurrestes bei Wecetin<sup>®</sup>-Streupuder 4,1 Tage (Richtherr). In dieser Studie zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Mumifikationsgrad der Nabelschnur und Zeitpunkt des Abfallens des Nabelschnurrestes: Im Vergleich zu der Pflege mit Triple-dye und Fissan<sup>®</sup>-Streupuder trocknete der Nabelgrund bei Wecetin<sup>®</sup>-Streupuder am wenigsten und der Nabelschnurrest fiel sehr früh ab. Das frühe Abfallen des Nabelschnurrestes deckt sich mit den Ergebnissen der Studie von Seidler et al. und von Zerm. Der genaue Mechanismus des Abfallens ist noch nicht geklärt. Diskutiert werden ursächlich Faktoren wie Austrocknung, Nekrose, Granulozytenaktivität (z.B.: Phagozytose), Kollagenaseaktivität, sowie die bakterielle Kontamination (Hayward et al., Oudesluis und Murphy, Wilson et al.).

##### Wirkung von Antimon

Trotz des langen therapeutischen Einsatzes bereits in der Antike und im Mittelalter von Antimonverbindungen ist wenig über die Biochemie, den Metabolismus und den Wirkungscharakter von Antimon bekannt. Antimon wird in der Tropenmedizin gegen die Leishmaniose eingesetzt. Das hochtoxische Metall findet in hoher Verdünnung in der Homöopathie Anwendung. Auch in der anthroposophisch orientierten Medizin wird seit langem dem Antimon eine Heilwirkung zugeschrieben. Nach Angabe Rudolf Steiners „ muß man... so weit kommen, dass man zuerst alles sogenannte Materielle als Geistiges anzusehen in die Lage kommt...“, denn „ man hat die Möglichkeit verloren, sich über das Geistige von Merkur, von Antimon, von Gold, von Silber zu unterrichten“. In Steiners Werken wird auf die Heilkraft durch die strahlende Wirkung von äußerlich in Salbenform angewendetem Antimon bei einem Ekzem hingewiesen (Basold et al.).

In den neuesten Studien wird beschrieben, dass Antimon nach der enteralen Absorption nicht methyliert wird.

Die meisten Informationen über die Toxizität der Antimonverbindungen findet man in Studien über organische Antimonverbindungen für den pharmakologischen Einsatz. Antimonpotassiumtartrat, eine dreivalente organische Antimonverbindung wird zu ca. 5 % enteral absorbiert, die Werte für die Aufnahme im Gastrointestinaltrakt für anorganische Antimonverbindungen sind nicht bekannt (Gebel). Auch hinsichtlich der Antimonkonzentrationen, in den für den Menschen bedeutsamen Umweltmedien, sind die Kenntnisse lückenhaft (Thron). Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses von Antimon auf die Funktion humaner PMN liegen der Verfasserin nicht vor.

Aufgrund einer Mängelrüge des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte wurde in der Studie von Czech untersucht, in welchem Ausmaß das Schwermetall Antimon aus der Salbe Stibium metallicum praeparatum 0,4 % der Firma Weleda AG, Schwäbisch Gmünd, durch die intakte Haut gesunder Probanden resorbiert werden kann. Anwendung findet das Metall in eher niedriger Konzentration in der Salbe bei destruierenden und auflösenden Hautprozessen, wie beispielsweise bei Ekzemen. Als Zielgrößen dienten die Antimonkonzentrationen im Vollblut, Urin und Kopfhair. Als toxikologische Verlaufsparmeter waren die Werte für das Blutbild und die Leberenzyme stabil. Aus den Ergebnissen dieser toxikologischen Studie wurde geschlossen, dass die bestimmungsgemäße Anwendung der Salbe Stibium metallicum praeparatum 0,4 % auf intakter Haut toxikologisch unbedenklich ist. Die Studie prüfte, ob es bei längerfristiger Anwendung zu einem signifikanten und toxikologischen Anstieg des Metalls im Organismus kommen kann, und sollte keinen Wirksamkeitsnachweis von Antimon erbringen.

Hingegen existieren in der Literatur eine Vielzahl von Studien über die Wirkung der übrigen Inhaltsstoffe des Puders.

#### **Inhaltsstoffe des Wecetin<sup>®</sup>-Streupuders und deren Wirkung**

Arnika und Calendula werden in der Literatur als therapeutisch verwendete pflanzliche Drogen zur Steigerung der Immunabwehr (unspezifische Reizkörper-Therapie) beschrieben. Für die Polysaccharide von Arnika und Calendula werden vielfach die immunstimulierende Wirkung aufgezeigt.

Als Hauptanwendungsgebiete für echinacinhaltige Präparate werden grippale Infekte, Entzündungen, chronische Polyarthritiden, Blasenerkrankungen, schlecht heilende Wunden und die adjuvante Krebstherapie angegeben. Erfolge bei der prophylaktischen und therapeutischen Anwendung werden der Stimulierung der körpereigenen Abwehrkräfte zugeschrieben.

### **Phagozytosestimulierende Wirkung von Echinacin**

Eine gesteigerte Phagozytoseaktivität durch Echinacea-Extrakte wurde von Fanselow beschrieben. Bauer et al. verwendete in den Untersuchungen 1,0 g Wurzelpulver von *Echinacea purpurea*, das alkoholisch extrahiert wurde.

Sie zeigten, dass die Lösung des Trockenrückstandes des Ethanolextraktes (1:10) in einer Konzentration von  $10^{-3}$  % in vitro den Phagozytoseindex von Hefe an menschlichen Granulozyten um 17 % steigert. Der Trockenrückstand der Chloroformausschüttelung führt in einer Konzentration von  $10^{-4}$  zu einer maximalen Stimulierung von 34 % (Bauer et al.).

Echinacosid, das in den Wurzeln von *Echinacea angustifolia* vorkommt, besitzt zwar eine schwache bakteriostatische Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus*, doch konnte für diesen Extrakt bisher keine immunstimulierende Aktivität nachgewiesen werden (Bauer et al.).

Wagner et al. isolierten Polysaccharide aus *Echinacea purpurea* herba, die in vitro (Phagozytostest von isolierten Granulozyten mit Hefepartikeln) und in vivo (Carbon- Clearance-Test) die Phagozytose von Granulozyten stimulierten. Im Granulozytentest war mit diesen Polysacchariden ein um 27- 52 % höherer Phagozytose-index zu beobachten. Nach immunologischer Definition gehören diese Polysaccharide zu den unspezifisch wirkenden Immunstimulantien, die zur sogenannten Paramunität führen (Wagner et al.). Eingesetzt wurde das Polysaccharid aus dem Kraut von *Echinacea purpurea* in einer Konzentration von 0,001 mg/ml, die Wurzel von *Echinacea purpurea* in einer Konzentration von 0,01 mg/ml. In dieser vorliegenden Studie ist *Echinacea purpurea* in der Stammkonzentration des Wecetin<sup>®</sup>-Puders mit 0,042 mg pro Ansatz eingesetzt worden.

Die Ergebnisse legen nahe, dass der Wecetin<sup>®</sup>-Streupuder auf mindestens zwei Wege das Verhalten der Granulozyten beeinflussen kann:

1. durch Steigerung der Phagozytosegeschwindigkeit und
2. durch Potenzierung des „respiratory burst“.

Wahrscheinlich wirken die Talkumpartikel selbst stimulierend auf die Granulozyten. Untersuchungen von Talkum (Magnesiumsilikat) auf die Phagozytoseleistung und die  $O_2^-$ -Produktion liegen der Verfasserin nicht vor.

### **Vorversuche**

Der Einfluss des Wecetin<sup>®</sup>- Streupuders auf die Vitalität, die Sauerstoff-radikalproduktion, das Bakterienwachstum, sowie die bakterielle Abtötung ist zunächst an Granulozyten Erwachsener untersucht worden. Die Phagozytose -und Abtötungsfähigkeit der Granulozyten mit *Saccharomyces cerevisiae* zu testen wurde, aufgrund der störenden Puderpartikel bei der lichtmikroskopischen Auswertung, verlassen. Bei der verwendeten Methode der *Staphylococcus aureus* Abtötung, erfolgte die Auswertung durch manuelles Auszählen der Kolonien auf Agarplatten.

### Vitalität

Das Überleben der PMN nach Zellisolation und Inkubation mit 0,5 g Puder/ml Inkubationsmedium bzw. 0,5 mg Stibium metallicum/ml Inkubationsmedium wurde bei einer vielfach längeren Inkubationsdauer (vier Stunden) getestet, als die Inkubationszeit in den Funktionsprüfungen (30 min bei den  $O_2^-$ -Ansätzen, 120 min bei den Killingversuchen). Antimon wirkt in der gewählten Konzentration innerhalb von vier Stunden nicht zelltoxisch, zur Kontrolle ohne Puder zeigten sich keine signifikanten Vitalitätsverluste. Interessant sind Untersuchungen an humanen PMN mit längeren Inkubationszeiten: Baginski untersuchte die Zellvitalität unter Einfluss von Cadmium, Blei und Quecksilber ebenso mit der Methode der Trypanblauexklusion mit einer Inkubationsdauer von 20 h. Die Zellvitalität wurde durch die Metalle in den getesteten Konzentrationen nur unerheblich vermindert: die Prozentzahl der mit Trypanblau angefärbten Zellen nach 20 h Vorinkubation, lag für  $CdCl_2$  in den Konzentrationen von  $10^{-4}$  bis  $10^{-6}$  M im Mittel zwischen 6,5 % und 7,1 %, für  $PbCl_2$  (Konzentrationen  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  M) lag der prozentuale Anteil gefärbter Zellen im Mittel zwischen 6,5 bis 10,8 %.

Die Zytotoxizität von  $HgCl_2$  für humane PMN setzte im Vergleich zu den beiden anderen Metallsalzen bei einer zehnfach niedrigeren Konzentration ein. Untersuchungen von Antimon auf die Zellvitalität von Granulozyten über diesen längeren Zeitraum liegen der Verfasserin nicht vor.

Das Element Antimon ist dem Element Arsen in chemisch-toxikologischer Hinsicht verwandt. Der Metabolismus des Antimons und seiner Verbindungen ist nur unzureichend untersucht. Diese Gegebenheit erschweren insgesamt eine abschließende Bewertung von Antimon unter toxikologischen Gesichtspunkten (Gebel). Bei Wolf in Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis werden die toxischen Wirkungen auf die Blockierung bestimmter Enzymaktivitäten zurückgeführt, mit deren Mercaptogruppen das Antimon reagieren soll. Fest steht, dass dreiwertige Antimonverbindungen um ein vielfaches (ca. 10-fach) toxischer wirken als fünfwertige. Bauer untersuchte die Toxizität von Antimon am Beispiel von Brechweinstein (Kaliumantimon(III)oxidtartrat-Hemihydrat).

Die Auswirkungen auf Vitalität und Aktivität kultivierter Leber- und Nierenzellen nach Zusatz von unterschiedlichen Konzentrationen von dreiwertigem Antimon wurden erforscht. Die Leberzellen und Nierenzellen wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10  $\mu\text{g/ml}$  Brechweinstein und einer Expositionszeit von 72 Stunden getestet. In Übereinstimmung mit in-vivo-Untersuchungen reagierten die Leberzellen wesentlich empfindlicher, als die Nierenzellen: so trat bei den Nierenzellen eine signifikante Verminderung der Zellzahl um mehr als ein Drittel bei einer Konzentration von 7,5  $\mu\text{g/ml}$  auf, d.h. im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hatten 29 % der Zellen überlebt. Die durch Extrapolation ermittelte effektive Dosis, bei der nach 72-stündiger Exposition ein Vitalitätsverlust von 50 % eingetreten war, lag für die Nierenzellen bei 5  $\mu\text{g/ml}$  Brechweinstein, für die Leberzellen bei nur 1,5  $\mu\text{g/ml}$  Brechweinstein.

