

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anaesthesiologie und Urologie

Effekte von Morphin, Fentanyl und Ketamin auf leukozytäre Funktion, Transkriptionsfaktoren und Interleukin-8-Synthese

Habilitationsschrift zur Erlangung der *venia legendi* des Fachbereichs Humanmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Dr. med. Ingeborg Dorothea Maria Welters

Giessen 2000

Meinem Mann Martin und meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	Darstellung des Themenkomplexes	7
1.2	Zielsetzung der Untersuchung	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Probenmaterial	15
2.1.1	Blutproben	15
2.1.1.1	Blutentnahme und -aufarbeitung	15
2.1.1.2	Isolierung von Leukozytensubpopulationen aus dem Vollblut	16
2.1.2	Zellkultur	16
2.1.3	Inkubation mit Morphin, Fentanyl und Ketamin	17
2.2	Durchflußzytometrische Methoden	18
2.2.1	Prinzip der Durchflußzytometrie	18
2.2.2	Expression von Oberflächenrezeptoren	20
2.2.3	Bestimmung der Phagozytoseaktivität	21
2.2.3.1	Markierung der Bakterien mit FITC	21
2.2.3.2	Aufarbeitung der Blutproben für den Phagozytose-Assay	22
2.2.4	Messung des Oxidativen Burst	22
2.2.5	Durchflußzytometrische Bestimmung von NF- κ B und AP-1	23
2.3	Bestimmung der Proteinexpression und –sekretion	24
2.3.1	Gewinnung von zytosolischen und nukleären Proteinen	24
2.3.2	Western Blot	24
2.3.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	25
2.3.2.2	Darstellung der Proteine auf PVDF-Membranen	25
2.3.3	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	26
2.4	Molekularbiologische Methoden	27
2.4.1	Electric Mobility Shift Assay	27
2.4.2	Extraktion von RNA	28
2.4.3	Reverse Transkription – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	28
2.4.3.1	Reverse Transkription	28
2.4.3.2	PCR	29

2.5	Statistische Auswertung	30
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Wirkungen von Morphin auf Leukozyten	33
3.1.1	Phagozytoseleistung und Oxidativer Burst in PMN	33
3.1.1.1	Phagozytoseleistung	33
3.1.1.2	Oxidativer Burst	34
3.1.2	Expression von Oberflächenmarkern auf PMN	35
3.1.2.1	Expression des Fc γ -Rezeptors IIIb (CD16)	35
3.1.2.2	Expression des Komplementrezeptors CR1 (CD35)	36
3.1.2.3	Expression des Komplementrezeptors CR3 (CD11b/CD18)	37
3.1.2.4	Expression des LPS-Rezeptors CD14	38
3.1.3	Veränderungen der nukleären Bindungsaktivität von NF- κ B und AP-1	40
3.1.3.1	Veränderungen von NF- κ B	40
3.1.3.2	Veränderungen von AP-1	46
3.1.4	Morphin-induzierte Veränderungen und μ -Rezeptor-Expression	50
3.1.5	Einfluß von Morphin auf die Interleukin-8-Produktion	51
3.2	Wirkungen von Fentanyl auf neutrophile Granulozyten	53
3.2.1	Phagozytoseleistung und Oxidativer Burst	53
3.2.2	Oxidativer Burst	54
3.2.3	Expression von Oberflächenmarkern	55
3.3	Wirkungen von Ketamin auf Leukozyten	57
3.3.1	Phagozytoseleistung und Oxidativer Burst	57
3.3.2	Expression von Oberflächenmarkern	58
3.3.2.1	Expression des Fc γ -Rezeptors IIIb (CD16)	58
3.3.2.2	Expression des Komplementrezeptors CR1 (CD35)	58
3.3.2.3	Expression des Komplementrezeptors CR3 (CD11b)	59
3.3.2.4	Expression des LPS-Rezeptors CD14	60
3.3.3	Veränderungen der nukleären Bindungsaktivität von NF- κ B und AP-1	61
3.3.3.1	Veränderungen von NF- κ B	61
3.3.3.2	Veränderungen von AP-1	64
3.3.3.3	Einfluß der LPS-Konzentration auf die Induktion von Transkriptionsfaktoren	66
3.3.3.4	Enantiomer-spezifische Effekte	68
3.3.4	Ketamin-induzierte Veränderungen und NMDA1-Rezeptor-Expression	71
3.3.5	Einfluß von Ketamin auf die Interleukin-8-Produktion	72

3.3.6	Einfluß von Ketamin auf die LPS-induzierte IL-8-mRNA-Produktion	74
3.3.7	Einfluß von Ketamin auf die LPS-induzierte p65-mRNA-Produktion	75
3.3.8	Einfluß von Ketamin auf I κ B α	76
4	DISKUSSION	77
4.1	Diskussion der verwendeten Methoden und Meßverfahren	77
4.1.1	Aufarbeitung von Blutproben	77
4.1.2	Durchflußzytometrische Messung	79
4.1.3	Oberflächenrezeptoren, Phagozytose und Oxidativer Burst	80
4.1.4	Durchflußzytometrische Bestimmung von Transkriptionsfaktoren im Vergleich zu EMSA und Western Blot	83
4.2	Diskussion der Ergebnisse	86
4.2.1	Morphin-induzierte Immunmodulation	86
4.2.1.1	Veränderungen der Granulozytenfunktion durch Morphin	86
4.2.1.2	Veränderungen funktionsrelevanter Oberflächenrezeptoren durch Morphin	86
4.2.1.3	Hemmung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 durch Morphin	87
4.2.1.4	Opiatrezeptoren und Morphin-induzierte Immunmodulation	89
4.2.1.5	Rolle von NO in der Morphin-induzierten Immunsuppression	91
4.2.1.6	Einfluß von Morphin auf die IL-8-Produktion	93
4.2.2	Fehlende Immunmodulation durch Fentanyl	95
4.2.3	Ketamin-induzierte Immunmodulation	96
4.2.3.1	Veränderungen der Granulozytenfunktion durch Ketamin	96
4.2.3.2	Veränderungen funktionsrelevanter Oberflächenrezeptoren durch Ketamin	97
4.2.3.3	Hemmung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 durch Ketamin	98
4.2.3.4	Einfluß von Ketamin auf IL-8-Gentranskription und -Produktion	99
4.2.3.5	Ketamin-induzierte Effekte und Stereoisomerie	100
4.2.3.6	Unterschiede und Parallelen der Morphin- bzw. Ketamin-induzierten Immunmodulation	101
4.2.4	Mögliche klinische Relevanz der Ergebnisse	103
5	ZUSAMMENFASSUNG	106
6	LITERATURVERZEICHNIS	108
7	ANHANG	128

7.1	Abkürzungverzeichnis	128
7.2	Verwendete Materialien und Reagenzien	130
7.3	Auflistung der Experimente	132
7.3.1	Meßparameter: Phagozytose	132
7.3.2	Meßparameter: Oxidativer Burst	132
7.3.3	Meßparameter: CD16	133
7.3.4	Meßparameter CD35	133
7.3.5	Meßparameter CD11b	134
7.3.6	Meßparameter CD14	134
7.3.7	Meßparameter: NF- κ B	135
7.3.8	Meßparameter: AP-1	136
7.3.9	Meßparameter: I κ B α	137
7.3.10	Meßparameter: p65	137
7.3.11	Meßparameter: μ -Rezeptor	137
7.3.12	Meßparameter: NMDA1-Rezeptor	137
7.3.13	Meßparameter: Interleukin-8	138
7.4	Lebenslauf	139
7.5	Danksagung	141

1 EINLEITUNG

1.1 Darstellung des Themenkomplexes

Neutrophile Granulozyten und Monozyten spielen durch ihre Fähigkeit, bakterielle Krankheitserreger aufzunehmen und zu vernichten, eine wichtige Rolle in der primären Abwehrreaktion des Immunsystems^{87; 182}. Diese Reaktion auf eine bakterielle Invasion wird in verschiedene Stoffwechselschritte unterteilt¹⁸². Nach der Bindung von Komplementfaktoren und Immunglobulinen an der Oberfläche der Zielbakterien, der sogenannten Opsonisierung, werden diese von neutrophilen Granulozyten erkannt, aufgenommen und in intrazellulären Vakuolen, den Phagosomen, eingeschlossen⁸⁴. Anschließend werden durch Degranulation proteolytische und bakterizide Faktoren aus den intrazellulären Granula in die phagosomalen Kompartimente freigesetzt, wobei die Membran der intrazellulären Granula mit derjenigen des Phagosoms verschmilzt und das Phagolysosom entsteht⁸⁴. Aktivierte neutrophile Granulozyten zeigen innerhalb der Phagolysosomen nach der Aufnahme von Bakterien eine Steigerung der Stoffwechselaktivität sowie eine erhöhte Produktion von zytotoxischen Sauerstoffmetaboliten. Diese Veränderungen werden zusammenfassend als „Oxidativer Burst“ bezeichnet^{179; 229}. Die vermehrte Bildung von reaktiven Stoffwechselprodukten, insbesondere von Superoxid (O_2^-), Hydrogenperoxid (H_2O_2) sowie Hydroxylgruppen (OH^\cdot) ist dabei durch eine initial erhöhte Sauerstoffaufnahme und einen Anstieg des nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs gekennzeichnet⁹⁵. Reaktive Sauerstoffmetabolite werden sowohl in neutrophilen Granulozyten als auch in aktivierten Makrophagen und Monozyten gebildet und von diesen in die extrazelluläre Matrix abgegeben¹⁵.

Die Aufnahme von opsonisierten Bakterien während des Phagozytoseprozesses wird durch Komplement- und IgG-Rezeptoren vermittelt. Im Rahmen der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten werden präformierte Komplementrezeptoren aus den intrazellulären Granula freigesetzt und auf der Zelloberfläche präsentiert²⁰⁹, so daß im Vergleich zu ruhenden Zellen die Expression der Komplementrezeptoren CR3 (CD11b/CD18) und CR1 (CD35) signifikant erhöht ist¹⁷⁴. Diese Komplementrezeptoren vermitteln als ersten Schritt im Phagozytoseprozeß die Anlagerung von opsonisierten Bakterien oder Partikeln an die neutrophilen Granulozyten⁹². Beide Rezeptoren erkennen Spaltprodukte des aktivierten Komplementfaktors 3 (C3) und besitzen im Rahmen der Phagozytose eine synergistische Funktion³²⁵. Den wichtigsten Liganden des CR3 (CD11b/CD18) stellt iC3b, ein relativ stabiles C3-Fragment, dar, während CR 1 (CD35) überwiegend C3b-opsonisierte Partikel erkennt. Dabei führen bereits geringste Mengen dieser Komplementfaktoren zu einer

Steigerung der Phagozytose, einem Anstieg des Oxidativen Burst sowie einer erhöhten Freisetzung von Enzymen aus den intrazellulären Granula der neutrophilen Granulozyten^{82; 229}. Über einen positiven Rückkopplungsmechanismus wird die Aktivierung des Komplementfaktors C3 und somit die Opsonisierung verstärkt (Abbildung 1).

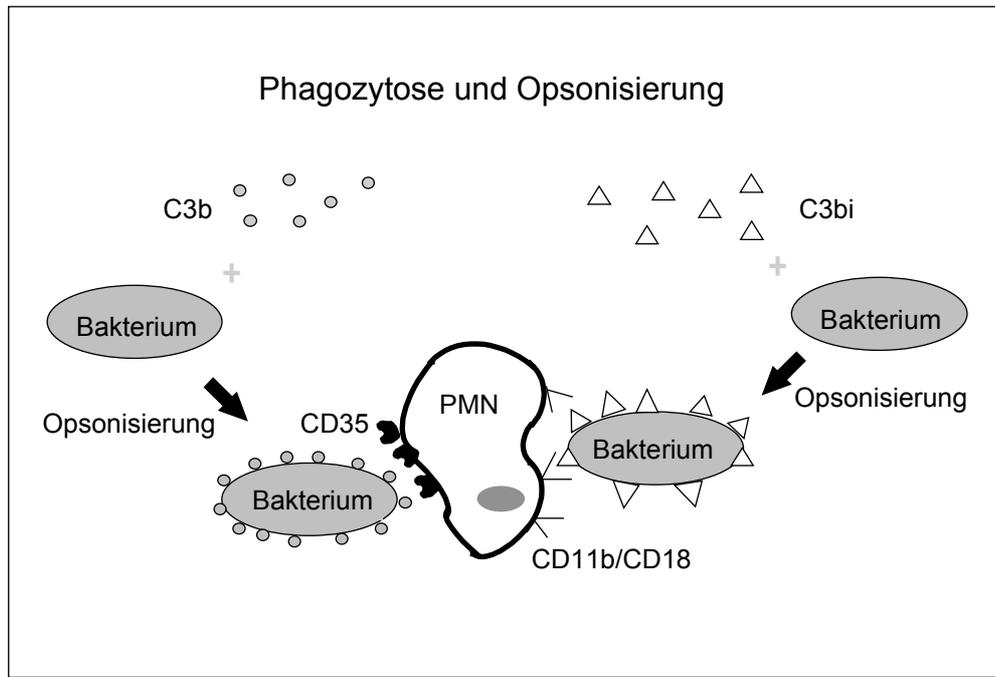


Abbildung 1

Die Komplementrezeptoren CR 1 (CD35) und CR 3 (CD11b/CD18) vermitteln die Erkennung opsonisierter Partikel durch Phagozyten.

Neben C3-Spaltprodukten stellt Immunglobulin G (IgG) ein weiteres, sehr effizientes Opsonin dar. Rezeptoren für das Fc γ -Fragment dieser Immunglobuline werden auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten exprimiert und vermitteln die Phagozytose von mit IgG besetzten Partikeln oder Krankheitserregern²³⁶. Die Fc γ -Rezeptoren spielen zudem bei der Aktivierung intrazellulärer Stoffwechselwege wie z. B. der Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetabolite eine wichtige Rolle⁸⁸. Mit 100 000 bis 200 000 Rezeptoren pro Zelle stellt der Fc γ -Rezeptor III den wichtigsten IgG-Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten dar⁸⁵. Fc γ -Rezeptoren werden in intrazellulären Pools gemeinsam mit CD14, einem weiteren für die Erkennung bakterieller Membranbestandteile erforderlichen Oberflächenmarker, gespeichert⁷⁵. CD 14 stellt den wichtigsten Rezeptor für Lipopolysaccharid (LPS), einem in gramnegativen Bakterien synthetisierten Membranbaustein, dar und vermittelt im Zusammenspiel mit dem LPS-bindenden Protein (LBP) die Induktion zellulärer Abwehrmechanismen in Leukozyten^{168; 322}. Als Antwort auf eine LPS-Stimulation synthetisieren diese Zellen proinflammatorische Mediatoren²¹⁰, steigern die Expression von

Oberflächenrezeptoren³⁵ und vernichten Krankheitserreger durch eine erhöhte Phagozytoseaktivität³⁶ und die Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite¹⁰. Die LPS-Stimulation von isolierten Leukozytenpopulationen, aber auch von Vollblut, ist als *ex-vivo*-Modell für die Untersuchung von Entzündungsvorgängen und septischen Krankheitsbildern anerkannt^{168; 188}.

Die Expression von Oberflächenrezeptoren auf Phagozyten hängt nicht nur von der Mobilisierung aus präformierten intrazellulären Pools und dem Abstoßen von der Zellmembran, dem sogenannten „Shedding“ ab^{86; 118}, sondern wird auch durch die Transkription entsprechender Gene mit nachfolgender *de-novo*-Synthese der Rezeptoren reguliert. Die Rekrutierung aus intrazellulären Pools erfolgt innerhalb von 15 Minuten als unmittelbare Antwort auf proinflammatorische Stimuli¹⁸⁰, während die *de-novo*-Synthese einen mehrstündigen Prozess darstellt, bei dem die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren eine Schlüsselfunktion einnimmt. Im Rahmen der Immunantwort auf proinflammatorische Mediatoren oder LPS wird der Transkriptionsfaktor Nuclear Factor κ B (NF- κ B) aktiviert^{46; 194}. Durch eine Inhibierung der NF- κ B-Aktivität entweder durch Tepoxalin oder durch NF- κ B-Antisense-Oligonukleotide wird die Expression von CD11b reduziert^{167; 264}. Umgekehrt bewirkt die Bindung von Trigger-Substanzen an Komplement- und Immunglobulinrezeptoren eine Induktion der NF- κ B-Aktivität^{22; 278}. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert nicht nur die Expression von Adhäsionsmolekülen³¹⁹, sondern spielt auch bei der transkriptionellen Aktivierung zahlreicher Entzündungsmediatoren wie zum Beispiel TNF- α , IFN- β , IL-8, IL-1 β , IL-2 und IL-6 eine wichtige Rolle³³. Der NF- κ B-Komplex besteht aus Heterodimeren, deren Untereinheiten als p50 (NF- κ B1) und p65 (RelA) bezeichnet werden. NF- κ B liegt im Zytosol vor, wird jedoch durch die Bindung an inhibitorische Proteine im inaktiven Zustand gehalten¹⁴⁶. Nach TNF- α - oder Lipopolysaccharidexposition wird der NF- κ B-Inhibitor I κ B α phosphoryliert und proteolytisch gespalten⁴³. Dadurch wird NF- κ B ins Zytoplasma freigesetzt. Freie NF- κ B-Dimere wandern direkt in den Zellkern und binden dort an die Promoter-Regionen von Genen, deren Transkription sie induzieren³³. Wichtige *second messenger* bei der Aktivierung von NF- κ B stellen H₂O₂ und Superoxidanionen dar²¹². Radikalfänger wie N-Acetyl-Cystein hemmen die NF- κ B-Aktivierung³³. Die NF- κ B-Aktivierung durch reaktive Sauerstoffmetabolite geht mit einem Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels einher^{212; 213; 253}. Als Folge steigt die Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite, was zu einer NF- κ B-Aktivierung führt²⁵⁰. Durch Calcium-Chelatoren kann die NF- κ B-Aktivierung verhindert werden.

Neben Calcium spielt Stickstoffmonoxid (NO) eine wichtige Rolle in der NF- κ B-vermittelten Synthese von Entzündungsmediatoren. Molekularbiologische Studien an Zellkulturen zeigen,

daß NF- κ B eine Schlüsselfunktion bei der Transkription der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) einnimmt ³²¹. In einem Tiermodell des septischen Schocks konnte durch eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B die iNOS mRNA-Expression in der Lunge reduziert und die systemische Hypotension verhindert werden ¹⁷⁶. Substanzen, die in die NF- κ B-Aktivierung eingreifen, könnten damit in Zukunft Bedeutung für die Therapie des septischen Schocks erlangen.

Gleichzeitig hemmt NO in verschiedenen Zellarten die NF- κ B-Aktivität und somit die Expression von Adhäsionsmolekülen und Cytokinen ^{12; 107; 166}. Die NO-Donoren Nitroprussid-Natrium und S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin hemmen durch Induktion und Stabilisierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B α die NF- κ B-Aktivierung ²¹⁷ und bewirken eine Reduktion der DNA-Bindungsaktivität von rekombinantem NF- κ B ¹⁹². Im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus kann die NO Produktion somit durch eine Interaktion zwischen NF- κ B und der Promotor-Region des iNOS-Gens limitiert werden ²¹⁵.

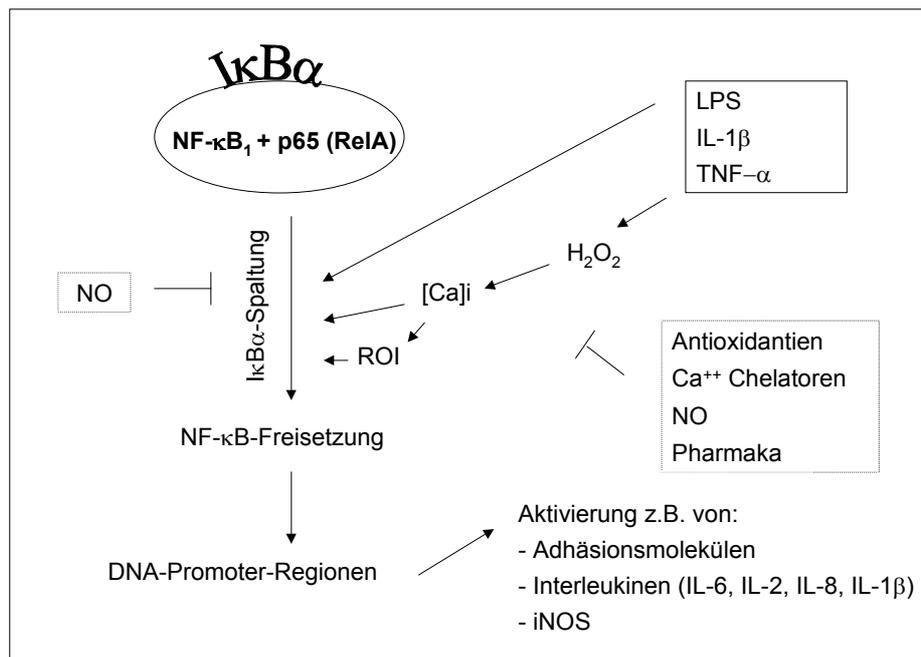


Abbildung 2

Darstellung der NF- κ B-Aktivierung. Nach Spaltung des NF- κ B Inhibitors I κ B α wird NF- κ B freigesetzt und induziert die Transkription von proinflammatorischen Mediatoren. Die NF- κ B-Aktivierung ist Folge der Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (ROI) und einem intrazellulären Calcium-Anstieg. Stickstoffmonoxid, Antioxidantien und Calcium-Chelatoren hemmen die NF- κ B-Aktivierung. Modifiziert nach Welters et al. ³⁰⁹.

Stickstoffmonoxid interagiert zudem mit Activator Protein 1 (AP-1), einem weiteren Transkriptionsfaktor, der durch LPS und proinflammatorische Zytokine aktiviert wird und zusammen mit NF- κ B die Transkription von IL-8, IL-6, IL-1 β und iNOS reguliert ^{56; 78; 204}.

Proteinprodukte der Proto-Oncogene c-jun und c-fos bilden als Homo- oder Heterodimere verschiedene AP-1-Komplexe, die an DNA-Consensus-Sequenzen binden und somit die Transkription entsprechender Gene initiieren können¹⁰². Homodimere werden dabei ausschließlich von jun-Proteinen gebildet, während fos-Proteine mit jun-Proteinen Heterodimere bilden³¹⁸. Nach Stimulation durch LPS wird die Bindung von AP-1-Komplexen an DNA unter anderem durch die *de-novo*-Synthese von c-fos und c-jun gesteigert⁷⁷. Die Aktivität dieser AP-1-Komponenten wird außerdem durch Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) geregelt, die durch Phosphorylierung die AP-1-abhängige Transkription potenzieren bzw. inhibieren²⁰. AP-1-Consensus-Sequenzen wurden unter anderem in den Promotor-Regionen folgender Gene nachgewiesen: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 und tissue factor^{16; 78; 144; 200; 204}. Eine Interaktion von AP-1 und NF- κ B potenziert die biologischen Effekte beider Transkriptionsfaktoren²⁷⁷.

Interleukin-8 ist ein potenter und spezifischer Entzündungsmediator und verstärkt proinflammatorische Vorgänge durch Demargination, Aktivierung und Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten¹²⁷. Zudem stellt IL-8 das wichtigste Chemokin dar, das von diesen Zellen synthetisiert wird¹¹. Im Rahmen eines autokrinen Regulationsmechanismus kann somit die Granulozytenaktivierung verstärkt und aufrecht erhalten werden. Die Beteiligung der beiden Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B an der Interleukin-8-Regulation ist hinreichend belegt^{163; 202; 204; 300}, so daß eine gesteigerte mRNA-Produktion zusammen mit einer vermehrten Bildung und Sekretion dieses Mediators als Ausdruck einer transkriptionellen Aktivierung mit nachfolgender *de-novo*-Synthese gewertet werden kann²⁸². Die Rolle von NO in diesem Regulationsmechanismus ist jedoch nicht hinreichend geklärt: Wenngleich eine NO-abhängige Hemmung von NF- κ B beschrieben wurde, so führte der Zusatz von bestimmten NO-Donoren in verschiedenen Zellmodellen zu einer Steigerung der IL-8-Produktion^{12; 67; 298}.

Seit langem ist bekannt, daß sowohl Opiate als auch endogene Opiode durch Bindung an Opiatrezeptoren die Funktion von Immunzellen beeinflussen²⁷⁶. Weitgehend ungeklärt ist jedoch bislang, welche Mechanismen der Signaltransduktion durch diese Substanzen beeinflußt werden und mit funktionellen Veränderungen von Immunozyten in Zusammenhang stehen. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß Morphin zu einer Freisetzung von NO in neutrophilen Granulozyten, Monozyten¹⁸³ und Endothelzellen²⁷⁵ führt. In Gegenwart von Naloxon oder dem NOS-Inhibitor N-Nitro-L-Arginin ist der NO-freisetzende Effekt des Morphins aufgehoben¹⁸³. Es wird vermutet, daß diese Effekte durch einen Morphin-sensitiven, aber Opioidpeptid-insensitiven Subtyp von μ -Rezeptoren, dem μ_3 -Rezeptor, vermittelt werden¹⁸⁴. Der μ_3 -Rezeptor wurde auf zahlreichen Immunzellen^{184; 270} sowie auf Endothelzellen²⁷² nachgewiesen. Neuere Untersuchungen zeigen, daß die Morphin-induzierte NO-Freisetzung in Endothelzellen in engem Zusammenhang mit einem

Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels steht ⁹⁸. Dieser Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels führt zu einer Aktivierung der Calcium-abhängigen, konstitutiven Isoform der NOS (cNOS) und bewirkt somit eine NO-Freisetzung ^{98; 276}.

Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß Morphin die Makrophagenfunktion durch Modulation der NF- κ B-Aktivierung beeinflusst ²³⁹. Dabei wurden differente Effekte in Abhängigkeit von der eingesetzten Morphindosis beobachtet: Während Konzentrationen im nanomolaren Bereich die LPS-induzierte Synthese von IL-6 und TNF- α steigerten, führten höhere Morphinkonzentrationen im mikromolaren Bereich zu einer verminderten Produktion beider Mediatoren. Diese dosisabhängigen Morphineffekte korrelierten mit einer unterschiedlich starken Aktivierung von NF- κ B. In der mikromolaren Konzentration führt Morphin zur Akkumulation des NF- κ B-Inhibitors I κ B α im Zytosol und verhindert somit die NF- κ B-Aktivierung nach LPS-Exposition. Zudem waren im mikromolaren Bereich die Morphineffekte durch Naloxon nicht antagonisierbar, so daß hier ein Opiatrezeptor-unabhängiger Prozess nicht ausgeschlossen werden kann. Der Einfluß von Morphin auf transkriptionelle Regulationsmechanismen von Immunzellen im zirkulierenden Blut ist jedoch bislang nicht belegt und stellt einen wichtigen Untersuchungsansatz für die vorliegende Arbeit dar.

Nach chirurgischen Eingriffen oder Traumata wird eine hypererge, proinflammatorische Immunantwort beobachtet, die durch die Entzündungsmediatoren TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 getriggert wird. Im weiteren Verlauf wird diese proinflammatorische Reaktion mit Hilfe von anti-inflammatorischen Mediatoren wie IL-10 gegenreguliert. In der postoperativen Phase können bei herzchirurgischen Patienten erhöhte Spiegel an endogenem Morphin festgestellt werden ⁴¹. Basierend auf dem gleichartigen inhibitorischen Einfluß von Morphin und Interleukin-10 auf Immunozyten und Endothelzellen wurde ein gemeinsamer, an die Freisetzung von NO gekoppelter Wirkmechanismus postuliert ²⁶⁹. Ferner konnte gezeigt werden, daß IL-10 durch die Stabilisierung von I κ B α die Aktivierung von NF- κ B supprimiert ¹⁶⁹. Bei Krankheitszuständen wie dem Systemic Inflammatory Response Syndrome oder Reperfusionsschäden, die mit einer exzessiven Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren einhergehen, könnte Morphin als endogener Botenstoff synergistisch mit IL-10 zu einer Normalisierung übermäßig aktivierter Immunmechanismen beitragen ²⁷⁵. Zudem könnte diese immunregulatorische Eigenschaft von Morphin therapeutisch genutzt werden. Im Gegensatz zu Morphin weist Fentanyl offenbar keine immunregulatorischen Eigenschaften auf ³². So konnte nach Fentanyl-Exposition weder eine Freisetzung von NO nachgewiesen werden, noch wurden Änderungen in der Funktion neutrophiler Granulozyten beobachtet.

In kürzlich publizierten Studien wurde beschrieben, daß Ketamin, ein Phencyclidin-Derivat, ebenfalls immunsuppressive Eigenschaften aufweist ^{149; 306}. Die analgetischen Eigenschaften

von Ketamin werden mit seiner inhibitorischen Wirkung an zentralnervösen N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptoren erklärt. Diese Rezeptoren vermitteln im Zentralnervensystem (ZNS) die exzitatorischen Wirkungen der Aminosäure Glutamat und sind für synaptische Plastizität, Lernvorgänge und Gedächtnisleistungen von Bedeutung⁶¹. Außerhalb des ZNS konnten NMDA-Rezeptoren nicht nur in den Langerhansschen Inselzellen des Pankreas, sondern auch in Osteoblasten und Osteoklasten nachgewiesen werden^{116; 142}. Die Existenz funktionell intakter NMDA-Rezeptoren im Knochenmark der Ratte, auf menschlichen Megakaryozyten und in einer megakaryoblastischen Zelllinie weist auf weitere Glutamat-abhängige Steuerungsvorgänge außerhalb des ZNS hin. Bisher wurde die Expression von NMDA-Rezeptoren auf Immunzellen des Blutes nicht beschrieben. Ketamin bindet im ZNS nicht nur an NMDA-Rezeptoren, sondern reagiert auch mit Opioid-Rezeptoren⁷⁶, so daß eine Interaktion von Ketamin mit den Opioidrezeptoren auf Immunzellen die immunmodulatorischen Effekte vermitteln könnte. Bisher ist jedoch unklar, welche Mechanismen der Signaltransduktion bei der Ketamin-induzierten Immunsuppression eine Rolle spielen.

1.2 Zielsetzung der Untersuchung

Zielsetzung dieser Untersuchungen war, die immunmodulierenden Wirkungen der Opiate Morphin und Fentanyl sowie diejenigen des Phencyclidin-Derivates Ketamin zu charakterisieren und zu vergleichen. Verschiedene zelluläre Mechanismen können an der medikamentös induzierten Immunmodulation beteiligt sein. Daher sollten folgende Fragestellungen im Zusammenhang mit der Wirkung von Opiaten und Ketamin auf immunkompetente Zellen untersucht werden:

1. Beeinflussen Opiate bzw. Ketamin die Granulozytenfunktion und die Expression von Oberflächenrezeptoren auf diesen Zellen?

Dazu wurde zunächst der Einfluß dieser Substanzen auf die Phagozytosekapazität und den Oxidativen Burst von neutrophilen Granulozyten untersucht. Um zu überprüfen, ob funktionelle Einschränkungen im Zusammenhang mit Veränderungen der Expression von Oberflächenrezeptoren stehen, wurden zudem Immunglobulin-, Komplement- und LPS-Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten bestimmt.

2. Werden transkriptionelle und posttranskriptionelle Vorgänge durch Opiate bzw. Ketamin moduliert?

Zur Bewertung transkriptioneller Regulationsmechanismen wurde zunächst die DNA-Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 gemessen. Darüber hinaus wurde die mRNA-Produktion NF- κ B- und AP-1-abhängiger Gene bestimmt. Um davon posttranskriptionelle Prozesse diskriminieren zu können, wurde die Expression und Sekretion von Interleukin-8 als korrelierendem Protein quantifiziert.

3. Welche Botenstoffe sind für die Opiat- bzw. Ketamin-induzierten Veränderungen von Bedeutung?

Zur Bewertung von intra- und extrazellulären Botenstoffen bei der Opiat- und Ketamin-abhängigen Immunmodulation wurde insbesondere der Einfluß von NO auf Gentranskription, Proteinexpression sowie auf strukturelle und funktionelle Veränderungen von Granulozyten und Monozyten untersucht.

4. Werden die medikamentösen Effekte durch entsprechende Rezeptoren vermittelt?

Zur Klärung dieser Fragestellung wurde zum einen die Produktion von mRNA für den μ -Rezeptor als Bindungsstelle für die Opiate Fentanyl und Morphin als auch die Expression des NMDA1-Rezeptors als möglicher Vermittler Ketamin-bedingter Veränderungen überprüft. Der Einsatz entsprechender Rezeptor-Antagonisten wurde ebenfalls evaluiert.

2 MATERIAL UND METHODEN

Die Untersuchungen zur immunmodulierenden Wirkung von Morphin, Fentanyl und Ketamin wurden im Rahmen von Vollblut-Methoden an Granulozyten und Monozyten durchgeführt. Isolierte Granulozyten sowie aus der Kultur von menschlichen Tumorzelllinien gewonnenes Material wurden ebenfalls eingesetzt.

Bei der Durchführung dieser Arbeit wurden verschiedene Arbeitstechniken verwendet: Die Bestimmung der funktionellen Aktivität von neutrophilen Granulozyten sowie die Expression von Oberflächenrezeptoren erfolgte mittels Durchflußzytometrie. Die Translokation der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 in den Zellkern wurde ebenfalls durchflußzytometrisch gemessen. Die DNA-Bindungsaktivität dieser Transkriptionsfaktoren wurde mittels „Electric Mobility Shift Assay“ (EMSA) bestimmt. Die Transkription NF- κ B- und AP-1-regulierter Gene wurde durch Bestimmung von mRNA mittels Reverser Transkription und nachfolgender Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) überprüft, die Expression und Sekretion der entsprechenden Proteine mittels Western Blot bzw. ELISA ermittelt.

Die verwendeten Reagenzien und Materialien sind im Anhang aufgelistet.

2.1 Probenmaterial

2.1.1 Blutproben

2.1.1.1 Blutentnahme und -aufarbeitung

In der vorliegenden Studie wurde Blut von gesunden männlichen Probanden im Alter von 20 bis 35 Jahren untersucht. Alle Studienteilnehmer wurden über das Untersuchungsziel der Studie aufgeklärt und erteilten vor Beginn der Studie ihr mündliches Einverständnis. Personen, die unter einer immunsuppressiven Therapie standen oder unter akuten oder chronischen Entzündungen litten, sowie Allergiker und Raucher wurden nicht in die Studie aufgenommen.

Der Zeitpunkt der Blutentnahme war bei allen Probanden vergleichbar und lag zwischen 8 und 11 Uhr morgens. Den Studienteilnehmern wurden aus einer peripheren Vene der Ellenbeuge über eine Kanüle 10 bis 60 ml Blut in ein Blutentnahmeröhrchen mit Natrium-Heparinat entnommen. Nach der Probenentnahme wurde die Blutprobe umgehend aufgearbeitet.

Zur Bestimmung der Sekretion des Entzündungsmediators IL-8 wurde Vollblut im Verhältnis 1:5 mit RPMI-Medium verdünnt und in 12-Well-Zellkulturplatten aliquotiert. Nach Inkubation mit den Testsubstanzen wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand bei -70°C eingefroren.

2.1.1.2 Isolierung von Leukozytensubpopulationen aus dem Vollblut

Für einige Experimente wurden isolierte Blutzellen verwendet. Dazu wurden 7 ml Vollblut auf einen Natriummetrizoat-Dextran-Gradienten (1-Step Polymorphs) aufgelegt und zentrifugiert (40 Minuten, $450 \times g$, 22°C , Beckmann, CEN-J6B-Rotor, München, Deutschland bzw. IEC EXD, Fisher scientific, Pittsburgh, PA, USA). Dadurch werden die Erythrozyten auf den Boden des Reagenzröhrchens pelletiert, während sich die polymorphkernigen Granulozyten in einer Bande oberhalb der pelletierten Erythrozyten anreichern. Die mononukleären Zellen befinden sich in einem schmalen, weiter oben gelegenen Ring. Die Granulozytenfraktionen wurden in PBS diluiert und erneut zentrifugiert (10 Minuten, 22°C , $450 \times g$). Zur Lyse der Erythrozyten wurde 1 ml destilliertes H_2O zugegeben. Diese Reaktion wurde nach 30 Sekunden durch Wiederherstellung der physiologischen Osmolarität mit 2 ml 2,7% NaCl-Lösung beendet. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt und die Suspension mit RPMI-Medium auf 10^6 Zellen/ml verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C unter Zusatz von 5% CO_2 .

2.1.2 Zellkultur

Sämtliche Zelllinien wurden von ATCC, Manassas, VA, USA bezogen. Für einige Experimente wurden die promyelozytäre Zelllinie HL-60, die histiozytäre Lymphom-Zelllinie U937 sowie die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y eingesetzt. Diese humanen Zelllinien wurden in RPMI-Medium 1640, supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum, HEPES (2,38 g/l), NaHCO_3^- (2 g/l), L-Glutamine (0,3 g/l), Pyruvat (0,088 g/l), Glukose (4,5 g/l) Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin ($\mu\text{g/ml}$) bei 37°C unter Zusatz von 5% CO_2 kultiviert. Das Medium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt, und die Zelldichte der in Suspension wachsenden Zelllinien HL-60 und U937 wurde zwischen 10^5 und 10^6 Zellen/ml gehalten. Zur Ausbildung eines granulozytären Phänotyps wurden HL-60 Zellen mit $1 \mu\text{M}$ Retinolsäure (RA) für drei bis fünf Tage inkubiert. Die Differenzierung von Zellen in den makrophagozytären Phänotyp wurde durch Zusatz von 30 nM PMA erreicht. Die Differenzierung in den granulozytären Phänotyp wurde durch Induktion des Oxidativen Burst mittels FMLP überprüft, während die Differenzierung in Makrophagen durch spontane Adhäsion und morphologische Veränderungen gekennzeichnet war. Die adhären

wachsenden SH-SY5Y-Zellen wurden durch Trypsin (0,25%)-EDTA (0,03%)-Lösung von der Plastikoberfläche abgelöst und passagiert. Für die Experimente wurde ein subkonfluent wachsendes Zellayer verwendet.

2.1.3 Inkubation mit Morphin, Fentanyl und Ketamin

Die Zellen bzw. das Vollblut wurden mit den folgenden Substanzen inkubiert: Morphin (50 nm, 1 μ M, 50 μ M, 1 mM), Fentanyl (10 ng/ml bzw. 19 nM, 50 ng/ml bzw. 95 nM, 100ng/ml bzw. 190 nM), Ketamin-Razemat (100 μ M, 1 mM) bzw. S(+)-Ketamin (100 μ M, 1 mM). Eine zehnmütige Vorinkubation mit Naloxon (10 μ M, 100 μ M) wurde durchgeführt, um die Bedeutung von Opiatrezeptoren in der Ketamin- und Opiat-induzierten Immunmodulation zu bestimmen. Zur Überprüfung der NO-Abhängigkeit der Morphin- und Ketamineffekte wurden die NOS-Inhibitoren N_ω-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) in einer Konzentration von 1 mM oder N_ω-Nitro-L-Arginin (NLA) in einer Konzentration von 500 μ M sowie der NO-Donor S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamin (SNAP) in einer Konzentration von 1 μ M eingesetzt. Um zwischen sofort und verzögert einsetzenden Effekten zu unterscheiden, wurden als Standard-Inkubationszeiten 10 und 150 Minuten gewählt. Zur Erstellung von Zeit-Wirkungskurven wurde 10, 20, 40, 90 und 150 Minuten mit Morphin inkubiert. Die DNA-Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B wurde durch Stimulation mit 100 ng/ml LPS (E. coli, Serotyp 026B6) für 30 bis 60 Minuten induziert. Zur Evaluierung eines möglichen Konzentrationseffektes von LPS als Stimulans wurden in Experimenten mit Ketamin zwei LPS-Konzentrationen (10 ng/ml und 100 ng/ml) eingesetzt.