### $O_2^-$ -Produktion

Eine Inkubationszeit von 30 min und ein Verhältnis der Granulozytenzahl zu Zymosanpartikel von 1 : 10 waren optimale Bedingungen für die  $O_2^-$ -Produktion (Paulussen).

Es zeichnete sich schon bei den Vorversuchen ein gewisser Trend ab, der in den Versuchsreihen mit Nabelschnurblut noch deutlicher auftrat: Je routinierter die Zellisolation und der  $O_2^-$ -Test durchgeführt wurden, desto geringer war die Vorstimulation der Zellen: die  $O_2^-$ -Produktion bei den Zellen ohne Stimulus war zu Beginn der Versuchreihe von sechs gesunden, erwachsenen Probanden höher als im weiteren Verlauf. Der Puder erhöhte signifikant die Sauerstoffradikalproduktion, unabhängig von dem Antimon Gehalt, lediglich bei der Stammkonzentration konnte ein signifikanter Unterschied im Vergleich Puder mit und ohne Antimon festgestellt werden: aufgrund von Puderartefakten streuten die Einzelwerte bei diesen hohen Konzentrationen sehr, so dass die statistische Signifikanz am ehesten auf Sedimentationseffekte zurückzuführen ist.

Höhere Puderkonzentrationen als 0,5 g/ml ergaben keine reproduzierbaren Ergebnisse in der  $O_2^-$ -Produktion. Die Opsonisation des Zymosans bewirkte eine signifikante Steigerung der  $O_2^-$ -Produktion im Vergleich zu nicht opsonisiertem Zymosan.

#### $O_2^-$ -Test mit Zymosan und Puder (vgl. 3.2.2)

Es zeigte sich kein synergistischer Effekt in der Sauerstoffradikalproduktion durch den gleichzeitigen Einsatz von opsonisiertem Zymosan und Wecetin<sup>®</sup>-Puder in einem Ansatz: die  $O_2^-$ -Produktion war bei höheren Puderkonzentrationen zusammen mit opsonisiertem Zymosan deutlich niedriger, als in den Ansätzen mit opsonisiertem Zymosan allein. Vermutlich wirkt Talkum (Magnesiumsilikat) selbst stimulierend auf die Granulozyten. Untersuchungen über den Einfluss des Hauptbestandteiles des Streupuders, Talkum, hinsichtlich der Granulozytenfunktion liegen der Verfasserin nicht vor. Vorstellbar ist eine Konkurrenz der Puder- und Zymosanpartikel, wobei opsonisiertes Zymosan besser stimulierte als Puder allein.

Die Streuung der Einzelwerte war im Vergleich zu den Ansätzen mit Puder allein höher, am ehesten ist dies durch den verstärkten Sedimentationseffekt zu erklären.

#### $O_2^-$ -Test mit PMA und Puder (vgl. 3.2.3)

PMA war der beste Stimulus für die Sauerstoffradikalproduktion. Dieser Phorbol-ester wirkt durch direkte Stimulation der Proteinkinase C rezeptorunabhängig. Durch das Hinzufügen von Puder zeigten sich keine weitere Zunahme der  $O_2^-$ -Produktion. In der Literatur wird berichtet, dass die Aktivierung durch PMA länger andauernd ist, als im Vergleich mit anderen Stimuli. Mit PMA vorstimulierte Zellen zeigen keinerlei zusätzliche Aktivität der NADPH-Oxidase, wenn andere Stimuli hinzugefügt werden. Dies ist ein Hinweis, dass die durch PMA stimulierte Proteinkinase C eine am Ende der Regulationskette des Oxidasesystems stehenden Schritt katalysiert, der durch die Regulationssysteme nicht mehr beeinflusst werden kann, die bei rezeptorvermittelter Stimulation eine überschießende Aktivierung verhindern (Whright et al., Hurst).

#### $O_2^-$ -Test mit Nabelschnur-PMN (vgl. 3.2.4)

PMA erweist sich auch bei diesen Zellen als stärkster Stimulus. Die Vorstimulation der Zellen ist im Vergleich zu den anderen Vorversuchen erstaunlich gering, wenn man an den zusätzlichen Zeitaufwand zur Gewinnung und Isolierung der Nabelschnurgranulozyten berücksichtigt, weil das verwendete Erwachsenenblut vor Ort im Labor abgenommen wurde, das Nabelschnurblut hingegen im Kreißsaal eines Krankenhauses im Stadtgebiet.

Die in der Literatur beschriebene eingeschränkte Funktion neonataler Granulozyten (vgl. 1.3) im Vergleich zu den Granulozyten Erwachsener kann im  $O_2^-$ -Test nicht bestätigt werden.

Signifikante Unterschiede konnten in der  $O_2^-$ -Produktion unter Einfluss von Puder mit Antimon im Vergleich zu Puder ohne Antimon *nicht* festgestellt werden.

### Killingversuche

Die in der Literatur beschriebenen Studien weisen ebenfalls auf Schwankungen der absoluten Zahl der CFU hin (Roesler et al.). Die Genauigkeit der Resultate konnte mit zunehmender Routine in den vorliegenden Versuchsreihen durch den doppelten Ansatz, sowie den Einsatz von zwei unterschiedlichen Zellkonzentrationen optimiert werden.

Antimon in nicht bakteriostatisch wirkender Konzentration erzielte keine Steigerung der Killingrate. Zytokine, wie z. B. TNF- $\alpha$  können die Abtötung von *Staphylococcus aureus* durch PMN steigern (Ferrante et al.).

### **Hauptversuche**

In den zehn Hauptversuchen zeigte sich, dass durch zunehmende Routine die  $O_2^-$  Werte für die Zellen ohne Stimulation bedingt durch die Präparationsartefakte im Laufe der Versuchsreihe fast um die Hälfte abnahmen. Dieser Effekt der Vorstimulation der PMN durch die Prozedur der Isolierung wird in der Literatur ebenfalls beschrieben (Hartung et al.).

Neben den immunstimulierenden Wirkung der Inhaltsstoffe, ist auch eine Stimulation der Puderpartikel selbst auf die Granulozyten vorstellbar.

In den Killingversuchen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Killingrate zwischen Puder mit Antimon (in nicht bakteriostatischer Konzentration) und Puder ohne Antimon festgestellt werden. Lediglich im Ansatz 3 (Puder mit Antimon in bakteriostatisch wirkender Konzentration) ergaben sich signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Ansätzen 1 (ohne Puder) und 5 (Puder ohne Antimon).

Die Signifikanz in dieser Testreihen beruht am ehesten darauf, dass der prozentuale Anteil der abzutötenden Keime im Ansatz 3 im Vergleich zu Ansatz 1 und 5 geringer ist, und somit die Killingrate im Mittel kleiner ausfällt.

### **Nachversuche**

Stibium metallicum wurde in diesen Versuchsreihen entsprechend der Menge, in der im Puder vorhandenen Konzentration eingesetzt. Antimon allein wirkt hemmend auf das Bakterienwachstum. Ab einer Verdünnung von 1:800 ausgehend von der Stammkonzentration von 0,5 mg Stibium metallicum/ml hat das Antimon keinen Einfluss mehr auf das Wachstum von *Staphylococcus aureus*.

Antimon wirkt auch bakteriostatisch auf das Wachstum von *Escherichia coli*. Ab einer Verdünnung von 1:100 ausgehend von der Stammkonzentration 0,5 mg Stibium metallicum/ml hat das Metall keinen Einfluss mehr auf das Wachstum von *Escherichia coli*.

Sowohl in der  $O_2^-$ -Produktion, als auch in der Killingkapazität zeigt Antimon allein keine Wirkung. Diese Ergebnisse bestätigen die Analysen in den Hauptversuchen, dass die Sauerstoffradikalproduktion durch Puderzugabe, unabhängig vom Antimon Gehalt gesteigert wird.

### **Kritische Bemerkungen über die Übertragbarkeit der in vitro Versuche auf die Verhältnisse in vivo**

#### Konzentrationen:

Wecetin<sup>®</sup> - Streupuder wird als Mittel zur Nabelpflege mit dem Ziel, einen möglichst frühen Abfall des Nabelschnurrestes zu begünstigen, eingesetzt. Die mittlere Gesamtdosis Wecetin<sup>®</sup> -Streumenge lag in den Untersuchungen zum Einfluss auf die Nabelpflege von Vierkant bei einer Tagesdosis von 14,1 mg–138 mg und einer mittleren Nabelrestabfallszeit von vier Tagen im Mittel bei 249,6 mg pro Kind. Die durchschnittliche Menge Antimon pro Kind pro Tag, bei einem Antimongehalt des Puders von 0,1g/100g, betrug im Mittel 0,0624 mg.

Die durchschnittliche Menge Antimon bei einer mittleren Nabelrestabfallszeit von vier Tagen betrug im Mittel 0,2496 mg.

In der prospektiven Studie von Richtherr über den Einfluss von Wecetin<sup>®</sup> -Streupuder auf den Zeitpunkt des Abfallens des Nabelschnurrestes findet man leider keine Angaben über die eingesetzte Pudermenge. Erwähnenswert aus dieser Studie ist die hochsignifikante Abhängigkeit zwischen der Nabelschnurlänge und dem Abfallen des Nabelschnurrestes: der Nabelschnurrest fällt umso schneller ab, je kürzer er ist.

Demgegenüber stehen die verwendeten Konzentrationen in den jeweiligen Testansätzen:

- 0,5 g Puder/ml Inkubationsmedium für die  $O_2^-$  -Teste als Stammkonzentrationen mit den Verdünnungen 1:4, 1:16, 1:64, 1:256, hiervon wurden jeweils 50 µl eingesetzt, dies entsprach einer maximalen Konzentration des Puders von 25 mg (für die Stammkonzentration ) pro Ansatz ,
- 0,5 mg Puder/ml RPMI und 0,8 mg Puder/ml RPMI bei den Killingversuchen, dies entsprach 0,225 mg Puder pro Ansatz.

Somit sind die in den Versuchsreihen eingesetzten Antimonkonzentrationen vor allem bei den Killingversuchen um ein Vielfaches niedriger, als die berechneten Konzentrationsverhältnisse am Nabelschnurrest bei einer zugrundeliegenden Expositionszeit von vier Tagen. Höhere Puderkonzentrationen wurden in den Vorversuchen ausgetestet: diese führten sowohl bei den  $O_2^-$  Testen, als auch bei den Killingversuchen zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen durch Puderartefakte.

Bei diesem Vergleich der in vivo eingesetzten Menge des Nabelschnurpuders mit den Konzentrationen von Antimon in den Versuchsreihen ist zu berücksichtigen, dass eine unbestimmte Menge des Puders in die Windel und auf die Haut um den Nabel verstreut wird. Ferner kommt es beim Lösen der Nabelschnur zur Bindegewebsbildung, durch fehlende Durchblutung des Nabelschnurrestes zur Zellschädigung und Zellnekrose. Durch trockene Gangrän, einem Summationseffekt aus Koagulationsnekrose und Austrocknung, kommt es zur Mumifikation des Nabelstrangrestes und Lösen des Nabelschnurrestes. Histologische Untersuchungen zeigen eine Infiltration von PMN am Übergang der Nabelschnur zur Epidermis, die vom Rand zum Zentrum her zunimmt. Bei diesem komplexen Mechanismus des Abfallens des Nabelschnurrestes bleibt auch unklar, welche Antimonkonzentration in vivo überhaupt auf die PMN wirken. Insofern muss der Vergleich der Antimonkonzentrationen in vivo, mit denen in vitro sicherlich relativiert werden. Ebenso unsicher ist der Kontakt der anderen Inhaltsstoffe des Puders mit den PMN.