Um eine Beeinträchtigung der Zellviabilität durch die getesteten Substanzen auszuschließen, wurden nach der Inkubation des Vollbluts neutrophile Granulozyten isoliert und in Trypanblau-Lösung (0,4%) resuspendiert. Nekrotische Zellen färben sich dabei blau an, während vitale Zellen diesen Farbstoff nicht aufnehmen. Zur Validierung wurden isolierte Zellpopulationen mit Propidiumjodidlösung (50 μ g/ml) inkubiert. Vitale Zellen färben sich dabei nicht an und zeigen daher keine Rotfluoreszenz in der durchflußzytometrischen Messung.

Eine tabellarische Auflistung der durchgeführten Experimente ist im Anhang enthalten.

2.2 Durchflußzytometrische Methoden

2.2.1 Prinzip der Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie analysiert Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Teilchen und ermöglicht daher aufgrund der physikalischen Eigenschaften von Zellen die Darstellung verschiedener Zellpopulationen. Durch ein spezifisch angeordnetes Optik- und Detektionssystem innerhalb des Durchflußzytometers können Zellgröße, Zellinnenstruktur sowie verschiedene Fluoreszenzsignale einer Zelle gleichzeitig gemessen und anschließend in entsprechenden Datenverarbeitungsprogrammen dargestellt und ausgewertet werden. Die Methodik zeichnet sich bei entsprechender Standardisierung durch eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, einhergehend mit geringen Standardabweichungen und einer hohen Sensitivität der zu messenden Parameter, aus.

Das in dieser Arbeit eingesetzte Durchflußzytometer (FACScalibur®, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg) benutzt als Lichtquelle einen Argon-Laser, der elektromagnetische Strahlung mit einer Wellenlänge von 488 nm emittiert. Dadurch werden Elektronen spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe, sogenannte Fluorochrome, auf ein höheres Energieniveau gehoben. Bei der spontanen Rückkehr auf das Anfangsniveau emittiert das Elektron ein Photon. Dieser Übergang des Atoms in seinen energetischen Grundzustand wird als Fluoreszenz bezeichnet, die Zahl der emittierten Photonen ist dem entstandenen Fluoreszenzsignal proportional. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC) und Propidiumjodid werden beide durch eine Wellenlänge von 488 nm angeregt, weisen jedoch ein unterschiedliches Emissionsspektrum auf: Durch die Wahl verschiedener optischer Detektoren können die Grünfluoreszenz des FITC und die Rotfluoreszenz des Propidiumjodids selektiv erfaßt werden.

Die Bindung Fluoreszenz-markierter Antikörper an Proteine und Rezeptoren auf der Zelloberfläche ermöglicht somit, die verschiedenen Leukozytenpopulationen über spezifische Antigene zu identifizieren und zu analysieren. Dabei ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen.

Im Rahmen des Meßvorganges wird die Zellsuspension aus dem Reagenzröhrchen in eine Meßküvette eingezogen und mit der Trägerlösung *FACS-Flow*® vermischt. Durch den in der Küvette vorhandenen laminaren Strom werden die Zellen der Zellsuspension dabei perlenkettenartig aufgereiht und einzeln an dem fokussierten Laser vorbeigeleitet. Dieses als "Hydrodynamische Fokussierung" bezeichnete Meßprinzip garantiert, daß nur einzelne Zellen als Meßereignis erkannt werden. In jeder Messung wurden 20000 dieser Meßereignisse erfaßt und mit dem Analyseprogramm des Durchflußzytometers (Cellquest®, Becton-Dickinson, Heidelberg) ausgewertet.

Innerhalb der Meßkapillare des Zytometers wird das Laserlicht durch die Eigenschaften der in der Suspension vorhandenen Zellen in seinem geradlinigen Verlauf beeinflußt und gestreut. Das entstandene Streulicht wird entsprechend seines Ablenkungswinkels in Vorwärtsstreulicht (Forward light scatter, FSC) und Seitstreulicht (Sideward light scatter, SSC) unterteilt. Der größere Anteil des entstandenen Streulichts, das Vorwärtsstreulicht, wird dabei primär durch die Größe der untersuchten Zellen beeinflußt. Die resultierende Ablenkung wird von den Detektoren in einem engen Winkel von 2° bis 20° gemessen. Ein geringerer Anteil, das seitliche 90°-Streulicht, wird sowohl durch die Dichte der Zellstruktur, deren Membranoberfläche als auch durch die intrazelluläre Granularität der Zelle verändert. Verschiedene Detektoren messen Streulicht und Fluoreszenzen der Zellen und wandeln diese optischen Signale in elektrische Impulse um. Durch das Setzen spezieller Auswertefenster (Gates) in der korrelierten Zwei-Parameter-Darstellung (Dot-Plot) von FSC und SSC können die einzelnen Leukozytenpopulationen selektiv ausgewertet werden.

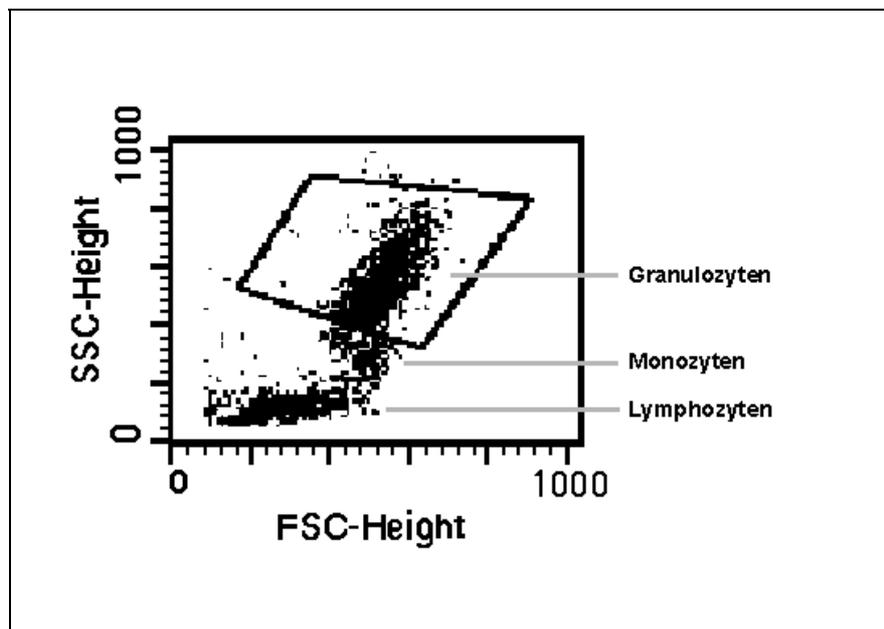


Abbildung 3

Darstellung der einzelnen Leukozytenpopulationen im FSC/SSC-Dot-Plot-Diagramm anhand einer Originalabbildung. Das Auswertefenster ist auf die Granulozytenpopulation ausgerichtet. Modifiziert nach Bossuyt et al.⁴⁰

Die Fluoreszenzintensität des Meßparameters kann zudem in einem Histogramm- oder Häufigkeitsdiagramm dargestellt werden. Hierbei werden die Zellen entsprechend ihrer Fluoreszenzintensität in verschiedene Intensitätskanäle oder Klassen eingeordnet und dabei gegen die absolute Zellzahl aufgetragen. In Abhängigkeit von der zuvor gewählten Signalverarbeitung und der elektrischen Spannung des Zytometers wird die innerhalb einer Zellpopulation unterschiedliche Fluoreszenzintensität in 256 oder 1024 Klassen verteilt. In

der vorliegenden Untersuchung wurde der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) als Auswerteparameter gewählt. Für die Bestimmung der Phagozytoseaktivität wurde zudem die mittlere Anzahl der phagozytierten Bakterien pro Granulozyt berechnet: Anzahl der phagozytierten Bakterien = $10^{(\text{Median der Fluoreszenzintensität Granulozyt/Skalierungsfaktor})} / 10^{(\text{Median der Fluoreszenzintensität Bakterien/Skalierungsfaktor})}$. Der Skalierungsfaktor errechnet sich aus der Anzahl der Fluoreszenzklassen (1024) dividiert durch die Anzahl der logarithmischen Dekaden (4) und beträgt 256.

Bei der Histogrammanalyse können die verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch das Setzen entsprechender Gates in negative, nicht-fluoreszierende und in positive, fluoreszierende Zellen klassifiziert werden. Vor der Messung der untersuchungsrelevanten Zellsuspensionen werden dadurch mit einer geeigneten Negativkontrolle nicht-fluoreszierende Zellen in der Histogramm-Darstellung definiert. Diese Abgrenzung negativer Zellen wird bei den anschließenden Messungen der Proben beibehalten und ermöglicht den Ausschluß unspezifischer Fluoreszenz aufgrund von Spontanfluoreszenz der Zellen oder unspezifischer Bindung FITC-markierter Antikörper. Der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) der Negativkontrolle wird von der Fluoreszenzintensität der anschließend gemessenen Proben abgezogen.

2.2.2 Expression von Oberflächenrezeptoren

Die quantitative Bestimmung der Komplementrezeptoren CR1 (CD35) und CR3 (CD11b/CD18) sowie des Fc γ -Rezeptors III (CD 16) und des LPS-Rezeptors CD14 auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten wurde an heparinisierten Vollblutproben mittels Fluoreszein-isothiozyanat-markierter Antikörper durchgeführt. Dabei wurden folgende monoklonale Mäuse-Antikörper verwendet: anti-human-CD11b (Klon ICRF44), anti-human-CD35 (Klon E11), anti-human-CD16 (Klon LNK16), anti-human CD14 (Klon UCHM1). Das Maximum des von FITC-markierten Molekülen emittierten Lichtes liegt bei 530 nm und kann mit Hilfe des Fluoreszenz-1 (FL-1)-Detektors gemessen werden. Zum Ausschluß unspezifischer Fluoreszenz wurde ein Ansatz mit FITC-markiertem polyklonalen Ziegen-Antikörpern gegen humanes IgG inkubiert. Die hierbei gemessene Fluoreszenzintensität wurde von derjenigen der Untersuchungsergebnisse abgezogen. Innerhalb einer Testreihe wurden eine Negativkontrolle, eine Positivkontrolle sowie ein Ansatz für jedes der zu untersuchenden Pharmaka durchgeführt. Dazu wurden 100 μ l Vollblut mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Inkubationszeit betrug in Abhängigkeit vom durchgeführten Experiment 10 bis 150 Minuten. Nach Ende der Inkubationszeit wurde jeder Ansatz mit 5 μ l der fluoreszierenden Antikörperlösung versetzt, gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln

inkubiert. Anschließend wurden die Vollblutproben zur Fixierung der Zellen und zur Lyse der Erythrozyten mit 2 ml FACS-Brand-Lysing®-Lösung versetzt und erneut 10 Minuten bei 22°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellpellets zweimal in PBS gewaschen und resuspendiert. Zur Darstellung der kernhaltigen Zellen wurde vor der Messung zu jedem Ansatz 100 µl einer Propidiumjodidlösung (50 µg/ml) zugegeben, und die Proben wurden für mindestens 10 Minuten auf Eis gelagert. Zellkerne, die mit Propidiumjodid markiert sind, emittieren fluoreszierendes Licht mit einer Wellenlänge zwischen 580 und 650 nm und können daher mit dem Fluoreszenz-2 (FL-2)-Detektor, der Licht im Bereich von 564 und 605 nm analysiert, gemessen werden.

In jeder Versuchsserie wurde nur eine Charge Antikörper eingesetzt, um Schwankungen in der Fluoreszenzintensität durch die FITC-Markierung zu vermeiden.

2.2.3 Bestimmung der Phagozytoseaktivität

2.2.3.1 Markierung der Bakterien mit FITC

Zur Bestimmung der Phagozytosekapazität sowie zur Induktion des Oxidativen Burst wurde der Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* K 807 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Lämmler, Institut für Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen) verwendet. Dabei wurden die Bakterien mittels Verdünnungsausstrich aus einer Stammlösung auf eine Hammelblutagarplatte übertragen, 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und bis zu 14 Tage bei -20 °C aufbewahrt. Die Bakterien-Stammlösung wurde bei -70 °C gelagert.

Mit einer Platinöse wurde eine Bakterienkolonie in einen Erlenmeyer-Kolben mit 200 ml BHI-Bouillon (Dr. Lämmler, Institut für Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen) überimpft und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde mit 20 ml einer Lösung aus 1 mg Fluoresceinisothiocyanat pro ml eines mit Petroläther vergällten 96%igen Äthanolgemisches (Apotheke des Klinikums der Justus-Liebig-Universität, Giessen) versetzt und für 1 Stunde bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurden die markierten Bakterien zentrifugiert (350 g, 4 °C, 10 Min), der Überstand wurde dekantiert, das Bakterienpellet wurde in PBS zweimal gewaschen und in 10 ml PBS resuspendiert. Jeweils 30 µl der Bakterienlösung wurden aliquotiert und mit 30 µl Türks-Lösung sowie 940 µl PBS-Puffer gemischt.

Die Anzahl der Bakterien pro ml wurde durch Auszählen der Bakterien in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Durch Verdünnung mit PBS wurde die Bakteriensuspension auf 1×10^9 Bakterien pro ml titriert und anschließend bei -20 °C aufbewahrt. Die Vitalität der

Bakterien konnte durch erneutes Anzüchten auf Agar-Platten nach dem Auftauen gesichert werden.

2.2.3.2 Aufarbeitung der Blutproben für den Phagozytose-Assay

Aus der Blutprobe wurden 100 µl Vollblut auf den Boden eines FACScan®-Reagenzröhrchen gegeben und gemäß den jeweiligen Versuchsbedingungen bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der mit FITC markierten Bakterienlösung zugegeben. Zwei Negativkontrollen wurden durchgeführt: Ein Ansatz wurde mit 100 µl Natriumchlorid-Lösung 0,9% inkubiert, eine weitere Blutprobe verblieb nach Zugabe der Bakterien auf Eis, so daß die Spontanphagozytose weitestgehend unterdrückt wurde. Dieser Ansatz diente zur Qualitätskontrolle.

Nach 10 Minuten wurden die Blutproben zum Abstoppen der Inkubationsreaktion auf Eis gekühlt. Anschließend wurden als "Quenching-Lösung" zu jedem Ansatz 100 µl einer Trypanblau-Lösung (0,16 mg/ml) gegeben und vermischt. Diese Lösung führt zur Unterdrückung der Fluoreszenz der an der Zellmembran angelagerten Bakterien, die nicht phagozytiert wurden. Die Zellsuspension wurde anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Lyse der Erythrozyten und die Anfärbung der DNA-haltigen Zellkerne erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.4 Messung des Oxidativen Burst

Zur Messung des Oxidativen Burst von neutrophilen Granulozyten wurde eine Modifikation eines Test-Kits (Phagoburst®) verwendet. Diese Methodik basiert auf der Umwandlung von nicht-fluoreszierendem Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) in grünfluoreszierendes Rhodamin 123 durch die während des Oxidativen Burst entstehenden reaktiven Sauerstoffmetabolite. Die Produktion dieser reaktiven Sauerstoffmetabolite wurde dabei durch die Phagozytose von nicht FITC-markierten Bakterien (*Staphylococcus aureus* K 807) induziert. Die Dihydrorhodamin-Lösung wurde durch Auflösen der im Test-Kit enthaltenen Substrat-Tablette nach Anleitung des Herstellers erhalten.

100 µl heparinisiertes Vollblut wurde mit den zu untersuchenden Substanzen bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Bakterienlösung wurden die Blutproben bei 37 °C für 10 Minuten im Wasserbad inkubiert. Der Kontrollansatz wurde entsprechend mit 10 µl Natriumchlorid-Lösung versetzt. Die Phagozytosereaktion wurde durch Kühlen auf Eis beendet.

Nach Zugabe von 20 µl der Dihydrorhodamin 123-Lösung wurden die Ansätze gemischt, 10 Minuten bei 37 °C inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend auf Eis gestellt. Die Lyse der Erythrozyten und die Anfärbung der DNA in den Zellkernen erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.5 Durchflußzytometrische Bestimmung von NF-κB und AP-1

Die durchflußzytometrische Bestimmung der Transkriptionsfaktoren erfolgte nach der von Foulds¹⁰⁶ beschriebenen Methode. Dazu wurden 100 µl Vollblut bzw. Zellsuspension wie oben beschrieben mit den zu testenden Pharmaka inkubiert. Anschließend wurde die Aktivierung beider Transkriptionsfaktoren durch 30-minütige Inkubation mit 10 bzw. 100 ng/ml LPS im Wasserbad induziert. Als Negativkontrolle diente eine mit PBS versetzte Blutprobe. Die Lyse der Erythrozyten wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Vor der Präparation der Zellen für die durchflußzytometrische Bestimmung der Transkriptionsfaktoren mit Hilfe der im Cycletest Plus DNA Reagent-Kit® enthaltenen Reagenzien wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen. Die Leukozyten wurden anschließend in 3 ml Zitratpuffer resuspendiert und 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Nach erneuter Resuspension in 1,5 ml Zitratpuffer wurde die Zentrifugation wiederholt. Die Zellen anschließend in 250 µl Lösung A und 200 µl Lösung B resuspendiert. Jeweils 40 µl einer polyklonalen Antikörper gegen NF-κB bzw. AP-1 wurden für eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur hinzugegeben. Die Spezifität dieser polyklonalen Antikörper wurde in Western-Blots überprüft. Folgende Antikörper wurden eingesetzt: Kaninchen-anti-NF-κB p65 (C-20, sc-372) und Kaninchen-anti-c-jun/AP-1 (sc-45). Anschließend wurde für weitere 10 Minuten mit einem FITC-markierten Antikörper gegen Kaninchen- bzw. Ziegen-IgG inkubiert. Durch alleinige Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde die Fluoreszenz aufgrund unspezifischer Bindung dieses Antikörpers ermittelt und von den Meßergebnissen abgezogen. Zur Darstellung der DNA wurde 200 µl gekühlte Propidiumjodid-Lösung zugegeben und erneut 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Einstellung des Durchflußzytometers für die Messung der Transkriptionsfaktoren erfolgte mit dem DNA Quality Control Particles® Kit. Die im Kit enthaltenen Hühnererythrozyten-Nuklei dienten zur Einstellung der Verstärker und Photomultiplier. Dazu wurde ein Tropfen der Zellkern-Lösung in 1 ml Propidiumjodid gelöst und 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Rotfluoreszenz der Zellkerne wurde anschließend mittels FL-2-Detektor ermittelt. Die so erhaltenen Einstellungen des Durchflußzytometers wurden bei der nachfolgenden Messung der Proben beibehalten.

2.3 Bestimmung der Proteinexpression und –sekretion

2.3.1 Gewinnung von zytosolischen und nukleären Proteinen

Um zytosolische und nukleäre Proteine separat gewinnen zu können, wurde das von Schreiber et al. ²⁵¹ beschriebene Verfahren in modifizierter Form angewandt. Für jedes Experiment wurden 10^6 bis 10^7 Zellen verwendet. Nach Zentrifugation wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und in Abhängigkeit von der Größe des Pellets in 100 bis 400 μ l Puffer A (10 mM HEPES-KOH pH 7,9 bei 4°C, 1,5 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF) resuspendiert. Die Zellmembran wurde durch 10-minütige Inkubation auf Eis lysiert. Die vollständige Zellyse wurde lichtmikroskopisch überprüft. Nach Zentrifugation (16 000 x g, 30 s, 4°C, IEC Centra MP4R, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) wurde der Überstand, der die zytosolischen Proteine enthält, abpipettiert. Das Pellet wurde in PBS gewaschen und nach Auflösen in 50 μ l Puffer C (20 mM HEPES-KOH pH 7,9, 25 % Glycerol, 420 mM NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF) für 20 Minuten auf Eis gelagert. Durch Zentrifugation (16000 x g, 2 min, 4°C) wurde der Überstand, der die nukleären Proteine enthält, gewonnen. Für die Gewinnung der Proteinextrakte aus polymorphkernigen Granulozyten wurden folgende Puffer verwendet: Puffer A (10 mmol/l HEPES, pH 7,9, 10 mmol/l NaCl, 1,5 mmol/l $MgCl_2$, 1 mmol/l EDTA, 0,5 mmol/l EGTA, 0,15% NP 40) und Puffer C (20 mM HEPES, pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF). Beiden Puffern wurde ein Cocktail aus Antiproteinasen (2 mmol/l DFP, 1 mmol/l PMSF, 1 mmol/l AEBSF, 10 μ g/ml Aprotinin, 10 μ g/ml Leupeptin, 10 μ g/ml Pepstatin A) zugesetzt. Der Proteingehalt der zytosolischen und nukleären Extrakte wurde mit Hilfe des DC Protein Assays bestimmt, wobei bovines Serumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0,25 bis 4 mg/ml zur Erstellung der Standardkurve diente. Jeweils 5 μ l Standard bzw. Extrakt wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. 25 μ l Reagenz A' und 200 μ l Reagenz B wurden hinzugegeben. Nach 15 Minuten wurde die Absorption im ELISA-Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) bei einer Wellenlänge von 690 nm gemessen. Die Erstellung der Standardkurve und die Berechnung der Proteinkonzentrationen erfolgte mittels Software des Readers. Die Extrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren.

2.3.2 Western Blot

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und die nachfolgende Darstellung auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen mit Hilfe von Antikörpern ermöglicht den spezifischen Nachweis von Proteinen in Zellysaten. In Gelen aufgetragene Proteine wandern dabei im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe eine definierte Strecke. Nach Transfer auf eine

Membran reagieren Antikörper mit bestimmten Epitopen des gesuchten Proteins. Nach Inkubation mit einem weiteren, Enzym-markierten Antikörper können diese Proteine dann anhand einer Farb- oder mittels Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen werden.

2.3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Anhand des mit dem DC Protein Assay bestimmten Gesamtproteingehalts wurden sämtliche Proben mit Wasser und doppelt konzentriertem Probenpuffer (1.52 g Tris Base, 20 ml Glycerol, 2.0 g SDS, 2.0 ml 2-Mercaptoethanol, 1 mg Bromphenolblau, pH 6,8 in 100 ml dest. H₂O) auf eine definierte Proteinkonzentration verdünnt. Dabei wurden in 20 µl Gesamtvolumen pro Probe für NF-κB und AP-1 je 2,5 µg Gesamtprotein und für IκBα 5 µg Gesamtprotein untersucht. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Nach Auftragen in Tris-HCl-Gelen (7 bzw. 12% Polyacrylamid) wurden die Proteinlösungen in einer mit Elektrophorese-Puffer (15,1 g Tris Base, 72 g Glycin, 5 g SDS in 1000 ml dest. H₂O) gefüllten Mini-Gel-Kammer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) unter denaturierenden Bedingungen bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Ein farbig markierter Marker (Kaleidoscope Protein Marker), der Proteine mit definiertem Proteingewicht in kDalton enthält, wurde zwecks Größenvergleich mit dem nachzuweisenden Protein ebenfalls aufgetragen. Anschließend wurden die Proteine in einer Transfer-Kammer unter Verwendung von Transfer-Puffer (12,02 g Tris Base, 57,65 g Glycin, 400 ml Methanol, 1 ml SDS 20%, pH 8,3 in 2000 ml dest. H₂O) mit konstanter Spannung (100 V) auf eine PVDF-Membran übertragen.

2.3.2.2 Darstellung der Proteine auf PVDF-Membranen

Unspezifische Proteinbindungen wurden durch Blocken der Membran in TBS-T-Puffer (2,46 g Tris Base, 8 g NaCl, 0,5 ml Tween 20, pH 7,6 in 1000 ml dest. H₂O), angereichert mit 5% fettfreier Milch, bei 4° C über Nacht reduziert. In Abhängigkeit vom darzustellenden Protein wurde die Membran anschließend 60 Minuten bei Raumtemperatur mit folgenden Antikörpern in einer 1:1000 Verdünnung inkubiert: NF-κB p65 (C20, polyklonaler Kaninchen-anti-human-Antikörper), IκBα (C21, polyklonaler Kaninchen-anti-human-Antikörper).

Nach drei 15-minütigen Waschschritten in TBS-T wurde die Membran 45 Minuten mit dem entsprechenden HRP-markierten sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Ziege-IgG) in einer Verdünnung von 1:2500 inkubiert. Ungebundene Reste des Antikörpers wurden durch drei weitere Waschschrritte entfernt. Anschließend wurde die Membran in einem Gemisch aus Detektionslösungen (ECL Western Blotting Detection Reagents) für 60 Sekunden inkubiert. Die entstandene Chemilumineszenz schwärzt in Abhängigkeit von der

Proteinkonzentration einen Autoradiografie-Film (Kodak BioMax Light Film) unterschiedlich stark. Die optimale Expositionszeit wurde für jedes Experiment neu ermittelt und lag zwischen 15 Sekunden und 30 Minuten.

2.3.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung der Interleukin-8-Konzentrationen in Plasma und Zellkulturüberstand wurde ein Sandwich-ELISA-Set (OptEIA-Set human IL-8, Pharmingen, San Diego, CA, USA) verwendet, das die im folgenden erwähnten Reagenzien enthält. Bei diesem Assay bilden am Kunststoff der Mikrotiterplatte fixierte Antikörper mit dem IL-8 der Probe Immunkomplexe, die dann durch einen zweiten, gegen eine weitere antigene Determinante des IL-8 gerichteten enzymmarkierten Antikörper und die anschließende Zugabe eines chromogenen Substrates nachgewiesen werden.

In einem ersten Inkubationsschritt wurden 100 µl eines spezifischen Antikörpers gegen IL-8 in einer Mikrotiterplatte durch mindestens achtstündige Inkubation bei 4° C fixiert. Durch dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatte mit 300 µl PBS wurden nicht gebundene Reste des Antikörpers entfernt. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde für 60 Minuten in 200 µl PBS mit 10% FCS, pH 7,0 bei Raumtemperatur geblockt. 100 µl Standard mit Konzentrationen von 3,1 bis 200 pg/ml bzw. 1:100 verdünnte Probe wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur in der Mikrotiterplatte inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Platte wurden 100 µl einer Lösung aus Avidin-HRP Konjugat und biotinyliertem Antikörper gegen eine weitere antigene Determinante des IL-8 aufgetragen. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte siebenmal gewaschen. Anschließend wurde mit 100 µl des chromogenen Substrates Tetramethylbenzidin 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Farbentwicklung wurde durch Zugabe von 50 µl 2 N H₂SO₄ abgestoppt und mit einem ELISA-Reader (Bio-Rad, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen Verdünnungspuffer gemessen. Die Erstellung der Standardkurve sowie die Berechnung der Konzentrationen erfolgte automatisch durch die Software des Platten-Photometers. Sämtliche Bestimmungen wurden in Doppelansätzen durchgeführt, und für jede Platte wurde eine eigene Standardkurve erstellt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Electric Mobility Shift Assay

Die Fähigkeit von Transkriptionsfaktoren, bestimmte Gene zu aktivieren, hängt nicht nur von ihrer Translokation in den Zellkern ab, sondern auch von ihrer Bindung an bestimmte Erkennungssequenzen in den Promotorregionen abhängiger Gene. Diese DNA-Bindungsaktivität kann mit Hilfe von radioaktiv markierten Oligonukleotiden, die mit den Transkriptionsfaktoren in nukleären Proteinextrakten Komplexe bilden, nachgewiesen werden. Die radioaktive Markierung der Oligonukleotide wurde durch Anlagerung von [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP an eine OH-Gruppe am 5'-Ende des Oligonukleotides erreicht. Voraussetzung für dieses Labeling ist, daß die Oligonukleotide mit einem sogenannten „blunt end“ und einer OH-Gruppe synthetisiert werden. Eine Mischung gleicher Volumina von Sense Reaktionspuffer, Oligonukleotid, RNase-freiem Wasser, $\gamma^{32}\text{P}$ Phosphor und T4 Polynukleotid Kinase wurde 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inaktivierung der T4-Kinase mit 0,5 M EDTA-Lösung gestoppt. Das radioaktiv markierte Oligonukleotid wurde 1:10 verdünnt. Folgende Oligonukleotide (Santa Cruz, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) wurden verwendet: AP-1: 5' CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA 3', NF κ B: 5' AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C 3'. Die DNA-Bindungsmotive für Homo- und Heterodimere der jeweiligen Transkriptionsfaktoren sind unterstrichen.

Die verwendeten Puffer wurden von Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, bezogen. 5 μg nukleäres Protein wurden in einem Gesamtvolumen von 16 μl , bestehend aus 4 μl Reaktions-Puffer (100 mM HEPES, pH 7,6, 5 mM EDTA, 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mM DTT, 1% Tween 20, 150 mM KCl), 1 μl Poly[dl-dC], 1 μl Poly-L-Lysin, 1 μl radioaktiv markiertem Oligonukleotid und 9 μl in destilliertem Wasser verdünntem Proteinextrakt 20 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 μl DNA-Proben-Puffer (60% 0,25 x TBE-Puffer [890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA], 40% Glycerol, 0,2% Bromphenolblau) wurden die Proben in ein 7,5%iges Polyacrylamid-Gel (Tris-CI) geladen und bei einer konstanten Spannung von 80 mV unter nicht-denaturierenden Bedingungen in TGE-Puffer (50 mM Tris Base, 380 mM Glycin, 2 mM EDTA) elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wandert ungebundenes Oligonukleotid im elektrischen Feld schneller als der Oligonukleotid-Protein-Komplex. Die Radioaktivität des Oligonukleotids wurde nach Vakuumtrocknung des Gels autoradiografisch ermittelt. Die Expositionszeit wurde für jedes Experiment optimiert und lag zwischen 24 und 72 Stunden.

2.4.2 Extraktion von RNA

Zur Gewinnung der RNA wurden ausschließlich DEPC-behandelte RNase-freie Reagenzien und Gefäße verwendet, um eine Degradation von RNA zu vermeiden. Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte mit Tri-Reagent. Zur Zellyse wurde 1 ml des Reagenz zu $5 - 10 \times 10^6$ pelletierten Zellen gegeben. Das Homogenat wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur gelagert, um die vollständige Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe zu gewährleisten. Nach Zugabe von 100 μ l 1-Bromo-3-Chloropropan wurden die Proben 15 sec heftig gemixt und weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation ($16\ 000 \times g$, 4°C , 15 Minuten) erfolgte die Auftrennung in drei Phasen, wobei die obere klare Phase, die die RNA enthält, gewonnen und in ein gesondertes Reaktionsgefäß übertragen wurde. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol und fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Durch Zentrifugation ($16\ 000 \times g$, 4°C , 8 min) wurde das RNA-Pellet gewonnen, in 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen, und in 50 μ l RNase-freiem Wasser resuspendiert. Um eine vollständige Auflösung der RNA zu gewährleisten, wurde diese anschließend 10 Minuten bei 55°C inkubiert.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte spektrophotometrisch im Genequant II Photometer (Amersham Pharmacia Biotech, USA). Dabei wird entsprechend dem Gehalt von Phosphat und Stickstoff in der Lösung eine Ratio aus der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorption gebildet. Ein Quotient $> 1,6$ schließt eine Proteinkontamination nahezu aus. Durch elektrophoretische Auftrennung der ribosomalen RNA in 18S- und 28S-Subeinheiten in einem einprozentigem Agarose-Gel konnte eine Degradierung der Nukleinsäure ausgeschlossen werden. Die RNA-Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren.

2.4.3 Reverse Transkription – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR diente in dieser Untersuchung zum einem zum Nachweis von Opiat- bzw. NMDA-Rezeptoren, zum anderen wurde die Expression NF- κ B- und AP-1-abhängiger Gene anhand des mRNA-Gehaltes determiniert. Sämtliche Reagentien für die RT-PCR wurden von Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA bezogen.

2.4.3.1 Reverse Transkription

Die komplementäre DNA (cDNA) wurde in Abhängigkeit von der Menge der gewonnenen RNA aus 1-3 μ g Gesamt-RNA synthetisiert. Dazu wurde zunächst die RNA mit H_2O auf 10 μ l verdünnt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. In einem Gesamtvolumen von 27 μ l wurde die

RNA anschließend mit 1 µl RNase-Inhibitor, 1 µl Random Hexadeoxynukleotid-Primer, 2 µl DTT 100 mM, 4 µl First Strand Buffer und 8 µl dNTP-Gemisch, bestehend aus dATP, dTTP, dGTP, dCTP, jeweils in einer Konzentration von 10 mM, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl Superscript™ II RNase H⁻ Reverse Transkriptase wurde die reverse Transkription durch 60-minütige Inkubation bei 40°C durchgeführt. Die Reverse Transkriptase wurde anschließend 10 Minuten bei 65°C inaktiviert. Beide Inkubationsschritte wurden in einem Progene Thermocycler (Techne, Cambridge, MA, USA) durchgeführt. Die gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.4.3.2 PCR

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Darin enthalten waren 1,5 µl Magnesiumchlorid 50 mM, 5 µl PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 2 µl des dNTP-Gemisches sowie jeweils 1 µl Sense- bzw. Antisense-Primer. Für alle verwendeten Primer wurde eine spezifische Amplifizierung des entsprechenden Genabschnittes beschrieben, so daß auf eine Sequenzierung des Amplikons verzichtet wurde. Die folgende Tabelle gibt die Sequenzen der Primer für die untersuchten Gene wieder:

Gen	Primer (sense / antisense)
β-Aktin	5' GCG AGA AGA TGA CCC AGA TCA TGT T 3'
	5' GCT TCT CCT TAA TGT CAC GCA CGA T 3'
IL-8	5' ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTGGCT 3'
	5' TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT C 3'
p65	5' GCC TCT GGC CCC TAT GTG GAG 3'
	5' GAT CTC ATC CCC ACC GTG GCA 3'
NMDA-1	5' GAT GTC TTC CAA GTA TGC GGA 3'
	5' GGG AAT CTC CTT CTT GAC CAG 3'
µ-Rezeptor	5' GGT ACT GGG AAA ACC TGC TGA AGA TCT GTG 3'
	5' GGT CTC TAG TGT TCT GAC GAA TTC GAG TGG 3'
IκBα	5' TAT TCT CCC TAC CAG CTC AC 3'
	5' GCT TAA CAC TCC TGG CTG TT 3'

Tabelle 1

Sequenzen der für die RT-PCR verwendeten Primer

Um unspezifische Amplifizierungen zu vermeiden, wurden sämtliche Reaktionen mit einem sogenannten Heißstart durchgeführt, bei dem die DNA-Polymerase erst nach Erhitzen der

Proben auf 95°C zugegeben wird. Als Enzym wurden 2,5 Units der aus *Thermus aquaticus* isolierten Taq-DNA-Polymerase verwendet. Für jedes Gen-Fragment wurden die Konditionen, unter denen die PCR durchgeführt wurde, wie folgt optimiert, wobei für semiquantitative Bestimmungen die Anzahl der Zyklen auf 30 beschränkt wurde:

Gen	Anzahl der Zyklen	PCR-Bedingungen (Denaturierung, Anlagerung, Verlängerung)	Länge des Amplikons
β-Aktin	20	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	302 bp
IL-8	30	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	292 bp
p65	27	95°C 1 min, 61,5°C 1 min, 72°C 1 min	577 bp
NMDA-1	35	95°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 30 sec	667 bp
μ-Rezeptor	35	95°C 1 min, 53°C 1 min, 72°C 1 min	441 bp
IκBα	30	95°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 1 min	569 bp

Tabelle 2

Konditionen der RT-PCR

Um zu überprüfen, ob in jedem Reaktionsansatz die gleiche Menge cDNA enthalten war, wurde für jede Probe β-Aktin als Referenzgen mitamplifiziert. Da die mRNA dieses Gens in hoher Konzentration vorliegt, wurden für die PCR nur 2-5 µl cDNA verwendet, während alle anderen Reaktionen mit 10 µl RT-Produkt durchgeführt wurden.

Die Amplikons wurden in einem Ethidiumbromid-haltigen zweiprozentigen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, mittels eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht und mit Hilfe der Pro Gel Analyser Software eingescannt.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der durchflußzytometrischen Meßergebnisse wurde mit Hilfe der Computersoftware Sigma-Stat durchgeführt. Bei Vergleichen von mehreren Prüfgruppen zu einer Kontrollgruppe wurde eine Ranganalyse für Meßwiederholungen durchgeführt. Dieses Verfahren prüft die Null-Hypothese: Die verschiedenen Gruppen sind hinsichtlich der Meßergebnisse vergleichbar. Wurde die Null-Hypothese verworfen, so wurde als Anschlußtest das Wilcoxon-Wilcox-Verfahren gewählt, um die Unterschiede zwischen den Gruppen zu definieren. Für Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurde nach Prüfung auf Normalverteilung der T-Test für verbundene Stichproben angewandt. Das Signifikanzniveau für alle Verfahren wurde mit $p < 0,05$ angesetzt.

Für die in EMSA, Western Blot und RT-PCR erhobenen Ergebnisse wurde wegen des semiquantitativen Charakters dieser Meßverfahren auf eine statistische Auswertung verzichtet.

3 ERGEBNISSE

Basierend auf der Beobachtung, daß Morphin und in ähnlicher Weise das Phencyclidin-Derivat Ketamin den Aktivitätszustand von Leukozyten, insbesondere von neutrophilen Granulozyten, beeinflussen kann, sollten in dieser Untersuchung Mechanismen herausgearbeitet werden, die für solche Veränderungen verantwortlich sein können.

Dazu wurden zunächst anhand des Phagozytoseverhaltens und der Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite funktionelle Veränderungen in Abhängigkeit von Morphin- bzw. Ketaminexposition definiert.

Anschließend wurde die Expression von Oberflächenrezeptoren bestimmt, die zum einen für diese funktionellen Veränderungen von Bedeutung sein können und zum anderen an der Induktion von intrazellulären Prozessen beteiligt sind. Dabei stehen die Komplementrezeptoren CR1 und CR3 sowie der Fc γ -Rezeptor IIIb in unmittelbarem Zusammenhang mit der Phagozytoseleistung, während der LPS-Rezeptor CD14 zusammen mit CR3 maßgeblich an der Vermittlung LPS-induzierter Prozesse ins Zellinnere beteiligt ist.

Sowohl die Modulation der Granulozytenfunktion als auch diejenige der Rezeptorenexpression wurden auf ihre Abhängigkeit von NO als intrazellulärem Botenstoff überprüft. Dazu wurden zum einen NO-Donoren eingesetzt, zum anderen wurde die Reversibilität der beobachteten Veränderungen durch NOS-Hemmer untersucht.

Als wichtiger intrazellulärer Vorgang im Rahmen der inflammatorischen Reaktion von Phagozyten des Blutes wurde im folgenden die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 analysiert und die Produktion von IL-8 als nachgeschaltetem Prozeß gemessen. Der Einfluß der beiden Analgetika Morphin und Ketamin wurde dabei berücksichtigt und die Rolle von Stickstoffmonoxid als *second messenger* evaluiert.

Durch keine der untersuchten Substanzen wurde die Viabilität der Leukozyten beeinträchtigt. Die in durchflußzytometrischen Untersuchungen ermittelte Viabilität lag in allen Zellsuspensionen zwischen 93 und 98% und korrelierte damit gut mit der Trypanblau-Exklusion, die bei 94 bis 99% der untersuchten Zellen positiv war. Direkt zytotoxische Effekte als Ursache der ermittelten Veränderungen konnten somit ausgeschlossen werden.

Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist im Anhang und in den jeweiligen Abbildungen erwähnt.