### Inkubationszeiten

Wecetin<sup>®</sup> führte zu einem signifikant früheren Abfall des Nabelschnurrestes: 101 +/- 27 Stunden (3 – 5 Tage) versus 257 +/- 102 Stunden (6,5 – 15 Tage) bei der Pflege mit 80%igem Alkohol. Dieser signifikant beschriebene frühere Abfall bei der Behandlung des Nabelschnurrestes mit dem arnika- und echinacinhaltigen Streupuder in der Studie von Janke, konnte in einer kontrollierten klinischen Studie mit insgesamt 400 Neugeborenen von Guala et al. bestätigt werden: 4 +/- 1 Tage.

Die Expositionszeit der PMN gegenüber Antimon in den Versuchsreihen ist im Vergleich extrem kurz.

Anhand der vorliegenden Untersuchungen kann nicht entschieden werden, inwieweit Antimon in höheren Konzentrationen und bei längerer Inkubationszeit die Vitalität und Granulozytenfunktion beeinflusst.

### **Andere Ursachen für das frühe Abfallen des Nabelschnurrestes**

Diskutiert werden muss eine chemotaktische Wirkung auf PMN durch Antimon, die den frühen Abfall des Nabelrestes mitbewirken könnte.

Im Tierversuch erhielten Ratten eine Dosis von 300 mg Antimon/kg/d intramuskulär über einen Zeitraum von 30 Tagen. Die Anzahl der Leukozyten stieg signifikant an (AlKhawajah et al.). Untersuchungen von Antimon auf die Granulozytenfunktion liegen der Verfasserin nicht vor.

In der prospektiven Studie mit Wecetin<sup>®</sup>-Streupuder war zum Zeitpunkt des Lösens der Nabelklemme kein einziger Nabel trocken, die Nabelstücke fielen teilweise samt Nabelklemme ab. Vorstellbar ist ein höherer Granulozyteneinstrom, als in der Gruppe mit Alkoholpflege, bei der zum Zeitpunkt des Lösens der Nabelklemme alle Nabelstücke trocken und hart waren. Neben der Granulozytenaktivität, spielen noch eine Reihe anderer Faktoren für das Abfallen des Nabelschnurrestes eine Rolle (vgl.1.1.2).

### **Kurzer Ausblick, welche Studien noch folgen sollten**

Außerhalb der Arbeitsmedizin gibt es für Antimon nur sehr wenig Basisdaten. Interessant wären weitere Studien über den Einfluss von Antimon auf die Granulozytenfunktion. Der Wirkstoffträger des Wecetin<sup>®</sup>-Streupuders ist Talkum, ein hydratisiertes Magnesiumsilikat. Untersuchungen von Talkum auf die Funktion von PMN liegen der Verfasserin ebenfalls nicht vor.

In den Versuchsreihen wurden PMN, isoliert aus dem Nabelschnurblut gesunder Neugeborener, verwendet. Die mit Puder versetzten Zellen erhöhten signifikant stärker die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion, unabhängig vom Antimongehalt, als die Kontrollzellen ohne Puderzugabe. Zu überprüfen ist, inwieweit die Wirkung des Puders eine intakte Leukozytenfunktion voraussetzt. Beim autosomal-rezessiv vererbten Leukozytenadhäsionsdefekt 1 dient der verspätete Nabelschnurabfall als ein wichtiger diagnostischer Hinweis auf das Vorliegen eines Leukozytenfunktionsdefekts. Bei diesem Synthesedefekt der β – Kette werden die Leukozytenadhäsionsproteine LFA-1, CR3 und p150,95 nicht exprimiert, der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Test fällt pathologisch aus. Bei dieser Granulozytenfunktionsstörung mit verzögertem Nabelschnurabfall wären entsprechende Funktionsuntersuchungen mit PMN durchzuführen. Da der selten vorkommende Leukozytenadhäsionsdefekt 1 relativ spät diagnostiziert wird, sind diese Versuche, auch unter ethischen Aspekten, sehr schwierig durchzuführen.

Hayward et al definieren den Zeitpunkt des normalen Nabelschnurabfalls zwischen den 5. und 8. Tag. Die Zeit des verzögerten Nabelschnurabfalls bei einem Leukozytenadhäsionsdefekt ist länger als 21 Tage. Es ist eher unwahrscheinlich, dass der Wecetin<sup>®</sup>-Streupuder auf funktionsdefekte PMN stimulierend wirkt. Somit wäre von einem verzögerten Abfall des Nabelschnurrestes auszugehen, und die Frühdiagnostik dieses Zelldefekts wäre nicht beeinträchtigt. Das potentielle Ausbleiben einer Granulozytenfunktionssteigerung bei der Behandlung des Nabels mit Wecetin<sup>®</sup> bei defekten Granulozyten könnte sich andererseits für die Frühdiagnostik sogar positiv auswirken, weil der Nabel „unerwartet“ nicht, wie bei der Behandlung der Nabelschnurreste mit Wecetin<sup>®</sup>-Streupuder bei gesunden Neugeborenen (im Mittel am 4. Tag), schon sehr früh abfällt.

Der Zeitpunkt der Nabelschnurablösung wird aber neben der Granulozytenaktivität noch von einer Reihe anderer Faktoren bestimmt (Kollagenaseaktivität, bakterielle Kontamination, Mumifikationsgrad). Mit der bisher zur Verfügung stehenden Literatur wird der genaue Mechanismus der Abfallszeit der Nabelreste nicht befriedigend erklärt.

## 5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktionen der PMN unter dem Einfluss von Wecesin<sup>®</sup>-Streupuder mit Antimon in vitro zu prüfen. Ein verzögerter Nabelschnurabfall dient als wichtiger Hinweis auf das Vorliegen eines Leukozytenadhäsionsdefektes. Unter der Nabelpflege mit Wecesin<sup>®</sup> kann ein signifikant beschleunigter Abfall des Nabelschnurrestes beobachtet werden. Da funktionstüchtige Granulozyten eine wesentliche Voraussetzung für das Abfallen des Nabelschnurrestes sind, sollte geklärt werden, ob Nabelpuder, der Antimon enthält, das frühere Abfallen des Nabelschnurrestes durch Stimulation der Granulozyten bewirken kann. Es wurden Vitalitätsprüfungen mit Granulozyten gesunder Erwachsener und mit PMN, isoliert aus Nabelschnurblut gesunder Neugeborener, durchgeführt. Der oxidative Metabolismus und die Killingkapazität der Erwachsenen- und Nabelschnurgranulozyten wurde unter dem Einfluss verschiedener Streupuderkonzentrationen getestet.

Resultierend aus diesen Ergebnissen wurde anschließend der Einfluss von metallischem Antimon allein auf die Vitalität, die Phagozytenfunktion, sowie das Wachstum von *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* untersucht.

Vitalität: Wecesin<sup>®</sup>-Streupuder und Puder ohne Antimon führten zu keinen signifikanten Vitalitätsverlust. Stibium metallicum allein wirkte ebenfalls nicht toxisch auf die Granulozyten. Sowohl bei den Vitalitätsprüfungen zwischen Erwachsenen-PMN und Nabelschnur-PMN (jeweils mit Puder versetzt), als auch in den Versuchen mit Stibium metallicum allein konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Bakterienwachstum: Der Puder mit Antimon hemmte konzentrationsabhängig das Wachstum von *Staphylococcus aureus* und von *Escherichia coli*. Diese Wirkung war auch durch Stibium metallicum allein zu erzielen, nicht aber durch Puder ohne Antimonzusatz.

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Produktion: Es stellte sich heraus, dass PMA stärker als opsonisiertes Zymosan stimulierte, und dass in Anwesenheit von PMN, die zuvor mit Puder inkubiert worden waren, mehr O<sub>2</sub><sup>-</sup> produziert wurde, als durch die Kontrollzellen ohne Puder. Es bestand keine Abhängigkeit von dem Antimongehalt. Die potenzierende Wirkung des Streupuders auf den respiratory burst konnte in dosisabhängiger Weise gesteigert werden. Metallisches Antimon allein hatte keinen Einfluss auf die O<sub>2</sub><sup>-</sup> -Produktion.

Killingkapazität: Der Puder (ohne Antimon und mit Antimon in nicht bakteriostatischer Konzentration) beeinflusste die Killingkapazität der Granulozyten nicht. Ebenso hatte Stibium metallicum allein (in nicht bakteriostatischer Konzentration) keinen Einfluss auf die Abtötungsfähigkeit.

Der Puder mit Antimon wirkte antimikrobiell und beeinflusste dosisabhängig die Sauerstoffradikalproduktion. Als Ursachen für das frühe Abfallen des Nabelschnurrestes sind eine Phagozytosesteigerung der PMN durch die Inhaltsstoffe des Puders und ein Anstieg der Superoxidanionenproduktion zu erwägen. Der Puder beeinflusste diese Granulozytenfunktion unabhängig vom Antimongehalt. Bei Vorliegen eines Leukozytenadhäsionsdefektes ist davon auszugehen, dass der Wecesin<sup>®</sup>-Streupuder diesen Stimulationseffekt mit funktionsdefekten PMN nicht zeigt.

Somit könnte sich dies für die Frühdiagnostik des Granulozytenfunktionsdefektes sogar positiv auswirken, weil der Nabel „unerwartet“ nicht, wie bei der Behandlung der Nabelschnurreste mit Wecesin<sup>®</sup>-Streupuder bei gesunden Neugeborenen (im Mittel am 4. Tag), schon sehr früh abfällt.

Der genaue Mechanismus des Abfallens des Nabelschnurrestes ist noch nicht bekannt. Neben der Granulozytenaktivität sind aber eine Reihe anderer Faktoren, wie die Austrocknung, die Kollagenaseaktivität, sowie die bakterielle Kontamination für das Abfallen des Nabelschnurrestes verantwortlich.

## 6. Anhang

### 6.1 Vitalitätsprüfungen nach vierstündiger Inkubation mit Puder mit Antimon, Puder ohne Antimon und Stibium metallicum

n = 5	<b>1. Test mit adulten PMN</b>		
	Ohne Puder	Puder mit Antimon	Puder ohne Antimon
1a	85	86	84
1b	88	89	91
1c	82	86	84
1d	79	81	77
1e	90	88	89
MW	84,8	86	85
SD	4,44	3,08	5,43
n = 5	<b>2. Test mit Nabelschnur -PMN</b>		
	Ohne Puder	Puder mit Antimon	Puder ohne Antimon
2a	85	86	87
2b	89	90	88
2c	88	86	89
2d	79	82	78
2e	91	90	88
MW	86,4	86,8	86
SD	4,67	3,34	4,5
n = 5	<b>3. Test mit adulten PMN</b>		
	Ohne Puder	Stibium metallicum	
3a	92	90	
3b	90	89	
3c	79	83	
3d	91	88	
3e	93	95	
MW	89	89	
SD	5,7	4,3	

**Tab. 6.1-1: Ergebnisse der Vitalitätsprüfungen in % vitaler Zellen**

Paarnr.	Gepaarte Stichproben für den T-Test
1	Puder mit Antimon und Puder ohne Antimon ( Erwachsendgranulozyten)
2	Kontrolle ohne Puder und Puder mit Antimon ( Erwachsendgranulozyten)
3	Kontrolle ohne Puder und Puder ohne Antimon (Erwachsendgranulozyten)
4	Puder mit Antimon und Puder ohne Antimon ( Nabelschnurgranulozyten )
5	Kontrolle ohne Puder und Puder mit Antimon ( Nabelschnurgranulozyten)
6	Kontrolle ohne Puder und Puder ohne Antimon (Nabelschnurgranulozyten )
7	Kontrolle ohne Puder und Sb
8	Puder mit Antimon ( Erwachsendgranulozyten ) und Puder mit Antimon ( Nabelschnurgranulozyten )
9	Puder ohne Antimon ( Erwachsendgranulozyten ) und Puder ohne Antimon ( Nabelschnurgranulozyten )

**Tab. 6.1-2: gepaarte Stichproben der Vitalitätsprüfungen**

Paarnr	Gepaarte Differenzen						T	df	Signi. ( 2-seitig)
	N	MW	SD	Standardfehler des MW	95 % Konfidenzinterv. der Differenz				
					Untere	Obere			
1	5	1,00	2,4495	1,0954	-2,0414	4,0414	0,913	4	0,413
2	5	- 1,20	2,1679	0,9695	-3,8919	1,4919	-1,238	4	0,284
3	5	- 0,20	2,1679	0,9695	-2,8919	2,4919	-0,206	4	0,847
4	5	0,80	2,7749	1,2410	-2,6455	4,2455	0,645	4	0,554
5	5	- 0,40	1,9494	0,8718	-2,8204	2,0204	-0,459	4	0,670
6	5	0,40	1,9494	0,8718	-2,0204	2,8204	0,459	4	0,670
7	5	0,00	2,9155	1,3038	-3,6200	3,6200	0,000	4	1,000
8	5	- 0,80	0,8367	0,3742	-1,8389	0,2389	-2,138	4	0,099
9	5	-1,00	3,1623	1,4142	-4,9265	2,9265	-0,707	4	0,519

**Tab. 6.1-3: Test bei gepaarten Stichproben**

## 6.2 Vorversuche: O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion

Verbundene Stichproben	Z-Wert	Asymptotische Signifikanz ( 2-seitig )
0,5 g/ml mit Ant.+ 0,5 g/ml ohne Ant.	- 2,201 a	0,028
1 : 2 mit Ant. + 1 : 2 ohne Ant.	- 1,363 a	0,173
1 : 4 mit Ant. + 1 : 4 ohne Ant.	- 0,314 a	0,753
1 : 8 mit Ant. + 1 : 8 ohne Ant.	- 0,314 b	0,753
1 : 16 mit Ant. + 1 : 16 ohne Ant.	- 0,943 b	0,345
1 : 32 mit Ant. + 1 : 32 ohne Ant.	- 0,314 a	0,753
1 : 128 mit Ant. + 1 : 128 ohne Ant.	- 0,105 a	0,917
a basiert auf positiven Rängen b basiert auf negativen Rängen		

**Tab. 6.2-1: Signifikanzberechnungen mit dem Wilcoxon-Test**

1. Test			1. Test mit Puder und ops. Zyosan						
Kontrolle ohne Puder			Konz.	1. Ansatz		2. Ansatz		MW	
				mit Ant.	ohne Ant.	mit Ant.	ohne Ant.	mit Ant.	ohne Ant.
LW	0,37	0,42	0,5 g/ml	50,56	86,37	36,99	48,8	43,78	67,59
ohne St.	2,44	0,89	1:2	55,98	81,46	62,73	78,51	59,36	79,79
nicht oZ	6,93	12,55	1:4	69,15	85,94	70,31	87,31	63,14	86,63
oZ	97,02	92,07	1:8	74,42	88,71	58,13	87,67	66,28	88,19
PMA	103,49	98,83	1:16	89,96	n.d	79,59	93,77	84,78	93,77
nmol O <sub>2</sub> <sup>-</sup> / 10 <sup>6</sup> PMN			1:32	85,65	92,51	83,5	92,23	84,58	92,37
			1:64	87,93	91,09	86,5	93,24	87,22	92,17
			1:128	88,51	91,76	86,65	100,63	87,58	96,2

**Tab. 6.2-2: Ergebnisse des ersten O<sub>2</sub><sup>-</sup> -Test mit opsonisierten Zyosan und Puder mit ohne Antimon, adulte PMN**

2. Test			2. Test mit Puder und ops. Zyosan						
Kontrolle ohne Puder			Konz.	1. Ansatz		2. Ansatz		MW	
				mit Ant.	ohne Ant.	mit Ant.	ohne Ant.	mit Ant.	ohne Ant.
LW	0,33	0,33	0,5 g/ml	48,99	51,48	38,18	34,95	43,56	43,22
ohne St	0,36	0,74	1:2	60,69	54,99	47,72	51,81	54,21	53,4
nicht oZ	1,65	1,65	1:4	63,89	63,94	54,79	52,39	59,34	58,16
ops. Zym	68,53	68,78	1:8	67,53	68,9	63,78	65,52	65,55	67,21
PMA	90,48	81,97	1:16	67,14	69,04	62,68	68,54	64,96	67,84
nmol O <sub>2</sub> <sup>-</sup> / 10 <sup>6</sup> PMN			1:32	67,78	77,77	70,58	73,8	69,18	75,79
			1:64	62,46	76,83	63,11	80,49	62,78	78,66
			1:128	80,52	71,45	62,74	72,88	71,63	72,17

**Tab. 6.2-3: Ergebnisse des zweiten O<sub>2</sub><sup>-</sup> -Test mit opsoniertem Zyosan und Puder mit/ohne Antimon, adulte PMN**

1. Test				1. Test mit Puder und PMA						
Kontrolle ohne Puder				Konz.	1. Ansatz		2. Ansatz		MW	
					mit Ant.	ohne Ant.	mit Ant.	ohne Ant.	mit Ant.	ohne Ant.
LW	0,25	0,29	0,27	0,5 g/ml	49,12	45,1	50,64	44,57	49,88	44,84
ohne St.	3,45	4,06	3,6	1:2	56,09	58,02	52,74	59,22	54,42	58,62
nicht oZ	22,28	20,53	21,41	1:4	68,24	63,45	69,06	61,13	68,65	62,29
oZ	62,7	65,02	63,86	1:8	70,04	72,74	69,97	69,43	70,01	71,09
PMA	68,67	71,25	69,96	1:16	64,95	69,39	64,39	75,88	64,67	72,64
nmol O <sub>2</sub> <sup>-</sup> / 10 <sup>6</sup> PMN				1:32	78,42	72,91	70,26	68,49	74,34	70,7
				1:64	69,87	72,04	75,55	80,38	72,21	76,21
				1:128	68,46	69,85	72,69	70,01	70,58	71,03

**Tab. 6.2-4: Ergebnisse des ersten O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Test mit PMA als Stimulus und Puder mit/ohne Antimon, adulte PMN**

2.Test.	2.Test mit Puder und PMA									
	Kontrolle ohne Puder			Konz.	1.Ansatz		2.Ansatz		MW	
	2a	2b	MW		mit Ant.	ohne Ant.	mit Ant.	ohne Ant.	mit Ant.	ohne Ant.
LW	0,37	0,4	0,39	0,5 g / ml	62,44	47,33	67,58	51,5	65,01	49,15
ohne St.	1,81	n.d.	1,81	1: 2	68,9	70,21	66,16	55,5	67,53	62,86
nicht oZ	6,69	5,07	5,88	1:4	91,4	66,83	87,48	63,02	89,44	64,93
oZ	63,94	65,25	64,6	1: 8	89,11	71,63	96,78	82,88	92,94	77,23
PMA	98,12	86,7	92,41	1:16	95,55	96,2	102,73	90,34	99,14	93,27
				1:32	99,69	103,92	92,45	104,55	96,07	104,24
				1:64	95,84	105,79	99,51	98,66	97,68	102,23
				1:128	98,44	98,15	97,87	96,45	98,16	97,3

nmol O<sub>2</sub><sup>-</sup>/10<sup>6</sup>PMN

**Tab. 6.2-5: zweiter O<sub>2</sub><sup>-</sup> -Test mit PMA als Stimulus und Puder mit/ohne Antimon, adulte PMN**

LW	ohne St.	nicht oZ	oZ	PMA	
0,36	5,02	6,22	97,55	98,57	1.Ansatz
0,37	7,15	8,62	96,16	98,57	2.Ansatz
0,37	6,09	7,42	96,86	98,57	MW

**1. Vorversuch mit Nabelschnurblut und Puder (mit / ohne Ant.)**

Konz.	1.Ansatz		2.Ansatz		MW ( 1. + 2. Ansatz )	
	mit Ant.	ohne Ant.	mit Ant.	ohne Ant.	mit Ant.	ohne Ant.
0,5g/ml	16,56	35,71	25,62	19,73	21,09	27,72
1:2	17,6	34,81	25,66	16,62	21,63	25,72
1:4	14,66	20,77	18,77	19,11	16,72	19,94
1:8	14,94	18,74	21,18	26,43	18,06	22,58
1:16	12,32	12,42	16,49	13,01	14,41	12,72
1:32	8,85	9,98	10,91	9,12	9,88	9,55
1:64	4,53	5,58	7,14	1,72	5,84	3,65
1:128	5,65	3,03	8,36	8,48	7,01	5,76

nmol O<sub>2</sub><sup>-</sup>/10<sup>6</sup> PMN

**Tab. 6.2-6: Ergebnisse des ersten O<sub>2</sub><sup>-</sup> -Test mit Nabelschnurgranulozyten**

LW	ohne St.	nicht oZ	oZ	PMA	
0,27	2,1	4,4	68,84	69,19	1.Ansatz
0,39	2,2	4,1	66,28	70,02	2.Ansatz
0,34	2,2	4,3	67,56	69,91	MW

**2. Vorversuch mit Nabelschnurblut und Puder (mit / ohne Ant.)**

Konz.	1.Ansatz		2.Ansatz		MW ( 1. + 2. Ansatz )	
	mit Ant.	ohne Ant.	mit Ant.	ohne Ant.	mit Ant.	ohne Ant.
0,5 g/ml	28,14	14,98	14,06	10,19	21,1	12,59
1:2	23,87	18,46	18,21	18,8	21,04	18,63
1:4	31,49	25,3	18,45	24,97	24,07	25,14
1:8	20,67	21,95	17,81	24,44	19,24	23,2
1:16	15,92	14,31	13,98	17,24	14,95	16,58
1:32	6,12	6	9,13	12,06	7,63	9,09
1:64	6,19	4,81	12,15	4,75	9,17	5,47
1:128	0,98	3,21	2,51	2,33	1,75	2,77

**Tab. 6.2-7: Ergebnisse des zweiten O<sub>2</sub><sup>-</sup> -Test mit Nabelschnurgranulozyten**

### 6.3 O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Teste im Hauptversuch mit Nabelschnurgranulozyten

#### 6.3.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung des Puders mit/ohne Antimon, n=10 Probanden und 5 Konzentrationen