3.1 Wirkungen von Morphin auf Leukozyten

3.1.1 Phagozytoseleistung und Oxidativer Burst in PMN

3.1.1.1 Phagozytoseleistung

Durch die Inkubation von Vollblut mit Morphin wurde die Phagozytoseleistung von neutrophilen Granulozyten signifikant eingeschränkt. In der höchsten getesteten Dosis von 50 μM Morphin wurde nach 2,5-stündiger Expositionszeit eine 50-prozentige Reduktion erzielt. Diese Veränderungen waren vergleichbar mit der nach Inkubation mit 1 μM SNAP beobachteten Inhibierung. Durch Präinkubation mit Naloxon konnte die suppressive Wirkung von Morphin aufgehoben werden (Tabelle 3).

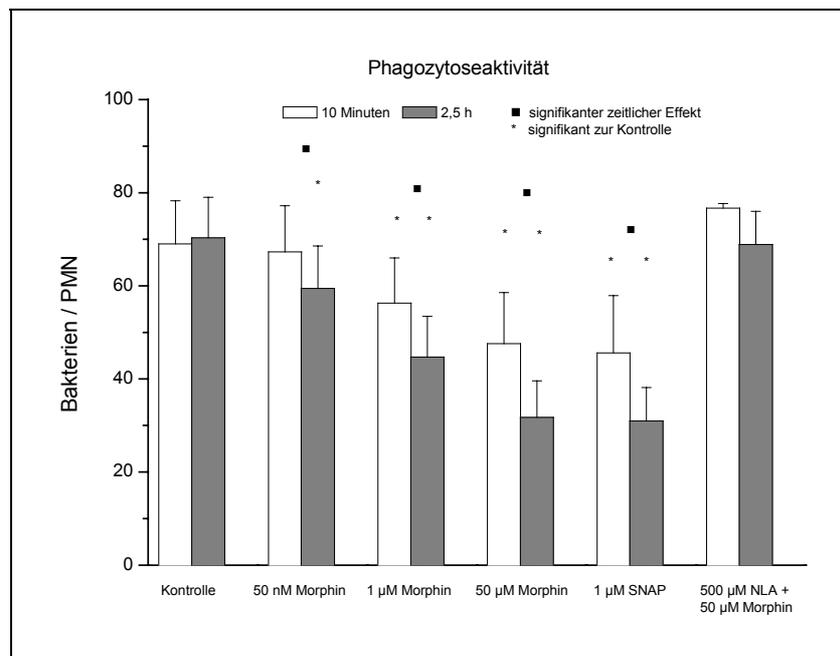


Abbildung 4

Anzahl der aufgenommenen Bakterien nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Morphin, SNAP und einer Kombination aus dem NOS-Antagonisten NLA und Morphin. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 12 voneinander unabhängigen Versuchen.

3.1.1.2 Oxidativer Burst

Ebenso führte die Inkubation von Vollblut mit Morphin in Abhängigkeit von der gewählten Inkubationszeit und der eingesetzten Morphin-Konzentration zu einer signifikanten Inhibierung des Oxidativen Burst.

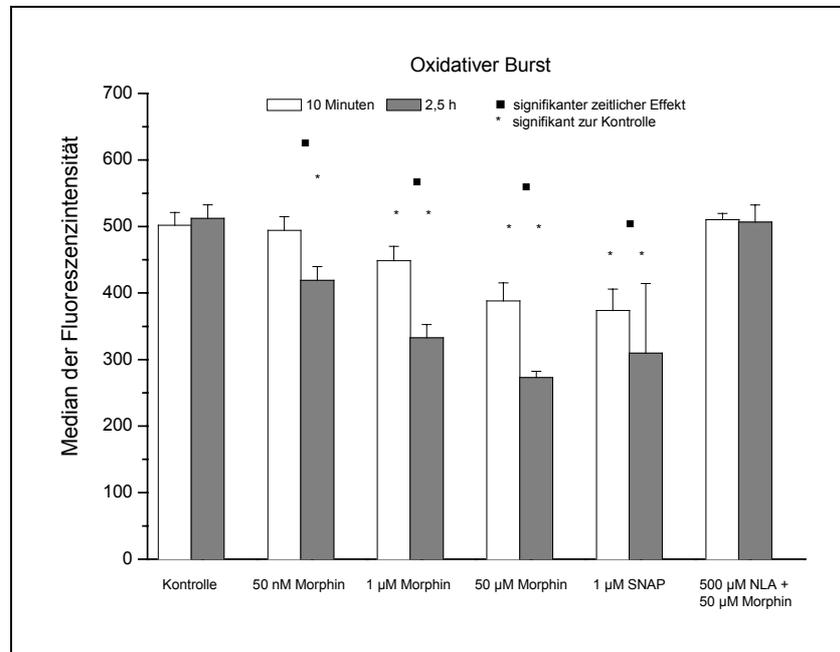


Abbildung 5

Bestimmung des Oxidativen Burst, induziert durch die Phagozytose von *Staphylococcus aureus* nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Morphin, SNAP und einer Kombination aus dem NOS-Antagonisten NLA und Morphin. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 12 voneinander unabhängigen Versuchen.

Die Veränderungen waren quantitativ mit der Inhibierung der Phagozytoseaktivität vergleichbar und ebenfalls durch NOS-Hemmer bzw. den Opiatantagonisten Naloxon antagonisierbar.

	Kontrolle	Morphin 50 nM	Morphin 50 µM	Naloxon + Morphin 50 nM	Naloxon + Morphin 50 µM
Phagozytose [Bakterien/PMN]	65 ± 7	48 ± 6*	36 ± 6*	65 ± 6	64 ± 6
Oxidativer Burst [MFI]	381 ± 30	298 ± 28*	238 ± 42*	379 ± 37	374 ± 23

Tabelle 3

Reversibilität der Morphin-induzierten Effekte auf Phagozytose und Oxidativen Burst durch zehnmütige Präinkubation mit Naloxon vor Behandlung mit Morphin in gleicher Konzentration für 2,5 Stunden. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 12 voneinander unabhängigen Versuchen. * = p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

3.1.2 Expression von Oberflächenmarkern auf PMN

3.1.2.1 Expression des Fc γ -Rezeptors IIIb (CD16)

Die Inkubation von Vollblut mit Morphin führte zu einer signifikanten Abnahme des Fc γ -Rezeptors IIIb auf neutrophilen Granulozyten in Abhängigkeit von Expositionszeit und Konzentration (Abbildung 6). Dabei wurde durch Verlängerung der Expositionszeit von 10 Minuten auf 2,5 Stunden eine signifikante Steigerung des Morphin-Effektes erzielt. Ebenso konnte die inhibitorische Wirkung durch eine Erhöhung der verwendeten Morphin-Konzentrationen verstärkt werden.

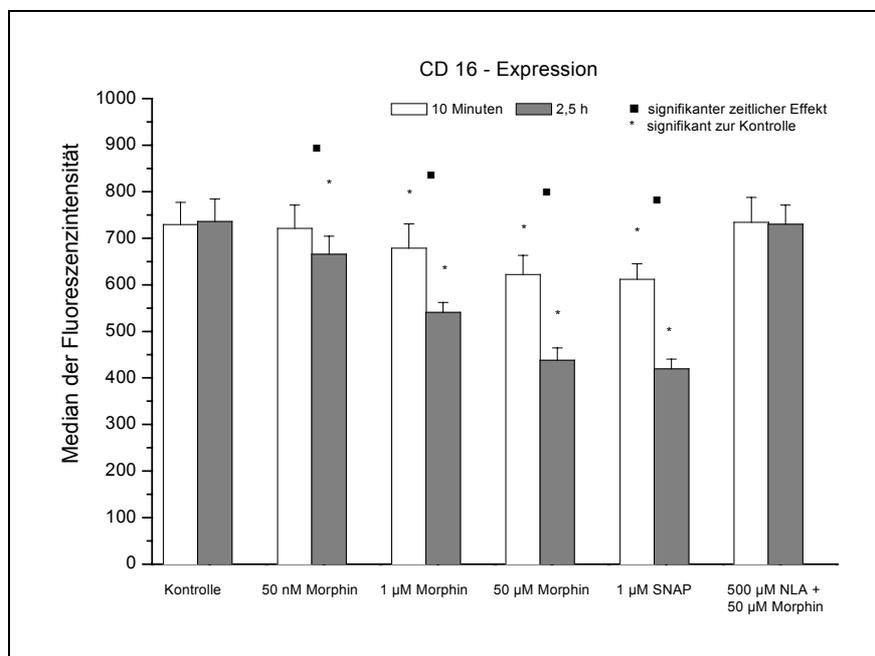


Abbildung 6

Expression des Fc γ -Rezeptors IIIb (CD16) nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Morphin, SNAP und einer Kombination aus dem NOS-Antagonisten NLA und Morphin. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 12 voneinander unabhängigen Versuchen.

Als Ausdruck eines Opiat-Rezeptor-vermittelten Prozesses war die Morphin-induzierte Suppression durch den Opiat-Rezeptor-Antagonisten Naloxon voll reversibel. Desweiteren konnte die Reduktion des Fc γ -RIIIb durch Zugabe von NO-Synthase-Hemmern wie NLA oder L-NAME vollständig geblockt werden. Zusammen mit der Beobachtung, daß Morphin-induzierte Veränderungen durch die alleinige Inkubation von Vollblut mit dem NO-Donor SNAP initiiert wurden, konnte die Abhängigkeit der suppressiven Wirkung von Morphin von NO als *second messenger* belegt werden. Quantitativ war die Inhibierung durch Morphin geringer ausgeprägt als bei Phagozytose- und Burstaktivität.

	Kontrolle	Morphin 50 nM	Morphin 50 µM	Naloxon + Morphin 50 nM	Naloxon + Morphin 50 µM
CD 16 [MFI]	546 ± 32	417 ± 19*	327 ± 42*	545 ± 25	532 ± 30

Tabelle 4

Reversibilität der Morphin-induzierten Effekte auf die Expression von CD 16 durch zehnmütige Präinkubation mit Naloxon vor Behandlung mit Morphin in gleicher Konzentration für 2,5 Stunden. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 12 voneinander unabhängigen Versuchen. * = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.1.2.2 Expression des Komplementrezeptors CR1 (CD35)

Die Effekte von Morphin auf die Expression des Komplementrezeptors 1 waren quantitativ etwas stärker ausgeprägt als die bei CD 16 beobachteten Veränderungen. Die inhibitorische Wirkung von Morphin war zeit- und konzentrationsabhängig und durch NOS-Hemmer antagonisierbar. Die Effekte der höchsten Morphin-Konzentration von 50 µM waren mit denjenigen von 1 µM SNAP vergleichbar.

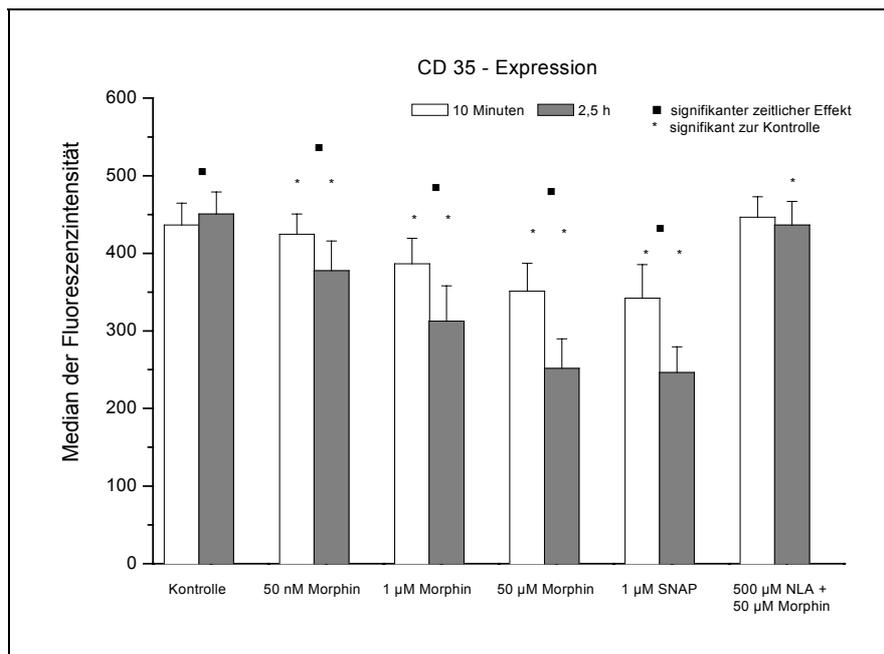


Abbildung 7

Expression des Komplementrezeptors CR1 (CD35) nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Morphin, SNAP und einer Kombination aus dem NOS-Antagonisten NLA und Morphin. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 12 voneinander unabhängigen Versuchen.

Interessanterweise konnte für diesen Oberflächenmarker beim Vergleich der Kontrollansätze nach zehnmütiger und nach 2,5-stündiger Inkubation ein prozentual geringer, aber doch signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden, der als Ausdruck einer in vitro-Aktivierung interpretiert werden kann.

Durch eine zehnmünütige Vorbehandlung mit Naloxon konnte eine nahezu vollständige Antagonisierung der Effekte auch bei Einsatz der höchsten Morphinkonzentration von 50 μ M erzielt werden.

	Kontrolle	Morphin 50 nM	Morphin 50 μ M	Naloxon + Morphin 50 nM	Naloxon + Morphin 50 μ M
CD 35 [MFI]	357 \pm 22	274 \pm 13*	200 \pm 10*	359 \pm 16	350 \pm 29

Tabelle 5

Reversibilität der Morphin-induzierten Effekte auf die Expression von CD 35 durch zehnmünütige Präinkubation mit Naloxon vor Behandlung mit Morphin in gleicher Konzentration für 2,5 Stunden. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 12 voneinander unabhängigen Versuchen. * = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

Die Unterschiede in der Fluoreszenzintensität der Kontrollansätze für CD 16 und CD 35 zwischen den beiden Untersuchungsserien sind durch die Verwendung unterschiedlicher Chargen der FITC-markierten Antikörper bedingt.

3.1.2.3 Expression des Komplementrezeptors CR3 (CD11b/CD18)

Die Expression von CR 3 wurde im Vergleich zu den anderen Oberflächenrezeptoren am deutlichsten durch Morphin gehemmt, so daß nach 2,5-stündiger Präinkubation eine Reduktion der Rezeptorenexpression von nahezu 50% beobachtet werden konnte. Der Unterschied zwischen der zehnmünütigen und der 2,5-stündigen Inkubation war ebenfalls stärker ausgeprägt.

Auch in dieser Untersuchungsserie konnten die Morphin-Effekte durch NOS-Antagonisten geblockt bzw. durch den NO-Donor SNAP reproduziert werden. Quantitativ wurde durch die Inkubation mit 50 μ M Morphin eine mit 1 μ M SNAP vergleichbare Reduktion der Rezeptorenexpression beobachtet.

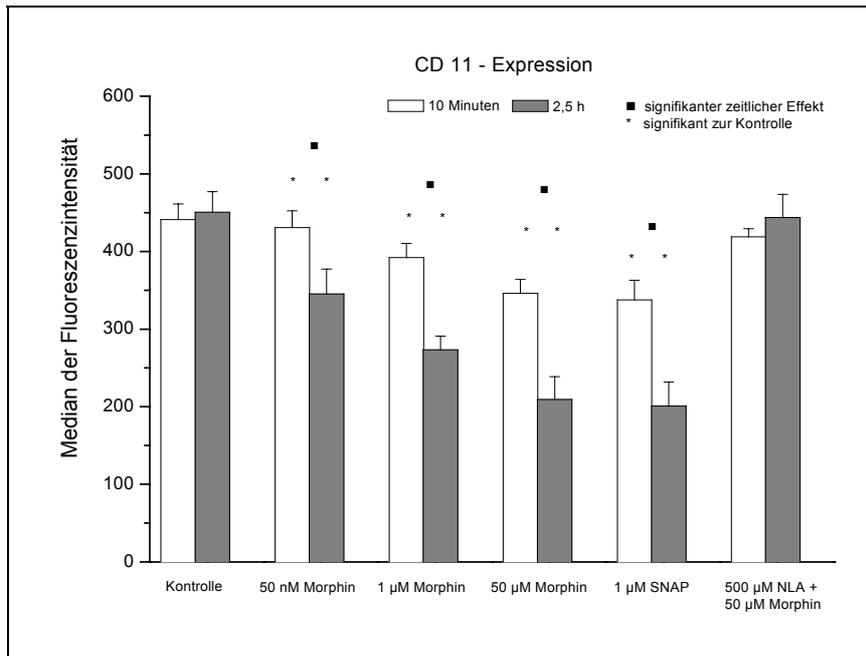


Abbildung 8

Expression des Komplementrezeptors CR3 (CD11b) nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Morphin, SNAP und einer Kombination aus dem NOS-Antagonisten NLA und Morphin. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 12 voneinander unabhängigen Versuchen.

Als Ausdruck eines Opiatrezeptor-spezifischen Prozesses war die Inhibierung der CD11b-Expression nach Morphin-Inkubation bei einer Vorbehandlung mit Naloxon nahezu vollständig aufgehoben.

	Kontrolle	Morphin 50 nM	Morphin 50 µM	Naloxon + Morphin 50 nM	Naloxon + Morphin 50 µM
CD11b [MFI]	433 ± 28	312 ± 12*	229 ± 21*	433 ± 22	423 ± 30

Tabelle 6

Reversibilität der Morphin-induzierten Effekte auf die Expression von CD 11b durch zehnmündige Präinkubation mit Naloxon vor Behandlung mit Morphin in gleicher Konzentration für 2,5 Stunden. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 12 voneinander unabhängigen Versuchen. * = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.1.2.4 Expression des LPS-Rezeptors CD14

Als weiterer wichtiger Oberflächenrezeptor, der intrazelluläre Signaltransduktionswege aktivieren kann, wurde der LPS-Rezeptor CD14 bestimmt. Auch hier führte Morphin bereits in einer Konzentration von 50 nM zu einer signifikanten Reduktion der spontanen Expression auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten. Ein signifikanter zeitlicher Effekt wurde jedoch nur nach Inkubation mit Morphin in der höheren Konzentration von 50 µM beobachtet.

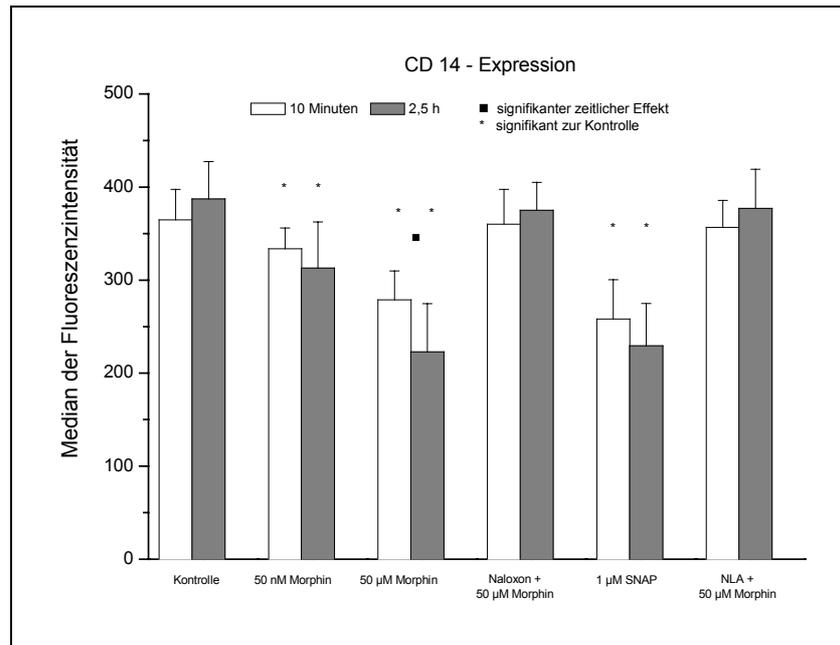


Abbildung 9

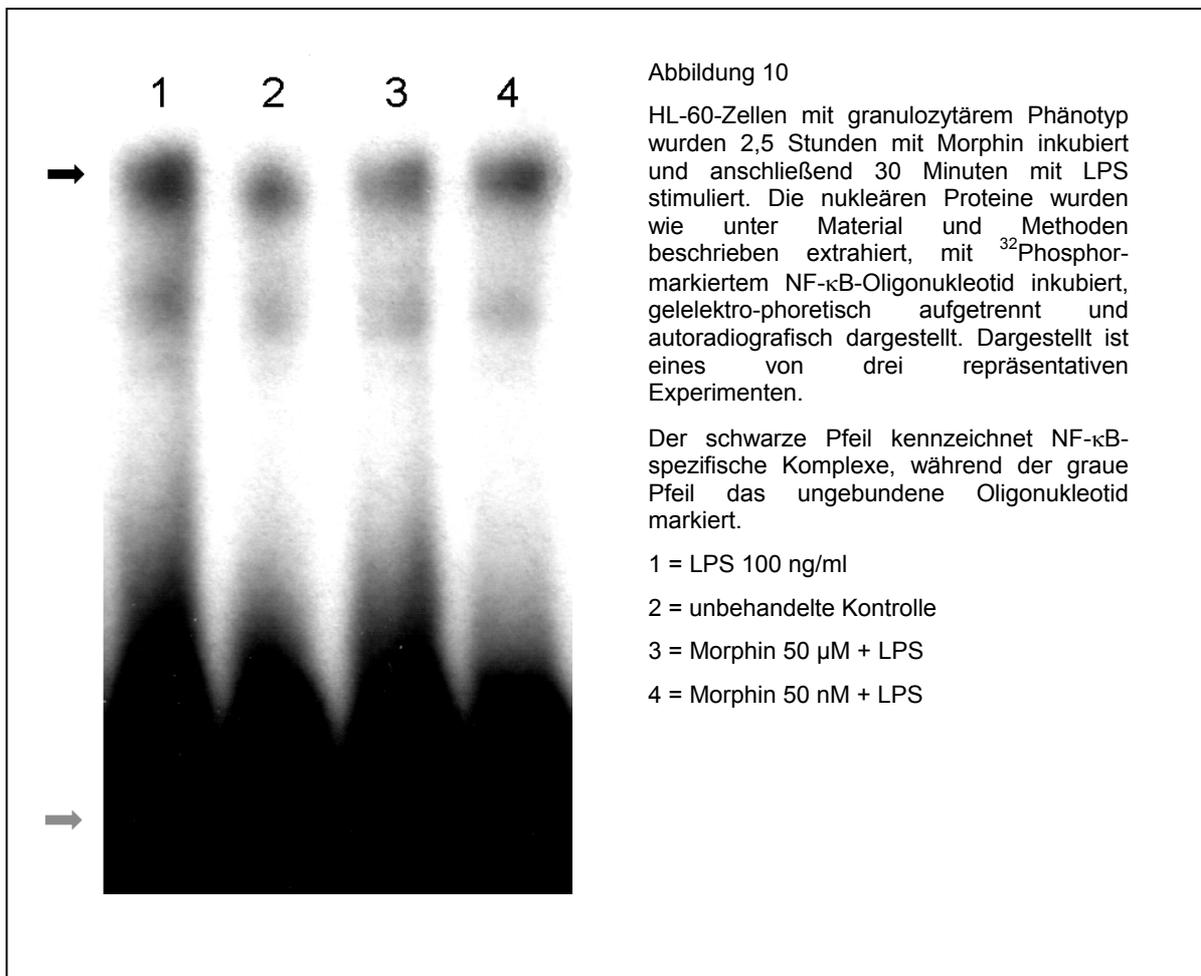
Expression des LPS-Rezeptors CD14 nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Morphin, SNAP und einer Kombination aus dem NOS-Antagonisten NLA und Morphin. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 voneinander unabhängigen Versuchen.

Auch die Veränderungen dieses Oberflächenrezeptors waren durch die Vorbehandlung mit Naloxon reversibel. Der NOS-Inhibitor NLA konnte den hemmenden Effekt von Morphin ebenfalls aufheben.

3.1.3 Veränderungen der nukleären Bindungsaktivität von NF- κ B und AP-1

3.1.3.1 Veränderungen von NF- κ B

Der Einfluß von Morphin auf die NF- κ B-Aktivität wurde zunächst an einem Zellmodell untersucht. Dazu wurde die promyeloische Zelllinie HL-60 ausgewählt, die funktionelle Morphin-Bindungsstellen aufweist und durch Behandlung mit Retinolsäure in einen granulozytären Phänotyp differenziert¹⁸⁵. Im EMSA zeigte sich nach 2,5-stündiger Vorbehandlung mit Morphin und anschließender Stimulation mit LPS eine konzentrationsabhängige Inhibierung der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität. Dieser Effekt konnte jedoch im EMSA nicht so deutlich herausgearbeitet werden wie in den durchflußzytometrischen Untersuchungen.



In weiteren Experimenten wurde die Beteiligung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ an der verminderten Translokation von NF- κB in den Zellkern untersucht. Dazu wurde $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Western Blot in den zytoplasmatischen Extrakten dieser Zellen dargestellt.

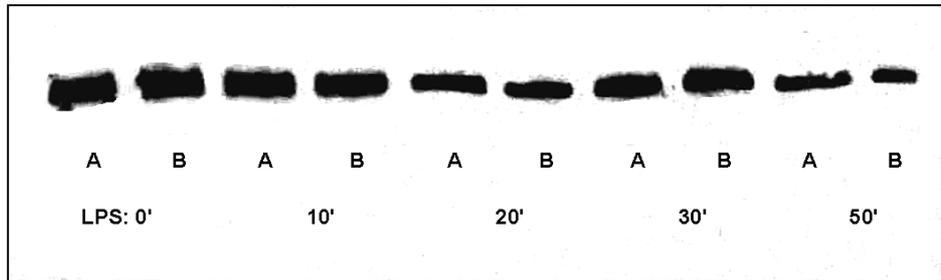


Abbildung 11

HI-60 Zellen mit granulozytärem Phänotyp wurden entweder 2,5 Stunden mit PBS oder mit 50 μM Morphin inkubiert und anschließend für die angegebenen Zeitintervalle mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Die Zytoplasmatische Proteine wurden gewonnen, elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem C-terminalen Antikörper gegen $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ geblottet. A = Kontrolle mit PBS, B = Inkubation mit Morphin. Dargestellt ist eines von drei repräsentativen Experimenten.

Wie bereits an verschiedenen Zellmodellen beschrieben^{45; 194; 283}, wurde nach 10 bis 20 Minuten eine Abnahme von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ beobachtet, der eine rasche, von transkriptionellen Vorgängen unabhängige Neusynthese nach 30 Minuten folgte. Die in unserer Untersuchung nur partielle Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ konnte durch Inkubation mit Morphin nicht verhindert oder abgeschwächt werden.

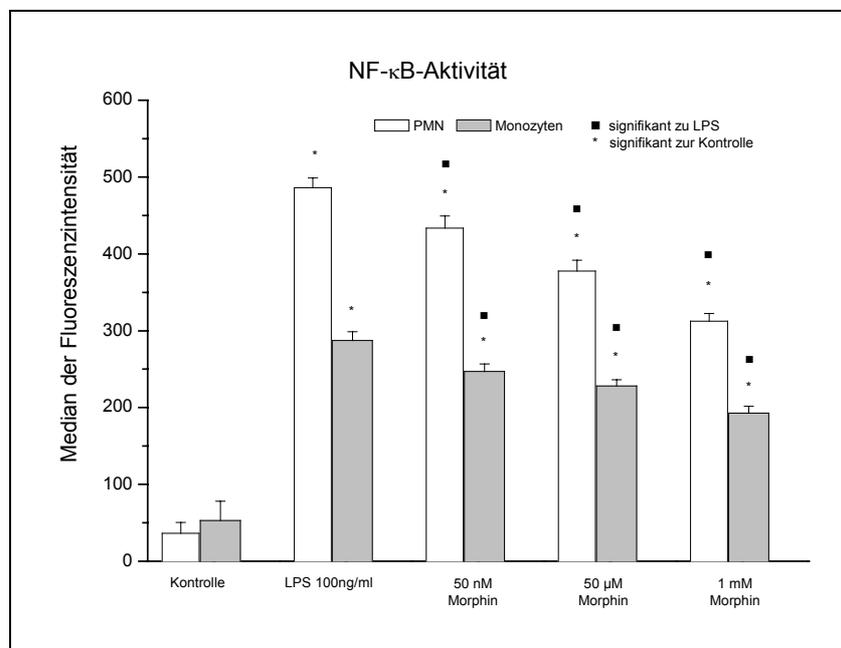


Abbildung 12

Durchflußzytometrische Bestimmung der NF- κB -Aktivität in Granulozyten und Monozyten nach 2,5-stündiger Inkubation mit verschiedenen Morphin-Konzentrationen und nachfolgender Stimulation mit LPS. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 12 voneinander unabhängigen Versuchen.

Um zu überprüfen, ob ähnliche Wirkungen von Morphin auch im Vollblut als physiologischerem Medium vorliegen, wurde durchflußzytometrisch die nukleäre Aktivität von NF- κ B bestimmt (Abbildung 12).

Dabei konnte durch die Inkubation von Vollblut mit Morphin in verschiedenen Konzentrationen die nukleäre Bindungsaktivität von NF- κ B bei nachfolgender Stimulation mit LPS signifikant gehemmt werden. Vergleichbare Effekte wurden in neutrophilen Granulozyten und Monozyten beobachtet und waren in beiden Zelltypen konzentrationsabhängig. Die Stimulation mit LPS führte in beiden Leukozytenpopulationen zu einer drastischen Zunahme der Fluoreszenzintensität, die bei Granulozyten stärker ausgeprägt war als bei Monozyten. Daher wurde eine deutlichere Abnahme der NF- κ B-Aktivität nach Inkubation mit Morphin im Granulozyten-Fenster festgestellt.

Der inhibierende Effekt von Morphin war abhängig von der Dauer der Einwirkzeit. Bei einer Morphin-Inkubation von nur 10 Minuten waren Konzentrationen von mehr als 50 μ M Morphin notwendig, um eine signifikante Suppression zu erhalten (Tabelle 7). Diese Konzentrationen liegen bis zu 1000-fach über den im Tierversuch¹⁴⁵ bzw. humanen Plasma bestimmten Spiegeln¹⁷⁸ und sind daher klinisch nicht relevant.

	LPS 100 ng/ml	Morphin 50 nM + LPS	Morphin 50 μ M + LPS	Morphin 1 mM + LPS	Morphin 5 mM + LPS
PMN	480,4 \pm 40,9	473,8 \pm 37,2	446,6 \pm 37,1	420,6 \pm 33,3*	391,3 \pm 43,1*
Monozyten	231,6 \pm 24,1	224,6 \pm 26,7	214,4 \pm 27,5	198,6 \pm 31,2*	197,5 \pm 30,5*

Tabelle 7

NF- κ B-Aktivität in Granulozyten nach 10-minütiger Inkubation von Vollblut mit verschiedenen Morphin-Konzentrationen und nachfolgender 30-minütiger Stimulation mit 100 ng/ml LPS. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Fluoreszenzintensität (n=10). * = p<0,05 im Vergleich zur alleinigen LPS-Behandlung.

In einer Zeit-Wirkungskurve zeigte sich, daß eine mindestens 60-minütige Präinkubation mit Morphin erforderlich ist, um eine mehr als zehnpromtente Abnahme der NF- κ B-Aktivität zu erzielen. Zwischen 90 Minuten und 2,5 Stunden flachte die Zeit-Wirkungskurve deutlich ab, so daß bei einer darüber hinausgehenden Verlängerung der Inkubationszeit keine weitere Steigerung des Morphineffektes zu erwarten ist. Weitere Experimente wurden daher mit einer 2,5-stündigen Morphin-Inkubation durchgeführt.

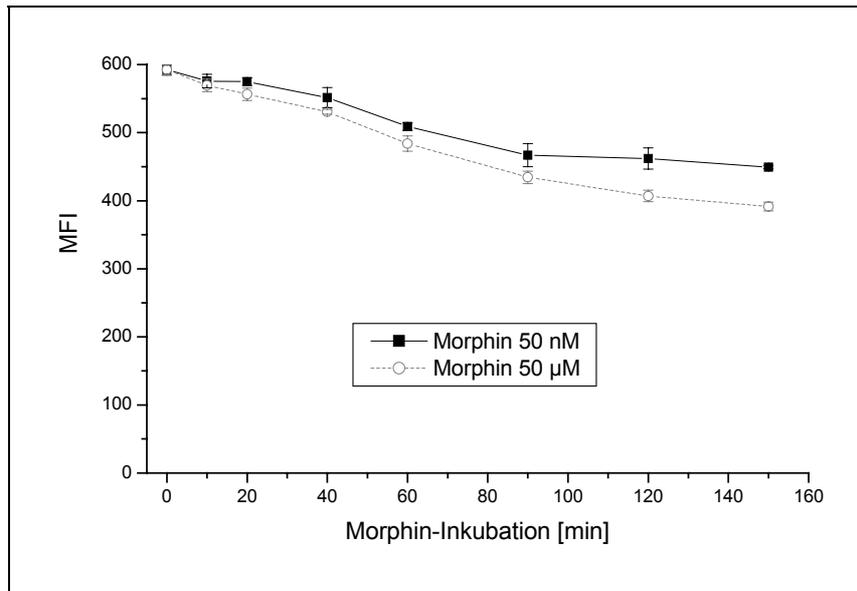


Abbildung 13

Einfluß verschiedener Präinkubationszeiten mit Morphin auf die Inhibierung der NF-κB-Aktivität in Granulozyten bei nachfolgender 30-minütiger Stimulation mit 100 ng/ml LPS. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 voneinander unabhängigen Experimenten.

Morphin alleine beeinflusste ebenso wie der NO-Donor SNAP ohne nachfolgende LPS-Stimulation die NF-κB-Aktivität nicht (Tabelle 8).

	Kontrolle	SNAP 1 μM	Morphin 50 nM	Morphin 50 μM	Morphin 1 mM
PMN	31,9 ± 5,6	31,6 ± 5,1	31,2 ± 5,2	32,3 ± 5,7	32,8 ± 5,2
Monozyten	23,8 ± 6,1	24,1 ± 6,7	23,9 ± 5,1	22,5 ± 5,5	23,0 ± 7,3

Tabelle 8

NF-κB-Aktivität in Granulozyten nach 2,5-stündiger Inkubation von Vollblut mit verschiedenen Morphin-Konzentrationen und nachfolgender 30-minütiger Stimulation mit 100 ng/ml LPS. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Fluoreszenzintensität (n=10).

Die Morphin-induzierten Veränderungen der NF-κB-Aktivität waren durch 10-minütige Inkubation des Blutes mit Naloxon vor Zugabe des Morphins und nachfolgender LPS-Stimulation reversibel (Abbildungen 14 und 15). Naloxon wurde hierbei in gleicher Dosierung wie Morphin eingesetzt. Naloxon in einer Konzentration von 50 μM zeigte keinen Einfluß auf die NF-κB-Aktivität nach LPS-Stimulation. Aufgrund dieser Ergebnisse kann von einer Opiatrezeptor-vermittelten Modulation der NF-κB-Aktivität durch Morphin ausgegangen werden.

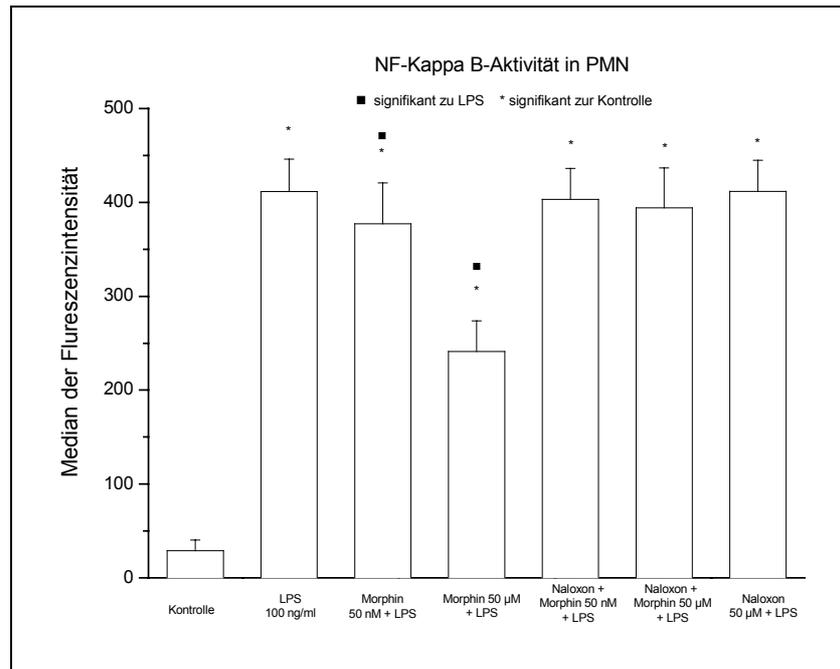


Abbildung 14

Durchflußzytometrische Bestimmung der NF- κ B-Aktivität in Granulozyten mit und ohne 10-minütiger Vorinkubation mit dem Opiat-Antagonisten Naloxon, 2,5-stündiger Behandlung mit Morphin und nachfolgender Stimulation mit LPS. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 10 voneinander unabhängigen Versuchen.

Die antagonistische Wirkung von Naloxon auf die Morphin-assoziierte Modulation der NF- κ B-Aktivität konnte nicht nur an Granulozyten, sondern auch an Monozyten demonstriert werden.

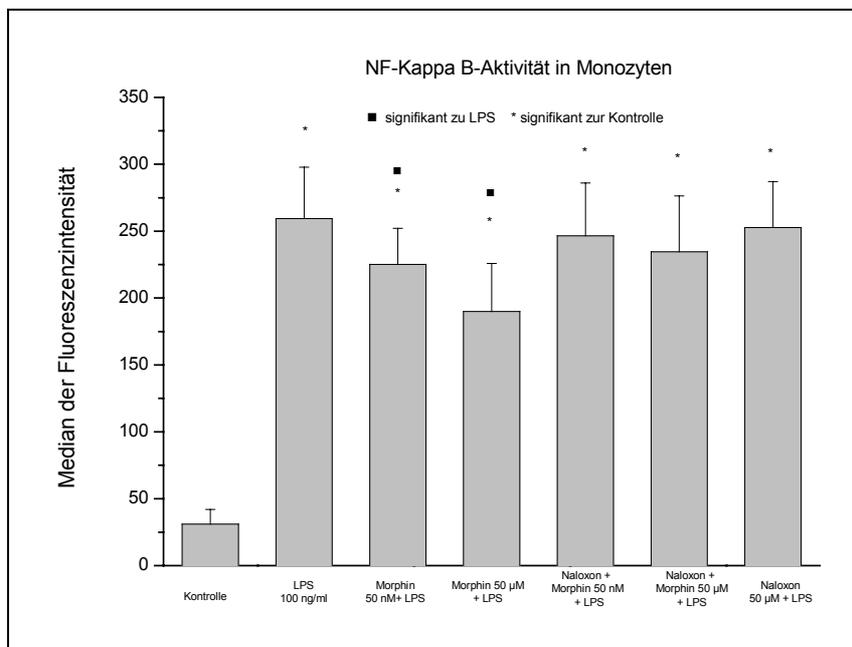


Abbildung 15

Durchflußzytometrische Bestimmung der NF- κ B-Aktivität in Monozyten mit und ohne 10-minütiger Vorinkubation mit dem Opiat-Antagonisten Naloxon, 2,5-stündiger Behandlung mit Morphin und nachfolgender Stimulation mit LPS. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 10 voneinander unabhängigen Versuchen.

Eine Abhängigkeit morphologischer Veränderungen in Granulozyten durch eine Morphin-induzierte Freisetzung von NO ist beschrieben¹⁸³. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob die Aktivitätsänderungen von NF- κ B durch Morphin ebenfalls einen NO-abhängigen Prozeß darstellen. Durch eine 10-minütige Vorinkubation mit dem NOS-Inhibitor L-NAME konnten die Morphin-induzierten Veränderungen vollständig aufgehoben werden. Auch hier konnten für Monozyten und Granulozyten parallele Veränderungen aufgezeigt werden (Abbildung 16).