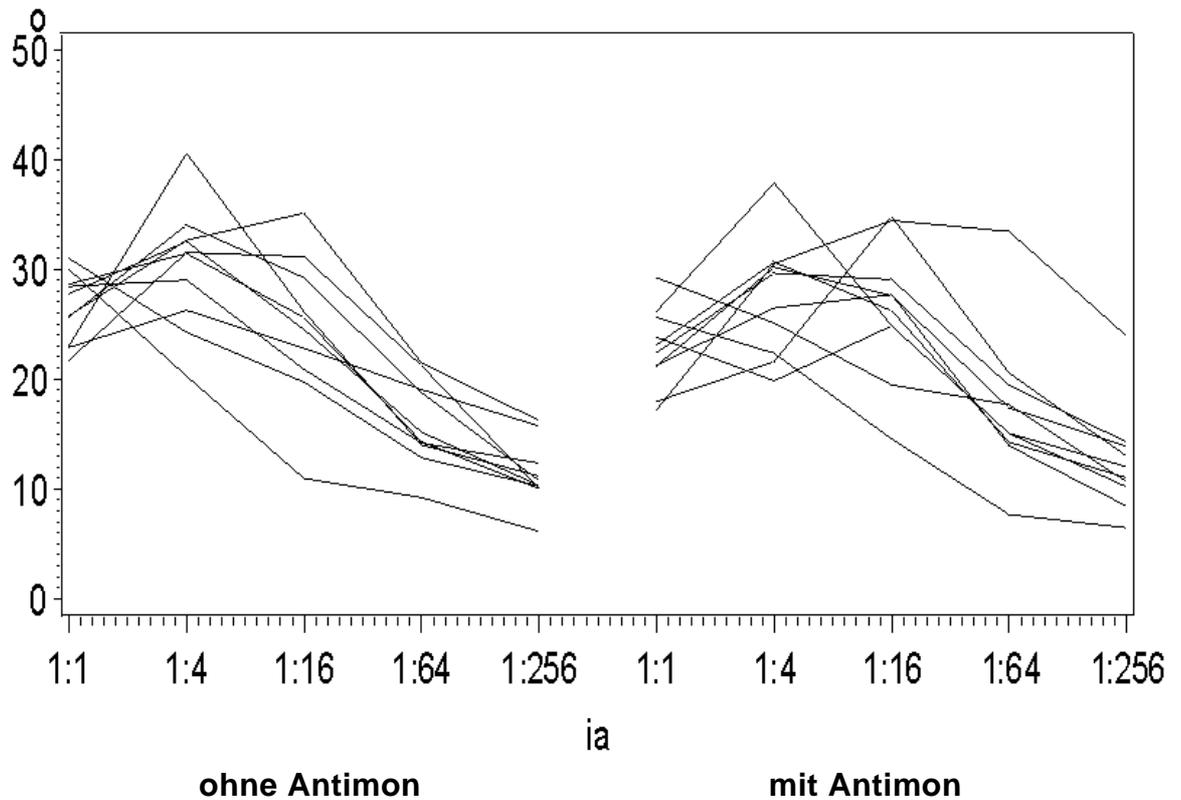


Abb. 6.3.1 : Dosis-Wirkungs-Beziehung

#### 6.3.2 MW der 5 Konzentrationen: 0,5g, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256 im O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Hauptversuch, n= 10

Proband	Mit Antimon	Ohne Antimon
1	27,894	26,242
2	22,048	21,344
3	22,964	20,964
4	18,740	22,050
5	21,576	23,138
6	23,190	22,978
7	19,546	23,686
8	20,418	19,604
9	15,316	15,306
10	21,052	21,990

Tab. 6.3.2: MW der 5 Konzentrationen

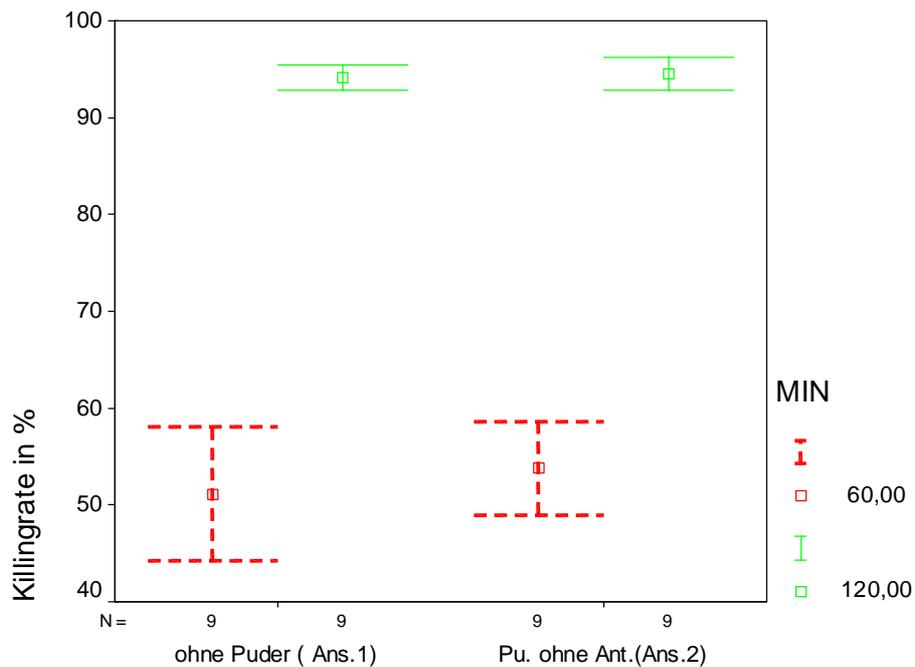
## 6.3.3 Signifikanzberechnungen mit den Wilcoxon-Test

Verbundene Stichproben	Z - Wert	Asymptotische Signifikanz (2 – seitig)
0,5 g/ml mit Ant. + 0,5 g/ml ohne Ant.	- 2,497 a	0,013
1 : 4 mit Ant. + 1 : 4 ohne Ant.	- 1,274 a	0,203
1 : 16 mit Ant. + 1 : 16 ohne Ant.	- 1,172 b	0,241
1 : 64 mit Ant. + 1 : 64 ohne Ant.	- 0,255 b	0,799
1 : 256 mit Ant. + 1 : 256 ohne Ant.	- 1,274 b	0,203
a basiert auf negativen Rängen b basiert auf positiven Rängen		

**Tab. 6.3.3: Signifikanzberechnungen zwischen den 5 Konzentrationen im  $O_2^-$  Test**

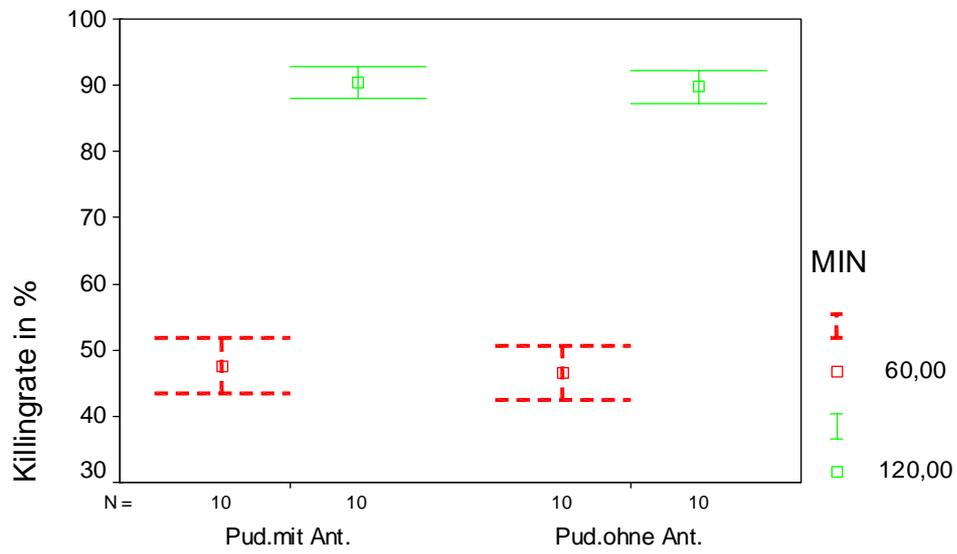
## 6.4 Killingversuche mit Nabelschnurgranulozyten

## 6.4.1 Konfidenzintervalle der MW, Ansatz 1 und Ansatz 5



**Abb. 6.4.1: Konfidenzintervalle der MW ( Ansatz 1 und Ansatz 5 )**

## 6.4.2 Konfidenzintervalle der MW aus den Ansätzen 7 und 9

**Abb. 6.4.2: Konfidenzintervalle der MW (Ansatz 7 + Ansatz 9)**

## 6.4.3 Absolute Zahlen der Killingversuche

n	ohne Puder					5 mg Puder mit Antimon / ml RPMI										
	1. Ansatz					2. Ansatz			3. Ansatz					4. Ansatz		
	350 µl RPMI 100 µl PMN 50 µl Staph.					350 µl RPMI 100 µl RPMI/F 50 µl Staph.			350 µl RPMI/A 100 µl PMN 50 µl Staph.					350 µl RPMI/A 100 µl RPMI/F 50 µl Staph.		
		5x10exp6 PMN/ml	10exp6 PMN/ml	5x10exp6 PMN/ml	10exp6 PMN/ml					5x10exp6 PMN/ml	10exp6 PMN/ml	5x10exp6 PMN/ml	10exp6 PMN/ml			
	0	60	60	120	120	0	60	120	0	60	60	120	120	0	60	120
1	30	98	n.d.	140	n.d.	27	200	2900	28	32	n.d.	12	n.d.	43	73	162
2	20	n.d.	70	n.d.	150	24	150	1800	29	n.d.	17	n.d.	18	30	40	82
3	28	40	70	60	140	27	150	1500	24	9	10	6	12	24	20	70
4	30	86	130	160	280	35	200	2200	28	28	34	9	17	25	54	70
5	40	100	136	180	290	37	210	2000	46	28	65	18	58	50	95	165
6	28	110	89	135	210	30	185	1900	32	28	51	16	42	34	88	105
7	22	92	106	70	120	24	180	1700	20	17	22	6	9	18	32	45
8	30	90	104	85	230	38	170	1800	23	17	19	9	6	21	25	45
9	22	85	100	80	120	26	170	1700	21	13	24	10	15	20	32	40
10	20	55	63	80	170	22	100	1100	19	13	20	14	20	18	21	30
5 mg Puder ohne Antimon / ml RPMI																
5. Ansatz																
350 µl RPMI/K 100 µl PMN 50 µl Staph.																
		5x10exp6 PMN/ml	10exp6 PMN/ml	5x10exp6 PMN/ml	10exp6 PMN/ml											
n	0	60	60	120	120	0	60	120	0	60	120	120	0	60	120	
1	40	70	n.d.	80	n.d.	30	190	2700								
2	40	n.d.	98	n.d.	125	38	190	2000								
3	21	70	79	106	190	31	190	1900								
4	28	128	140	165	300	36	230	2100								
5	48	95	120	190	270	43	235	2200								
6	30	103	120	148	200	37	215	2000								
7	28	110	139	55	300	38	230	2000								
8	28	110	123	70	240	32	190	1800								
9	19	60	70	65	105	23	120	1200								
10	19	55	60	60	165	25	110	1400								

RPMI / A : 5 mg P. mit Antimon / ml RPMI  
 RPMI/K: 5 mg P. ohne Antimon / ml RPMI  
 RPMI/F: RPMI + 10 % FCS

Anzahl der Keime ( CFU ) x 10<sup>4</sup>

Tab. 6.4.3-1: Absolute Zahlen der Killingversuche ( Ansatz 1 – 6 ): CFU x 10.000

		0,8 mg Puder mit Ant./ml RPMI						0,8 mg Puder ohne Ant./ml RPMI									
		7. Ansatz			8. Ansatz			9. Ansatz			10. Ansatz						
		350 µl RPMI/a 100 µl PMN 50 µl Staph.			350 µl RPMI/a 100 µl RPMI/F 50 µl Staph.			350 µl RPMI/k 100 µl PMN 50 µl Staph.			350 µl RPMI/k 100 µl RPMI/F 50 µl Staph.						
					Kontrolle						Kontrolle						
		10 <sup>6</sup> PMN / ml		10 <sup>6</sup> PMN / ml				10 <sup>6</sup> PMN / ml		10 <sup>6</sup> PMN / ml							
		min		0		60		120		0		60		120		min	
n		1* = 5 x 10 <sup>exp</sup> PMN/ml															
1*		31	98	125	46	220	2800	32	107	130	39	250	3000				
2		39	110	160	43	207	2100	20	80	150	26	140	1600				
3		34	70	90	30	170	1600	30	60	100	29	130	1400				
4		38	110	200	32	205	1900	40	140	260	39	240	2000				
5		52	130	280	39	250	2300	36	105	200	48	225	2100				
6		39	120	185	41	230	2000	37	145	235	48	260	2400				
7		32	105	260	27	200	1900	30	110	265	37	210	2000				
8		37	126	270	40	200	1800	29	98	210	36	168	1900				
9		20	85	100	24	150	1300	19	90	85	27	160	1100				
10		21	73	110	23	135	1200	24	80	130	28	140	1300				

**Tab. 6.4.3-2: Absolute Zahlen der Killingversuche (Ansatz 7 -10): CFU x 10.000**

#### 6.4.4 Signifikanzberechnungen mit dem Wilcoxon-Test

Verbundene Stichproben	Z-Wert	Asympt. Signifikanz (2-seitig)
<b>1. Ansatz + 3. Ansatz</b>		
Nach 60 min und mit 10 <sup>5</sup> PMN	- 2,075 a	<b>0,038</b>
Nach 60 min und mit 5 x 10 <sup>5</sup> PMN	- 0,296 b	0,767
Nach 120 min und mit 10 <sup>5</sup> PMN	- 2,524 a	<b>0,012</b>
Nach 120 min und mit 5 x 10 <sup>5</sup> PMN	- 2,668 a	<b>0,008</b>
<b>1. Ansatz + 5. Ansatz</b>		
Nach 60 min und mit 10 <sup>5</sup> PMN	- 0,535 b	0,593
Nach 60 min und mit 5 x 10 <sup>5</sup> PMN	- 0,981 b	0,326
Nach 120 min und mit 10 <sup>5</sup> PMN	- 0,171 a	0,864
Nach 120 min und mit 5 x 10 <sup>5</sup> PMN	- 0,850 b	0,395
<b>1. Ansatz + 7. Ansatz</b>		
Nach 60 min und mit 10 <sup>5</sup> PMN	- 1,541 b	0,123
Nach 120 min und mit 10 <sup>5</sup> PMN	- 1,292 b	0,196
<b>1. Ansatz + 9. Ansatz</b>		
Nach 60 min und mit 10 <sup>5</sup> PMN	- 0,889 b	0,374
Nach 120 min und mit 10 <sup>5</sup> PMN	- 0,497 b	0,619
<b>3. Ansatz + 5. Ansatz</b>		
Nach 60 min und mit 10 <sup>5</sup> PMN	- 2,075 b	<b>0,038</b>
Nach 60 min und mit 5 x 10 <sup>5</sup> PMN	- 0,178 b	0,859
Nach 120 min und mit 10 <sup>5</sup> PMN	- 2,521 b	<b>0,012</b>
Nach 120 min und mit 5 x 10 <sup>5</sup> PMN	- 2,666 b	<b>0,008</b>
<b>7. Ansatz + 9. Ansatz</b>		
Nach 60 min und mit 10 <sup>5</sup> PMN	- 0,666 a	0,505
Nach 120 min und mit 10 <sup>5</sup> PMN	- 1,897 a	0,058

a basiert auf positiven Rängen / b basiert auf negativen Rängen

**Tab. 6.4.4: Signifikanzberechnungen zwischen den 10 Ansätzen**

## 6.5 Einfluss von Stibium metallicum auf die Granulozytenfunktion

### 6.5.1 $O_2^-$ -Test mit Erwachsenen-PMN

Paarnr.	Gepaarte Stichproben
1	$O_2^-$ -Test ohne Stimulus + $O_2^-$ -Test mit 0,5 mg Sb / ml
2	$O_2^-$ -Test ohne Stimulus + $O_2^-$ -Test Sb 1 : 4 verdünnt
3	$O_2^-$ -Test ohne Stimulus + $O_2^-$ -Test Sb 1 : 16 verdünnt
4	$O_2^-$ -Test ohne Stimulus + $O_2^-$ -Test Sb 1 : 64 verdünnt
5	$O_2^-$ -Test ohne Stimulus + $O_2^-$ -Test Sb 1 : 128 verdünnt

**Tab. 6.5.1-1: gepaarte Stichproben des  $O_2^-$ -Tests**

Paarnr	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig. ( 2-seitig )
	MW	SD	Standar dfehler des MW	95 % Konfidenzintervall der Differenz				
				Untere	Obere			
1	- 0,510	2,2986	1,0279	-3,3640	2,3440	- 0,496	4	0,646
2	1,0780	1,9777	0,8845	-1,3777	3,5337	1,219	4	0,290
3	2,6000	0,9882	0,4419	-1,2010	1,2530	0,059	4	0,956
4	- 0,1460	1,9499	0,8720	-2,5672	2,2752	- 0,167	4	0,875
5	-0,1540	1,3052	0,5837	-1,7746	1,4666	- 0,264	4	0,805

**Tab. 6.5.1-2: T- Test der gepaarten Stichproben**

### 6.5.2 Killingversuche mit Erwachsenengranulozyten

Paarnr.	Gepaarte Stichproben
1	Ansatz 1 + Ansatz 5 : nach 60 min und mit $5 \times 10^5$ PMN
2	Ansatz 1 + Ansatz 5: nach 60 min und 10 PMN
3	Ansatz 1 + Ansatz 5: nach 120 min und $5 \times 10^5$ PMN
4	Ansatz 1 + Ansatz 5: nach 120 min und 10 PMN

**Tab. 6.5.2-1: gepaarte Stichproben des Killingversuchs**

Paarnr	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig. ( 2-seitig )
	MW	SD	Standar dfehler des MW	95 % Konfidenzintervall der Differenz				
				Untere	Obere			
1	0,4000	3,7815	1,6912	-4,2954	5,0954	0,237	4	0,825
2	- 2,2000	3,3466	1,4967	-6,3554	1,9554	- 1,470	4	0,216
3	7,0000	16,2173	7,2526	-13,1364	27,1364	0,965	4	0,389
4	-9,8000	21,9591	9,8204	-37,0658	17,4658	0,998	4	0,375

**Tab. 6.5.2-2: T-Test der gepaarten Stichproben**

## 7. Literaturverzeichnis

**Abramson JS, Mills EL, Sawyer MK, Regelman WR, Nelson JD, Quie PG**

Recurrent infections and delayed separation of the umbilical cord in an infant with abnormal phagocytic cell locomotion and oxidative response during particle phagocytosis.

J Pediatr. 99: 887-94 (1981)

**Akbari H, Zadeh MM**

Leukocyte adhesion deficiency.

Indian J Pediatr. 68(1): 77-9 (2001)

**Allende LM, Hernandez M, Corell A, Garcia-Perez MA, Varela P, Moreno A, Caragol I, Garcia-Martin F, Guillen-Perales J, Olive T, Espanol T, Arnaiz-Villena A**

A novel CD18 genomic deletion in a patient with severe leukocyte adhesion deficiency: a possible CD2/lymphocyte function-associated antigen-1 functional association in humans.

Blackwell Science Ltd, Immunology, 99: 440-50 (2000)

**AlKhwajah A, Larbi EB, Jain S, Al-Gindan Y, Abahussain A**

Subacute toxicity of pentavalent antimony compounds in rats.

Hum-Exp-Toxicol. 11(4): 283-88 (1992)

**Anderson DC, Freeman KL, Heerdt B, Hughes BJ, Jack RM, Smith CW**

Abnormal stimulated adherence of neonatal granulocytes: impaired induction of surface Mac-1 by chemotactic factors or secretagogues.

Blood 70: 740-50 (1987)

**Anderson D, Freeman K, Hughes B, Buffone G**

Secretory determinants or impaired adherence and motility of neonatal PMNs.

Pediatr Res. 19, 257A (1985)

**Anderson DC, Schmalstieg FC, Arnaout MA, Kohl S, Tosi MF, Dana N, Buffone GJ, Hughes BJ, Brinkley BR, Dickey WD, Abramson JS, Springer TA, Boxer LA, Hollers JM, Smith CW**

Abnormalities of polymorphonuclear leukocyte associated with a heritable deficiency of high molecular weight surface glycoproteins (GP138): common relationship to diminished cell adherence.

J Clin Invest. 74: 536-51 (1984)

**Anderson DC, Schmalstieg FC, Finegold MJ, Hughes BJ, Rothlein R, Miller LJ, Kohl S, Tosi MF, Jacobs RL, Waldrop TC, et al.**

The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features.

J Infect Dis. 152 (4): 668-89 (1985)

**Anderson DC, Springer TA**

Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1 and p150,95 glycoproteins.

Annu Rev Med. 38: 175-94 (1987)

**Arad I, Eyal F, Fainmesser P**

Umbilical care and cord separation.

Arch Dis Child. 56: 887-88 (1981)

**Arnaout MA**

Leukocyte adhesion molecules deficiency: its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response.

Immunol Rev. 114: 145-80 (1990)

**Babior BM**

Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes.

New Engl J Med. 298 (13): 721-25 (1978)

**Baginski B**

Der Einfluss von Cadmium, Blei und Quecksilber auf die Funktionsfähigkeit Humaner Polymorphkerniger Leukozyten. Habilitationsschrift, Univ. Düsseldorf, (1987)

**Basold A, Cloos W, Daems WF, Krüger H, Pelikan W, Schmidt G, Schwenk T, Thetter R**

Heilmittel für typische Krankheiten nach Angaben von Rudolf Steiner. Verlag am Goetheanum, Dornach (1995)

**Bauer K**

Zytotoxizität von Antimon (III) am Beispiel von Kaliumantimon(III)-oxidtartrat-Hemihydrat.

Medizinische Dissertation, Univ. Tübingen, (2004)

**Bauer VR, Jurcic K, Puhlmann J, Wagner H**

Immunologische In-vivo und In-vitro-Untersuchungen mit Echinacea-Extrakten.

Arzneim. Forschung 38 (2): 276-81 (1988)

**Bellavite P**

The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes.

Free Radic Biol Med. 4: 225-61 (1988)

**Berghmans H J, Rösner O**

Antimon und Antimonverbindungen. In: Ullmanns Encyclopädie der technischen Chemie, Bd. 8, 4. Aufl., 1–18, Verlag Chemie, Weinheim (1974)

**Bhalla JN, Nafis N, Rohatgi P, Singh J**

Some observations of the umbilical stump in the newborn.

Indian J Paediatr. 42: 329–34 (1975)

**Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Fontes B, Banerjee A, Peterson VM**

Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges.

Shock 3: 157-66 (1995)

**Bowen TJ, Ochs HD, Altman LC, Price TH, Van Epps DE, Brautigan DL, Rosin RE, Perkins WD, Babior BM, Klebanoff SJ, Wedgwood RJ**

Severe recurrent bacterial infections associated with defective adherence and chemotaxis in two patients with neutrophils deficient in a cell-associated glycoprotein.

J Pediatr. Dec; 101 (6): 932-40 (1982)

**Brace N, Kemp R, Selgar R**

SPSS for Psychologists A guide for Data Analysis using SPSS für Windows (Versions 8, 9 and 10). Macmillan press LTD, London, 71–85 (2000)

**Brosius F**

SPSS 8.0: Professionelle Statistik unter Windows, MITP- Verlag GmbH, Bonn (1998)

**Bruce M, Baley J, Medvik K**

Impaired surface membrane expression of C3bi but not C3b receptors on neonatal neutrophils.

Pediatr Res. 21, 306-11 (1987)

**Brugsch H, Klimmer OR**

Vergiftungen im Kindesalter, 2. Aufl. Enke, Stuttgart, 43–54 (1966)

**Budavari S**

The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, 12<sup>th</sup> Ed., Whitehouse Station, New York, 733–51 (1996)

**Bugge G**

Das Buch der großen Chemiker, Bd.1, Verlag Chemie, Weinheim, 6. Aufl., 125–41 (1984)

**Clark RA**

The human neutrophil burst oxidase.