Somit kann von einer kausalen Rolle der Morphin-induzierten NO-Freisetzung für intrazelluläre Regulationsvorgänge ausgegangen werden. Dabei könnte die Freisetzung von NO einen an den Opiatrezeptor auf Granulozyten und Monozyten gekoppelten Prozeß darstellen.

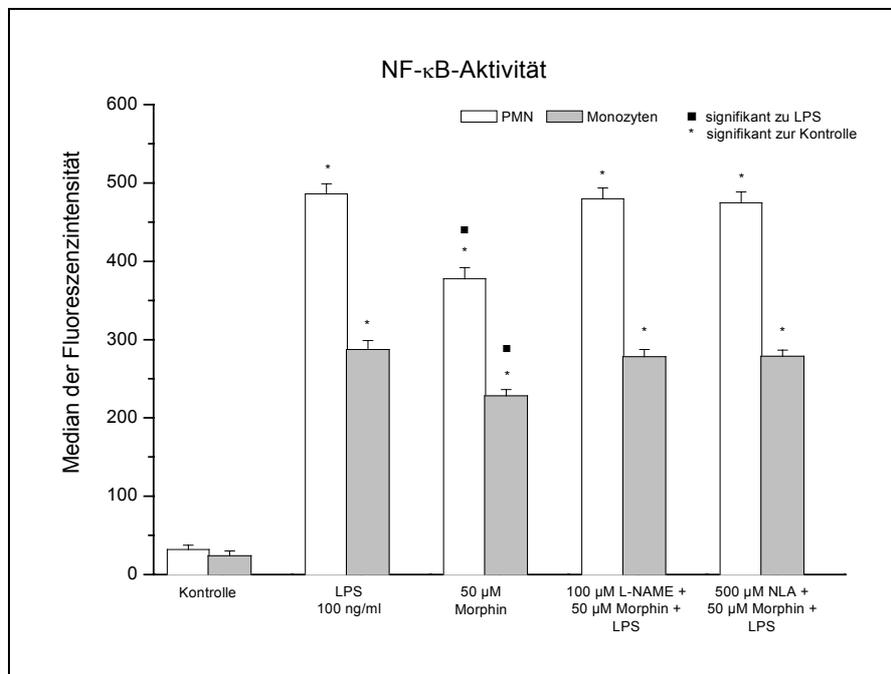


Abbildung 16

Durchflußzytometrische Bestimmung der NF- κ B-Aktivität in Granulozyten und Monozyten mit und ohne 10-minütiger Vorinkubation mit dem NOS-Inhibitor L-NAME, 2,5-stündiger Behandlung mit Morphin und nachfolgender Stimulation mit LPS. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 8 voneinander unabhängigen Versuchen.

Die nach Morphin-Inkubation verminderte nukleäre Aktivität von NF- κ B nach Stimulation mit LPS korrelierte mit einer verminderten Nachweisbarkeit von zytosolischem p65 in isolierten Granulozyten. Dabei war diese Untereinheit sowohl bei unbehandelten Zellen als auch nach 2,5-stündiger Behandlung mit 50 μ M Morphin und nachfolgender LPS-Stimulation fast nicht nachweisbar. Auch dieser Effekt war nach Vorbehandlung der Zellsuspension mit dem NOS-Antagonisten NLA vollständig aufgehoben.

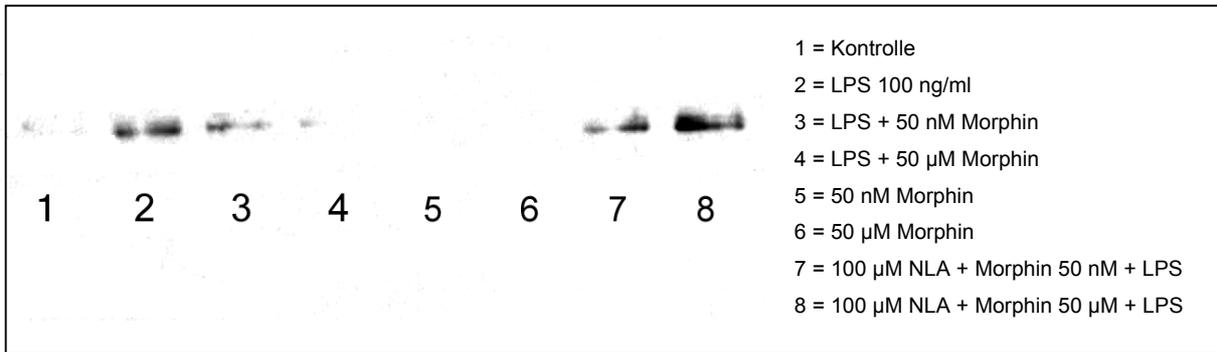
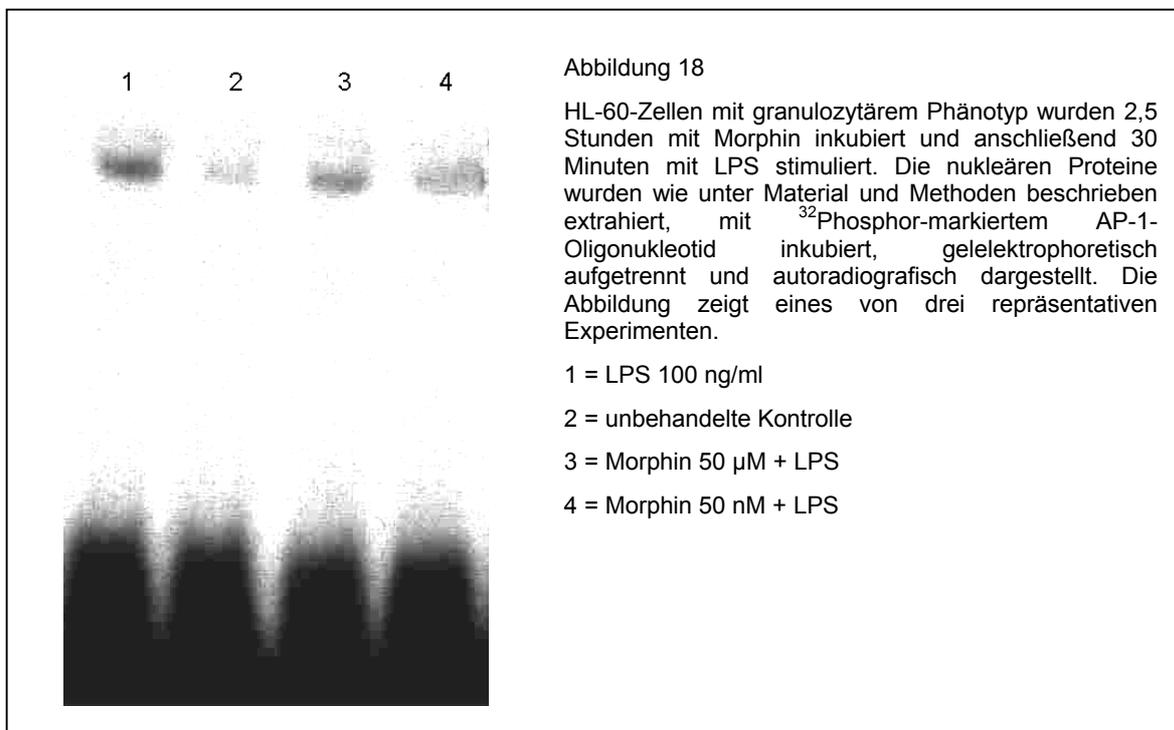


Abbildung 17

Inkubation von isolierten Granulozyten mit verschiedenen Morphin-Konzentrationen mit und ohne Vorbehandlung durch NLA und 30-minütiger Stimulation mit LPS. Nach Gewinnung der zytoplasmatischen Proteinextrakte wurde im Western Blot die p65-Subeinheit dargestellt. Dargestellt ist eines von drei repräsentativen Experimenten.

3.1.3.2 Veränderungen von AP-1

Neben Morphin-induzierten Veränderungen von NF-κB wurde als weiterer Transkriptionsfaktor AP-1 evaluiert. Wiederum wurden nach Morphin-Behandlung nukleäre Extrakte von HL-60 Zellen mit granulozytärem Phänotyp mittels EMSA als klassischem Darstellungsverfahren der DNA-Bindungsaktivität untersucht. Auch hier wurde nach Inkubation mit Morphin eine verminderte Bindungsaktivität nach LPS-Stimulation beobachtet.



In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob die an Zellkulturen erhobenen Ergebnisse in einem Vollblutansatz reproduzierbar sind. Dazu wurde heparinisiertes Vollblut von gesunden Probanden für 10 Minuten bzw. 2,5 Stunden sowohl mit verschiedenen Morphinkonzentrationen als auch mit NO-Donoren oder NOS-Inhibitoren vorbehandelt, 30 Minuten mit LPS stimuliert und durchflußzytometrisch analysiert.

In diesen Experimenten konnte eine Morphin-abhängige Hemmung der AP-1-Aktivität festgestellt werden, die mit den im EMSA erhobenen Ergebnissen in Einklang stand. Die höhere Morphin-Konzentration von 50 μM führte im durchflußzytometrischen Assays zu einer signifikant stärkeren Abschwächung der AP-1-Aktivität als 50 nM. Dieser Konzentrationseffekt war im EMSA nicht eindeutig nachzuweisen. Morphin allein ohne nachfolgende LPS-Stimulation hatte keinen Einfluß auf die AP-1-Aktivität.

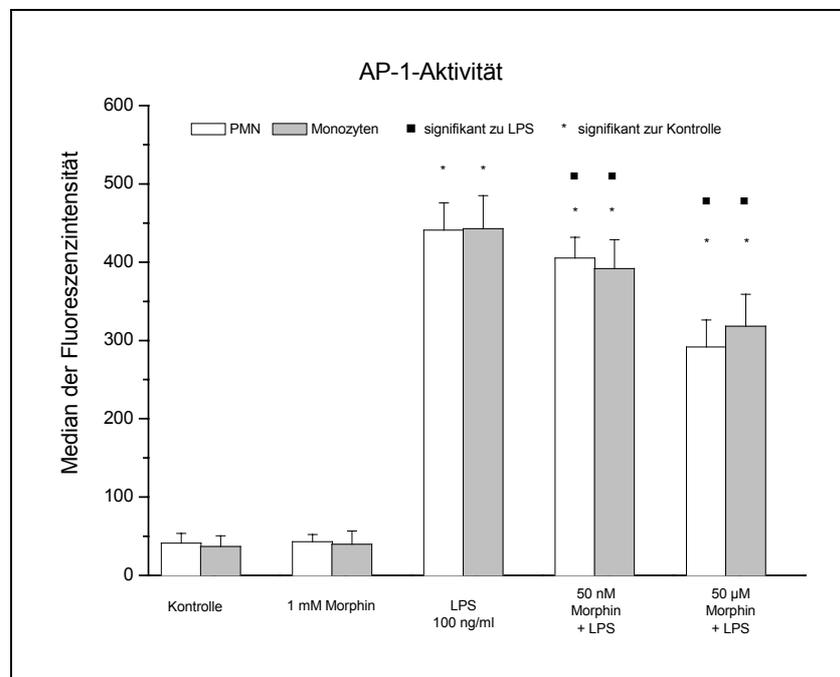


Abbildung 19

Konzentrationsabhängige Hemmung der AP-1-Aktivität durch 10-minütige Morphin-Inkubation und nachfolgender Stimulation mit LPS in humanen PMN und Monozyten. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 Experimenten.

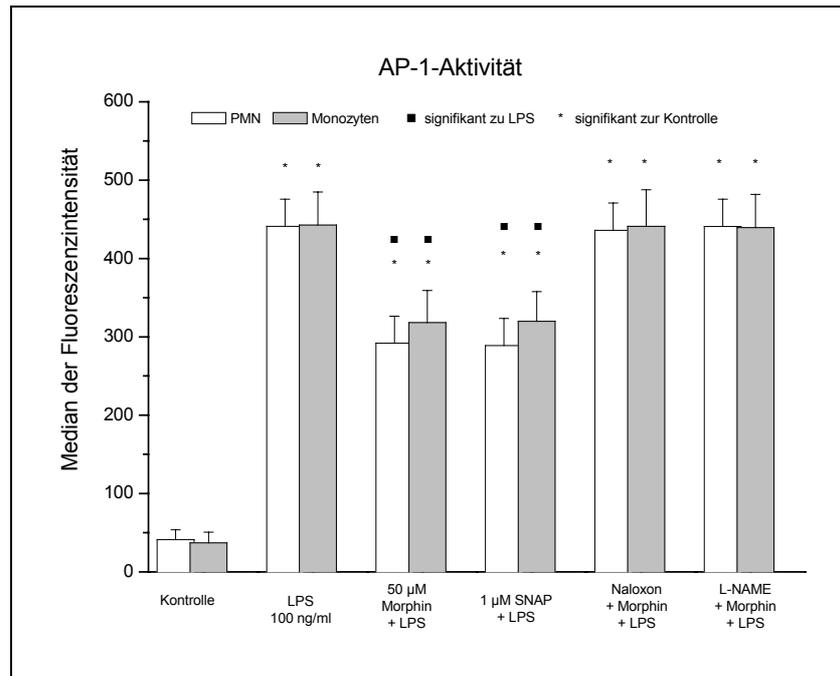


Abbildung 20

Einfluß von NO-Donoren und NOS-Inhibitoren sowie Naloxon auf die AP-1-Aktivität in humanen PMN und Monozyten. Die Inkubationszeiten mit Morphin, SNAP, L-NAME und Naloxon betragen jeweils 10 Minuten. L-NAME wurde in einer Konzentration von 500 µM, Naloxon in einer Konzentration von 50 µM eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 Experimenten.

Durch den NO-Donor SNAP konnte eine Hemmung der AP-1-Aktivität erzielt werden, die mit derjenigen nach Morphin-Inkubation vergleichbar war. Gleichzeitig konnte der inhibierende Effekt von Morphin durch eine Vorbehandlung sowohl mit dem NOS-Inhibitor L-NAME als auch mit dem Opiat-Rezeptor-Antagonisten Naloxon aufgehoben werden.

Im Gegensatz zu den für NF-κB erhobenen Ergebnissen spielte die Inkubationszeit mit Morphin für den hemmenden Effekt auf die AP-1-Aktivität keine Rolle. So konnten keine Unterschiede im Ausmaß der AP-1-Inhibierung nach 10-minütiger bzw. 2,5-stündiger Vorbehandlung mit Morphin oder SNAP beobachtet werden.

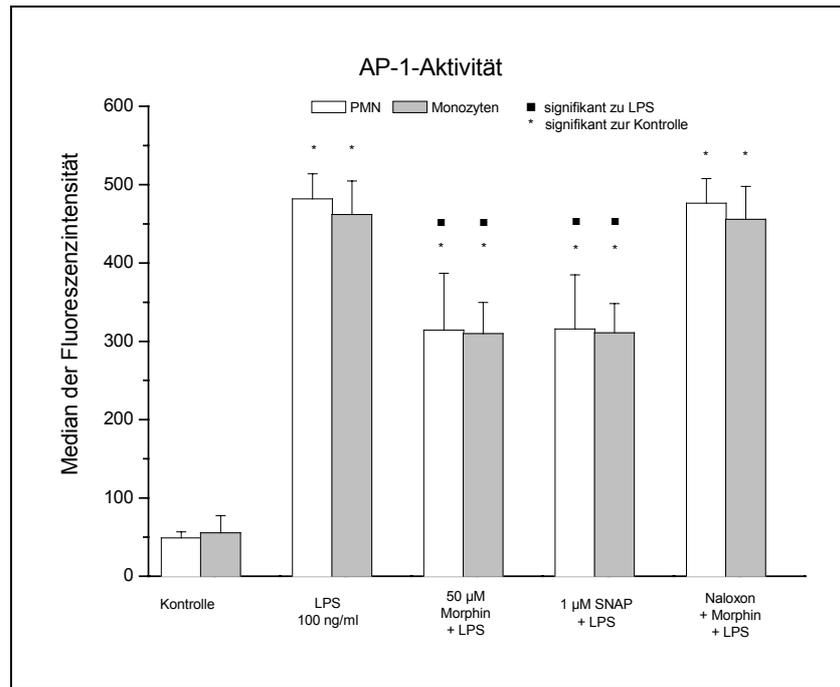


Abbildung 21

Hemmung der AP-1-Aktivität nach 2,5-stündiger Inkubation mit Morphin bzw. SNAP und nachfolgender LPS-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von 6 Experimenten. Aufhebung des Morphin-Effektes durch Präinkubation mit 50 µM Naloxon.

Sowohl der durchflußzytometrische Vollblutassay als auch der EMSA als klassisches Verfahren lieferten vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der NF-κB- und AP-1-Bindungsaktivität, wobei ein inhibierender Effekt von Morphin dargestellt werden konnte. Beide Verfahren sind somit zur Darstellung von Medikamenten-induzierten Effekten auf die nukleäre Aktivität von Transkriptionsfaktoren geeignet.

3.1.4 Morphin-induzierte Veränderungen und μ -Rezeptor-Expression

Obwohl in den vorangegangenen Versuchsserien sämtliche Morphin-induzierten Veränderungen durch den Opiat-Rezeptor-Antagonisten Naloxon aufgehoben wurden, blieb wegen der Interaktion von Naloxon sowohl mit μ - als auch mit δ -Rezeptoren unklar, welcher Opiat-Rezeptor-Subtyp für die immuninhibitorische Wirkung von Morphin verantwortlich ist. Daher wurde in weiteren Experimenten an U937 und HL-60-Zelllinien mittels RT-PCR überprüft, ob die hemmenden Effekte von Morphin mit der genetischen Expression des μ -Rezeptors korrelieren.

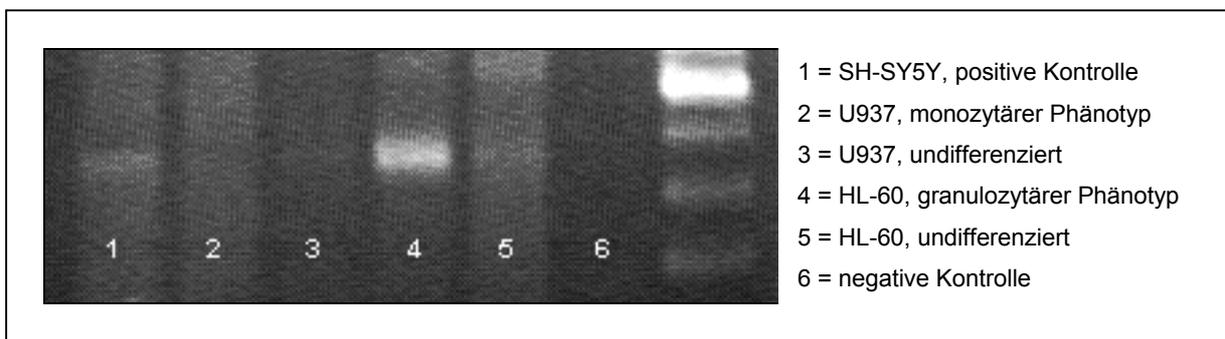


Abbildung 22

RT-PCR zur Überprüfung der Expression des μ -Opiat-Rezeptors in verschiedenen Zelllinien. RNA aus der humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y diente als positive Kontrolle. U937-Zellen wurden durch Inkubation mit PMA, HL-60-Zellen durch Behandlung mit Retinolsäure ausdifferenziert. Die Negativ-Kontrolle diente zum Ausschluß einer DNA-Kontamination und enthielt keine RNA. Die rechte Bande stellt den DNA-Marker dar. Dargestellt ist eines von drei repräsentativen Experimenten.

Während U937-Zellen sowohl im undifferenzierten Zustand als auch bei Ausprägung eines monozytären Phänotyps μ -Rezeptor-negativ waren, konnte durch Ausdifferenzierung von HL-60 Zellen in einen granulozytären Phänotyp die Expression des μ -Rezeptors induziert werden. In unbehandelten Zellen ist die Expression minimal und kann durch eine spontane Differenzierung, die in ca. 10% der Zellen stattfindet, erklärt werden. In humanen Granulozyten als enddifferenzierten Zellen wurde die Expression des μ -Rezeptors bei Verwendung des gleichen Primerpaares ebenfalls beschrieben⁵⁸. Inwieweit die Expression dieses Rezeptors vom Differenzierungsgrad der Zelle abhängt, muß in Folgestudien geklärt werden.

In Übereinstimmung mit der fehlenden Expression des μ -Rezeptors konnte Morphin in U937-Zellen die LPS-stimulierte NF- κ B-Aktivität auch bei Einsatz hoher Konzentrationen nicht hemmen, wie anhand von durchflußzytometrischen Untersuchungen gezeigt werden konnte. Desweiteren sind reine δ -Agonisten im Gegensatz zu Morphin nicht in der Lage, über eine NO-Freisetzung inhibitorisch zu wirken¹⁸³.

Somit kann angenommen werden, daß die Expression des μ -Opiat-Rezeptors essentiell für die Morphin-induzierte Immunsuppression ist. Inwieweit der μ -Rezeptor auf Immunzellen mit dem zentralnervösen Korrelat identisch ist, muß jedoch molekularbiologisch aufgeklärt werden.

3.1.5 Einfluß von Morphin auf die Interleukin-8-Produktion

Um zu überprüfen, inwieweit die Inhibition der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 durch Morphin mit einer verminderten Produktion proinflammatorischer Mediatoren korreliert, wurde in einem Vollblut-Assay die Produktion von IL-8 nach Inkubation mit Morphin und Stimulation mit LPS bestimmt.

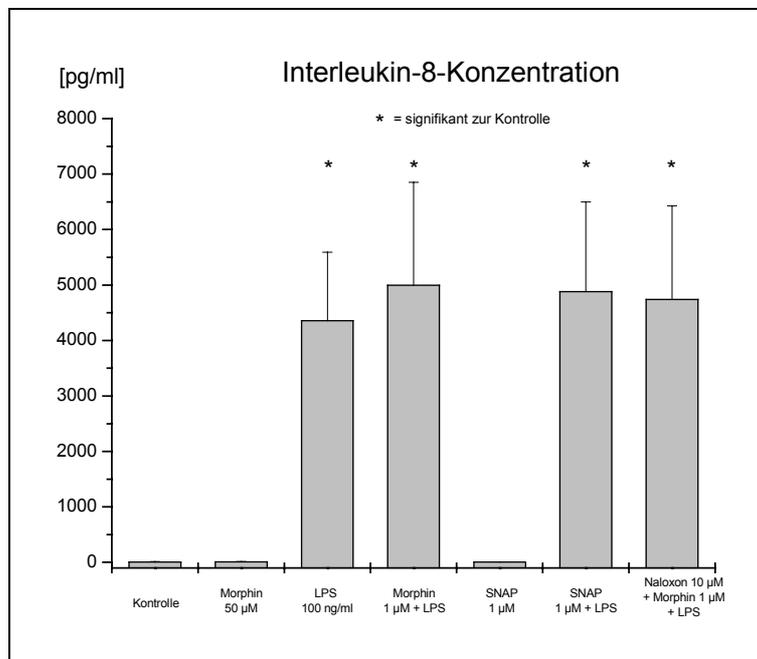


Abbildung 23

Effekte von Morphin und SNAP auf die LPS-induzierte IL-8-Produktion im Vollblut. In Zellkulturplatten aliquotiertes Vollblut wurde 2,5 Stunden mit Morphin bzw. SNAP inkubiert und anschließend 6 Stunden mit LPS stimuliert. Naloxon wurde 10 Minuten vor Inkubation mit Morphin zugegeben. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 8 voneinander unabhängigen Experimenten.

Überraschenderweise führte die Behandlung von Vollblut mit Morphin nicht zu einer Hemmung der LPS-stimulierten IL-8-Produktion, sondern steigerte tendentiell ($p=0,075$) die Freisetzung dieses Mediators ins Blut. Ähnliche Effekte konnten durch den NO-Donor SNAP erzielt werden ($p=0,108$). Die interindividuellen Schwankungen in der IL-8-Produktion spiegeln sich in einer hohen Standardabweichung wider. Ob diese Priming-Effekte von Morphin die IL-8-Sekretion bei nachfolgender LPS-Stimulation signifikant erhöhen können, muß daher in Folgestudien an einem größeren Probandenkollektiv geklärt werden. Eine

inhibierende Wirkung von Morphin auf die IL-8-Produktion im Vollblut kann jedoch ausgeschlossen werden. Eine Antagonisierung des Morphin-Effektes durch Naloxon konnte nicht sicher dargestellt werden und muß ebenfalls in Folgestudien überprüft werden.

3.2 Wirkungen von Fentanyl auf neutrophile Granulozyten

Um zu überprüfen, ob synthetische Opiate die Granulozytenfunktion und Rezeptorenexpression in ähnlicher Weise beeinflussen wie Morphin, wurden diese Parameter nach Inkubation von Vollblut mit Fentanyl bestimmt.

3.2.1 Phagozytoseleistung und Oxidativer Burst

Die Anzahl der phagozytierten Bakterien konnte durch die Inkubation mit Fentanyl nicht reduziert oder gesteigert werden, selbst wenn supraklinische Dosen der Substanz von 100 ng/ml eingesetzt wurden.

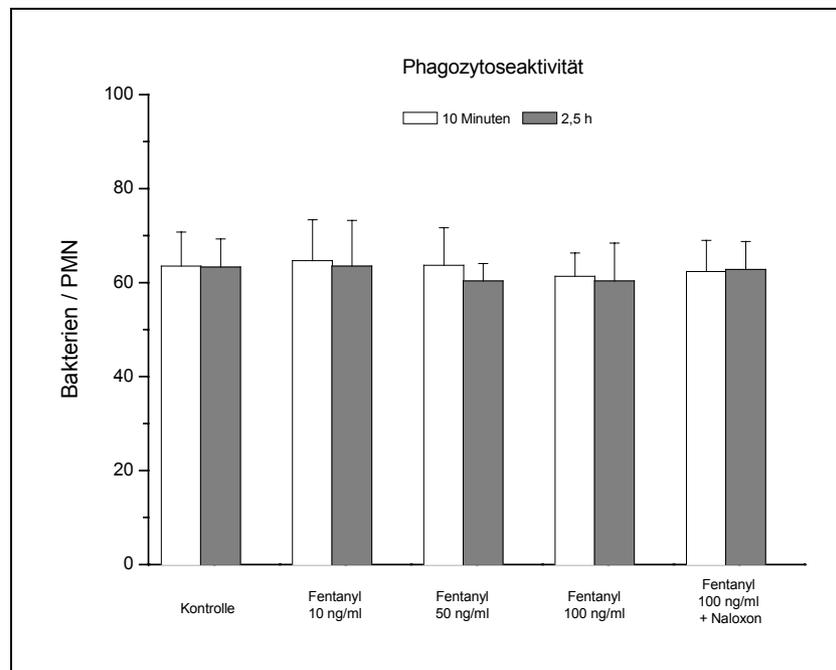


Abbildung 24

Anzahl der aufgenommenen Bakterien nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Fentanyl. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 15 voneinander unabhängigen Versuchen.

3.2.2 Oxidativer Burst

Aufgrund der unveränderten Phagozytoseaktivität konnte der Oxidative Burst, der durch die Phagozytose von Staphylokokken induziert wurde, ebenfalls nicht durch die Inkubation mit Fentanyl beeinflusst werden.

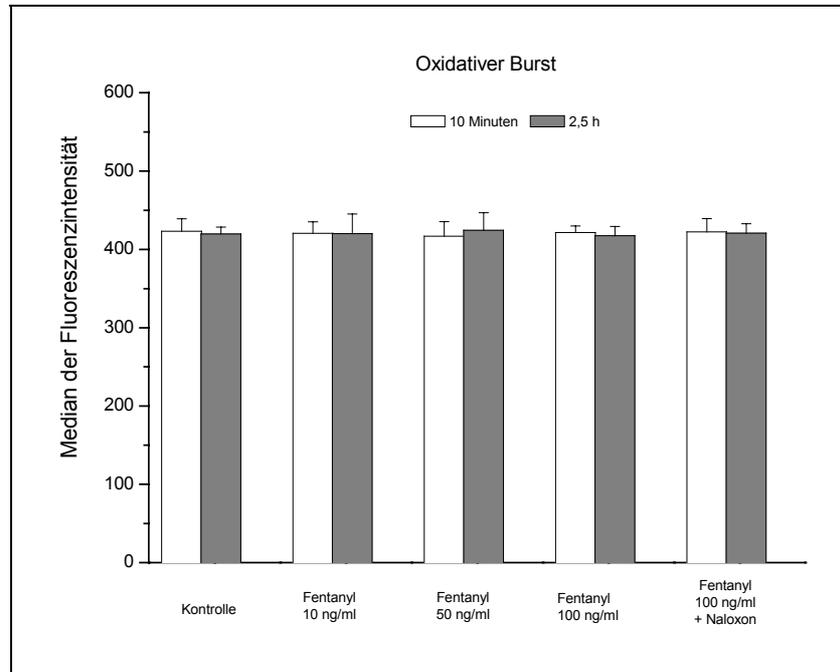


Abbildung 25

Oxidativer Burst nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Fentanyl. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 15 voneinander unabhängigen Versuchen.

3.2.3 Expression von Oberflächenmarkern

Die fehlende Modulation der Funktionsparameter „Phagozytose“ und „Oxidativer Burst“ durch Fentanyl korrelierte mit der unveränderten Expression sämtlicher in dieser Untersuchung bestimmten Oberflächenrezeptoren, wie in den folgenden Grafiken dargestellt ist.

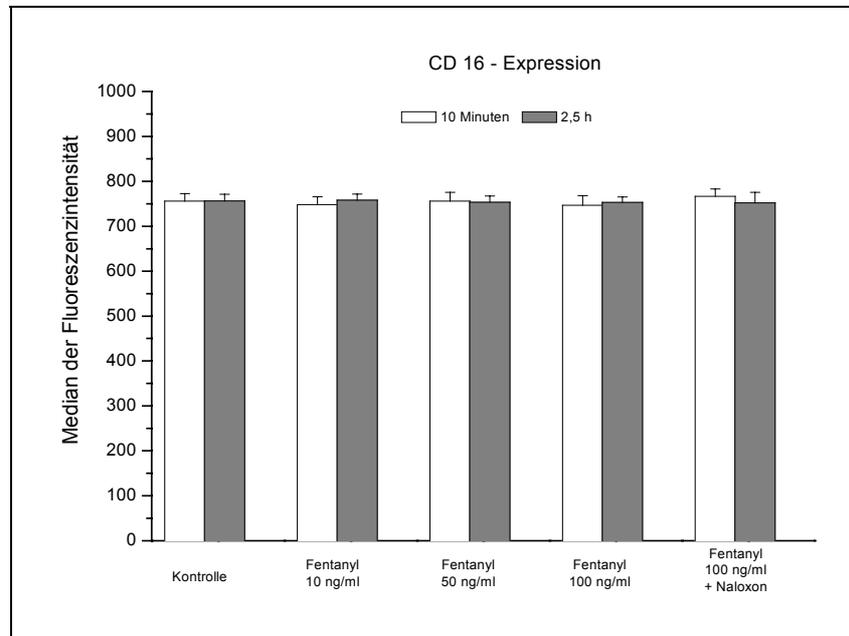


Abbildung 26

Expression des $Fc\gamma$ -Rezeptors IIIb (CD16) nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Fentanyl. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 15 voneinander unabhängigen Versuchen.

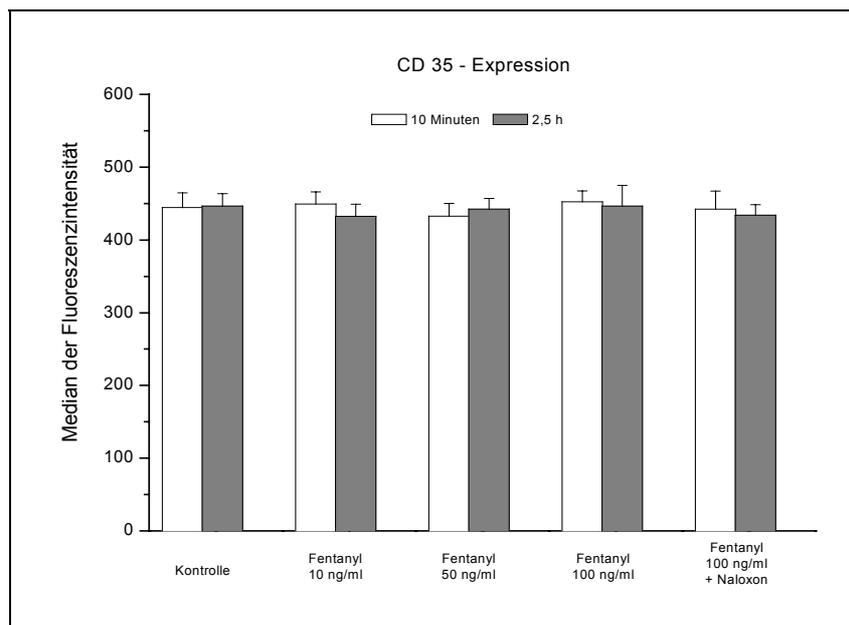


Abbildung 27

Expression des Komplementrezeptors CR1 (CD35) nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Fentanyl. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 15 voneinander unabhängigen Versuchen.

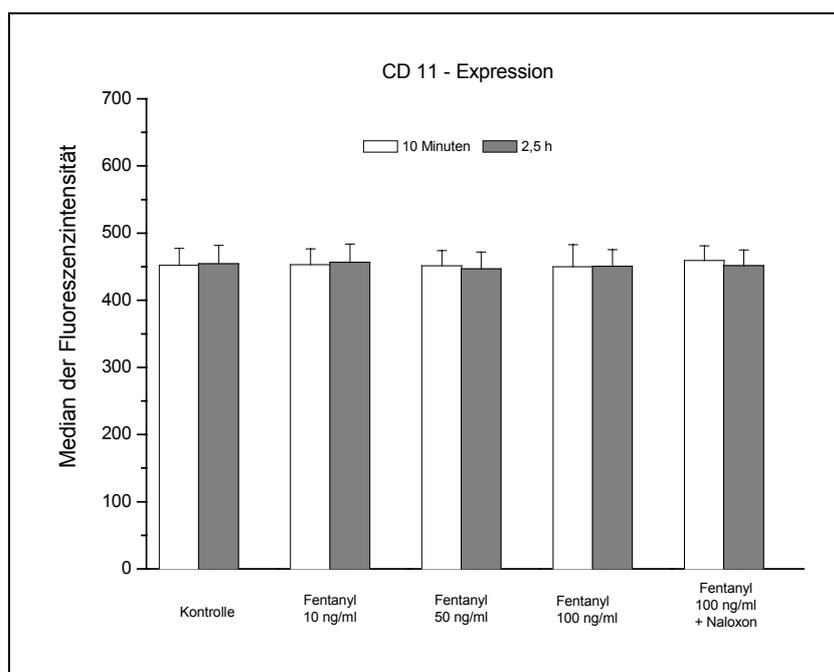


Abbildung 28

Expression des Komplementrezeptors CR3 (CD11b) nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Fentanyl. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 15 voneinander unabhängigen Versuchen.

Wegen mangelnder Effekte von Fentanyl auf die Rezeptorenexpression und die Granulozytenfunktion wurde auf eine weitere Untersuchung hinsichtlich modulierender Effekte dieser Substanz auf die transkriptionelle Regulation verzichtet.

3.3 Wirkungen von Ketamin auf Leukozyten

Für das Ketamin als weiterem Analgetikum mit immunomodulatorischen Eigenschaften wurde ebenfalls der Einfluß auf die Expression von Oberflächenmarkern auf Granulozyten und Monozyten sowie die Granulozytenfunktion bestimmt.

3.3.1 Phagozytoseleistung und Oxidativer Burst

Die Granulozytenfunktion, gemessen an der Phagozytoseleistung und im Oxidativen Burst wurde durch Ketamin konzentrationsabhängig gehemmt.

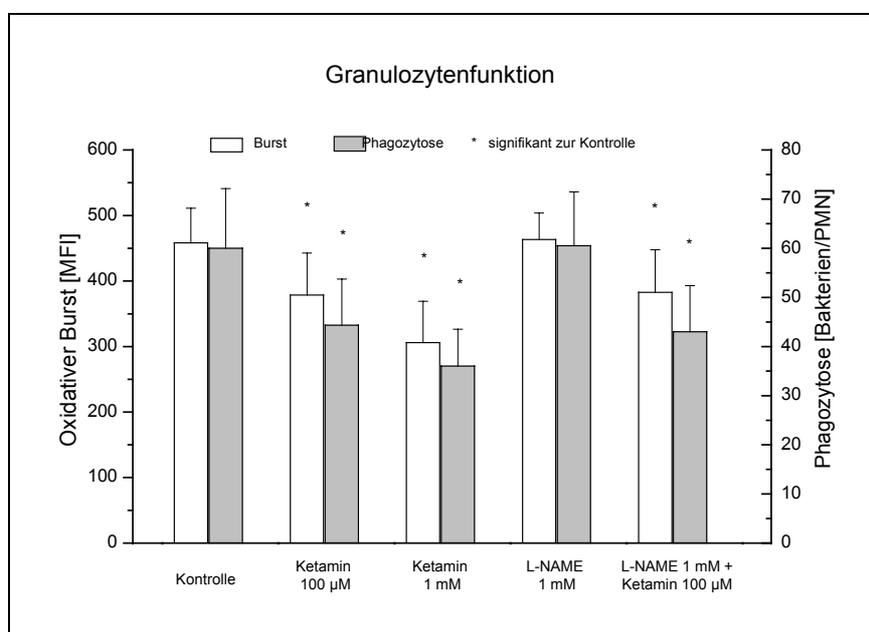


Abbildung 29

Einfluß einer zehnminütigen Inkubation von Vollblut mit Ketamin auf die Phagozytoseaktivität und den Oxidativen Burst in neutrophilen Granulozyten. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 voneinander unabhängigen Experimenten.

Die inhibitorische Wirkung von Ketamin war bereits nach Inkubation von Vollblut mit einer klinisch relevanten Konzentration von 100 µM signifikant und konnte durch eine Erhöhung der Ketamin-Konzentration auf 1 mM weiter gesteigert werden. Der NOS-Antagonist L-NAME hatte keinen Einfluß auf die Granulozytenfunktion und hob die Ketamin-induzierte Hemmung von Phagozytose und Oxidativem Burst nicht auf.

3.3.2 Expression von Oberflächenmarkern

Der Einfluß von Ketamin auf die Expression der leukozytären Rezeptoren CD16, CD35, CD11b und CD14 auf Granulozyten wurde durchflußzytometrisch evaluiert. Zusätzlich wurde die Rezeptorenexpression auf Monozyten untersucht, um festzustellen, ob vergleichbare Veränderungen auch in anderen Leukozytenpopulationen vorliegen.

3.3.2.1 Expression des Fc γ -Rezeptors IIIb (CD16)

Der Fc γ -Rezeptor IIIb wird auf Monozyten nicht exprimiert, so daß nur das Fluoreszenzsignal von Granulozyten bestimmt wurde. Dabei konnte eine signifikante Abnahme der Rezeptorenexpression bereits nach Inkubation mit 100 μ M Ketamin, einer klinisch relevanten Konzentration, festgestellt werden. Eine Erhöhung der Ketamin-Konzentration auf 1 mM steigerte den inhibitorischen Effekt. Eine Vorbehandlung der Proben mit NO-Antagonisten hob die Ketamin-assoziierte Hemmung der CD16-Expression nicht auf.