J Infect Dis. 161: 1140-47 (1990)

**Cramer R, Dri P, Spessotto P, Mittenzwei H, Patriarca P**

Potential of Human Polymorphonuclear Leukocytes Respiratory Burst and Phagocytosis by a Standardized Liver and Spleen Fraction of Peptides.

Arzneim. Forschung 43 ( I ) Nr. 6 (1993)

**Czech O M**

Pharmaziegeschichte, Ökologie und Toxikologie des Antimons.

Medizinische Dissertation, Univ. Berlin (2003)

**Daems WF**

Stimmi Stibium Antimon, Eine substanzhistorische Betrachtung. Verlag AG, Basel (1976)

**Dauderer M**

Handbuch der Umweltgifte, Klinische Umwelttoxikologie für die Praxis. 11. Erg. Lfg. 6, ecomed, Landsberg/Lech, Kapitel: Toxikologische Einzelstoffinformationen, Abschnitt III-3: Antimon, S. 1 ff. (1994)

**De Wolff FA**

Antimony and health. Brit. Med. J. 310:1216-17 (1995)

**Eberle, M**

Aktivierungsmechanismen bei neutrophilen Granulozyten. Medizinische Dissertation, Univ. des Saarlandes (1993)

**Elinder CG, Friberg L**

Antimony. In: Handbook of the Toxicology of Metals.

Edit.:Friberg L; Nordberg GF, Vouk V, Verlag: Elsevier Science Publisher, Amsterdam-New York-Oxford, 2<sup>nd</sup>. Edit. Vol II, 27-39 (1986)

**Engels S, Nowak A**

Dt. Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 2. Aufl., 57 ff. (1971)

**Falbe J, Regnitz M**

Römpp: Römpps Chemie Lexikon, Bd. 1, 10.Aufl., Georg Thieme-Verlag, Stuttgart New York, 225-29 (1996)

**Fanselow G**

Der Einfluß von Pflanzenextrakten (*Echinacea purpurea*, *Aristolochia clematidis*) und homöopathischer Medikamente (Acidum formicum, Sulfur) auf die Phagozytoseleistung humaner Granulozyten in vitro. Medizinische Dissertation, München (1981)

**Ferrante A, Martin AJ, Bates EJ, Goh DHB, Harvey DP, Rathjen D, Russ G, Dayer JM**

Killing of *Staphylococcus aureus* by tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated neutrophils.

The role of serum opsonins, integrin factors, respiratory burst, and degranulation.

J Immunol. 152: 4821-28 (1993)

**Fischer A, Seger R, Durandy A, Grosppierre B, Virelizier JL, Le Deist Griscelli C, Fischer E, Kazatchkine M, Bohler MC, Descamps-Latscha B, Trung P T, Springer TA, Olive D, Mawas C**

Deficiency of the Adhesive Protein Complex Lymphocyte Function Antigen 1, Complement Receptor Type 3, Glycoprotein p150,95 in a Girl with Recurrent Bacterial Infections.

J Clin Invest. 76: 2385-92 (1985)

**Forth W, Henschler D, Rummel W, Stark U**

Allgemeine und spezielle Pharmakologie, 7. Aufl., S. 769 (1996)

**Gahr M, Jendrossek V, Speer CP**

Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie von Granulozytenfunktionsstörungen  
Monatsschr. Kinderheilkd. 137:380-89, Springer-Verlag (1989)

**Gallin JI, Wright DG, Schiffmann E**

Role of secretory events in modulating human neutrophil chemotaxis.  
J Clin Invest. 62: 1364-71 (1980)

**Gebel T**

Metalle/Antimon: Handbuch Umweltmedizin. Wichmann, Schlipköter, Fülgraff, 17.  
Erg. Lfg. 11/99: 1-17 (1999)

**Gmelin**

Gmelins Handbuch der anorg. Chemie, Syst-Nr.18, Sb, Teil A: Geschichtliches.  
Hrsg.: Dt. Chem. Gesellschaft, Verlag Chemie, Berlin (1942)

**Golombek SG, Brill PE, Salice AL**

Randomized trial of alcohol versus triple dye for umbilical cord care.  
Clin Pediatr. 41 (6): 419-23 (2002)

**Greim H**

Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische  
Begründungen von MAK-Werten. Senatskommission zur Prüfung  
gesundheitsschädlicher Arbeitstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Verlag  
Weinheim (2000)

**Guala A, Pastore G, Garipoli V, Agosti M, Vitali M, Bona G**

The time of umbilical cord separation in healthy full-term newborns: a controlled  
clinical trial of different cord care practices.  
Eur J Pediatr. 162: 350-51 (2003)

**Güneser S, Altintas DU, Aksungur P, Herguner O, Sanal O**

An infant with severe leukocyte adhesion deficiency.  
Acta Paediatr. 85: 622-24 (1996)

**Harlan JM**

Leukocyte adhesion deficiency syndrome: insights into the molecular basis of  
leukocyte emigration.  
Clin Immunol Immunopathol. 76, 16-24 (1993)

**Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis**

Springer-Verlag, 5.Aufl. (1992)

a Bd. 3 Gifte, 82–84, Hrsg.: Wolf H.U.

b Bd. 5 Drogen E – O, 17–26, Hrsg: Hänsel R., Keller K

c Bd. 4 Drogen A – D, 349-354, Hrsg.: Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G

d Bd. 7 Stoffe A – D, 267-268, Hrsg: von Bruchhausen F., Ebel S.

**Hayward AR, Leonard J, Wood CBS, Harvey BAM, Greenwood MC, Soothill JF**

Delayed separation of the umbilical cord, widespread infections, and defective  
neutrophil mobility.  
The Lancet, May: 1099–101 (1979)

**Hallett MB, Lloyds D**

The molecular and ionic signaling of neutrophils. Landes Bioscience, Springer-  
Verlag (1997)

**Hill HR, Augustine NH, Jaffe HS**

Human recombinant interferon-gamma enhances neonatal polymorphonuclear  
leukocyte activation and movement and increases free intracellular calcium.  
J Exp Med. 173: 767-70 (1991)

**Hoeck T, Reifferscheid P, Hadam M, Gahr M**

LFA-1-Defekt: Eine seltene Granulozytenfunktionsstörung als Ursache der therapieresistenten Omphalitis des Neugeborenen.

Monatsschr Kinderheilkd. 139: 418-20, Springer-Verlag (1991)

**Hogg N, Stewart MP, Scarth S, Newton R, Shaw JM, Law SKA, Klein N**

A novel leukocyte adhesion deficiency caused by expressed but nonfunctional  $\beta_2$  integrins Mac-1 and LFA-1.

J Clin Invest. 103: 97-106 (1999)

**Hurst NP**

Molecular basis of activation and regulation of the phagocyte respiratory burst.

Ann Rheum Dis. 46: 265-72 (1987)

**Iffland R**

Antimony. In: Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds, Edit.: Seiler, H G et al., 67-76 (1988)

**Issekutz B**

Die Geschichte der Arzneimittelforschung, Akad. Kiado, Budapest, 486 -89 (1971)

**Jackson JH, Cochrane CG**

Leukocyte-induced tissue injury.

Hematol. Oncol. Clin. North Am. 2: 317-334 (1986)

**Kammerer S**

Antimon. In: Leitfaden Umweltmedizin, Befund, Diagnostik, Therapie, Prävention, Hrsg.: Boese S, Kammerer S, Gustav-Fischer-Verlag (1997)

**Kanwar VS, Cairo MS**

Neonatal neutrophil maturation, kinetics and function.

in Abramson Jon S, Gary Wheeler

The Neutrophil, the Natural Immune System, Irl Press, at Oxford University Press (1989)

**Kettler K**

Einfluß akuter körperlicher Belastungen auf die Neutrophilenfunktion und Oberflächenexpression peripherer Leukozyten sowie Beeinflussung der Neutrophilenfunktion durch Laktatinkubation in vitro. Naturwissenschaftliche Dissertation, Univ. d. Saarlandes (1998)

**Kikawa Y, Shigematsu Y, Sudo M**

Leukotriene B4 biosynthesis in polymorphonuclear leukocytes from blood of umbilical cord, infants, children and adults. Pediatr Res. 20, 402-6 (1986)

**Kinoshita Y, Masuda K, Kobayashi Y**

Adherence of cord blood neutrophils: effect of mode of delivery.

J Pediatr. 118: 115-7 (1991)

**Kishimoto TK, Hollander N, Roberts TM, Anderson PL, Springel TA**

Heterogeneous mutations in the beta subunit common to LFA-1, Mac-1 and p150,95 glycoproteins cause leukocyte adhesion deficiency.

Cell 50:193-9 (1987)

**Lewin L**

Die Gifte in der Weltgeschichte: toxikologische allgemeinverständliche Untersuchung der historischen Quellen; Louis Lewin, Reprograph. Nachdr. der Ausg. Berlin, Springer, 1920, 3. Aufl. Hildesheim: Gerstenberg, S.: 437 f. (1984)

**Leroi R**

Antimon In: Beiträge zu einer Erweiterung d. Heilkunst Heft 6/1983, Hrsg.: Med. Sektion der Freien Hochschule am Goetheanum, Dornach (Schweiz), Dr. med. Lorenz, Verlag: Gesellschaft Anthroposophischer Ärzte, Stuttgart, 189-200 (1983)

**Lüdy-Tenger F**

Alchemistische und chemische Zeichen. Berlin 1928, Neudruck: jal-print, Würzburg (1973)

**Lubec G**

Collagenase activity in the human umbilical cord.

Pediatr Padol. 12,: 258–62 (1977)

**Luckey T D , Venugopal B, Hutcheson D**

Heavy Metal, Toxicity, Safety and Hormology, Georg Thieme Publishers, Stuttgart, New York,: 41–43, 97–101 (1975)

**Merian E, Stemmer KL**

Antimon In: Metalle in der Umwelt. Hrsg.: Merian E, Verlag Chemie, Weinheim, 309–17 (1984)

**Moeschlin S**

Klinik und Therapie der Vergiftungen.

7. Aufl., Thieme-Verlag, Stuttgart, 226-27 (1986)

**Mühlendahl K E , Bunjes U, Ritter S**

Vergiftungen im Kindesalter. 3. Aufl., Verlag Enke, Stuttgart,1995, 119–21 (1995)

**Müller Klaus R**

Toxicological Analysis, Verlag Gesundheit, Berlin, 171–72 (1991)

**Müller – Jahnke W D, Friedrich C**

Geschichte der Arzneimitteltherapie, Dt. Apotheker Verlag (1996)

**Murray H W, Delph-Etienne S**

Roles of Endogenous Gamma Interferon and Macrophage Microbicidal Mechanisms in Host Reponse to Chemotherapy in Experimental Visceral Leishmaniasis.

Infection and Immunity, 288-93 (2000)

**Mutschler E, Schäfer–Korting M**

Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, wissenschaftl. Verlagsges. mbH Stuttgart, 7. Aufl. (1996)

**Notarangelo L et al.**

Primary immunodeficiency diseases: an update by the IUIS PID Classification Committee.

J Allergy Clin Immunol. 114: 677-87 (2004)

**Novack AH, Mueller B, Ochs H**

Umbilical cord separation in the normal newborn.

Am J Dis Child. vol 142, 220- 23 (1988)

**Olson T, Ruymann F, Cook B, Burgess D, Henson S, Thomas P**

Newborn polymorphonuclear leukocyte aggregation. Pediatr. Res. 17, 993-7 (1983)

**Oudesluys-Murphy HM**

The human umbilical cord and its separation. Medizinische Dissertation, Univ. Amsterdam (1990)

**Oudesluys-Murphy HM, Eilers GAM, De Groot CJ**

The time of separation of the umbilical cord.