	Kontrolle	Ketamin 100 μ M	Ketamin 1mM	L-NAME 500 μ M + Ketamin 100 μ M
CD16-Expression [MFI]	620 \pm 56,2	555,3 \pm 49,0 *	479,2 \pm 78,9 *	555,2 \pm 44,6 *

Tabelle 9

Inhibierung der Spontanexpression von CD16 auf neutrophilen Granulozyten nach 10-minütiger Inkubation von Vollblut mit Ketamin. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 voneinander unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.3.2.2 Expression des Komplementrezeptors CR1 (CD35)

Die Komplementrezeptoren CD35 und CD11b und auch der LPS-Rezeptor CD14 werden sowohl auf Granulozyten als auch auf Monozyten exprimiert, so daß beide Leukozytenpopulationen für diese Parameter ausgewertet wurden.

Für den Komplementrezeptor 1 (CD35) konnte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Abnahme der Expression auf der Oberfläche von Granulozyten und Monozyten beobachtet werden. Auch hier genügte eine 10-minütige Inkubationszeit, um diese signifikanten Veränderungen hervorzurufen.

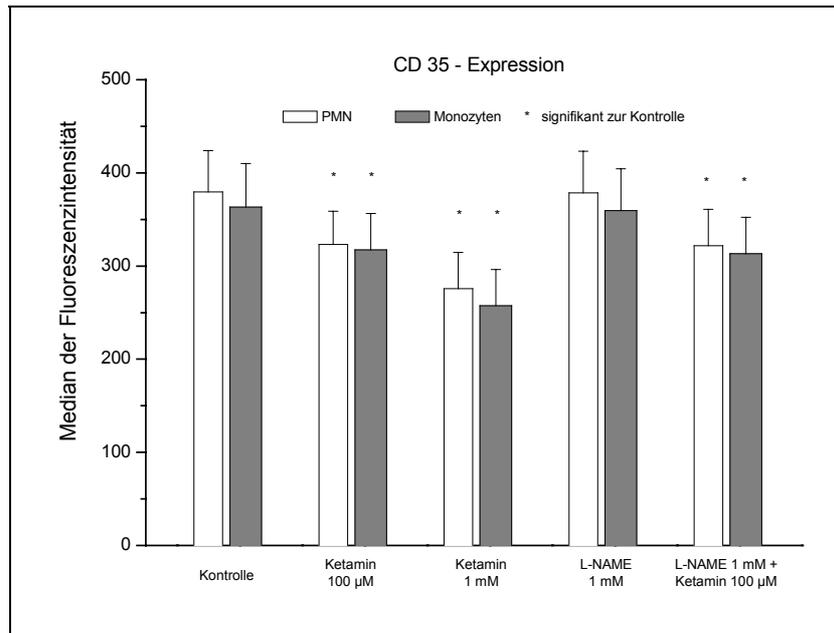


Abbildung 30

Inhibierung der Spontanexpression von CD35 auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten nach 10-minütiger Inkubation von Vollblut mit Ketamin. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 voneinander unabhängigen Experimenten.

3.3.2.3 Expression des Komplementrezeptors CR3 (CD11b)

Vergleichbare Ergebnisse konnten für die Spontanexpression von CD11b nach Ketamin-Exposition beobachtet werden.

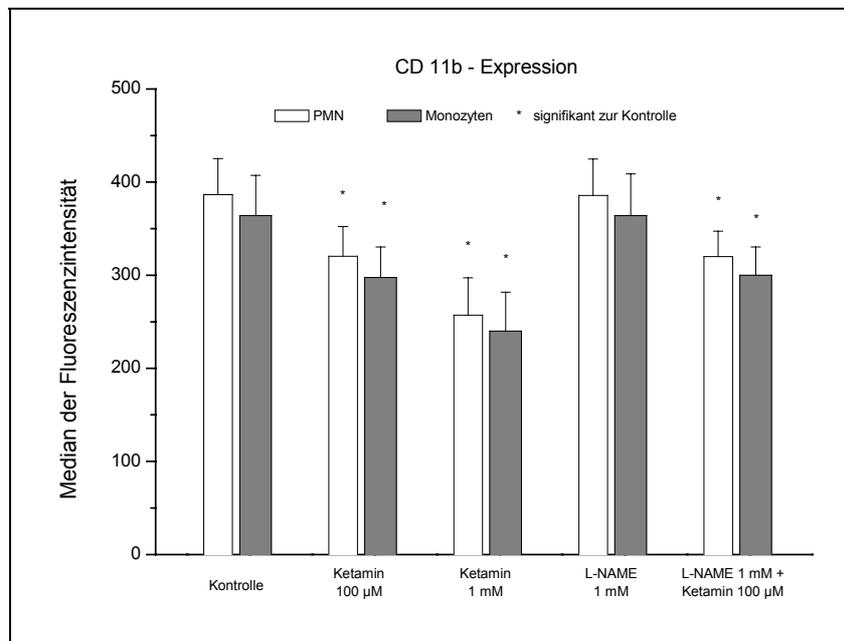


Abbildung 31

Inhibierung der Spontanexpression von CD11b auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten nach 10-minütiger Inkubation von Vollblut mit Ketamin. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 voneinander unabhängigen Experimenten.

3.3.2.4 Expression des LPS-Rezeptors CD14

Durch eine zehnmünütige Inkubation von Vollblut mit Ketamin konnte die Spontanexpression des Oberflächenrezeptors CD14 auf Granulozyten und Monozyten ebenfalls signifikant gehemmt werden.

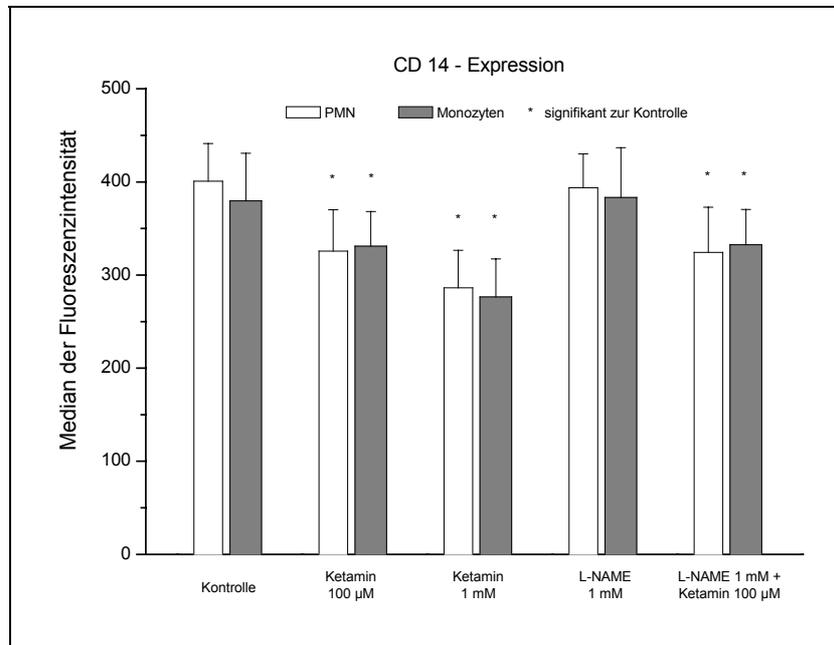


Abbildung 32

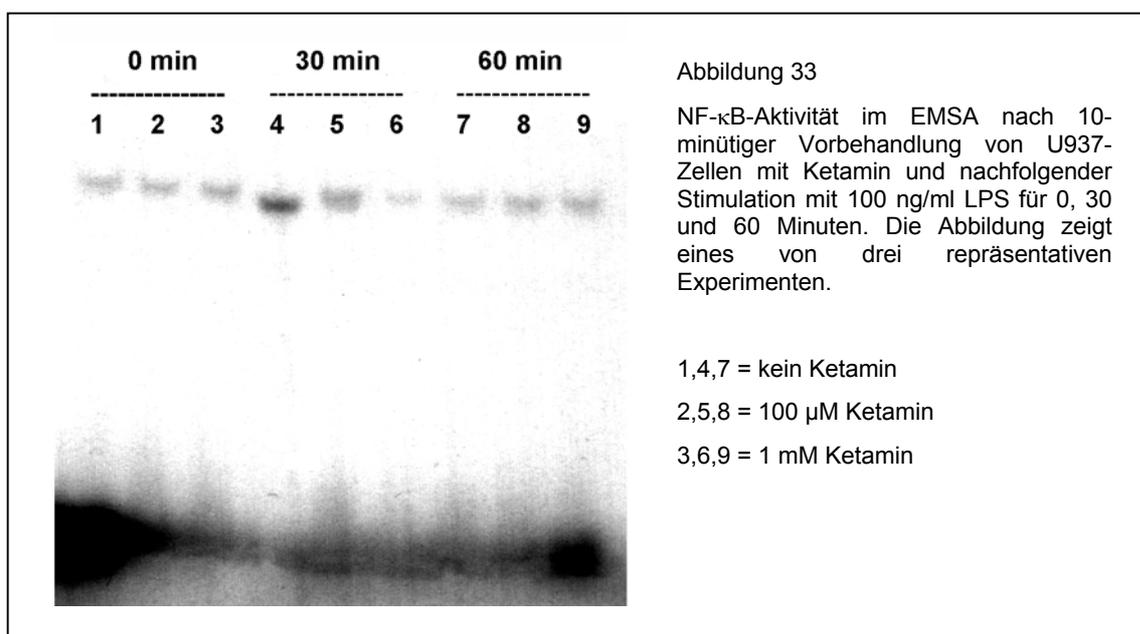
Inhibierung der Spontanexpression von CD14 auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten nach 10-minütiger Inkubation von Vollblut mit Ketamin. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 voneinander unabhängigen Experimenten.

Der NOS-Antagonist L-NAME hatte keinen Einfluß auf die Expression der Oberflächenmarker CD16, CD11b, CD35 und CD14. Die inhibierende Wirkung von Ketamin auf die Expression dieser Rezeptoren und auf die Granulozytenfunktionen Oxidativer Burst und Phagozytose konnte durch die Vorbehandlung mit einem NOS-Inhibitor nicht antagonisiert werden. Ebenso wenig konnte nach Ketamin-Exposition eine NO-Freisetzung in monozytären U937-Zellen beobachtet werden. Somit kann von einem NO-unabhängigen Transduktionsmechanismus ausgegangen werden.

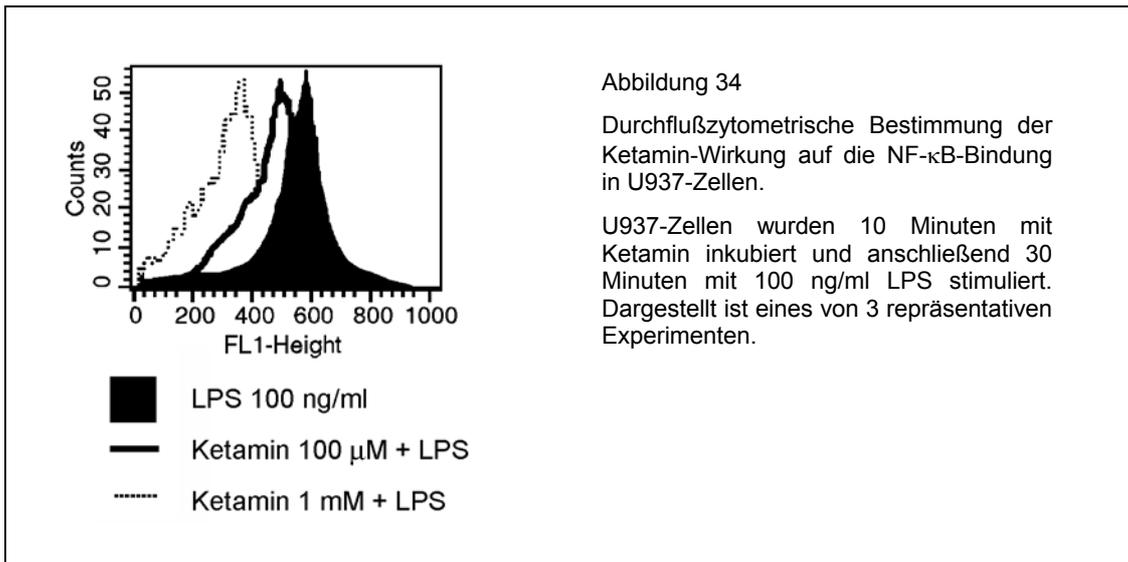
3.3.3 Veränderungen der nukleären Bindungsaktivität von NF- κ B und AP-1

3.3.3.1 Veränderungen von NF- κ B

Der Einfluß von Ketamin auf die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 wurde zunächst in der Zelllinie U937 mittels EMSA bestimmt. Nach nur 10-minütiger Vorbehandlung mit Ketamin konnte eine deutliche Hemmung der DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B festgestellt werden. Die inhibitorische Wirkung von Ketamin konnte durch eine Erhöhung der verwendeten Konzentration von 100 μ M auf 1 mM gesteigert werden. Am deutlichsten war der Effekt nach 30-minütiger Stimulation mit LPS, so daß für Folgeexperimente diese Stimulationszeit verwendet wurde.



In durchflußzytometrischen Untersuchungen an U937-Zellen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden: Nach zehnmütiger Inkubation mit Ketamin war eine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität als Ausdruck der verminderten nukleären Bindung von NF- κ B zu beobachten. Auch hier war der inhibitorische Effekt nach Einsatz der höheren Ketamin-Konzentration von 1 mM signifikant stärker ausgeprägt.



Um zu überprüfen, ob die in Tumorzelllinien erhobenen Effekte von Ketamin auch in peripheren Blutzellen beobachtet werden können, wurde Vollblut mit Ketamin inkubiert und die nukleäre NF-κB-Bindung durchflußzytometrisch analysiert. Dabei wurde ebenfalls eine inhibierende Wirkung von Ketamin auf die LPS-induzierte NF-κB-Aktivität in Granulozyten und Monozyten festgestellt:

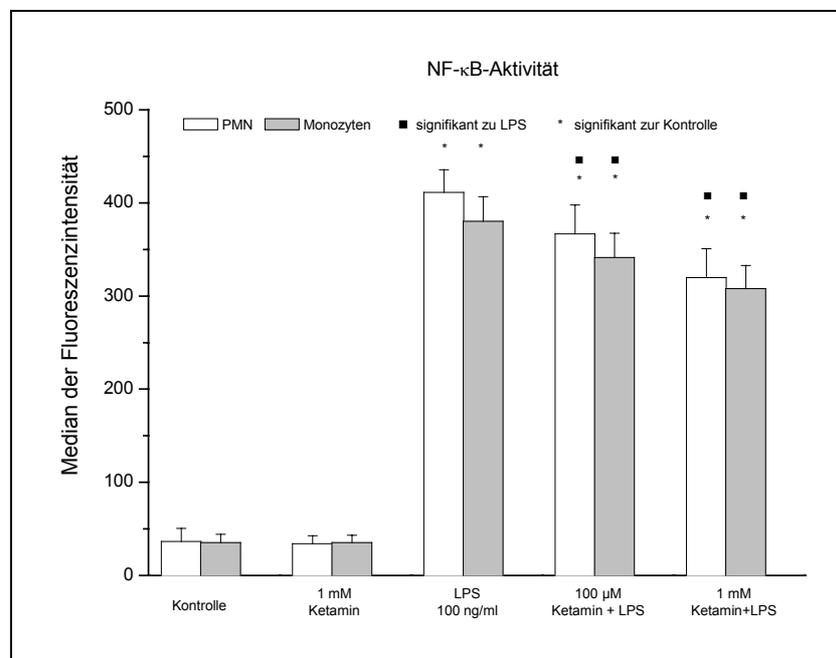


Abbildung 35

Konzentrationsabhängige Hemmung der NF-κB-Aktivität nach 10-minütiger Ketamin-Inkubation und nachfolgender Stimulation mit LPS in humanen PMN und Monozyten. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 Experimenten.

Im Gegensatz zu den nach Inkubation mit Morphin beobachteten Effekten konnte die inhibierende Wirkung von Ketamin auf die NF- κ B-Aktivität nach LPS-Stimulation durch eine Verlängerung der Inkubationszeit mit Ketamin auf 2,5 Stunden nicht weiter gesteigert werden.

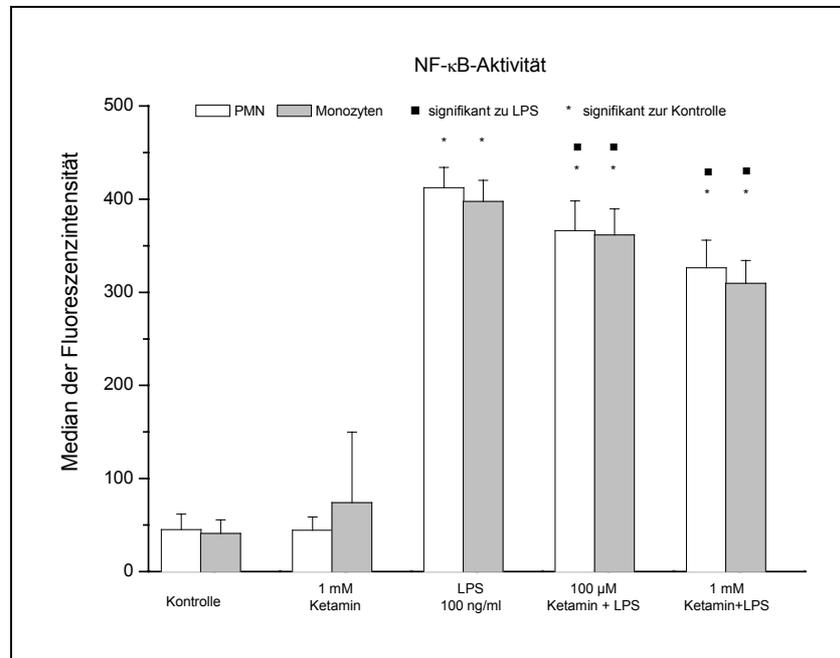


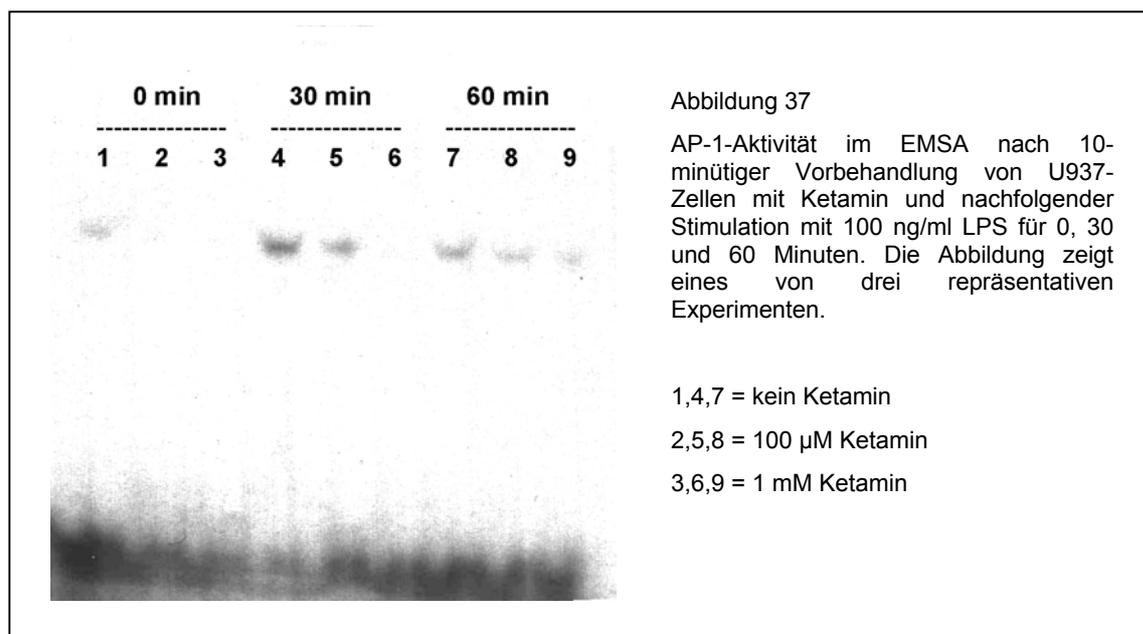
Abbildung 36

Konzentrationsabhängige Hemmung der NF- κ B-Aktivität nach 2,5-stündiger Ketamin-Inkubation und nachfolgender Stimulation mit LPS in humanen PMN und Monozyten. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 Experimenten.

In beiden durchflußzytometrischen Versuchsserien konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der NF- κ B-Inhibierung durch Ketamin dargestellt werden. Die alleinige Inkubation mit Ketamin ohne nachfolgende LPS-Stimulation veränderte die nukleäre Bindungsaktivität von NF- κ B nicht.

3.3.3.2 Veränderungen von AP-1

Die Wirkung von Ketamin auf transkriptionelle Vorgänge wurde nicht nur anhand von NF- κ B dargestellt, sondern es wurden außerdem Effekte dieses Analgetikums auf den Transkriptionsfaktor AP-1 untersucht. In U937-Zellen zeigt sich nach 10-minütiger Inkubation mit Ketamin und nachfolgender Stimulation mit LPS ebenfalls ein inhibitorischer Einfluß dieser Substanz auf die DNA-Bindungsaktivität von AP-1.



Ein Maximum der nukleären Bindungsaktivität wurde nach 30-minütiger Stimulation mit LPS beobachtet, so daß dieses Zeitintervall für sämtliche folgenden Experimente gewählt wurde. Die spontane AP-1-Aktivität ohne nachfolgende Stimulation mit LPS wurde durch den Zusatz von Ketamin inhibiert (Bande 2 und 3).

Im folgenden sollte erneut die Übertragbarkeit der an Zellkulturen erhobenen Ergebnisse auf Leukozyten des peripheren Blutes überprüft werden. Dazu wurde Vollblut mit Ketamin inkubiert, mit LPS stimuliert und die nukleäre AP-1-Bindung nach Markierung durch entsprechende Antikörper durchflußzytometrisch analysiert. Konzentrationen von 100 μ M Ketamin führten hierbei zu einer signifikanten Abnahme der AP-1-Aktivität, nach Inkubation mit der höheren Ketamin-Konzentration von 1 mM zeigte sich eine Reduktion der AP-1-Aktivität von nahezu 20%. Dieser inhibierende Effekt von Ketamin war ebenso wie die Hemmung der NF- κ B-Bindung nicht zeitabhängig, so daß eine Verlängerung der Inkubationszeit mit Ketamin auf 2,5 Stunden keine weitere Reduktion des nukleären AP-1-Gehaltes bewirkte.

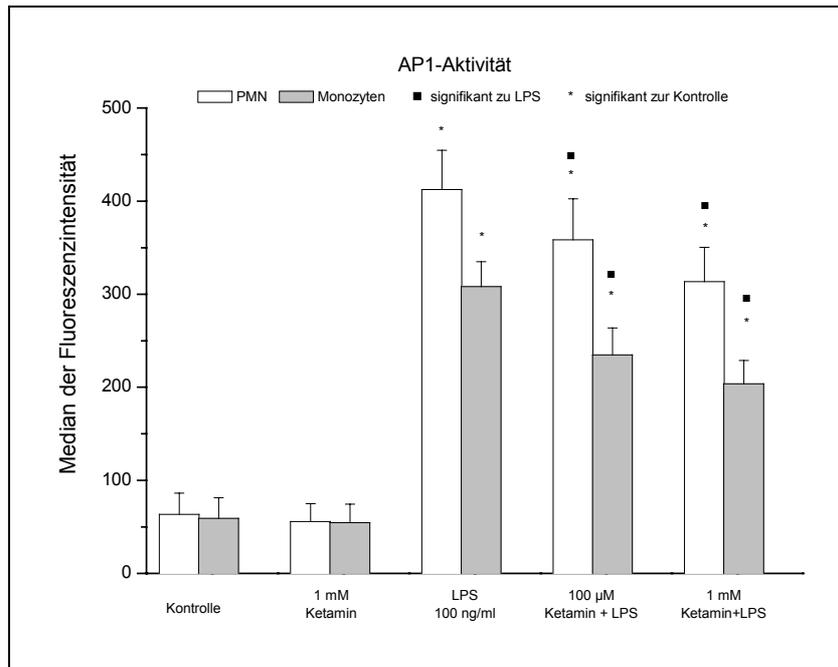


Abbildung 38

Konzentrationsabhängige Hemmung der AP-1-Aktivität nach 10-minütiger Ketamin-Inkubation und nachfolgender Stimulation mit LPS in humanen PMN und Monozyten. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 Experimenten.

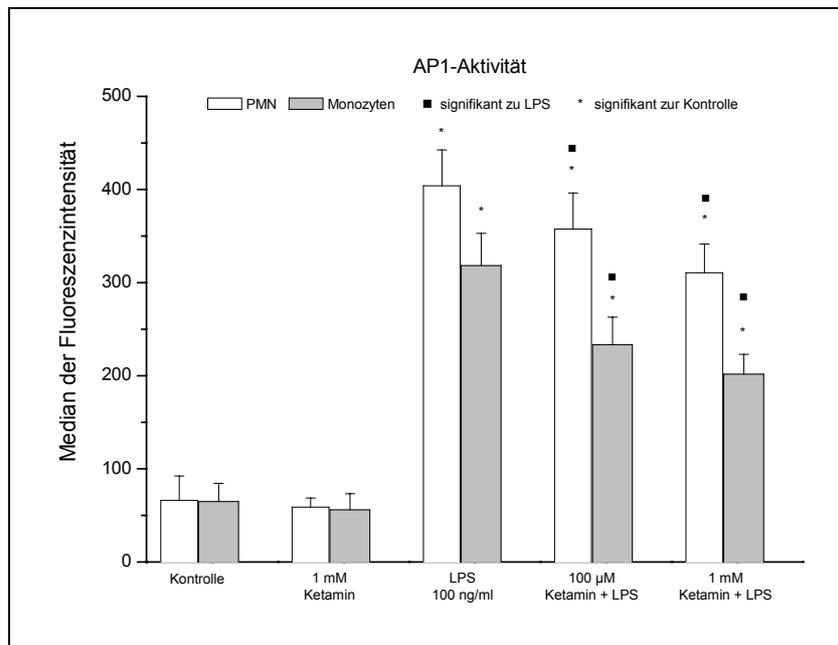


Abbildung 39

Konzentrationsabhängige Hemmung der AP-1-Aktivität nach 2,5-stündiger Ketamin-Inkubation und nachfolgender Stimulation mit LPS in humanen PMN und Monozyten. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 Experimenten.

3.3.3.3 Einfluß der LPS-Konzentration auf die Induktion von Transkriptionsfaktoren

Im weiteren wurde der Einfluß der zur Induktion der transkriptionellen Aktivität verwendeten LPS-Konzentration evaluiert. Dabei zeigte sich, daß durch eine geringere, möglicherweise jedoch pathophysiologisch relevantere LPS-Konzentration von 10 ng/ml^{149; 311} eine signifikante, aber quantitativ geringere Induktion beider Transkriptionsfaktoren erzielt wurde. Insbesondere für das Ausmaß der Aktivierung von AP-1 war die LPS-Konzentration von entscheidender Bedeutung.

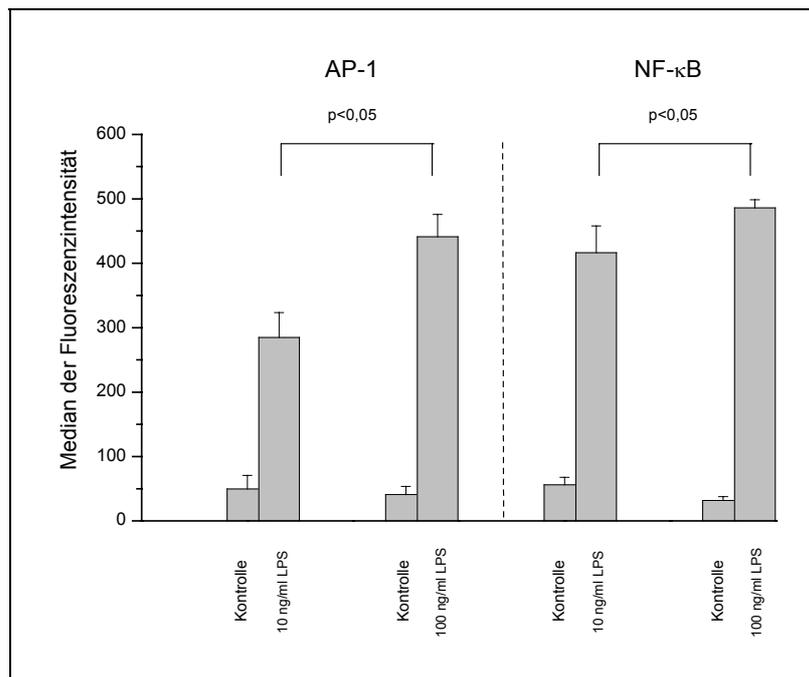


Abbildung 40

Einfluß der LPS-Konzentration auf die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-κB in Granulozyten nach Stimulation von Vollblut mit 10 bzw. 100 ng/ml LPS. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 Experimenten.

Auch in Monozyten hing das Ausmaß der Induktion dieser Transkriptionsfaktoren von der gewählten LPS-Konzentration ab.

In weiteren Experimenten wurde nun der Einfluß von Ketamin bei Stimulation von Vollblut mit der niedrigeren LPS-Konzentration von 10 ng/ml untersucht. Bei diesem Versuchsaufbau führten bereits Konzentrationen von 10 µM Ketamin zu einer signifikanten Reduktion der AP-1-Aktivität; durch eine Erhöhung der Ketamin-Konzentration auf 1mM konnte die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors um rund 40% gehemmt werden.

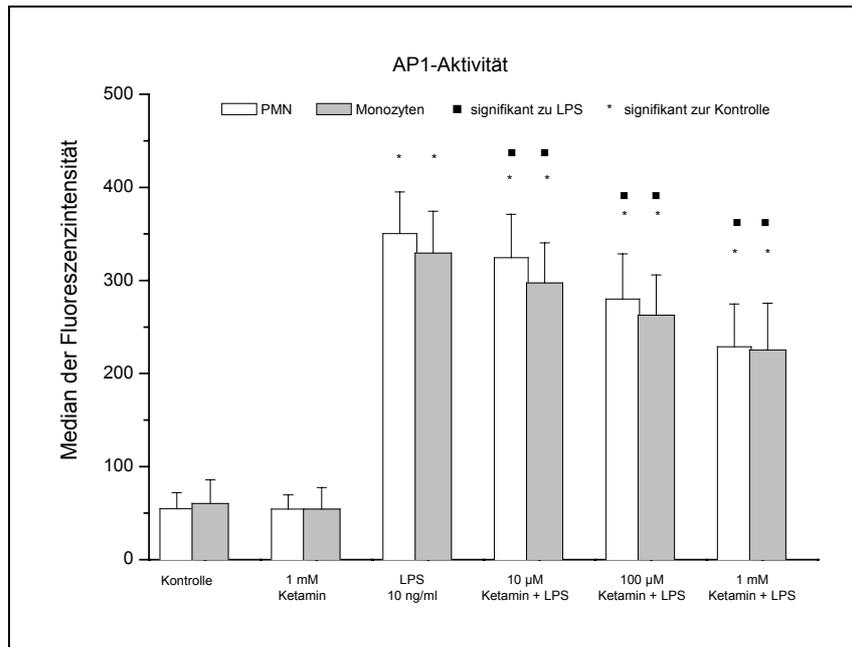


Abbildung 41

Konzentrationsabhängige Hemmung der AP-1-Aktivität in humanen PMN und Monozyten nach 10-minütiger Ketamin-Inkubation und nachfolgender Stimulation mit LPS in niedriger Konzentration. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 Experimenten.

Auch hier war die Länge der Inkubationszeit mit Ketamin ohne Bedeutung, die Effekte waren nach 10-minütiger Inkubation ebenso ausgeprägt wie nach 2,5-stündiger Vorbehandlung von Vollblut mit Ketamin.

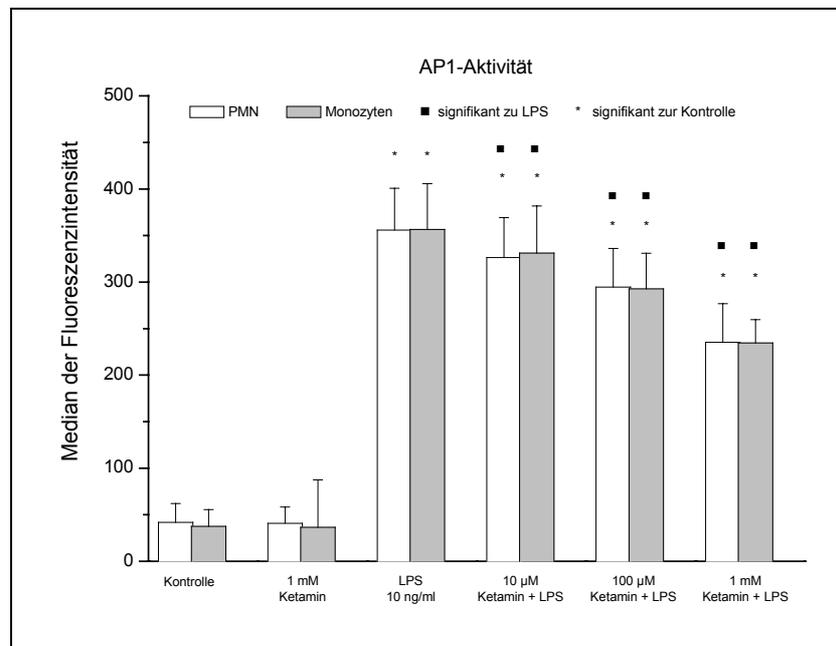


Abbildung 42

Konzentrationsabhängige Hemmung der AP-1-Aktivität in humanen PMN und Monozyten nach 2,5-stündiger Ketamin-Inkubation und nachfolgender Stimulation mit LPS in niedriger Konzentration. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 Experimenten.

Die AP-1-Aktivität konnte bei Stimulation mit der niedrigeren LPS-Konzentration von 10 ng/ml bereits durch Vorbehandlung mit 10 μ M Ketamin signifikant gehemmt werden (Abbildung 42).

In Übereinstimmung mit dem geringeren Einfluß der LPS-Konzentration auf NF- κ B-Aktivität bewirkte eine Inkubation mit 10 μ M Ketamin noch keine Hemmung der durch 10 ng/ml LPS induzierten NF- κ B-Aktivität, so daß eine Mindestkonzentration von 100 μ M Ketamin zur Inhibierung erforderlich war.

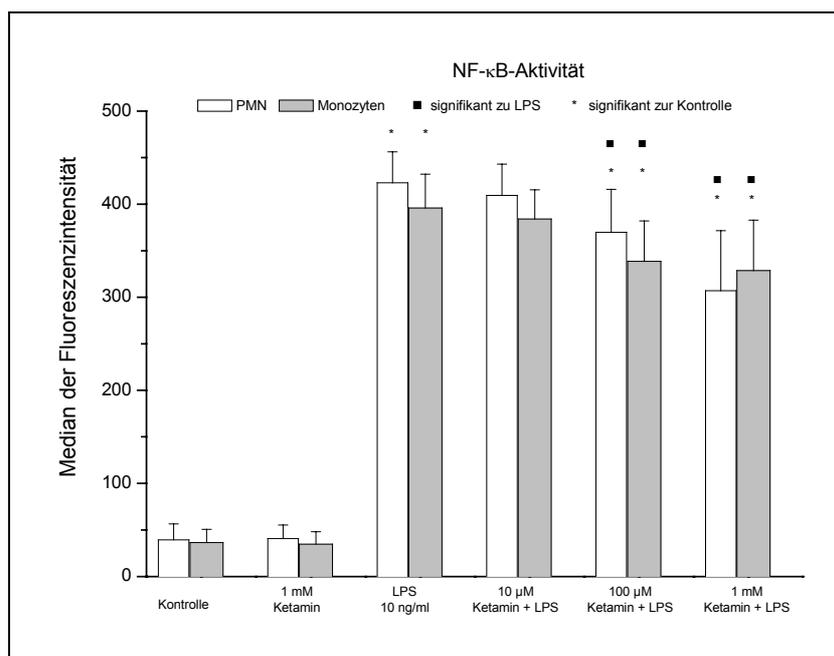


Abbildung 43

Einfluß von Ketamin auf die NF- κ B-Aktivität von Granulozyten und Monozyten nach 10-minütiger Stimulation von Vollblut mit einer niedrigen LPS-Konzentration von 10 ng/ml. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 Experimenten.

3.3.3.4 Enantiomer-spezifische Effekte

Ketamin wurde lange Zeit als Razemat in der klinischen Praxis eingesetzt. Seit kurzem ist das S(+)-Enantiomer des Ketamins als eigenes Präparat verfügbar. Um eventuelle Enantiomer-spezifische Effekte dieser Substanz auf die Regulation transkriptioneller Vorgänge zu untersuchen, wurde S-(+)-Ketamin mit dem Razemat hinsichtlich des Einflusses auf die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 untersucht.

Dabei konnte für S-(+)-Ketamin eine ebensostarke Hemmung der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivität in Granulozyten und Monozyten nachgewiesen werden wie für das Razemat.

Im Gegensatz hierzu war die Inhibierung der LPS-induzierten AP-1-Aktivität nach Inkubation mit S-(+)-Ketamin geringer ausgeprägt als nach Inkubation mit dem Razemat. So war nach

Inkubation mit 100 μ M S-Ketamin keine signifikante Reduktion der AP-1-Aktivität nachweisbar, während eine Behandlung mit dem Razemat zu einer rund 10-prozentigen Inhibierung führte.

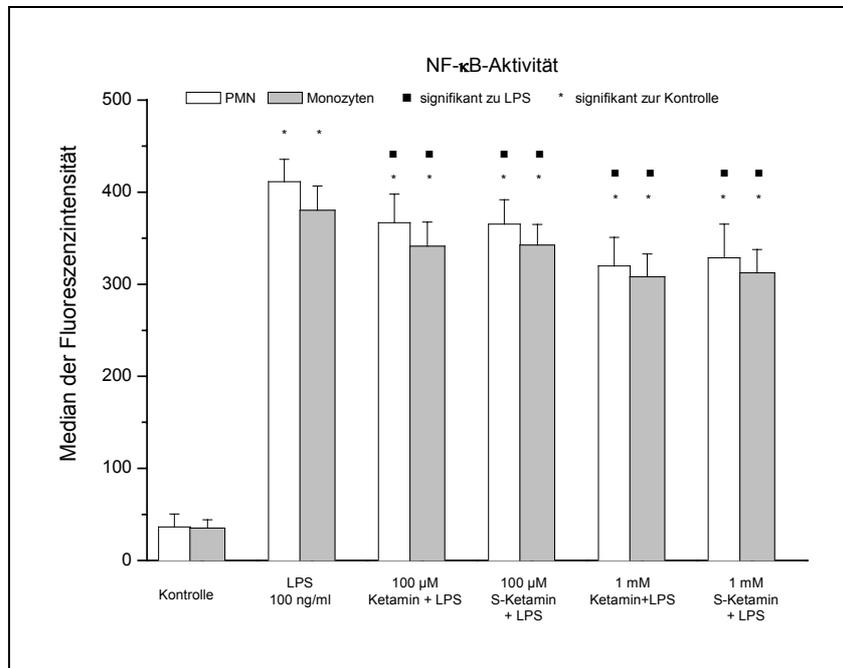


Abbildung 44

Vergleich der inhibitorischen Wirkung von racemischem und S-(+)-Ketamin auf die LPS-induzierte NF-κB-Aktivität in Granulozyten und Monozyten. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 voneinander unabhängigen Experimenten.

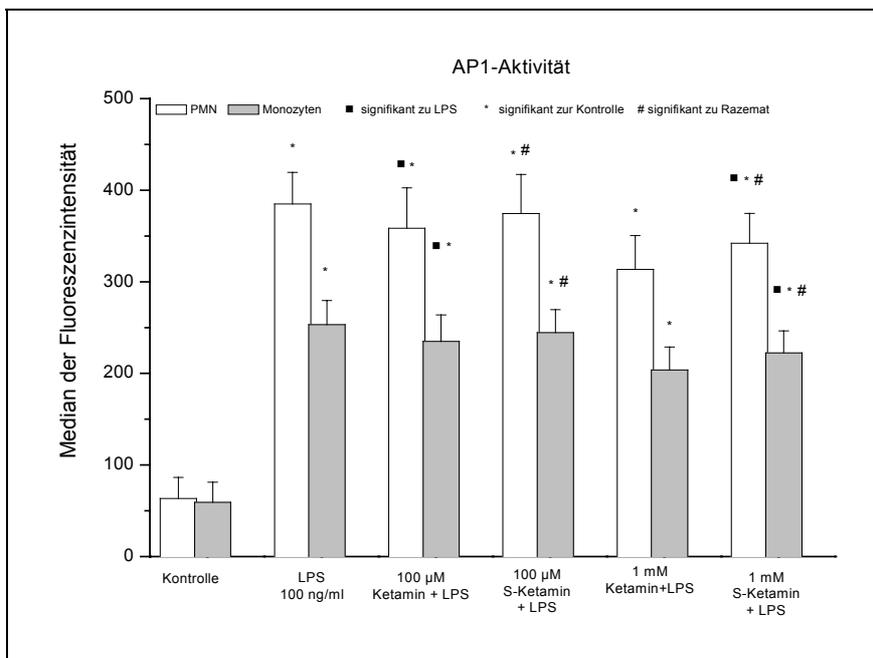


Abbildung 45

Vergleich der inhibitorischen Wirkung von racemischem und S-(+)-Ketamin auf die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivität in Granulozyten und Monozyten. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 voneinander unabhängigen Experimenten.

3.3.4 Ketamin-induzierte Veränderungen und NMDA1-Rezeptor-Expression

NMDA1-Rezeptoren stellen einen wichtigen Angriffspunkt für die dämpfende Wirkung von Ketamin im ZNS dar. Zur Überprüfung, ob diese Rezeptoren-Klasse auch für die inhibierenden Effekte dieses Analgetikums im ZNS verantwortlich sein könnte, wurde mittels RT-PCR die Expression des NMDA1-Rezeptors auf mRNA-Ebene überprüft.

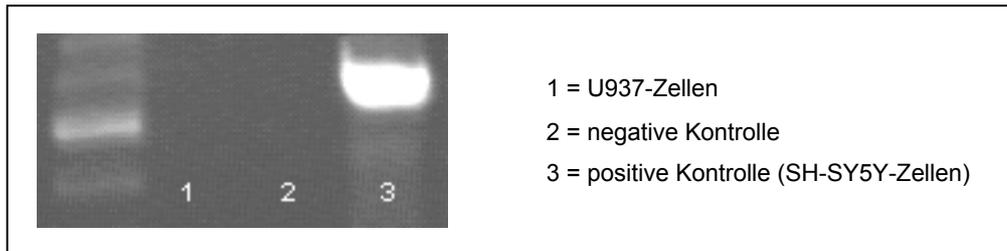


Abbildung 46

RT-PCR zum Nachweis des NMDA1-Rezeptors. Die linke Bande zeigt einen 100 bp-DNA-Marker. Als positive Kontrolle diente mRNA aus Neuroblastom-Zellen, die negative Kontrolle wurde ohne Zusatz von mRNA zum Ausschluß von DNA-Kontaminationen durchgeführt. Dargestellt ist eines von drei repräsentativen Experimenten.

U937-Zellen, in denen ein hemmender Effekt von Ketamin auf die LPS-induzierte Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 nachgewiesen werden konnte, exprimierten den NMDA1-Rezeptor nicht, wohingegen in SH-SY5Y-Neuroblastom-Zellen mRNA für diesen Rezeptor nachgewiesen werden konnte. Somit werden die immuninhibierenden Effekte von Ketamin nicht durch den NMDA1-Rezeptor vermittelt. Im Vergleich zu zentralnervösen Wirkungen muß daher von unterschiedlichen Signaltransduktionsmechanismen für Ketamin im Immunsystem ausgegangen werden.

3.3.5 Einfluß von Ketamin auf die Interleukin-8-Produktion

In weiteren Experimenten sollte nun geklärt werden, ob die Hemmung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 durch Ketamin mit einer verminderten Produktion des proinflammatorischen Mediators IL-8 im Vollblut einhergeht. Dazu wurde Vollblut nach Vorbehandlung mit verschiedenen Ketamin-Konzentrationen mit LPS stimuliert und die IL-8-Konzentration im Überstand determiniert.

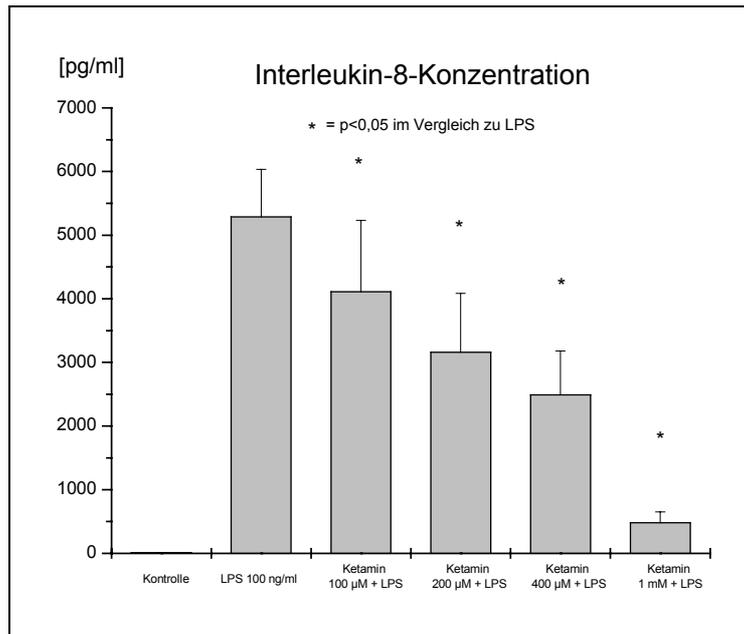


Abbildung 47

Interleukin-8-Konzentration nach 10-minütiger Vorbehandlung von Vollblut mit Ketamin und konsekutiver Stimulation mit 100 ng/ml LPS für 6 Stunden. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 7 voneinander unabhängigen Experimenten.

Im unstimulierten Vollblut konnte eine IL-8-Konzentration von durchschnittlich 9,1 pg/ml nachgewiesen werden, nach LPS-Stimulation mit 100 ng/ml fand sich ein IL-8-Anstieg auf über 5000 pg/ml. Bereits eine Inkubation mit 100 µM Ketamin bewirkte eine signifikante Reduktion der LPS-induzierten IL-8-Sekretion um rund 25%. Dieser Ketamin-Effekt war konzentrationsabhängig, wobei die höchste Konzentration von 1 mM zu einer rund 90%igen Suppression der IL-8-Produktion führte.

Im folgenden wurde der Einfluß der gewählten LPS-Konzentration auf die IL-8-Produktion im Vollblut evaluiert. Dabei wurde ferner untersucht, inwieweit Ketamin-abhängige Effekte bei Stimulation von Vollblut mit LPS-Konzentrationen von 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml differieren.

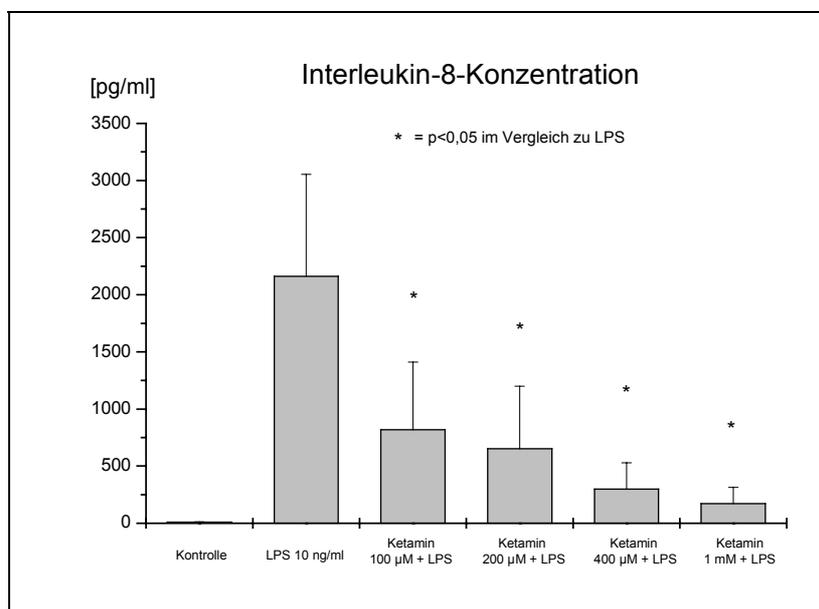


Abbildung 48

Interleukin-8-Konzentration nach 10-minütiger Vorbehandlung von Vollblut mit Ketamin und konsekutiver Stimulation mit 10 ng/ml LPS für 6 Stunden. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 7 voneinander unabhängigen Experimenten.

Die Freisetzung von IL-8 in den Überstand lag nach einer Stimulation mit 10 ng/ml LPS mit 2160 pg/ml mehr als 50% unter der durch 100 ng/ml LPS induzierten LPS-Produktion. Die hohen interindividuellen Unterschiede bei diesem Versuchsaufbau führten zu einer deutlich höheren Standardabweichung als in der vorangegangenen Versuchsserie. Dennoch wirkte eine Konzentration von nur 100 µM Ketamin bei nachfolgender Stimulation mit 10 ng/ml LPS mit einer Reduktion von rund 70% signifikant stärker inhibierend auf die IL-8-Produktion als bei LPS-Behandlung mit 100 ng/ml ($p < 0,001$). Der Effekt der höchsten untersuchten Ketamin-Konzentration von 1 mM lag auch bei Stimulation mit der niedrigen Dosis von 10 ng/ml LPS bei rund 90%.

3.3.6 Einfluß von Ketamin auf die LPS-induzierte IL-8-mRNA-Produktion

Um zu überprüfen, ob die Ketamin-abhängige Hemmung der IL-8-Produktion im Vollblut auf transkriptioneller Ebene stattfindet, wurde der IL-8-mRNA-Gehalt neutrophiler Granulozyten mit und ohne Ketamin-Behandlung und nachfolgender LPS-Stimulation mittels RT-PCR bestimmt.

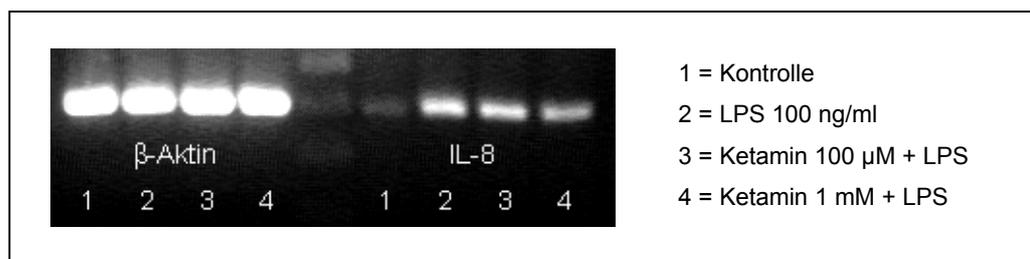


Abbildung 49

RT-PCR zur semiquantitativen Bestimmung des IL-8-mRNA-Gehaltes in neutrophilen Granulozyten mit und ohne Vorbehandlung mit Ketamin und nachfolgender LPS-Stimulation. Die mittlere Bande zeigt den 100 bp DNA-Marker, wobei das oberste Signal bei 400 bp liegt. Als Referenz diente die Bestimmung von β -Aktin-mRNA. Dargestellt ist eines von drei repräsentativen Experimenten.

β -Aktin als Referenzgen wird in Granulozyten stark exprimiert, so daß nur 20 PCR-Zyklen durchgeführt wurden.

Während in der unbehandelten Kontrolle nur eine schwache IL-8-Expression bestimmt werden konnte, führte die Stimulation der Granulozyten mit LPS zu einer vermehrten Expression von IL-8-mRNA. Nach zehnminütiger Inkubation der Zellen mit 100 μ M Ketamin und nachfolgender Stimulation mit LPS konnte mittels RT-PCR als semiquantitativem Verfahren keine eindeutige Hemmung der IL-8-mRNA-Produktion dargestellt werden. Hingegen konnte durch Vorbehandlung mit 1 mM Ketamin die LPS-induzierte Steigerung der IL-8-mRNA-Produktion abgeschwächt, aber nicht vollständig verhindert werden. Die Inhibition der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 durch Ketamin korreliert somit mit einer Abschwächung der IL-8-mRNA-Synthese in Antwort auf eine Stimulation mit LPS. Daher kann von einer transkriptionellen Hemmung von Ketamin auf die LPS-induzierte Synthese proinflammatorischer Mediatoren ausgegangen werden. Allerdings wurde die IL-Transkription auch durch die höchst Ketamin-Konzentration von 1 mM nicht in dem Ausmaß gehemmt wie die IL-8-Sekretion im Vollblut (Abbildung 47), so daß neben transkriptionellen Effekten auch posttranskriptionelle Vorgänge bei der Inhibierung der LPS-induzierten IL-8-Synthese durch Ketamin eine Rolle spielen könnten.

3.3.7 Einfluß von Ketamin auf die LPS-induzierte p65-mRNA-Produktion

Die Synthese der NF- κ B-Untereinheit p65 wird im Sinne eines positiven Autoregulationsmechanismus durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B verstärkt. Als Ausdruck für die Transkriptionsrate eines weiteren NF- κ B-abhängigen Gens wurde daher die mRNA dieser Untereinheit nach Vorbehandlung von Granulozyten mit Ketamin und nachfolgender Stimulation mit LPS mittels RT-PCR bestimmt.

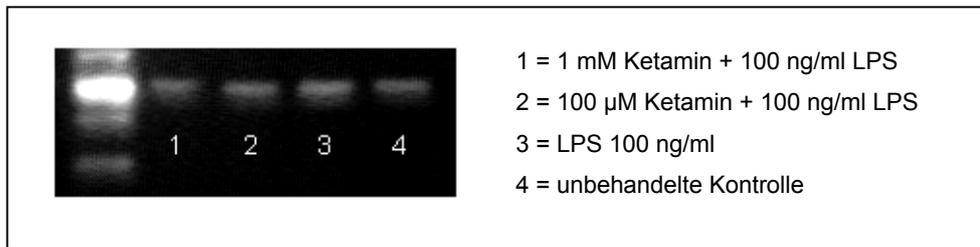


Abbildung 50

RT-PCR zur semiquantitativen Bestimmung des p65-mRNA-Gehaltes in neutrophilen Granulozyten mit und ohne Vorbehandlung mit Ketamin und nachfolgender LPS-Stimulation. Die linke Bande zeigt den 100 bp DNA-Marker, wobei das stärkste Signal bei 600 bp liegt. Als Referenz diente die in Abbildung 49 dargestellte Bestimmung der β -Aktin-mRNA. Dargestellt ist eines von drei repräsentativen Experimenten.

Die p65-Untereinheit wird ebenso wie IL-8 in Granulozyten konstitutiv exprimiert, wie die unbehandelte Kontrolle zeigt. Durch alleinige Behandlung mit LPS konnte eine leichte Steigerung der p65-Expression erzielt werden. Auch wenn Ketamin tendentiell diesen LPS-induzierten Anstieg der p65-Synthese inhibierte, konnte dieser hemmende Effekt auf die p65-Transkription mittels RT-PCR als semiquantitativem Verfahren nicht eindeutig dargestellt werden. Ein Ketamin-Effekt auf transkriptioneller Ebene könnte zwar die p65-Synthese inhibieren und damit die NF- κ B-Aktivität limitieren, posttranskriptionelle Regulationsmechanismen müssen jedoch in Betracht gezogen werden und könnten einen stärkeren Einfluß auf die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch Ketamin haben.

3.3.8 Einfluß von Ketamin auf $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$

Neben der transkriptionellen Regulation der *de-novo*-Synthese von NF- κ B-Untereinheiten beeinflusst der NF- κ B-Inhibitor $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ die Aktivität des Transkriptionsfaktors. Daher wurde mittels Western Blot zusätzlich der Einfluß von Ketamin auf diesen Inhibitor untersucht.

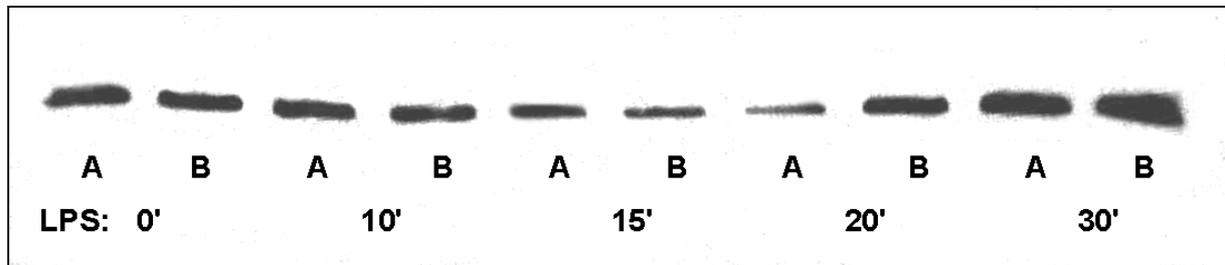


Abbildung 51

Zeitlicher Verlauf von zytoplasmatischem $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nach Stimulation von U937-Zellen mit 100 ng/ml LPS im Western Blot. Gruppe A: Kontrolle ohne Ketamin, Gruppe B: 10-minütige Vorbehandlung mit 1 mM Ketamin. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 6 Experimenten.

Die Behandlung mit Ketamin konnte dabei die Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 15 Minuten nach Stimulation mit LPS nicht verhindern. Im weiteren Verlauf konnte jedoch in der Ketamin-Gruppe eine verstärkte *de-novo*-Synthese beobachtet werden. Aufgrund des raschen Auftretens dieses Konzentrationsanstieges wird eine von Transkriptionsvorgängen unabhängige Neusynthese vermutet. Übereinstimmend hiermit konnte durch die Bestimmung der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -mRNA mittels RT-PCR keine eindeutige Hemmung der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Transkriptionsrate durch Ketamin dargelegt werden.

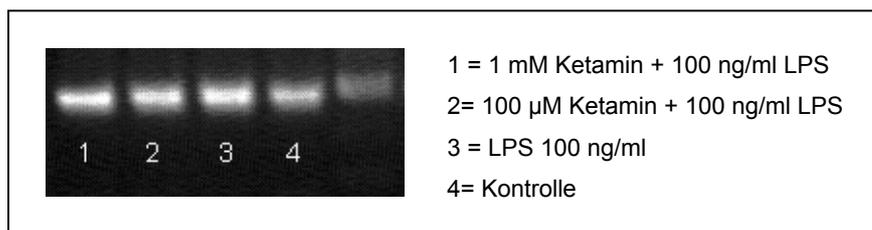


Abbildung 52

RT-PCR zur semiquantitativen Bestimmung des $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -mRNA-Gehaltes in neutrophilen Granulozyten mit und ohne Vorbehandlung mit Ketamin und nachfolgender LPS-Stimulation. Die rechte Bande zeigt den 100 bp DNA-Marker, wobei das stärkste Signal bei 600 bp liegt. Als Referenz diente die in Abbildung 49 dargestellte Bestimmung der β -Aktin-mRNA. Dargestellt ist eines von drei repräsentativen Experimenten.

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der verwendeten Methoden und Meßverfahren

4.1.1 Aufarbeitung von Blutproben

Für die durchflußzytometrischen Messungen und auch für die Bestimmung der Interleukin-8-Sekretion wurde in der vorliegenden Studie eine Vollblutmethodik angewandt, die gegenüber anderen Analyseverfahren wichtige Vorteile aufweist: Durch die Verwendung von Vollblut als physiologischem Medium kann auf physikalische Trennverfahren, wie sie bei der Isolierung von Zellen über Dichte-Gradienten notwendig sind, verzichtet werden. Die Reduktion der Arbeitsschritte trägt zudem dazu bei, die Funktion von peripheren Blutzellen zu erhalten³¹², während durch die Isolierung insbesondere von neutrophilen Granulozyten *in vitro*-Veränderungen der Oberflächenstrukturen sowie der granulozytären Stoffwechselfunktionen induziert werden können¹²⁸.

Nach Anwendung unterschiedlicher Separationsverfahren konnten in verschiedenen Studien im Vergleich zu unstimulierten Vollblutansätzen Veränderungen der Antigenexpression auf der Zellmembran neutrophiler Granulozyten und Monozyten nachgewiesen werden^{181; 228; 304}. Als Zeichen der Zellaktivierung war dabei die Expression von C3-Rezeptoren auf der Zelloberfläche um bis zu 400 % erhöht. Dieser Effekt ist vergleichbar mit einer Stimulation von Granulozyten mit PMA³²³. In einer weiteren Arbeit konnte bei verschiedenen Zellseparationsverfahren im Vergleich zu einer Vollblutmethode neben der erhöhten Expression von Oberflächenantigenen auch eine signifikante Aktivierung des Oxidativen Burst demonstriert werden²⁹¹. Hingegen wurde die Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten nur unwesentlich beeinflusst.

Eine derartige Funktionsänderung neutrophiler Granulozyten steht im Zusammenhang mit der Wahl des Dichtegradienten, der zur Zellisolierung verwendet wird, und kann als toxische Schädigung der Zellen interpretiert werden. Insbesondere nach Isolierung über Ficoll, einem Sucrose-haltigen Dichtegradienten, wurde eine spontane Formänderung der Granulozyten, einhergehend mit einer erhöhten Zelladhäsion an Glasoberflächen und einer verminderten Chemotaxis beschrieben¹²⁸. Hingegen wurden nach Verwendung Sucrose-freier Gradienten, wie z. B. Percoll, keine adversen Effekte auf die Granulozytenfunktion beobachtet^{81; 128}. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte bei einer Zellisolierung mit Percoll-Gradienten auch keine vermehrte Expression von Komplementrezeptoren im Sinne einer Aktivierung der neutrophilen Granulozyten festgestellt werden²⁸. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde in der vorliegenden Untersuchung ein Sucrose-freier Dextran-

Gradient zur Isolierung der verschiedenen Leukozytenpopulationen eingesetzt, sofern die Anwendung einer Vollblutmethode nicht möglich war. Nach eigenen Untersuchungen beeinflusst Dextran selbst die Granulozytenfunktionen und die Expression von Oberflächenmolekülen nur unwesentlich³¹⁰.

Durch mechanische Manipulation während der Probenaufbereitung, aber auch durch wechselnde Temperaturen kann die Expression von Oberflächenrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten induziert werden¹⁰⁵. Damit stellt die Umgebungstemperatur einen weiteren Einflußfaktor auf die Aktivität neutrophiler Granulozyten dar. Durch das Aufarbeiten der Proben bei 4°C kann eine Induktion von Komplementrezeptoren *in vitro* zwar vermieden werden^{105 126; 305}, wechselnde Arbeitstemperaturen mit einer Erwärmung der Proben von 0 °C auf 37 °C erhöhen jedoch als Ausdruck der Zellaktivierung die Expression von CD11b- und CD35-Molekülen auf der Granulozytenoberfläche^{31; 323}. Daher wurden in der vorliegenden Untersuchung Vollblutaufarbeitung und Granulozytenisolierung bei Raumtemperatur durchgeführt und sämtliche Reagenzien auf 37°C vorgewärmt. Trotz dieser Maßnahmen ließ sich eine Aktivierung der Granulozyten bei der Zellseparation nicht immer vermeiden. Eine makroskopisch sichtbare Leukozytenaggregation korrelierte dabei mit einer gesteigerten IL-8-Transkription, so daß diese Zellsuspensionen nicht verwendet werden konnten.

Die Stimulation von Leukozyten mit LPS ermöglicht eine Beurteilung der zellulären Antwort auf proinflammatorische Reize. Unter der Annahme, daß Morphin- bzw. Ketamin-induzierte Veränderungen der Rezeptorenexpression die Grundlage für nachfolgende intrazelluläre Prozesse darstellen könnten, wurde auf eine nachfolgende Stimulation mit LPS oder anderen Substanzen verzichtet. Die intrazellulären Mechanismen, die durch eine solche Stimulation induziert werden, sind an leukozytären Zelllinien oder isolierten Blutzellen hinreichend dargestellt worden^{23; 140; 174; 180; 195}. Die Übertragung und Validierung dieser Prozesse im Rahmen eines Vollblutassays ermöglicht Rückschlüsse auf systemisch-entzündliche Vorgänge. Die Stimulation von Vollblut mit Entzündungsmediatoren wird daher zunehmend als *ex-vivo*-Modell für septische Krankheitsbilder angewandt^{29; 165; 187; 314}. Leukozyten üben ihre immunologischen Aufgaben durch Interaktionen mit dem vaskulären Endothel aus, wobei das Rolling, die Adhäsion und die nachfolgende Transmigration von Leukozyten von besonderer Bedeutung für die Rekrutierung in entzündete Gewebeareale ist²⁶⁸. Dieser Prozeß wird durch die Bindung leukozytärer Selektine und Integrine an Adhäsionsmoleküle der Endothelzelle vermittelt¹⁴⁸. Durch Untersuchungen an isolierten Zellpopulationen oder auch im Vollblut-Assay ist eine Bewertung dieser Interaktionen nicht möglich. Daher wird die Aussagekraft eines Vollblut-Assays durch das Fehlen einer endothelialen Oberfläche begrenzt.

4.1.2 Durchflußzytometrische Messung

Das mit dem Durchflußzytometer gemessene Streulicht ist abhängig von Form, Oberflächenstruktur sowie der intrazellulären Granularität der Zellen⁸⁰. Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten führt zwar zu morphologischen und strukturellen Veränderungen¹⁵⁰, eine Korrelation zwischen Vorwärtsstreulicht und Veränderungen von Zellform und Zellgröße, z. B. in Abhängigkeit von der Phagozytoseaktivität, ist jedoch nur eingeschränkt möglich⁸⁰. Die Messung des Streulichtes stellt somit keinen validen Parameter für die Beurteilung von Zellvolumen oder Zellform aktivierter neutrophiler Granulozyten dar¹⁷³.

Die Streulichtsignale von Monozyten und Granulozyten überschneiden sich in der Dot-Plot-Darstellung, so daß trotz entsprechender Eingrenzungen in der zweiparametrischen Darstellungsform eine vollständige Trennung beider Leukozytenpopulationen nicht immer gewährleistet werden kann^{225; 228}. Bei der durchflußzytometrischen Analyse von 10.000 Zellen im Auswertefenster für Granulozyten stellen die darin enthaltenen Monozyten nur einen minimalen Anteil dar und sind für die Bewertung der Fluoreszenzintensität der Granulozyten nur von untergeordneter Bedeutung²⁸⁰. Bei der Auswertung der Monozyten hingegen kann der hohe Anteil von Granulozyten die Meßergebnisse verfälschen, so daß in der vorliegenden Untersuchung die Auswertung der Oberflächenantigene für Monozyten nur durchgeführt wurde, wenn diese zweifelsfrei von der Granulozytenpopulation abgegrenzt werden konnte. Eine einwandfreie Trennung zwischen Monozyten und Granulozyten war für die Funktionsparameter „Phagozytose“ und „Oxidativer Burst“ nur in wenigen Fällen möglich, so daß hier auf eine Bewertung der Monozyten verzichtet wurde.

Die gemessenen Fluoreszenzsignale sind innerhalb einer Häufigkeitsverteilung um einen Mittelwert gestreut. Zur Auswertung der Fluoreszenzintensität können das geometrische Mittel, das arithmetrische Mittel oder der Median dieser Verteilung herangezogen werden. Im Vergleich mit dem arithmetrischen Mittelwert einer Normalverteilung zeigt der Median bei der statistischen Auswertung im Vergleich zum Mittelwert bei Meßwerten mit einer starken Streuung eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Ausreißern²⁴⁵. Obwohl die Zahlenwerte beider Parameter nur geringfügig voneinander abwichen, wurde in dieser Untersuchung der Median herangezogen, um bei mehreren Meßreihen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie eine hohe Präzision der Probenanalyse sicherzustellen. Dieser Auswertemodus erwies sich insbesondere bei der Bewertung der Phagozytose als vorteilhaft, da hier eine hohe interindividuelle Varianz beobachtet wurde. Hingegen wurde bei der Messung der Rezeptorenexpression aufgrund der geringen Standardabweichungen trotz einer Differenz von nur circa 10% gegenüber den Kontrollwerten das Signifikanzniveau erreicht.

4.1.3 Oberflächenrezeptoren, Phagozytose und Oxidativer Burst

Bei der durchflußzytometrischen Bestimmung der Oberflächenantigene resultiert die gemessene Fluoreszenz aus der Bindung von FITC-markierten Antikörpern an spezifischen und unspezifischen Bindungsstellen der Zellmembran sowie aus der von intrazellulären Flavoproteinen emittierten Spontanfluoreszenz einer Zelle^{55; 205}. Um diese unspezifische Autofluoreszenz zu eliminieren, wurde Vollblut in Kontrollansätzen mit unmarkiertem Antikörper inkubiert und die so ermittelte Fluoreszenzintensität von den Meßwerten der Proben abgezogen. Die verwendeten monoklonalen Antikörper zur Markierung der Oberflächenrezeptoren reagieren nach Angaben des Herstellers spezifisch mit dem entsprechenden Antigen, so daß unspezifische Bindungen vernachlässigt werden können. Durch eine Färbung der intrazellulären DNA mit Propidiumjodid lassen sich bei durchflußzytometrischen Messungen einzelne Zellen von Aggregationsartefakten oder Zellbruchstücken abgrenzen^{130; 218; 247}. Das rot fluoreszierende Propidiumjodid bindet dabei an die Kernfragmente von Zellen, deren Membran zuvor durch Lysieren permeabilisiert wurde²⁷⁹. Durch die Mehrfarbenfluoreszenzanalyse, einer kombinierten Messung der Grünfluoreszenz der FITC-markierten Antikörper und der Rotfluoreszenz des Propidiumjodids, wurde eine Differenzierung zwischen kernhaltigen Zellen und zellulären Fragmenten ermöglicht. Bei der durchflußzytometrischen Untersuchung von Vollblutproben gilt die präanalytische Lyse der Erythrozyten als Standard^{40; 235}. In der vorliegenden Studie wurde durch die lysierenden Substanzen Formaldehyd und Diglycol der FACS-Lysing-Solution® eine Permeabilisierung der Zellmembran erreicht, ohne daß die durchflußzytometrische Messung durch eine signifikante Reduktion der Anzahl neutrophiler Granulozyten bzw. ein Übermaß an Zellfragmenten verfälscht wurde^{40; 47}. Das Streulichtsignal der Granulozyten kann zwar durch diese Form der Lyse beeinflusst werden, das Fluoreszenzsignal der Zellen bleibt jedoch unverändert erhalten⁴⁰.

Während die Erfassung und Quantifizierung der Oberflächenrezeptoren ein durchflußzytometrisches Standardverfahren darstellt³¹, weisen die in dieser Studie verwendeten Messungen von Phagozytoseaktivität und Oxidativem Burst einige Besonderheiten auf. Die Phagozytose von Mikroorganismen durch Granulozyten stellt einen wichtigen Abwehrmechanismus gegen Krankheitserreger dar, während die Ingestion unbelebter Partikel hierbei nur eine sekundäre Rolle spielt. Daher wurde als Phagozytoseobjekt *Staphylococcus aureus* als Keim mit klinischer Relevanz gewählt. Im Gegensatz zu zahlreichen anderen Phagozytose-Assays wurden in der vorliegenden Studie vitale Bakterien verwendet, um möglichst physiologische Bedingungen *in vitro* zu erzielen²¹⁸. Dabei wurde in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen²¹⁹ eine maximale Aufnahme von *Staphylococcus aureus* durch neutrophile Granulozyten im Vollblut nach 10 bis 15

Minuten beobachtet, wobei etwa 90 bis 95 % der stimulierten Granulozyten eine meßbare Phagozytoseaktivität entwickelten.

Die berechnete Anzahl der während der Phagozytose aufgenommenen Bakterien pro neutrophilen Granulozyten lag in der vorliegenden Arbeit im Mittel bei 65 bis 70 Bakterien/PMN und war damit etwas höher als in früheren Studien ²¹⁸, in denen allerdings das Probandenkollektiv nicht näher definiert wurde. Aussagen über eine mögliche immunsuppressive medikamentöse Therapie oder Vorerkrankungen wurden nicht gemacht. In der vorliegenden Studie hingegen wurden ausschließlich Probanden aufgenommen, bei denen anamnestisch eine etwaige Beeinträchtigung des Immunsystems durch Nikotinkonsum, atopische Erkrankungen oder akute Infektionen ausgeschlossen werden konnte. Dennoch variierte die ermittelte Anzahl der ingestierten Bakterien stark. Da die durchflußzytometrisch ermittelte Phagozytoserate gut mit der fluoreszenzmikroskopisch ausgezählten Anzahl der phagozytierten Bakterien korreliert ²¹⁸, muß die hohe Standardabweichung bei den vorliegenden Ergebnissen als Ausdruck einer interindividuell stark differierenden Phagozytoseaktivität angesehen werden.

Bei der Probenaufarbeitung wurde Trypan-Blau-Lösung eingesetzt, um die Differenzierung zwischen extrazellulär adhärenenten und intrazellulär ingestierten Bakterien zu ermöglichen ²²⁰. Trypan-Blau induziert strukturelle Veränderungen der Granulozytenmembran, die zur Entfernung von an der Zelloberfläche gebundenen fluoreszierenden Bakterien führen. Dieser Vorgang wird als *Quenching* bezeichnet und eliminiert bei etwa 90% der Zellen die Oberflächenfluoreszenz, ohne daß die Messung der intrazellulären Fluoreszenz beeinflusst wird ²⁹⁵.

Durch die Phagozytose von opsonisierten Bakterien wird die membranständige NADPH-Oxidase aktiviert, die die Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite katalysiert ^{25; 220}. Dabei korreliert der Oxidative Burst mit der antibakteriellen Aktivität von neutrophilen Granulozyten, der Anstieg der reaktiven Sauerstoffmetabolite während der Phagozytose ist proportional zur Anzahl der aufgenommenen Bakterien ¹⁷³.

Der Oxidative Burst beginnt mit der Umwandlung von molekularem Sauerstoff in das Superoxid-Anion O_2^- und das Perhydroxyl-Radikal HO_2^\bullet . Diese Reaktion wird durch die NADPH-Oxidase katalysiert. Dabei werden im Rahmen der Granulozytenaktivierung membranständige und zytosolische Komponenten zum NADPH-Oxidase-Komplex zusammengefügt ³⁹, wodurch das Enzym aktiviert wird und nachfolgend Sauerstoff zu O_2^- reduziert werden kann. Im Phagosom wird das O_2^- -Anion spontan zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reduziert ²³⁰. Aus den azurophilen Granula wird das Enzym Myeloperoxidase freigesetzt, das die Bildung bakteriozider Oxidantien aus Cl^- und H_2O_2 katalysiert ²⁰¹.

Zur Bestimmung des Oxidativen Burst wurde in dieser Untersuchung eine Methode angewandt, die auf der intrazellulären Oxidation des nicht-fluoreszenten Dihydrorhodamin

123 (DHR 123) in das fluoreszierende Reaktionsprodukt Rhodamin 123 durch H_2O_2 basiert^{173; 237} und durch Myeloperoxidase katalysiert wird^{19; 296}. Im Vergleich mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen weist diese Reaktion in der durchflußzytometrischen Analyse eine hohe Sensitivität auf^{89; 302}. Dadurch wird eine Quantifizierung des Oxidativen Burst auch nach weniger potenten Stimuli ermöglicht²³⁷. Im Gegensatz hierzu stellt die Messung der Luminol-abhängigen Chemilumineszenz, der wohl am häufigsten angewandte Methodik zur Bestimmung des Oxidativen Burst in Leukozyten, nur eine semiquantitative Technik dar²²⁹.

Das ausgeglichene Ladungspotential der Plasmamembran ermöglicht den Einstrom von Dihydrorhodamin 123 aus dem Extrazellulärraum in den Intrazellulärraum. Dort wird durch elektrochemische Vorgänge die Molekülstruktur so verändert, daß das Rhodamin die Zelle nicht wieder verlassen kann²³⁸. Untersuchungen an den unterschiedlichen Granula neutrophiler Granulozyten zeigen, daß die Oxidation des Dihydrorhodamin durch H_2O_2 in den azurophilen Granulae stattfindet, da nur in diesem Zellkompartiment die Myeloperoxidase als das für diese Reaktion notwendige Enzym vorhanden ist^{132; 296}. Im Rahmen der Granulozytenaktivierung korreliert die Fluoreszenz des entstandenen Rhodamin 123 demzufolge mit der intrazellulären Bildung von H_2O_2 ²³⁸, während die Produktion vorgeschalteter NADPH-abhängiger reaktiver Sauerstoffmetabolite wie O_2^- und HO_2^* nicht erfaßt wird²⁹⁶.

Für die Verwendung von DHR zur durchflußzytometrischen Bestimmung des Oxidativen Burst sind hohe interindividuelle Schwankungen beschrieben worden²⁶², die die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Probanden sowie die statistische Auswertung erschweren²⁹⁶. In der hier vorliegenden Untersuchung hingegen betragen die Standardabweichungen der gemessenen Fluoreszenzen maximal 20 % des Mittelwertes. Die statistische Auswertung wurde dadurch auch bei unterschiedlichem Stichprobenumfang der Meßreihen nicht beeinträchtigt. In beiden zitierten Arbeiten wurde der Oxidative Burst mit PMA, FMLP oder opsonisiertem Zymosan an isolierten Leukozyten induziert, während in dieser Untersuchung Bakterien als physiologischer Stimulus in einem Vollblutassay eingesetzt wurden. Eine Veränderung des Phagozytoseverhaltens neutrophiler Granulozyten durch Dihydrorhodamin ist beschrieben^{89; 296}, wurde in anderen Arbeiten jedoch ausgeschlossen¹⁷⁹. In der vorliegenden Studie konnte eine eventuelle Beeinflussung der Phagozytoseaktivität durch Dihydrorhodamin ausgeschlossen werden, da dieses erst nach Induktion des Oxidativen Burst durch die Phagozytose von Bakterien zugesetzt wurde. Solche methodischen Unterschiede können zu der guten Reproduzierbarkeit der hier dargestellten Ergebnisse beitragen.

4.1.4 Durchflußzytometrische Bestimmung von Transkriptionsfaktoren im Vergleich zu EMSA und Western Blot

In der hier vorliegenden Untersuchung wurde erstmals ein durchflußzytometrisches Verfahren eingesetzt, um den Einfluß in der Anästhesie gebräuchlicher Anästhetika auf transkriptionelle Steuerungsvorgänge zu evaluieren. Das klassische Meßverfahren zur Bestimmung von transkriptionsregulierenden Proteinen basiert auf der Bindung eines radioaktiv markierten Oligonukleotids mit einer spezifischen Konsensussequenz an den in den Zellkern gewanderten Transkriptionsfaktor. Nach elektrophoretischer Auftrennung kann autoradiografisch der Anteil der gebundenen radioaktiven Sonde nachgewiesen werden. Dabei können in Abhängigkeit von ihrer Größe verschiedene Untereinheiten differenziert werden, die durch Inkubation mit einem entsprechenden Antikörper im sogenannten Supershift-Assay weiter spezifiziert werden können.