Eur J Pediatr. 146: 387–89 (1987)

**Paracelsus**

Sämtliche Werke, nach der 10-bändigen Huserschen Gesamtausgabe (1589-1591) zum ersten Mal in neuzeitliches Deutsch übersetzt, mit Einleitung, Biographie, Literaturangaben und erklärenden Angaben versehen von Dr. Bernhard Aschner, Bd. I-IV, Anger-Verlag Eick, 1. Auflage (1993)

**Paulussen, M**

Einfluß von Glukose und Mannose auf die O<sub>2</sub><sup>-</sup> -Produktion von Granulozyten. Medizinische Dissertation, Univ Düsseldorf (1994)

**Pezzati M, Rossi S, Tronchin M, Dani C, Filippi L, Rubaltelli FF**

Umbilical cord care in premature infants: the effect of two different cord-care regimens (salicylic sugar powder vs chlorhexidine) on cord separation time and other outcomes.

Pediatrics, 112(4): e275 (2003)

**Pyne DB**

Regulation of neutrophil function during exercise. Sports Med. 17 (4): 245-258 (1994)

**Quiring H**

Antimon: Die Metallischen Rohstoffe, ihre Lagerungsverhältnisse und ihre wirtschaftliche Bedeutung Verlag: Enke, Stuttgart: 27-35 (1945)

**Richtherr A**

Nabelpflege bei Neugeborenen: Eine prospektive Studie mit 3 verschiedenen Pflegesubstanzen und 3 Windelsorten. Medizinische Dissertation, Universität Würzburg (1997)

**Roesler J, Emmendorffer A, Elsner J, Zeidler C, Lohmann-Matthes M, Welte K**

In vitro functions of neutrophils induced by treatment with rhG-CSF in severe congenital neutropenia.

Eur J Haematol. 46: 112- 18 (1991)

**Ronchera-Oms C, Hernandez C, Jimenez NV**

Antiseptic cord care reduces bacterial colonization but delays cord detachment.

Arch Dis Child Fetal NeonatalEd., 71 (1) : F70 (1994)

**Rotrosen D**

The respiratory burst oxidase.

In: Gallin JI, Goldstein IM, Synderman R (Hrsg.). Inflammation: Basic principles and clinical correlates.

Raven Press, S. 589-601 (1992)

**Sarwano E, Disse WS, Oudesluys- Murphy HM, Oostin H, De Groot CJ**

Umbilical cord: factors which influence the separation time.

Paediatr Indones. 31 (7-8): 179-84 (1991)

**Savill J, Fadok V, Henson O, Haslett C**

Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis.

Immunol Today. 14: 131–36 (1993)

**Schmidt G**

Heilmittel für typische Krankheiten nach Angaben von Rudolf Steiner, Hrsg. Basold Anselm, Verl. Am Goetheanum, CH, 471 S. (1995)

**Schneider W**

**a** Geschichte der pharmazeutischen Chemie, Verlag Chemie, Weinheim, 106 –7 (1972)

**b** :Lexikon zur Arzneimittelgeschichte, Bd IV: Pharmazeutische Chemikalien und Mineralien (1975), Govi-Verlag – Pharmazeutischer Verlag, Frankfurt a.M., 42-8 (1975)

**c** :Geschichte der Pharmazie Stuttgart: Wiss. Ver.- Ges., S. 25 (1985)

**Seger R, Wahn V, Belokradsky B**

Granulozytendefekte

In: Pädiatrische Allergologie und Immunologie in Klinik und Praxis. Hrsg.: Wahn U, Seger R, Wahn V, Gustav-Fischer-Verlag, 378-79 (1987)

**Seidler A, Janke S, Schmidt E**

Früher Abfall des Nabelschnurrestes (NSR) unter Wecesin®-Pädiatrisch erwünscht ? Monatsschr Kinderheilkd., Suppl. 1, Band 142, Heft 8, S.116 (1994)

**Stalmach-E, Ruggeberg-J, Zubrod-Eichert C, Wahn V, Schrotten H**

Antimicrobial functions of human monocytes depend on concentration of glutamine in vitro.

Ann Nutr Metab. 41 (6):371-5 (1997)

**Stemmer KL**

Pharmacologie and toxicology of heavy metals: antimony.

Pharmacol Ther. 1:157-60 (1976)

**Stolz R**

Geschichte der Chemie. Dt. Verlag für Grundstoffindustrie, 1. Aufl., 388–89( 1989)

**Thilaganathan B, MD, Meher-Homji N, MD, Nicolaidis K.H.,MD**

Labor: An immunologically beneficial process for the neonate.

Am J Obstet Gynecol., 171: 1271-2 (1994)

**Töttermann Le, Autio S**

Treatment of the umbilical cord of the newborn.

Acta Obstet. Gynecol.Scand. 49:57-9 (1970)

**Thron HL**

Vorkommen, Bedeutung und Nachweis von Antimon.

In: Die Trinkwasserverordnung, Hrsg.: Aurand K, Hässelbarth U, Lange – Asschenfeldt H, 3.Aufl., Erich – Schmidt – Verlag (1991)

**Verber IG, Pagan FS**

What cord care – if any ?

J Arch Dis Child. 68: 594-96 (1993)

**Vierkant S**

Untersuchungen zum Einfluß auf die Nabelheilung: Wecesein®- Streupuder und Alkohol im Vergleich. 1.Aufl.Aachen: Aachener Beiträge zur Medizin, Wissenschaftsverl. Mainz, 58 S. zugl.: Medizinische Dissertation, Univ. Düsseldorf (1999)

**Wagner H, Jurcic K**

Immunologische Untersuchungen von pflanzlichen Kombinationspräparaten.

Arzneim. Forschung 41 (II), Nr. 10, (1991)

**Wagner H, Proksch A, Riess-Maurer I, Vollmar A, Odenthal S, Stuppner H, Jurcic K, Turdu M Le, Fang JN**

Immunstimulierend wirkende Polysaccharide (Heteroglykane) aus höheren Pflanzen.

Arzneim.Forschung.35: 1069-75 (1984)

**Walden P**

Zur Geschichte der Antimonpräparate und des Basilius Valentinus. In: Scientia Pharmaceutica, 13 Jahrgang, Heft III, Dt. Apotheker-Verlag, Wien, 5-8 (1942)

**Walker BAM, Ward PA**

Priming and signal transduction in neutrophils.

Biol Signals 1: 237-49 (1992)

**Watson RW, Rotstein OD, Nathens AB, Parodo J, Marshall JC**

Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement.

J Immunolog. 158 (2): 945-53 (1997)

**Weckenmann M**

Das Arzneibild von Stibium. In: Beiträge zu einer Erweiterung d. Heilkunst Heft 6 / Hrsg.: Dr. med. K. Lorenz, Med. Sektion der Freien Hochschule am Goetheanum, Dornach (Schweiz), Verlag: Gesellschaft Anthr.Ärzte, Stuttgart (1985)

**Weisenberg A**

Handbuch der gesammelten Arzneimittel von der ältesten bis auf die neueste Zeit für Ärzte und studierte Wundärzte.

Reprint von Jena 1853, Hildesheim, Verlag: Olms G, Hildesheim- New York, 543–60 (1969)

**Weiß, C**

Basiswissen medizinische Statistik. Springer-Verlag (1999)

**White AG, Walker SM**

A new assay for the assessment of staphylococcal killing by human leukocytes.

J Immunol Methods. 42(2): 203-12 (1981)

**Wilson CB, Ochs HD, Almquist J, Dassel S, Mauseth R, Ochs UH**

When is umbilical cord separation delayed ?

J Pediatr. 107: 292–94 (1985)

**Wirth W**

Toxikologie, Hrsg. Von Gloxhüber C, , 5. Neub. Aufl., Georg Thieme Verlag, S.108 (1994)

**Wright SD, Meyer BC**

Phorbol esters cause sequential activation and deactivation of complement receptors on polymorphonuclear leukocytes.

J Immunol. 136: 1759-64 (1986)

**Zerm C**

Wecetin®-Streupuder in der Säuglingsnabelpflege.

Sonderdruck aus: Weleda Korrespondenzblätter für Ärzte, Heft 118: 35-7 (1987)

## 8. Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serum Albumin
CFU	Colony forming units
Cyt C	Cytochrom C
FMLP	N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-phenylalanin
IM	Inkubationsmedium
Ko	Kontrolle (Ansatz ohne Puder)
LW	Leerwert
MW	Mittelwert
MPRM	Mony-Poly-Resolving Medium
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEM	N-Ethylmaleimid
n	Stichprobengröße (Anzahl)
n.d.	nicht durchgeführt
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
ohne St.	ohne Stimulus
oZ	opsonisiertes Zymosan
NHS	Natives Humanserum
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PMA	Phorbolmyristataacetat
PMN	Polymorphkernige Granulozyten
RPMI/A	5 mg Puder mit Antimon/ml Medium RPMI 1640
RPMI/K	5 mg Puder ohne Antimon/ml Medium RPMI 1640
UQ	Ubichinon Q
Sb	Stibium metallicum
SD	Standard deviation
SOD	Superoxiddismutase

## 9. Lebenslauf

### I. Persönliche Daten

Name: Sigrid Jungbluth-Opota  
geb. Milewski  
Wohnort: Eichendorffstr. 35  
58708 Menden  
Geburtstag und –ort: 19.04.1967 in Iserlohn  
Konfession: evangelisch  
Familienstand: geschieden, zwei Söhne

### II. Schulausbildung

1973 - 1977 Hindenburg-Grundschule in Menden  
1977 - 1983 Städt. Realschule Menden  
06/1983 Fachoberschulreife  
1983 - 1986 Städt. Walram-Gymnasium Menden  
05/1986 allgemeine Hochschulreife, Note: 2,3

### III. Berufsausbildung

1986 - 1988 Ausbildung zur medizinisch-technischen  
Laboratoriumsassistentin an der Lehranstalt für technische  
Assistenten in der Medizin, Düsseldorf  
Berufserlaubnis als MTA, Note: gut  
10/1988

### IV. Studium

10/1988 - 07/1990 Vorklinisches Studium der Medizin an der Heinrich-  
Heine-Universität in Düsseldorf  
09/1990 Physikum  
10/1990 - 9/1994 Klinisches Studium der Medizin an der Heinrich-Heine-  
Universität Düsseldorf  
10/1995 - 09/1996 Praktisches Jahr im Centre Hospitalier in Luxemburg mit  
Wahlfach Pädiatrie  
12/1996 Drittes Staatsexamen, Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf, Note: gut

### V. Berufspraxis

1988 - 1989 MTA, Gemeinschaftslabor, Dr. Bräuer in Düsseldorf in  
den Bereichen Klinische Chemie und Serologie  
1990 – 1991 Nachtwachen in der Pädiatrie und Gynäkologie im  
Evangelischen Krankenhaus, Düsseldorf  
1992 – 1995 MTA im Bereitschaftsdienst in der Paracelsus-Klinik  
Golzheim für Urologie in Düsseldorf  
01/1997 - 08/1997 MTA, Praxis Dr. Saylan, Arzt für Chirurgie  
09/1997 - 09/2000 Erziehungsurlaub  
10/2000 - 08/2001 Ärztin im Praktikum, Paracelsus-Klinik Hemer, Innere  
Medizin  
10/2001 - 04/2002 Ärztin im Praktikum, St. Vincenz-Krankenhaus, Menden,  
Innere Medizin  
05/2002 Vollapprobation als Ärztin  
05/2002 - 09/2002 Assistenzärztin im St. Vincenz-Krankenhaus, Menden,  
Innere Medizin  
10/2002 - bis dato Assistenzärztin in der Kinderabteilung im Karolinen –  
Hospital Arnsberg-Hüsten