Die Bestimmung der NF- κ B-Aktivität in Leukozyten im Rahmen entzündlicher Prozesse wird dadurch erschwert, daß bei sämtlichen konventionellen Meßverfahren wie EMSA oder Western Blot eine Zellseparation erforderlich ist, um einzelne Leukozytenpopulationen selektiv untersuchen zu können. Wie bereits dargelegt, kann durch diese Isolierungsprozesse der Aktivitätszustand der Leukozyten verändert werden, so daß die Interpretation dieser Daten erschwert wird. Trotz der Verwendung verschiedener Isolationsverfahren kann eine Aktivierung insbesondere der Granulozyten nicht immer vermieden werden, so daß z. B. eine inhibitorische Wirkung von Morphin im nachfolgenden Experiment nicht mehr dargestellt werden kann. Die Quantifizierung von Konzentrations- bzw. Aktivitätsänderungen in einer Größenordnung von bis zu 50% ist aufgrund dieser methodologischen Probleme nur eingeschränkt möglich.

Im Gegensatz dazu ermöglicht die in dieser Untersuchung angewandte durchflußzytometrische Methodik eine quantitative Darstellung des DNA-gebundenen NF- κ B-Gehaltes in polymorphkernigen Granulozyten und Monozyten. Diese beiden Leukozytenpopulationen können durch entsprechende Zytometereinstellungen zuverlässig voneinander abgegrenzt werden¹⁰⁶. Die Anwendung eines Vollblutassays ermöglicht zudem die Inkubation von Blutzellen in einem physiologischen Medium, in dem zelluläre Regulationsmechanismen erhalten bleiben³¹⁴. Durch Stimulation mit LPS konnte die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 sicher induziert werden. Vermehrt wird eine solche Stimulation von Vollblut mit LPS auch als *ex-vivo*-Modell der Sepsis angewandt^{91; 154; 187}.

Eine Validierung dieser Methodik wurde bislang jedoch nur insofern durchgeführt, als eine durch LPS induzierte Translokation von NF- κ B in den Nukleus beschrieben wurde, die durch klassische NF- κ B-Inhibitoren gehemmt werden kann¹⁰⁶. Der direkte Vergleich einer

durchflußzytometrischen Messung mit den konventionellen Methoden EMSA und Western Blot fehlte jedoch bislang. In der nun vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, daß beide Methoden an monozytären und granulozytären Zelllinien qualitativ und quantitativ vergleichbare Ergebnisse liefern. Sie stimmen zudem mit den im Vollblut gefundenen Veränderungen an Granulozyten und Monozyten überein.

Die klassische NF- κ B-Bestimmung in neutrophilen Granulozyten mittels EMSA wird dadurch erschwert, daß bei der Proteinextraktion Proteinasen aus den intrazellulären Granula freigesetzt werden, die die NF- κ B-Untereinheiten proteolytisch spalten¹⁹⁵. Ähnliche Degradationsprozesse durch endogene Proteinasen sind auch für weitere Transkriptionsfaktoren, wie z. B. STAT beschrieben worden¹⁹⁵. Durch den Zusatz spezieller Antiproteinase wie DFP kann eine Spaltung zwar weitgehend verhindert werden^{195; 282}, falsch negative oder sehr niedrige NF- κ B-Konzentrationen können jedoch insbesondere die quantitative Auswertung der Ergebnisse erschweren. Bei der in dieser Untersuchung angewandten durchflußzytometrischen Technik bleibt trotz Permeabilisierung der Zellmembran die Struktur der Zellorganellen erhalten, so daß eine Proteolyse von Transkriptionsfaktoren vermieden werden kann. Dieser methodische Vorteil sowie die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ermöglichen eine verlässliche Quantifizierung der beobachteten Veränderungen.

Ein weiterer Vorteil der durchflußzytometrischen Bestimmung von Transkriptionsfaktoren liegt in dem geringen Probenvolumen von 100 μ l Vollblut, mit dem die Analyse durchgeführt werden kann. Im Gegensatz dazu werden zur Durchführung des EMSA mindestens 10^6 Zellen benötigt, um eine ausreichende Menge von Proteinen extrahieren zu können. Für die Gewinnung dieser Anzahl von Granulozyten sind ca. 10 ml Vollblut erforderlich. Somit könnte das durchflußzytometrische Meßverfahren in Zukunft für das Screening von Patienten oder den Einsatz im Kleintierversuch an Bedeutung gewinnen.

Für den konventionellen Nachweis der Bindung von DNA an Transkriptionsfaktoren ist die Markierung des Oligonukleotides entweder mit radioaktivem Phosphor oder mit Digoxigenin erforderlich. Das Arbeiten mit Isotopen unterliegt nicht nur gewissen Sicherheitsvorschriften, sondern kann zudem gesundheitliche und ökologische Risiken mit sich führen. In einem vergleichsweise zeitaufwendigen Verfahren kann alternativ das Oligonukleotid mit Digoxigenin markiert und anschließend durch Blotting mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Im Vergleich hierzu stellt die durchflußzytometrische Analyse eine zeitsparende Bestimmung von Transkriptionsfaktoren dar, die ohne den Einsatz von Isotopen innerhalb von drei Stunden durchgeführt werden kann.

Durch den Einsatz verschiedener Antikörper, die spezifisch mit einer Untereinheit des Transkriptionsfaktors reagieren, kann die Zusammensetzung der nukleären Heterodimere nachgewiesen werden. Die Spezifität der in dieser Studie verwendeten polyklonalen

Antikörper wurde durch den Nachweis einer singulären Bande, die mit der Größe des entsprechenden Proteins korrelierte, im Western Blot überprüft. Im Vergleich zu der beschriebenen durchflußzytometrischen Methode stellt jedoch der Supershift-Assay, bei dem der Nachweis des radiokativ markierten Oligonukleotides mit der Bindung eines entsprechenden Antikörpers und entsprechend verzögerter elektrophoretischer Auftrennung des Oligonukleotid-Protein-Antikörper-Komplexes kombiniert wird, ein wesentlich spezifischeres Verfahren dar.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Morphin-induzierte Immunmodulation

Zahlreiche Immunfunktionen werden durch Opiate und Opioidpeptide beeinflusst^{21; 276; 293}. Eine immunsuppressive Wirkung wird insbesondere nach längerer Therapie mit Morphinsulfat¹³⁵ und bei Heroinabhängigen¹³⁷ beobachtet und umfaßt neben Funktionseinschränkungen von Leukozyten auch inhibitorische Effekte auf Splenozyten und Thymozyten^{241; 260}. Die Signaltransduktionswege und die intrazellulären Mechanismen, die an der Morphin-induzierten Immunsuppression beteiligt sind, konnten bislang nur unzureichend aufgeklärt werden.

4.2.1.1 Veränderungen der Granulozytenfunktion durch Morphin

Der Einfluß von Morphin auf die Funktion von zirkulierenden Blutzellen ist Gegenstand zahlreicher Studien. Während einige Untersuchungen keinen Einfluß von Morphin auf Chemilumineszenz³¹³, Adhärenz¹⁶¹ und Phagozytoseleistung²⁰³ neutrophiler Granulozyten zeigen konnten, wiesen andere Studien inhibitorische Effekte von Morphin auf die Funktion sämtlicher Leukozytensubpopulationen^{21; 186; 221; 292; 294} nach. Diese Funktionseinschränkungen werden als Basis für das häufige Auftreten bakterieller Infektionen bei Opiatabhängigen angesehen²⁹³ und wirken als Kofaktor in der Pathogenese von AIDS in diesem Patientenkollektiv²²³. Dennoch sind die intrazellulären Mechanismen, die zu diesen Veränderungen beitragen, weitgehend unbekannt. Insbesondere die Beteiligung von Oberflächenrezeptoren, die für die Vernichtung von Pathogenen von Bedeutung sind, ist unzureichend untersucht.

4.2.1.2 Veränderungen funktionsrelevanter Oberflächenrezeptoren durch Morphin

Basierend auf den bereits bekannten und in dieser Studie bestätigten inhibitorischen Effekten von Morphin auf granulozytäre Phagozytoseleistung und Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite⁵⁴ wurden in unserer Untersuchung zunächst Veränderungen in der Expression von Oberflächenrezeptoren als möglicher kausaler Faktor für die Morphin-bedingten Funktionseinschränkungen von Granulozyten analysiert. Dabei konnte eine zeit- und konzentrationsabhängige Reduktion von Oberflächenrezeptoren beobachtet werden, die in ihrem Ausmaß mit einer Einschränkung von Phagozytose und Burst als nachgeschalteten Vorgängen korrelierte. Erstmals konnte damit eine verminderte Expression von

Oberflächenrezeptoren als möglicher kausaler Mechanismus für die Morphin-assoziierten Veränderungen der Granulozytenfunktion definiert werden.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen beobachtete Marcoli et al.¹⁸⁶ weder Veränderungen in der Expression von Komplementrezeptoren noch von Adhäsionsmolekülen auf polymorphkernigen Granulozyten nach Inkubation mit 0,2 µM Morphin. Im Widerspruch hierzu wurde in derselben Arbeit jedoch eine Naloxon-reversible Inhibierung von Granulozytenmigration und -aggregation beschrieben. Methodische Unterschiede, insbesondere die Wahl der Expositionszeiten und die Präparation der Zellsuspensionen könnten diese differenten Ergebnisse erklären: In unseren Experimenten wurde erst nach einer Inkubationszeit von 2,5 Stunden die Expression von Oberflächenmolekülen um mehr als 10% reduziert.

In einer weiteren Studie wurde durchflußzytometrisch untersucht, inwiefern eine einmalige subkutane Gabe von Morphin die Verteilung unterschiedlicher Leukozytensubpopulationen in der Milz beeinflusst⁹³. Trotz einer Inhibierung der Lymphozytenproliferation und -zytotoxizität war weder die Gesamtzahl von Leukozyten, noch die Verteilung von T- und B-Lymphozyten noch die relative Anzahl von CD11b/c(+)HIS48(-)-Monocyten/Makrophagen bzw. CD11b/c(+)HIS48(+) Granulozyten in der Milz verändert. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen weisen unsere Beobachtungen darauf hin, daß nach einer einmaligen Morphingabe die funktionellen Veränderungen von Immunozyten nicht durch eine Umverteilung, sondern vielmehr durch direkte zelluläre Effekte hervorgerufen werden.

In einer Studie an Mäusen war die Implantation eines Morphin-Pellets mit einer Reduktion von spezifischen T-Zell-Oberflächenmarkern assoziiert¹⁵². Diese Veränderungen konnten 24 Stunden nach Implantation des Morphin-Pellets mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern durchflußzytometrisch bestimmt werden und waren über drei Tage nachweisbar. In unseren Ergebnissen mit einer Expositionszeit von maximal 2,5 Stunden wurde möglicherweise das volle Ausmaß der Morphin-induzierten Funktionsstörungen noch nicht erfaßt. Somit sind weitere Untersuchungen zur Charakterisierung von Oberflächenmarkern auf Monozyten und Granulozyten nach mehrstündiger oder chronischer Morphin-Exposition gerechtfertigt.

4.2.1.3 Hemmung der Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 durch Morphin

In der vorliegenden Untersuchung konnte eine konzentrations- und zeitabhängige Inhibierung der LPS-induzierten NF-κB- und AP-1-Aktivität durch Morphin nachgewiesen werden. Der Einfluß von Morphin auf transkriptionelle Regulationsmechanismen wurde bislang nur in wenigen Untersuchungen evaluiert, wobei große Unterschiede in den angewandten Methoden bestehen. In einer Untersuchung an isolierten Peritonealmakrophagen der Maus wurde eine differentielle Wirkung von Morphin auf die NF-

κ B-Bindungsaktivität festgestellt ²³⁹: Während die Inkubation mit 50 μ M Morphin zu einer Inhibierung von NF- κ B führte, wurde nach Inkubation mit 50 nM eine Aktivitätszunahme beobachtet, die mit einer gesteigerten Produktion von IL-6 und TNF- α einherging. Nicht untersucht wurde jedoch, ob Morphin allein ohne konsekutive LPS-Stimulation in dieser Dosierung zu einer NF- κ B-Aktivierung führen kann. Zudem wurde eine komplette Suppression der NF- κ B-Bindungsaktivität nach Vorbehandlung mit 50 μ M Morphin festgestellt. Im Gegensatz hierzu konnten wir bei dieser Morphin-Konzentration maximal eine 50-%ige Hemmung dieses Transkriptionsfaktors nachweisen. Das Ausmaß dieser Inhibierung korreliert dabei gut mit den Veränderungen der Rezeptorenexpression. Unterschiede in der Durchführung der Experimente könnten die gegensätzlichen Effekte nach Inkubation mit der niedrigsten Dosierung von 50 nM Morphin im Vergleich zu den hier vorgestellten Ergebnissen erklären: Die Konzentration von LPS zur Induktion der NF- κ B-Aktivität war mit 10 μ g/ml um den Faktor 100 höher als in unseren Experimenten.

Eine weitere Studie, die den Einfluß von Morphin und seinem synthetischen Derivat KT-90 auf AP-1- und NF- κ B-Aktivität in verschiedenen Tumorzelllinien beschreibt, führt die krebshemmende Wirkung dieser Substanzen auf eine proapoptotische Wirkung zurück, die mit einer NF- κ B-Inhibierung assoziiert ist ²⁸¹. Dieser Morphineffekt wurde in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 4 mM beobachtet, der klinisch relevante ¹⁴ oder im Tierexperiment nachgewiesene Spiegel ¹⁷¹ um mehr als 1000-fach überschreitet. Im Gegensatz zu der Arbeit von Roy et al. ²³⁹ wurde eine nahezu komplette Inhibierung der NF- κ B-Aktivität in HL-60-Zellen erst nach Inkubation mit 4 mM Morphin erzielt. Als möglicher Wirkmechanismus wäre eine Stabilisierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B α denkbar, die durch Stickstoffmonoxid vermittelt wird ²¹⁷. Eine solche Stabilisierung von I κ B α wird 30 Minuten nach Freisetzung von endogenem oder exogenem NO beobachtet ²¹⁷, während die hemmenden Effekte von Morphin auf NF- κ B erst nach längeren Inkubationszeiten erzielt werden. In unseren Experimenten konnte die Behandlung mit Morphin eine Degradation von I κ B α nicht verhindern oder abschwächen. Nach 24-stündiger Stimulation mit LPS bei Morphin-vorbehandelten Makrophagen wurde eine höhere I κ B α -Konzentration ermittelt ²³⁹, die jedoch weniger auf eine direkte Stabilisierung des Inhibitors als auf einen indirekten, mit der Neusynthese von I κ B α einhergehenden Prozeß zurückgeführt werden muß.

Unsere Untersuchungen stellen erstmals den inhibitorischen Einfluß von Morphin auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 in humanen Granulozyten und Monozyten dar. Bislang wurde in lymphoiden Zellen der Einfluß von Morphin auf die Bindungsaktivität von AP-1 und die Transkriptionsrate des IL-2-Gens bestimmt ²⁴¹, um die molekularen Mechanismen der proliferationshemmenden Effekte von Morphin auf diese Zellen ²¹ zu charakterisieren. Dabei konnte eine signifikant geringere AP-1-Aktivität in nukleären

Extrakten von Morphin-behandelten Thymozyten festgestellt werden, die mit einer verminderten Transkriptionsrate des IL-2-Gens und konsekutiv verminderter IL-2-Synthese einhergingen. Diese Veränderungen waren mit einer selektiven Hemmung der c-fos-Expression assoziiert, die die Basis für den inhibitorischen Effekt von Morphin auf die AP-1-Aktivität darstellen könnte. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung zeigen, daß die inhibitorische Wirkung von Morphin auf die AP-1-Aktivität nicht nur auf lymphoide Zellen beschränkt ist, sondern ebenfalls in Monozyten und Granulozyten des zirkulierenden Blutes beobachtet werden kann.

Wie in den hier vorliegenden Untersuchungen dargestellt werden konnte, spielt die zur Stimulation verwendete LPS-Konzentration nicht nur eine Rolle für das Ausmaß der proinflammatorischen Antwort, sondern beeinflusst zudem die Effektivität von immunoinhibitorisch wirksamen Substanzen. Nach Stimulation mit der niedrigeren Konzentration von 10 ng/ml LPS war die Aktivität beider gemessenen Transkriptionsfaktoren geringer, zugleich war jedoch der inhibitorische Effekt von Ketamin deutlicher ausgeprägt. Konzentrations- und Zeitkurven für die Effektivität von LPS zur Induktion inflammatorischer Prozesse in Granulozyten sind beschrieben, wobei eine maximale Stimulation in Abhängigkeit von der LPS-produzierenden Bakterienspezies nach 100 bis 500 ng/ml LPS erzielt wird ²⁸². Allerdings liegen diese LPS-Konzentrationen über dem pathophysiologisch relevanten Bereich, wie in Experimenten an Primaten ³¹¹ und anhand von Plasmaproben septischer Patienten ^{24; 246} ermittelt wurde. Die ideale LPS-Inkubationszeit zur Induktion von Transkriptionsfaktoren wird mit 30 bis 60 Minuten angegeben ^{106; 282}, nach zwei Stunden ist die Bindungsaktivität beider Transkriptionsfaktoren bereits wieder signifikant abgesunken.

4.2.1.4 Opiatrezeptoren und Morphin-induzierte Immunmodulation

Die strukturellen und stereochemischen Besonderheiten, die mit der analgetischen Wirkung von Morphin und verwandten Opioiden in Verbindung stehen, bilden die Grundlage für das heutige Opiat-Rezeptor-Modell. Basierend auf dualen Effekten synthetischer Opioide, die zum einen Morphin-antagonistisch wirken, zum anderen jedoch selbst analgetische Effekte haben, wurde die Existenz verschiedener Opiat-Rezeptor-Subtypen postuliert ¹⁸⁹. In den letzten 20 Jahren wurden verschiedene Klassen von Opiat-Rezeptoren beschrieben und als μ -, δ - und κ -Rezeptoren definiert. Die Gene, die diese Rezeptoren kodieren, konnten mittlerweile identifiziert und geklont werden ¹⁹⁰. Alle Opiatrezeptoren stellen 7-Helix-Rezeptoren dar, die mittels Pertussis-Toxin-sensitiver G-Proteine Signale auf Ionenkanäle oder Enzymsysteme übertragen ²²⁴.

Pharmakologische Studien konnten zeigen, daß nicht nur eine Vernetzung von zentralnervösen und immunologischen Vorgängen für die Opiat-induzierte Immunmodulation

von Bedeutung ist ²²², sondern daß Opiate und Opioidpeptide auch direkt auf Zellen des Immunsystems wirken ²⁵⁸. Diese Beobachtung konnte durch den molekularbiologischen Nachweis von Opiat-Rezeptor-Transkripten in Immunzellen untermauert werden ^{57; 58; 111}. Weitergehende Untersuchungen belegen einen differenten Einfluß der verschiedenen Opiat-Rezeptoren: Klassische δ -Rezeptor-Agonisten stimulieren T- und B-Zellen ^{208; 254}, aktivieren Granulozyten ^{121; 274} und steigern die Chemotaxis in Monozyten ²⁴⁴. Dagegen inhibieren überwiegend μ -agonistisch wirkende Substanzen wie Morphin die Funktion von mononukleären Zellen ²²¹ und Granulozyten ²⁷³. Die durch diese Opiatrezeptoren vermittelten Effekte können durch selektive δ - bzw. μ -Antagonisten geblockt werden ^{119; 259}.

In Übereinstimmung mit zahlreichen anderen Untersuchungen ^{119; 120; 273} und als Ausdruck eines Opiat-Rezeptor-vermittelten Prozesses zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse eine Reversibilität der Morphin-induzierten Hemmung mono- und granulozytärer Funktionen durch Naloxon. Gemeinsam mit immunologischen Verfahren und Bindungsstudien ²⁷⁰ bildet die Klonierung und Sequenzierung eines mit dem zerebralen μ -Rezeptor identischen Transkripts in Peritonealmakrophagen der Ratte die Grundlage für diese Beobachtung ²⁵². Im Bindungsstudien konnte eine im Vergleich zu zentralnervösen μ -Rezeptoren hohe Selektivität des μ -Rezeptors auf Monozyten und Granulozyten für Morphin dargestellt werden, so daß dieser immunozytäre μ -Rezeptor als μ_3 -Rezeptor-Subtyp klassifiziert wurde ^{184; 270}. Aufgrund der mangelnden Affinität dieses Rezeptors für Opioidpeptide wird zwischen einem Opiatalkaloid-sensitiven, aber Opioidpeptid-insensitiven, immunoinhibitorischem μ_3 -Rezeptor und einem Opiatalkaloid-insensitiven, aber Opioidpeptid-sensitiven δ_2 -Rezeptor, der stimulierende Signale vermittelt, unterschieden ¹⁸⁴. Dabei zeigt die Morphin-Bindungsstelle auf Granulozyten eine sehr geringe Affinität für δ -Antagonisten, so daß eine δ -Rezeptor-vermittelte Wirkung von Morphin auf Granulozyten eher unwahrscheinlich erscheint. Als weiterer Hinweis auf eine μ -Rezeptor-abhängige Inhibierung der Granulozytenfunktion konnte in unserer Untersuchung keine inhibitorische Wirkung von Morphin auf U937-Zellen, die den μ -Rezeptor nicht exprimieren, festgestellt werden. Auch in der HL-60-Zelllinie wurden immunsuppressive Effekte von Morphin erst nach einer Differenzierung der Zellen mit Retinolsäure und Ausprägung eines granulozytären Phänotyps beobachtet. Die zur Differenzierung der HL-60-Zellen eingesetzten Substanzen PMA und Retinolsäure modulieren jedoch auch die Aktivität von Transkriptionsfaktoren ^{7; 115}. Die Übertragung der Morphin-Wirkungen auf ein Zellmodell und die Interpretation der in diesem Modell erhobenen Ergebnisse wird dadurch stark erschwert. Inwieweit die Expression des μ -Rezeptors Ausdruck des Differenzierungsgrades ist und ob eine mögliche Regulation von Zellwachstum und Apoptose durch diesen Rezeptor vermittelt wird und mit einer Modulation von Transkriptionsfaktoren in Zusammenhang steht, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Durch Tierexperimente mit Knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, daß der μ -Opiat-Rezeptor (MOR) eine entscheidende Rolle bei der Opiat-vermittelten Immunsuppression spielt ¹¹²: Genetisch manipulierte Mäuse mit nicht funktionsfähigem μ -Rezeptor unterschieden sich ohne Behandlung mit Morphin in ihren immunologischen Funktionen nicht vom Wildtyp, so daß eine direkte immunologische Funktion des μ -Rezeptorproteins ausgeschlossen werden kann. Durch chronische Morphingabe wurde jedoch in den nicht manipulierten Mäusen eine Atrophie der lymphoiden Organe, eine verminderte CD4/CD8 T-Zell-Ratio im Thymus und eine stark reduzierte NK-Zell-Aktivität induziert. Diese Effekte konnten in mutierten Tieren nicht nachgewiesen werden, so daß der μ -Rezeptor als eine wesentliche Schnittstelle für die Effekte von Morphin auf das Immunsystem angesehen werden muß. Weitere Studien an MOR-defizienten Mäusen konnten zeigen, daß diese Rezeptorenklasse zudem für die Morphin-induzierte Analgesie und physische Abhängigkeit verantwortlich ist ¹⁹¹. Bei der Applikation von Morphin zur Schmerztherapie oder von anderen an diesem Rezeptor angreifenden Substanzen, wie z. B. Methadon zur Substitutionsbehandlung bei Opiatabhängigen, muß daher eine maßgebliche Beeinflussung des Immunsystems in Betracht gezogen werden.

4.2.1.5 Rolle von NO in der Morphin-induzierten Immunsuppression

Stickstoffmonoxid stellt ein wichtiges Molekül in der Signaltransduktion sowohl im Immun- und Nervensystem als auch bei kardiovaskulären Steuerungsvorgängen dar ²⁷¹. Die Synthese von NO aus L-Arginin wird durch das Enzym NO-Synthase katalysiert ³⁰³. Verschiedene Isoformen dieses Enzyms konnten charakterisiert werden, nämlich endotheliale, neuronale und induzierbare NOS, wobei die ersten beiden konstitutiv exprimiert werden und Calcium-abhängig sind, während die iNOS durch Entzündungsmediatoren induziert wird und Calcium-unabhängig ist ³⁰³. Die konstitutiv exprimierte Isoform cNOS produziert NO im nanomolaren Bereich, während iNOS mikromolare Konzentrationen von NO über einen deutlich längeren Zeitraum hinweg produzieren kann ²⁷¹.

Eine hemmende Wirkung von NO auf die Phagozytoseaktivität und den Oxidativen Burst neutrophiler Granulozyten konnte durch Inkubation mit NO-Donoren dargestellt werden ^{59; 103; 104}. Ferner konnte gezeigt werden, daß Morphin eine Freisetzung von NO in verschiedenen Zellarten, darunter Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, Mikroglia und Endothelzellen induziert ^{94; 183; 272}. Die Freisetzung von NO durch Morphin war mit Konformationsänderungen dieser Zellen assoziiert, wobei spontan aktivierte Zellen von einer amöboiden Form in eine inaktive, runde Form überführt wurden ^{183; 272}. Eine Präinkubation mit NOS-Inhibitoren oder Naloxon schwächte diesen Effekt signifikant ab. In Erweiterung dieser Aussage konnte in der hier vorliegenden Untersuchung gezeigt werden, daß diese Morphin-induzierten und NO-

abhängigen Effekte nicht nur auf Konformationsänderungen beschränkt sind, sondern auch eine Inhibierung der granulozytären Rezeptorenexpression und Funktion umfassen.

Mehrere Studien legen dar, daß NO die Funktion und die Bindungsfähigkeit von granulozytären Oberflächenrezeptoren beeinträchtigt ^{17; 162; 290}. Die Adhäsionsfähigkeit von Granulozyten, die insbesondere durch Mitglieder der β_2 -Integrine CD11a/CD18, CD11b/CD18 und CD11c/CD18 vermittelt wird, konnte durch zweiminütige Inkubation mit NO-Donoren gehemmt werden ¹⁷. Die effektiven NO-Konzentrationen lagen dabei zwischen 14 und 56 nM NO/min und liegen damit in dem Bereich, der nach Zugabe von Morphin zu isolierten Granulozyten beobachtet wird ¹⁸³ und Ausdruck einer cNOS-Aktivierung ist ²⁷¹. In der hier vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, daß die Morphin-induzierte NO-Freisetzung nicht nur die Expression von Integrinen, sondern auch von Komplement- und Fc γ -Rezeptoren auf der Oberfläche von Granulozyten reduziert. Diese Inhibierung kann einen kausalen Faktor für die Morphin-bedingte Einschränkung der Phagozytoseaktivität und der Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite darstellen. Zudem vermitteln Integrine in Kooperation mit endothelialen Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 die Adhäsion von Leukozyten am Gefäßendothel. Dieser Vorgang kann durch Inkubation mit NO-Donoren geblockt werden, wie in einer Studie an postischämischen Mesenterialgefäßen der Katze gezeigt wurde ¹⁶². In Endothelzellen wird zudem in einem NO-abhängigen Prozeß die Expression von Adhäsionsmolekülen ^{151; 257} reduziert, wobei die Hemmung von NF- κ B eine entscheidende Rolle spielt. NO inhibiert die transkriptionelle Aktivierung in einer Vielzahl von Zelltypen, darunter Monozyten, Mikroglia und Endothelzellen. NO und NO-Donoren aktivieren dabei den I κ B α -Promotor, so daß über eine vermehrte *de-novo*-Synthese dieses NF- κ B-Inhibitors dessen transkriptionelle Aktivität gehemmt wird ²⁶⁶. Unterstützend wirkt in den Zellkern transloziertes I κ B α inhibitorisch auf die NF- κ B-abhängige Gentranskription, ein Prozeß, der durch endogenes NO und NO-Donoren verstärkt wird ²⁶⁷. NO stabilisiert zudem I κ B α im Zytosol, wodurch dessen Phosphorylierung und anschließende Degradierung verhindert wird ²¹⁷. In unseren Experimenten konnte durch Morphin-Inkubation eine Degradierung von I κ B α nicht verhindert werden, so daß die inhibitorische Wirkung von Morphin auf die transkriptionelle Aktivität möglicherweise überwiegend durch eine *de-novo*-Synthese von I κ B α oder anderen, I κ B α -unabhängigen Vorgängen bedingt wird ⁷⁰. Für beide Transkriptionsfaktoren wurde jedoch auch eine stimulierende Wirkung von NO beobachtet, die dem Peroxynitrit, einem Reaktionsprodukt aus NO und Superoxidanionen, zugeschrieben wird ³⁰¹.

Zahlreiche Untersuchungen zeigen eine direkte Interaktion zwischen NO und DNA. Dabei sind mutagene ³¹⁷ und proapoptotische ¹⁷⁵ Wirkungen sowie eine Beeinträchtigung von DNA-Reparaturmechanismen ¹⁷⁰ insbesondere durch die NO-Stoffwechselprodukte Peroxynitrat und NO-Sauerstoff-Radikale beschrieben, während NO selbst zytoprotektiv wirkt und die

Zellschäden durch Sauerstoffradikale limitieren kann³¹⁶. Mittels rekombinantem NF- κ B p50-Protein konnte ein direkter inhibitorischer Effekt von NO auf die DNA-Bindungsaktivität der p50-Untereinheit nachgewiesen werden¹⁹², wobei die S-Nitrosylierung des an der DNA-Bindung beteiligten Cystein-Rests C62 eine kausale Rolle spielt. Für die AP-1-Untereinheit c-jun hingegen konnte eine Inhibierung der DNA-Bindungsaktivität aufgrund von Nitrosylierungsvorgängen nicht nachgewiesen werden⁷⁴. Eine Modulation der AP-1-Aktivität durch NO ist jedoch beschrieben^{114; 285}, wobei ein inhibierender Effekt auf der Interaktion von NO und Cysteinresten beruht²⁰⁶.

Die mehrstündige Präinkubationszeit mit Morphin, die in unseren Experimenten erforderlich war, um eine signifikante Reduktion der NF- κ B-Aktivität zu erzielen, weist darauf hin, daß neben direkten Interaktionen von durch Morphin freigesetztem NO mit der DNA-Bindungsstelle der NF- κ B-Subeinheiten möglicherweise komplexere intrazelluläre Vorgänge, wie Internalisierung oder Shedding von Rezeptoren, Aktivierung oder Inhibierung von Enzymkaskaden wie z.B. dem System der Mitogen-aktivierten Kinasen oder auch die *de-novo*-Synthese von Proteinen eine Rolle spielen könnten.

Im Gegensatz hierzu war die Hemmung der LPS-induzierten AP-1-Aktivität durch Morphin bereits nach 10 Minuten hochsignifikant und durch NOS-Inhibitoren reversibel. Die Dauer der Inkubationszeit spielt offensichtlich für die Morphin-abhängigen Effekte auf AP-1 eine untergeordnete Rolle, so daß die oben dargestellten direkten, NO-vermittelten intrazellulären Prozesse für diese AP-1-Inhibierung von Bedeutung sein könnten.

4.2.1.6 Einfluß von Morphin auf die IL-8-Produktion

Der Einfluß von Morphin auf die Produktion von Entzündungsmediatoren in Leukozyten ist nur unzureichend untersucht. Dabei wurde eine hemmende Wirkung von Morphin auf die TNF- α - und IL-1-Produktion in stimulierten Peritonealmakrophagen und mononukleären Zellen beobachtet^{30; 52}. Dieser Effekt war nicht Naloxon-reversibel und erforderte Morphin-Konzentrationen bis zu 1mM. Hingegen konnte gezeigt werden, daß Morphin die Produktion von TGF- β , einem antiinflammatorischen Mediator in LPS-stimulierten mononukleären Zellen, potenziert⁵¹.

Überraschenderweise wurde in unserer Untersuchung im Vollblut keine Hemmung der IL-8-Synthese durch Morphin gefunden, obwohl die Bindungsaktivität von NF- κ B und AP-1, die als wesentliche Faktoren für die transkriptionelle Regulierung der IL-8-Synthese angesehen werden^{204; 232}, durch Morphin gehemmt wurde. Im Gegenteil, Morphin führte tendentiell zu einer Steigerung der IL-8-Sekretion nach Stimulation von Vollblut mit LPS. Interessanterweise wurden nach Inkubation mit dem NO-Donor SNAP ähnliche Effekte erzielt.

Diese Ergebnisse scheinen im Widerspruch zu anderen Studien zu stehen, die an Endothelzellen eine Suppression von IL-8-mRNA¹⁰⁷ durch NO und eine konsekutiv verminderte IL-8-Sekretion⁷¹ nachweisen konnten. Die Hemmung der IL-8-Produktion wird dabei in engem Zusammenhang mit einer NO-abhängigen Inhibierung von NF-κB gesehen¹⁰⁷. Weitere NF-κB-abhängige Proteine, wie z.B. iNOS, können in ihrer Expression auf transkriptioneller Ebene durch NO^{60; 226} und somit auch durch NO-Donoren wie Morphin⁹⁷ geblockt werden.

Andere Studien hingegen weisen auf einen stimulierenden Einfluß von NO auf die IL-8-Produktion hin^{12; 298}. Insbesondere im Vollblutssystem konnte ein stimulierender Einfluß von NO auf die Sekretion von IL-8 nachgewiesen werden^{67; 96; 299}. Vergleichbar mit unseren Experimenten an Vollblut bewirkte SNAP in einer Untersuchung an isolierten PMN⁶³ tendentiell eine Steigerung der LPS-induzierten IL-8-Produktion. Nach Zusatz von N-Acetylcystein, einer Substanz, die die Verfügbarkeit von NO erhöht, steigerte SNAP signifikant sowohl die Produktion von IL-8-mRNA als auch die Sekretion dieses Mediators nach LPS-Stimulation²⁹⁹. In Übereinstimmung hiermit konnte im Vollblut durch den NOS-Inhibitor L-NAME die IL-8-Genexpression und -Produktion nach LPS-Stimulation reduziert werden²⁹⁹. Im Gegenzug hemmt IL-8 die Expression von iNOS²⁶⁵, dem wichtigsten Produzenten von NO unter pathophysiologischen Bedingungen¹⁵⁵.

Die exakten intrazellulären Mechanismen, die diesen kontrovers erscheinenden Ergebnissen zugrunde liegen, sind derzeit ungeklärt. Zahlreiche Studien haben den sogenannten *oxidativen Stress*, ein Zustand, der mit einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite einhergeht, als Aktivator von NF-κB und als Induktor für die nachfolgende Produktion von IL-8 identifiziert^{8; 18; 73; 231; 233; 249}. Radikalfänger blocken, H₂O₂ verstärkt die LPS-induzierte IL-8-Produktion im Vollblut⁷². Diese Effekte könnten durch die Reaktion von Superoxid und NO zu Peroxynitrit, einem hochreaktiven Oxidans, das oxidativen Stress induzieren und somit die Produktion von IL-8 als Antwort auf eine LPS-Stimulation von Vollblut verstärken kann, erklärt werden⁹⁶. Aufgrund der Fähigkeit von neutrophilen Granulozyten und Monozyten, nach entsprechender Stimulation große Mengen reaktiver Sauerstoffmetabolite zu produzieren, könnte die Inkubation mit NO-Donoren bei nachfolgender mehrstündiger LPS-Stimulation zur Bildung von Peroxynitrit führen und damit den primär inhibitorischen Effekt von NO auf Transkriptionsregulatoren aufheben. Das Zeitintervall zwischen der Präinkubation mit NO-Donoren und der nachfolgenden Stimulation mit LPS sowie die Dauer der LPS-Stimulation könnten für die unterschiedlichen Effekte von NO eine entscheidende Bedeutung haben und sollten in weiteren Studien untersucht werden. Möglicherweise hängt die Wirkung von NO auch von der Wahl des Zellmodells ab: Während in Endothelzellen NO die Expression von IL-8 hemmt, könnte in Monozyten und Granulozyten nach einer exzessiven Freisetzung von Superoxidanionen ein stimulierender

Effekt von NO dominieren. Bislang konnte dieser Redox-sensitive Steuerungsmechanismus im wesentlichen für die Expression und Produktion von IL-8 nachgewiesen werden, während im Vollblut andere Entzündungsmediatoren wie TNF- α oder IL-6 durch oxidativen Stress nicht beeinflusst werden⁷³. Dabei könnte eine differentielle Regulierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 durch oxidativen Stress bzw. Antioxidantien eine Rolle spielen^{197; 198}. Weitere Studien sind erforderlich, um die exakten Mechanismen der gegensätzlichen Effekte von NO auf die Produktion von Entzündungsmediatoren zu erklären.

4.2.2 Fehlende Immunmodulation durch Fentanyl

In der hier vorliegenden Untersuchung konnte kein Einfluß von Fentanyl auf die Granulozytenfunktionen „Phagozytose“ und „Oxidativer Burst“ festgestellt werden. Dies korreliert mit einer unveränderten Expression auch nach mehrstündiger Inkubation mit supraklinischen Konzentrationen von Fentanyl. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen beeinflusste Fentanyl die Adhärenz von Leukozyten an isolierten Endothelien nicht³² und induzierte keine Konformationsänderungen an Granulozyten und Monozyten^{183; 184}. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in der hier vorliegenden Arbeit auf die Untersuchung von Fentanyl hinsichtlich einer etwaigen Veränderung der NF- κ B-Aktivität und der Interleukin-8-Produktion verzichtet.

Fentanyl gehört zu den in Anästhesie und Intensivmedizin am häufigsten eingesetzten Analgetika²¹¹ und gilt als reiner μ -Agonist⁶⁴. Im Gegensatz zu Morphin besitzt Fentanyl keine vasodilatatorischen Effekte. Verschiedene Mechanismen wie die Histaminausschüttung aus Mastzellen¹³³ und die NO-Freisetzung aus Endothelzellen²⁷² und Leukozyten¹⁸³ werden für die gefäßerweiternde Wirkung von Morphin verantwortlich gemacht. Fentanyl hingegen setzt keinen dieser beiden Mediatoren frei, was durch eine fehlende Interaktion von Fentanyl mit Opiatrezeptoren auf Granulozyten und Monozyten erklärt werden könnte^{32; 184}. In Bindungsstudien wurde dargestellt, daß Fentanyl eine extrem geringe Bindungsaffinität für die leukozytäre Morphin-Bindungsstelle aufweist, die als μ_3 -Opiat-Rezeptor definiert wurde³².

Dagegen konnten Untersuchungen an Lymphozyten zeigen¹³⁸, daß insbesondere die Zytotoxizität sowie die Produktion von Zytokinen nach Inkubation mit Fentanyl eingeschränkt werden, wobei allerdings aufgrund mangelnder Reversibilität durch Naloxon von unspezifischen Effekten ausgegangen werden muß. Im Tiermodell wurde eine Inhibierung der Concanavalin A-induzierten Lymphozytenproliferation durch Morphin- oder Fentanyl-Behandlung nachgewiesen, wobei diese Effekte durch Injektion von Naltrexon geblockt werden konnten und in adrenaletomierten Tieren nicht auftraten¹⁰¹. Während die Anzahl der zirkulierenden Lymphozyten nach Opiat-Therapie um 30% reduziert war, blieben die

Monozyten- und Granulozytenzahlen konstant. Diese Untersuchung belegt den Einfluß von hormonellen und zentralnervösen Vorgängen auf die Opiat-induzierte Immunmodulation, die jedoch von lokalen Opiat-Wirkungen auf Immunozyten differenziert werden müssen. Im Plasma herzchirurgischer Patienten, bei denen zwischen einem Anästhesieregime mit hoch- bzw. niedrigdosiertem Fentanyl unterschieden wurde, war die Konzentration von IL-8, IL-6 und IL-10 bei beiden Narkoseverfahren vergleichbar ⁴².

Wenig ist bislang über den Einfluß neuerer Fentanylderivate und Opiatanalgetika auf immunologische Vorgänge bekannt. Krumholz et al. konnte in seinen Untersuchungen keinen Einfluß von Morphin, Pethidin, Buprenorphin, Fentanyl oder Alfentanil auf die Adhärenz neutrophiler Granulozyten feststellen ¹⁶¹. Ebenso blieben die Phagozytoseleistung ¹⁵⁹ und die Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite ^{143; 156} durch Fentanyl, Remifentanil und Alfentanil unbeeinflusst. Hingegen führt Sufentanil zu einer signifikanten Hemmung der Leukozytenmigration durch Endothelzellschichten *in vitro* ¹³⁶. Dabei tragen sowohl Endothelzellen als auch Granulozyten zu diesem Effekt bei, wie die additive Wirkung nach selektiver Inkubation beider Zelltypen zeigen konnte. Eine mögliche Interaktion weiterer synthetischer Opiate mit Opiatrezeptoren auf Immunozyten sollte daher in weiterführenden Studien untersucht werden.

4.2.3 Ketamin-induzierte Immunmodulation

Das intravenöse Anästhetikum Ketamin wird aufgrund seiner stabilisierenden Wirkung auf die Hämodynamik insbesondere für die Anästhesie und Sedierung bei kritisch Kranken ¹ und in der Notfallmedizin ²⁶³ eingesetzt. Während die zentralnervösen Effekte dieses Analgetikums Gegenstand zahlreicher Untersuchungen sind, sind die Wirkungen auf periphere Organsysteme nur unzureichend belegt. In jüngerer Zeit sind immunomodulatorische Effekte von Ketamin beschrieben worden ^{149; 306}, wobei die beteiligten intra- und extrazellulären Mechanismen jedoch nur unzureichend aufgeklärt werden konnten.

4.2.3.1 Veränderungen der Granulozytenfunktion durch Ketamin

Die Wirkungen von Ketamin auf die granulozytären Funktionen Chemotaxis, Phagozytose und Oxidativer Burst sind vielfach untersucht worden ^{68; 131; 158; 158; 160; 207; 307}. Dennoch ist umstritten, inwieweit klinisch relevante Konzentrationen die Granulozytenfunktion beeinträchtigen. Nach Injektion von 2-2,2 mg/kg Körpergewicht wurden maximale Plasmakonzentrationen von rund 25 µg/ml bzw. 100µM erreicht ⁷⁹. Bei einer Plasmaproteinbindung von rund 30% ⁶⁹ können somit Konzentrationen von bis zu 200 µM in Vollblutexperimenten als klinisch relevant angesehen werden. In der hier vorliegenden

Untersuchung wurde eine signifikante Hemmung der Granulozytenfunktionen Phagozytose und Oxidativer Burst nach Zusatz von 100 µM Ketamin beobachtet. In früheren Studien wurde zwar eine Reduktion der Phagozytoseleistung^{158; 207}, nicht aber der Superoxidanionen- bzw. H₂O₂-Produktion durch vergleichbare Ketaminkonzentrationen beobachtet^{131; 157; 207}. In unseren Experimenten wurde die Stimulation des Oxidativen Burst durch die Phagozytose von Bakterien induziert. Bei diesem Versuchsaufbau muß daher die Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite in direkter Abhängigkeit von der Phagozytoseleistung betrachtet werden.

4.2.3.2 Veränderungen funktionsrelevanter Oberflächenrezeptoren durch Ketamin

In dieser Untersuchung wurde nach Inkubation von Vollblut mit Ketamin auf Granulozyten eine verminderte Spontanexpression sämtlicher gemessener Oberflächenmarker beobachtet, die in Zusammenhang mit einer Hemmung von Phagozytoseaktivität und Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite steht. Ähnliche inhibitorische Wirkungen von Ketamin auf die Expression der Adhäsionsmoleküle CD18 und CD62L sowie der Superoxidanionen-Produktion von Granulozyten wurden nach Stimulation von Vollblut mit FMLP oder PMA berichtet³⁰⁶. Im Gegensatz zu dieser Studie konnten wir auch ohne Stimulation der Leukozyten eine signifikante Reduktion der Oberflächenrezeptoren CD11b, CD35, CD16 und CD14 beobachten. Dabei können methodische Unterschiede, wie z.B. die verwendeten Antikörper oder die Aufarbeitung der Blutproben, von Bedeutung sein. So können das Abkühlen der Blutproben auf Raumtemperatur und eine nachfolgende Erwärmung auf 37°C bereits einen Stimulus darstellen, der die Expression von Oberflächenmarkern steigert¹²³. Eine verminderte Bindung fluoreszierender Antikörper muß zudem nicht auf einer verminderten Expression der Oberflächenrezeptoren beruhen, sondern kann auch eine verminderte Affinität für den Liganden als Ausdruck eines differenten Aktivitätszustandes des Rezeptors widerspiegeln. Eine solche funktionelle Aktivierung oder Deaktivierung insbesondere von Komplementrezeptoren durch verschiedene Substanzen ist beschrieben⁸⁵. Eine verminderte Spontanexpression bzw. eine reduzierte Bindungsaffinität der Komplement- und IgG-Rezeptoren nach Inkubation mit Ketamin auch ohne nachfolgende Stimulation könnte die in unserer Studie beobachtete Hemmung von Phagozytose und Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite erklären: Beide Prozesse sind von der intakten Funktion der genannten Oberflächenrezeptoren abhängig, da die Anlagerung und nachfolgende Ingestion opsonisierter Mikroorganismen ohne diese Rezeptoren nicht stattfinden kann²⁹⁷. Ferner kann eine verminderte Expression von granulozytären Adhäsionsmolekülen zusammen mit endothelialen Prozessen zu einer

Reduktion der Leukozytenadhäsion und -akkumulation, wie sie in Mesenterialvenolen der Ratte beobachtet wurde, führen ^{199; 248}.

Im Rahmen der Signaltransduktion bei LPS-induzierter Leukozytenstimulation bindet der Oberflächenrezeptor CD14 Komplexe aus LPS und einem Serumprotein, dem sogenannten LPS-bindenden Protein (LBP) ³²⁰. LBP erhöht dabei die Bindungsaktivität des CD14-Rezeptors für LPS, ist jedoch nicht essentiell für die Induktion intrazellulärer Prozesse ¹²². In neutrophilen Granulozyten befindet sich CD14 in denselben intrazellulären Pools wie CD16 und wird bei der Aktivierung der Zellen gemeinsam mit diesem auf der Zelloberfläche präsentiert ⁷⁵. Durch Shedding von der Zelloberfläche wird eine lösliche Form des Rezeptors abgegeben ²³⁴, der konzentrationsabhängig eine LPS-Antwort in CD14-negativen Zellen induziert ^{108; 227}, wie anhand der IL-8-Produktion in Endothelzellen dargestellt werden konnte ¹⁶⁴. Während bei Inkubation mit niedrigen Konzentrationen von LPS eine Zellaktivierung überwiegend durch CD14-Rezeptoren vermittelt wird, ist nach Applikation von Konzentrationen von 100 ng/ml auch eine Stimulation Integrine möglich ¹⁰⁰.

4.2.3.3 Hemmung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 durch Ketamin

Trotz zahlreicher Hinweise auf eine Hemmung leukozytärer Funktionen ist ein modulierender Einfluß von Ketamin auf die transkriptionelle Regulation bislang nicht beschrieben. In der hier vorliegenden Untersuchung wurde somit erstmals eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 beobachtet. Dabei konnten signifikante Wirkungen bereits in einem klinisch relevanten Konzentrationsbereich von 10 bis 100 μ M festgestellt werden. Die Dauer der Präinkubation mit Ketamin hatte dabei keinen Einfluß auf die Bindungsaktivität von NF- κ B und AP-1. Durch eine Reduktion der LPS-Konzentration von 100 ng/ml auf die physiologischere Konzentration von 10 ng/ml konnte insbesondere der hemmende Einfluß von Ketamin auf die AP-1-Aktivität verdeutlicht werden.

Mehrere Berichte weisen auf eine Inhibierung von NF- κ B- und AP-1-regulierten Genen durch Ketamin hin: In einer murinen Makrophagen-Zelllinie ²⁵⁶ und in Alveolarmakrophagen der Ratte ¹⁷² führte die Inkubation mit Ketamin bei nachfolgender Stimulation mit LPS und Interferon- γ zur Reduktion der Nitrit-Produktion, was als Ausdruck einer Hemmung der iNOS interpretiert werden kann. Dabei war der inhibierende Effekt von Ketamin stärker als derjenige von Dexamethason, einem gut untersuchten Inhibitor von AP-1- und NF- κ B-regulierten Genen ⁹. In ähnlicher Weise wurde durch Ketamin auch die Produktion des proinflammatorischen Mediators TNF- α , der ebenfalls die NF- κ B-Aktivität stimuliert ⁶, nach LPS-Stimulation gehemmt ^{141; 256}. Somit kann Ketamin durch eine verminderte Produktion proinflammatorischer Mediatoren, die die DNA-Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren

steigern, nicht nur direkt, sondern über einen negativen Regelkreis auch indirekt NF- κ B- und AP-1-gesteuerte intrazelluläre Prozesse limitieren.

Für den Transkriptionsfaktor NF- κ B konnte nach Ketamin-Inkubation und konsekutiver LPS-Stimulation allenfalls ein schwacher Effekt auf die p65-mRNA-Synthese beobachtet werden. Dennoch könnte die verminderte Produktion der p65-Untereinheit nicht nur auf transkriptioneller Ebene sondern auch durch posttranskriptionelle Mechanismen zu einer Hemmung der NF- κ B-Aktivität im Sinne eines negativen Feedbacks beitragen²⁸⁶. Die p65-Untereinheit ist für die NF- κ B-Effekte in Granulozyten von entscheidender Bedeutung, während die Bindungsaktivität von p50 interindividuelle Schwankungen aufweist¹⁹⁴. Auch in Monozyten konnte mittels Antisense-Oligonukleotiden gegen die verschiedenen NF- κ B-Untereinheiten eine essentielle Rolle für p65 in Adhärenz, Differenzierung und Reifung dieser Zellen definiert werden^{62; 286}.

Die Aktivierung von redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren muß zudem in engem Zusammenhang mit funktionellen Vorgängen betrachtet werden. So wird durch die Phagozytose von Mikroorganismen eine transiente DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B induziert. Ebenso kann die NF- κ B-Aktivität durch Komplementrezeptoren getriggert werden²⁸⁹. Für die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivität ist eine ausreichende Expression von Rezeptoren, die eine intrazelluläre Signalantwort auslösen, wie z.B. CD14 oder CD11b auf der Oberfläche von Granulozyten, Voraussetzung^{100; 125}. Substanzen, die die Expression solcher Rezeptoren vermindern, können damit sekundär die NF- κ B-Aktivität inhibieren.

4.2.3.4 Einfluß von Ketamin auf IL-8-Gentranskription und -Produktion

In Übereinstimmung mit früheren Berichten wurde die IL-8-Produktion im LPS-stimulierten Vollblut durch Ketamin signifikant gehemmt¹⁴⁹. Dieser inhibierende Effekt korrelierte mit einer reduzierten IL-8-mRNA-Synthese in LPS-stimulierten Granulozyten. Daher kann im Zusammenhang mit der verminderten NF- κ B- und AP-1-Aktivität von einer Regulation der IL-8-Produktion auf transkriptioneller Ebene ausgegangen werden.

Ein hemmender Einfluß von Ketamin auf die Sekretion der NF- κ B- und AP-1-regulierten Zytokine IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α in LPS-stimuliertem Vollblut konnte in mehreren Untersuchungen belegt werden^{149; 165; 306}. Hingegen wird die Produktion antiinflammatorischer Mediatoren, wie z. B. IL-10 oder dem IL-1-Rezeptor-Antagonisten, in klinisch relevanten Konzentrationen nicht beeinflusst¹⁶⁵.

Im Gegensatz zu einer früheren Studie¹⁴⁹ konnte in unserer Untersuchung durch eine LPS-Konzentration von 10 ng/ml nur eine submaximale Stimulation der IL-8-Produktion im Vollblut erreicht werden. Eine Erhöhung der LPS-Konzentration auf 100 ng/ml führte zur

Verdopplung der IL-8-Sekretion. Damit lagen die unter LPS-Stimulation bestimmten IL-8-Werte deutlich über den von Kawasaki et al.¹⁴⁹ gemessenen Konzentrationen und waren mit bei Patienten im septischen Schock beobachteten IL-8-Plasmaspiegeln vergleichbar⁹⁰. Im Gegensatz zur IL-8-Sekretion wurde in unserer Untersuchung kein Unterschied in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren nach Stimulation mit 10 bzw. 100 ng/ml LPS beobachtet. In beiden Versuchsserien hemmte Ketamin die IL-8-Produktion, wobei jedoch nach Stimulation mit 10 ng/ml der inhibierende Effekt von klinisch relevanten Plasmakonzentrationen stärker ausgeprägt war.

4.2.3.5 Ketamin-induzierte Effekte und Stereoisomerie

Ketamin wurde viele Jahre als racemische Mischung der beiden optisch aktiven Isomere S(+)- und R(-)-Ketamin klinisch eingesetzt. Basierend auf dem bis zu dreifach stärkeren analgetischen Effekt bei gleichzeitig verminderten psychomimetischen Nebenwirkungen⁵ wurde S(+)-Ketamin vor kurzem als eigenständiges Medikament in die klinische Praxis eingeführt. Außerhalb des ZNS sind stereospezifische Effekte ebenfalls beschrieben: In isolierten Aortenringen der Ratte führte S(+)-Ketamin zu einer signifikant geringeren Vasodilatation als racemisches oder R(-)-Ketamin¹⁴⁷, wobei dieser Effekt unabhängig von L-Calcium-Kanälen, ATP-abhängigen Kalium-Kanälen und NO war. S(+)-Ketamin reduzierte zudem die postischämische Adhärenz von PMN im isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen²⁸⁴. Dabei wurde jedoch kein stereospezifischer Effekt auf die CD11b-Expression nach Perfusion des Herzens mit S(+)- bzw. R(-)-Ketamin festgestellt, so daß möglicherweise endotheliale Prozesse stereospezifisch die Adhärenz von PMN mindern. In Übereinstimmung mit früheren Studien, die keinen stereospezifischen Einfluß von Ketamin auf die Expression von Adhäsionsmolekülen³⁰⁶ und die Produktion von Sauerstoffradikalen³⁰⁷ in PMN feststellen konnten, war in der hier vorliegenden Untersuchung die inhibierende Wirkung beider Ketaminisomere auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B vergleichbar. Hingegen war die Hemmung des Transkriptionsfaktors AP-1 durch S(+)-Ketamin geringer ausgeprägt als durch das Razemat. Eine signifikante Inhibierung war durch S(+)-Ketamin erst nach Applikation der supraklinischen Konzentration von 1 mM zu erzielen, während klinisch relevante Konzentrationen von 100 μ M S(+)-Ketamin keinen hemmenden Effekt zeigten. Zur abschließenden Beurteilung muß jedoch eine eventuelle klinische Bedeutung dieses Enantiomer-spezifischen Effekts in weiteren *in-vivo*-Studien abgeklärt werden.

4.2.3.6 Unterschiede und Parallelen der Morphin- bzw. Ketamin-induzierten Immunmodulation

Die intrazellulären Vorgänge und Transmitter, die bei der Ketamin-abhängigen Immunmodulation involviert sind, unterscheiden sich gravierend von den Mechanismen, die an den zentralen Effekten dieses Analgetikums beteiligt sind. Die anästhetischen und auch die psychomimetischen Wirkungen werden überwiegend der Bindung von Ketamin mit NMDA-Rezeptoren zugesprochen, wobei Ketamin als nicht-kompetitiver Antagonist wirkt³. Die analgetische Wirkung ist zudem durch eine Interaktion mit μ -, δ - und κ -Opiatrezeptoren bedingt^{99; 261}. Für immunologische Prozesse hingegen konnte eine Beteiligung von μ -Opiatrezeptoren ausgeschlossen werden, da die inhibierende Wirkung von Ketamin auch in μ -Rezeptor-negativen Zellen zu beobachten war.

Ketamin-induzierte Effekte in Immunozyten sind ebenfalls unabhängig von der Expression funktioneller NMDA-1-Rezeptoren. In keiner der Zelllinien, in denen Ketamin inhibierend auf die gemessenen Parameter wirkte, konnte eine Expression dieses Rezeptors nachgewiesen werden. Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren im ZNS führt zu einer cNOS-abhängigen NO-Synthese, die durch Ketamin und andere nicht-kompetitive NMDA-Rezeptor-Antagonisten gehemmt werden kann^{110; 117}. In Makrophagen hingegen konnte nur Ketamin, nicht aber andere nicht-kompetitive NMDA-Antagonisten die NO-Synthese hemmen²⁵⁶, so daß eine Beteiligung anderer NMDA-Rezeptor-Subtypen in der Ketamin-induzierten Immunmodulation nahezu ausgeschlossen werden kann.

Aufgrund dieser Ergebnisse bleibt unklar, über welchen Mechanismus Ketamin seine immunoinhibitorische Effekte vermittelt. Während sämtliche Morphin-abhängigen Veränderungen der Granulozytenfunktion durch Naloxon geblockt werden konnten, ist eine Antagonisierung der Ketamin-induzierten Wirkung auf das Immunsystem bislang nicht beschrieben. Die fehlende Stereospezifität von Ketamin auf granulozytäre Funktionen läßt zudem vermuten, daß Ketamin nicht über einen spezifischen Rezeptor immunoinhibierend wirkt.

Im Gegensatz zu Morphin waren die Ketamin-induzierten Effekte unabhängig sowohl von der Freisetzung von NO als auch von der Dauer der Inkubationszeit. Während Morphin erst nach mehrstündiger Inkubationszeit zu einer mehr als zehnpromzentigen Hemmung der Immunfunktion führte, konnte bereits nach nur zehnminütiger Präinkubation eine solche inhibierende Wirkung durch Ketamin beobachtet werden. Somit nutzen beide Analgetika unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionswege für ihre immunoinhibitorische Wirkung. Eine hemmende Wirkung von Ketamin auf die Proteinkinase C, die sowohl für die Expression von Adhäsionsmolekülen als auch für die Induktion des Oxidativen Burst von Bedeutung ist^{139; 193; 201}, wurde postuliert. Die Proteinkinase C ist ebenfalls an der Aktivierung von NF- κ B und AP-1 und der nachfolgenden Produktion proinflammatorischer Zytokine

beteiligt^{53; 153}, so daß eine Inhibierung von redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren auf einer Hemmung dieses Enzyms beruhen könnte.

Einen weiteren Angriffspunkt von Ketamin könnte die Hemmung des intrazellulären Calcium-Anstieges darstellen²⁰⁷. Sowohl die Expression von Oberflächenrezeptoren als auch die Phagozytose und Vernichtung von Mikroorganismen stellen Calcium-abhängige Vorgänge dar^{27; 315}. Ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration durch Efflux von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum kann durch Thapsigargin induziert werden und führt zur Aktivierung von NF- κ B²¹². In vorläufigen Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe konnte der Calcium-Kanal-Blocker Verapamil die inhibierende Wirkung von Ketamin auf die LPS-induzierte IL-8-Produktion im Vollblut nicht aufheben. Hingegen kann durch Morphin ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Endothelzellen induziert werden, der zeitlich der Freisetzung von NO vorausgeht⁹⁸. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob und inwieweit intrazelluläres Calcium an den immunologischen Vorgängen, die durch diese beiden Analgetika modifiziert werden, involviert ist.

Ketamin und Morphin hemmten die Bindungsfähigkeit FITC-markierter Antikörper gegen Oberflächenrezeptoren in ähnlichem Ausmaß. Sämtliche in dieser Studie untersuchten Oberflächenrezeptoren sind an der Signaltransduktion ins Zellinnere und der nachfolgenden Induktion intrazellulärer Vorgänge beteiligt^{49; 86; 196}. Dabei konnte eine Beteiligung von Komplement- und CD14-Rezeptoren an der Aktivierung von NF- κ B durch LPS und Membranbestandteile grampositiver Bakterien nachgewiesen werden¹⁹⁶. Studien an Granulozyten belegen, daß β 2-Integrin-vermittelte Interaktionen die Expression von IL-8-mRNA und damit die *de-novo*-Synthese dieses Zytokins triggern können³²⁴. Da die Aktivierung von NF- κ B für die *de-novo*-Synthese von IL-8 unabdingbar ist²⁰⁴, muß von einer NF- κ B-Induktion durch diesen Rezeptor ausgegangen werden. Eine Reduktion dieser Oberflächenrezeptoren durch Morphin und Ketamin kann daher eine kausale Rolle in der Inhibierung von NF- κ B in unseren Untersuchungen einnehmen.

Eine Inhibierung der NF- κ B-Aktivität durch antisense Oligonukleotide führt in HL-60-Zellen zu einer Hemmung der CD11b-Expression während der Differenzierung mit PMA⁸³. Ein indirekter Effekt von NF- κ B auf die *de-novo*-Synthese dieses Komplementrezeptors wird vermutet, da eine direkte κ B-Bindungssequenz im CD11b-Gen nicht nachgewiesen werden konnte²¹⁴. Andere NF- κ B-Inhibitoren, wie z.B. Tepoxalin, konnten unabhängig von einer *de-novo*-Synthese nach nur 40-minütiger Inkubation die PMA-induzierte Oberflächenexpression von CD11b in Granulozyten und PMN konzentrationsabhängig hemmen¹⁶⁷. Eine mögliche Beteiligung von NF κ B-abhängigen Vorgängen beim Umsatz dieser Rezeptoren durch Mobilisierung aus intrazellulären Pools bzw. Shedding von der Oberfläche sowie der Einfluß NF- κ B-hemmender Substanzen wie Morphin oder Ketamin auf diesen Prozeß muß in weiteren Studien abgeklärt werden.

4.2.4 Mögliche klinische Relevanz der Ergebnisse

Wenngleich *ex-vivo*-Untersuchungen insbesondere im Vollblut den Vorteil eines verhältnismäßig physiologischen Milieus mit sich bringen, so können die hier erhobenen Ergebnisse dennoch nicht uneingeschränkt auf pathophysiologische Vorgänge *in vivo* übertragen werden: Zum einen wird in diesem Versuchsaufbau die Interaktion von Blutbestandteilen mit dem Endothel nicht berücksichtigt, zum anderen können parakrine Steuerungsvorgänge und zentralnervöse Prozesse mit Einfluß auf das Immunsystem nicht erfaßt werden.

Klinische Studien, in denen inflammatorische Mechanismen untersucht werden, sind aufgrund der spezifischen Effekte von Anästhetika und dem Einfluß des operativen Traumas bzw. der zugrundeliegenden Erkrankung in ihrer Aussagekraft ebenfalls beschränkt. Dabei wird insbesondere die neuroendokrine Stressantwort unter Allgemeinnarkose beeinflusst^{65; 66}, wobei neben dem direkten Einfluß auf das ZNS auch Nebenwirkungen der verwendeten Pharmaka wie z. B. eine systemische Hypotension eine Rolle spielen¹²⁹.

Anhand von Tierexperimenten konnte gezeigt werden, daß die Wahl des Narkose- bzw. Sedierungsregimes einen Einfluß auf das Outcome bei septischen Individuen haben könnte¹⁴¹. Gestützt wird diese Hypothese durch Versuche an Mäusen, bei denen die subkutane Gabe von Ketamin die LPS-induzierte TNF- α -Produktion um 50% reduzierte²⁸⁷. Hingegen ist die Applikation von Morphin im Tiermodell mit einer Progression des septischen Krankheitsbilds assoziiert²⁴⁰. Nach Injektion von LPS starben Morphin-behandelte Mäuse früher und wiesen zeitgleich drastische Einschränkungen der Lymphozytenfunktion auf²⁴².

Fentanyl, Morphin und Ketamin sind häufig eingesetzte Substanzen in der Analgosedierung septischer Patienten¹. Die immunologischen Veränderungen nach ausgedehnter operativer Intervention, Verbrennungen oder schwerem Trauma und die daraus resultierende posttraumatische Organdysfunktion werden als begünstigende Faktoren für die Entwicklung einer Sepsis angesehen³⁸. Die komplexe Interaktion pro- und antiinflammatorischer Mediatoren kann dabei zu einer balancierten Immunantwort einerseits oder zu einem anergen bzw. hyperinflammatorischen Zustand andererseits führen. Diese Disbalance zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren ist für die Pathogenese des Multiorganversagens und der Sepsis von zentraler Bedeutung³⁸. Der Aktivierung von NF- κ B und auch AP-1 mit der nachfolgenden Produktion proinflammatorischer Mediatoren wird eine entscheidende Rolle in der Entwicklung hyperinflammatorischer Sepsisbilder zugeschrieben^{37; 44}. Dabei ist die NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität prädiktiv für das klinische Outcome septischer Patienten und korreliert mit dem APACHE II-Score^{13; 37}. In einer Untersuchung an 15 septischen Patienten starben alle Patienten, die eine Steigerung der NF- κ B-

Bindungsaktivität von mehr als 200% des Ausgangswertes aufwiesen³⁷. Die in unserer Untersuchung verwendete durchflußzytometrische Methodik könnte aufgrund ihrer raschen Durchführbarkeit, der guten Quantifizierbarkeit und des geringen Probenvolumens ein ideales Screening-Verfahren für Risiko-Patienten darstellen. Erste *in-vivo*-Studien, in denen die Inhibierung der NF- κ B-Aktivität durch Antioxidantien^{33; 177}, Antisense-Oligonukleotide oder den somatischen Gentransfer von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ³⁷ untersucht wurde, zeigen positive Effekte einer transkriptionellen Inhibierung proinflammatorischer Substanzen auf die Organfunktion und eine konsekutiv verminderte Mortalität septischer Krankheitsbilder.

Klinische Studien müssen in der Zukunft klären, inwieweit Anästhetika und Analgetika, die die Aktivität redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren beeinflussen, als adjuvante Substanzen zur transkriptionellen Regulierung von Entzündungsmediatoren eingesetzt werden können. Denkbar wäre ein Sedierungsschema, das bei ausgeglichenem Verhältnis zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren immunologisch inerte Substanzen wie Fentanyl enthält, während bei hyperinflammatorischen Zuständen oder gesteigerter Aktivität von NF- κ B bzw. AP-1 inhibierende Substanzen wie Ketamin eingesetzt werden könnten.

Auch in der Anästhesie könnte die Immunmodulation durch Pharmaka an Bedeutung gewinnen. Dabei stehen als Angriffspunkte eine Verminderung der Stressantwort sowie ein direkter immunmodulatorischer Effekt verschiedener Narkoseverfahren im Vordergrund. In diesem Zusammenhang beeinflussen Opiate ebenso wie Ketamin die perioperative Stressantwort und wirken zudem inhibitorisch auf das Immunsystem^{2; 109; 255}. Während bei Ketaminanästhesien eine Zunahme der Stresshormone Adrenalin, Noradrenalin, Cortisol und ACTH beobachtet wird^{2; 4}, die auf eine sympathomimetische Wirkung der Substanz zurückzuführen ist, führen Narkosen auf Morphin-Basis zu einer Reduktion der perioperativen Stressantwort¹¹³. Dabei wirkt sich insbesondere die epidurale bzw. intrathekale Gabe von Morphin vorteilhaft aus^{50; 124}. Für die Applikation von Fentanyl ist eine hemmende Wirkung auf die Stressantwort umstritten²⁶. Über einen negativen Feedback-Mechanismus via Hypothalamus-Hypophyse-Nebenniere kann somit der direkte inhibierende Effekt von Morphin auf das Immunsystem durch eine Abschwächung der perioperativen Stressantwort verstärkt werden. Der immunmodulierende Effekt von Ketamin hingegen beruht wohl weitgehend auf der direkten Interaktion von Ketamin mit immunkompetenten Zellen. So konnten bei Patientinnen, die sich einer abdominalen Hysterektomie unterzogen, die Interleukin-6-Spiegel im Serum durch die intravenöse Gabe von Ketamin in subanästhetischen Dosen bei Narkoseeinleitung signifikant gesenkt werden²⁴³.

Bei herzchirurgischen Eingriffen führt die extrakorporale Zirkulation zu einer ausgeprägten Immunreaktion¹³⁴, wobei die Aktivierung von Plasmaproteinkaskaden, wie dem Komplement- und Gerinnungssystem durch den Kontakt von Blut mit Fremdoberflächen eine zentrale Rolle einnimmt³⁰⁸. Die daraus resultierende Immunantwort umfaßt neben der

Dysfunktion zellulärer Abwehrmechanismen auch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und die Expression von Oberflächenrezeptoren auf Leukozyten ²¹⁶. Diese Immunaktivierung im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe wird auch durch die Wahl des Narkoseverfahrens vorteilhaft beeinflusst. So konnte bei Patienten, die sich einer aortokoronaren Bypass-Operation unterzogen, bereits durch subanästhetische Dosen von 0,25 mg/kg Körpergewicht Ketamin zur Narkoseeinleitung die intra- und postoperative Produktion von IL-6 um 50% gesenkt werden ²⁴³. IL-6 stellt einen wichtigen Indikator für die Aktivierung des Immunsystems dar, wobei die Serumspiegel dieses Zytokins als Prädiktor für Organdysfunktion und Outcome angesehen werden ⁴⁸. Die Produktion von IL-6 ist unter anderem von der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B abhängig ³⁴. Die Hemmung von NF- κ B durch Ketamin könnte somit einen kausalen Mechanismus für diese anästhesiologisch relevante Beobachtung darstellen. In weiteren Studien muß nun untersucht werden, ob die Supplementierung Opiat-basierter Narkoseverfahren mit Ketamin die Produktion weiterer NF- κ B- und AP-1-abhängiger Entzündungsmediatoren, wie IL-8 oder TNF- α , ebenfalls beeinflussen kann. Hingegen hat die intraoperativ eingesetzte Konzentration von Fentanyl offensichtlich keinen inhibierenden Einfluß auf die Zytokin- und Akut-Phase-Antwort, wie vergleichende Untersuchungen an herzchirurgischen Patienten zur Narkoseführung mit hoch- bzw. niedrig-dosiertem Fentanyl zeigen konnten ⁴². Auch die Supplementierung von Inhalationsanästhesien mit Fentanyl in einer Dosierung von 3 bzw. 15 μ g/kg Körpergewicht beeinflusst die IL-6-Antwort nicht ²⁸⁸. Das Fehlen eines immunmodulatorischen Einflusses von Fentanyl wurde in der hier vorliegenden Arbeit in vitro anhand von Funktion und Rezeptorenexpression neutrophiler Granulozyten dargelegt und kann diese klinischen Beobachtungen zumindest teilweise erklären.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der hier vorliegenden Arbeit wird der Einfluß der in der Anästhesie gebräuchlichen Analgetika Morphin, Fentanyl und Ketamin auf die Funktion neutrophiler Granulozyten dargelegt. Dazu wurden immunologische, durchflußzytometrische und molekularbiologische Untersuchungsverfahren eingesetzt. Die untersuchten Substanzen modulieren die Funktion, transkriptionelle Regulation und Proteinexpression von Granulozyten in unterschiedlicher Weise.

Morphin hemmt die Funktion neutrophiler Granulozyten konzentrations- und zeitabhängig. Erstmals wird dargestellt, daß der inhibitorische Effekt von Morphin auf die Phagozytose und den Oxidativen Burst durch die Freisetzung von NO als *second messenger* hervorgerufen wird. Die verminderte Expression von Komplement-, Fc γ - und CD14-Rezeptoren korreliert mit diesen Funktionseinschränkungen. Zudem reguliert Morphin die intrazelluläre Signaltransduktion und führt dadurch zu einer Minderung der LPS-induzierten DNA-Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1. Die hemmende Wirkung von Morphin auf transkriptionsregulierende Proteine wird in dieser Arbeit erstmals an humanen Leukozyten nachgewiesen. Dabei stellt die Morphin-abhängige Freisetzung von NO das Schlüsselereignis für die hemmenden Effekte von Morphin dar: Durch NOS-Antagonisten kann die Morphin-induzierte Hemmung von Rezeptorenexpression, Granulozytenfunktion und Transkriptionsfaktoren verhindert werden, während NO-Donoren die Morphin-Wirkung imitieren. Die Blockade von Opiatrezeptoren mit Naloxon hebt die inhibierende Wirkung von Morphin ebenfalls auf, so daß eine Bindung an NO-freisetzende μ -Rezeptoren auf Granulozyten als kausaler Mechanismus angesehen werden kann. Die Inhibierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 korreliert im Vollblut nicht mit einer verminderten Produktion von IL-8 als NF- κ B- bzw. AP-1-abhängigem Mediator. Die exakten intrazellulären Mechanismen und die funktionelle Bedeutung dieser Granulozyten-inhibierenden Effekte von Morphin auf das Entzündungsgeschehen müssen in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Fentanyl zeigt weder aktivierende noch inhibierende Wirkungen auf Granulozytenfunktion und Expression von Oberflächenrezeptoren. Grundlage hierfür kann die mangelnde Affinität von Fentanyl für die auf Leukozyten exprimierten Opiatrezeptoren sein. Basierend auf der Annahme, daß diese Substanz immunologisch inert ist, wurden Effekte auf transkriptionelle Regulation und Proteinsynthese nicht untersucht.

Ketamin hemmt die Granulozytenfunktion und die Expression von Komplement-, Fc γ - und CD14-Rezeptoren konzentrationsabhängig, wobei die Dauer der Ketamin-Inkubation nicht von Bedeutung ist. Erstmals wird in dieser Arbeit ein inhibitorischer Effekt von Ketamin auf

die LPS-induzierte DNA-Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 beschrieben, wobei konsekutiv die leukozytäre Produktion von IL-8 auf transkriptioneller Ebene gehemmt wird. Das Ausmaß der Hemmung durch Ketamin hängt dabei von der zur Stimulation eingesetzten LPS-Dosierung ab. Im Gegensatz zu Morphin-induzierten Veränderungen sind diese Effekte unabhängig von NO als *second messenger* und werden nicht durch Opiat- oder NMDA-Rezeptoren vermittelt. Damit unterscheiden sich die Signaltransduktionswege Ketamin-vermittelter Effekte auf Immunzellen grundlegend von denjenigen, die für die anästhetische und psychomimetische Wirkung dieser Substanz im ZNS verantwortlich sind. Enantiomer-spezifische Effekte spielen für die immunsupprimierende Wirkung von Ketamin nur eine untergeordnete Rolle. Folgestudien sind erforderlich, um die an der Ketamin-abhängigen Inhibierung beteiligten intrazellulären Mediatoren und Stoffwechselwege in Leukozyten zu definieren.

Der in dieser Studie erstmals zur Untersuchung von Analgetika-induzierten Veränderungen von Transkriptionsfaktoren angewandte durchflußzytometrische Vollblut-Assay weist eine hohe Reproduzierbarkeit auf, ermöglicht eine verlässliche und schnelle Quantifizierung des nukleären NF- κ B- bzw. AP-1-Gehalts und liefert mit klassischen Verfahren vergleichbare Ergebnisse. Bei dieser Technik kann auf eine Zellseparation verzichtet werden, so daß die physiologischen Zustände im Vollblut berücksichtigt werden. Eine eventuelle Anwendung dieses Verfahrens zum Screening von Risikopatienten in Anästhesie und Intensivmedizin sollte in zukünftigen Untersuchungen evaluiert werden.

Der differente Einfluß dieser Analgetika auf das Immunsystem sollte bei den verschiedenen Indikationen in Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerztherapie Beachtung finden und in klinischen Studien weiter abgeklärt werden, um nicht nur eine effiziente Analgesie zu erzielen, sondern auch um etwaige Vor- bzw. Nachteile einer Immunmodulation durch diese Substanzen berücksichtigen zu können.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams HA: Analgesia and sedation on patients with sepsis syndrome. *Anaesthesist* 44 Suppl 3:S573-S579, 1995
2. Adams HA: Endocrine reactions following S-(+)-ketamine. *Anaesthesist* 46 Suppl 1:S30-S37, 1997
3. Adams HA: Mechanisms of action of ketamine. *Anaesthesiol Reanim* 23:60-63, 1998
4. Adams HA, Bauer R, Gebhardt B, Menke W, Baltes-Gotz B: Total i.v. anesthesia with S-(+)-ketamine in orthopedic geriatric surgery. Endocrine stress reaction, hemodynamics and recovery. *Anaesthesist* 43:92-100, 1994
5. Adams HA, Werner C: From the racemate to the eutomer: (S)-ketamine. Renaissance of a substance?. *Anaesthesist* 46:1026-1042, 1997
6. Adcock IM: Transcription factors as activators of gene transcription: AP-1 and NF kappa B. *Monaldi Arch Chest Dis* 52:178-186, 1997
7. Adcock IM, Brown CR, Gelder CM, Shirasaki H, Peters MJ, Barnes PJ: Effects of glucocorticoids on transcription factor activation in human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Physiol* 268:C331-C338, 1995
8. Adcock IM, Brown CR, Kwon O, Barnes PJ: Oxidative stress induces NF kappa B DNA binding and inducible NOS mRNA in the human epithelial cell line A549. *Biochem Soc Trans* 22:186S, 1994
9. Adcock IM, Shirasaki H, Gelder CM, Peters MJ, Brown CR, Barnes PJ: The effects of glucocorticoids on phorbol ester and cytokine stimulated transcription factor activation in human lung. *Life Sci* 55:1147-1153, 1994
10. Aida Y, Pabst MJ: Neutrophil responses to lipopolysaccharide. Effect of adherence on triggering and priming of the respiratory burst. *J Immunol* 146:1271-1276, 1991
11. Altstaedt J, Kirchner H, Rink L: Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology* 89:563-568, 1996
12. Andrew PJ, Harant H, Lindley IJ: Nitric oxide regulates IL-8 expression in melanoma cells at the transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 214:949-956, 1995
13. Arnalich F, Garcia-Palomero E, Lopez J, Jimenez M, Madero R, Renart J, Vazquez JJ, Montiel C: Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect Immun* 68:1942-1945, 2000
14. Ashby M, Fleming B, Wood M, Somogyi A: Plasma morphine and glucuronide (M3G and M6G) concentrations in hospice inpatients. *J Pain Symptom Manage* 14:157-167, 1997
15. Babior BM: The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 73:599-610, 1984
16. Bailly S, Fay M, Israel N, Gougerot-Pocidalo MA: The transcription factor AP-1 binds to the human interleukin 1 alpha promoter. *Eur Cytokine Netw* 7:125-128, 1996
17. Banick PD, Chen Q, Xu YA, Thom SR: Nitric oxide inhibits neutrophil beta 2 integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic GMP synthesis. *J Cell Physiol* 172:12-24, 1997

18. Barchowsky A, Munro SR, Morana SJ, Vincenti MP, Treadwell M: Oxidant-sensitive and phosphorylation-dependent activation of NF kappa B and AP-1 in endothelial cells. *Am J Physiol* 269:L829-36, 1995
19. Barry MC, Condron CM, Watson RW, Redmond HP, El Jack M, Watson RG, Bouchier HD: Pre-operative neutrophil and monocyte activation state predicts post-operative neutrophil and monocyte function. *Eur J Surg* 163:739-745, 1997
20. Bauer J, Ganter U, Abel J, Strauss S, Jonas U, Weiss R, Gebicke-Haerter P, Volk B, Berger M: Effects of interleukin-1 and interleukin-6 on metallothionein and amyloid precursor protein expression in human neuroblastoma cells. Evidence that interleukin-6 possibly acts via a receptor different from the 80-kDa interleukin-6 receptor. *J Neuroimmunol* 45:163-173, 1993
21. Bayer BM, Hernandez MC, Ding XZ: Tolerance and cross-tolerance to the suppressive effects of cocaine and morphine on lymphocyte proliferation. *Pharmacol Biochem Behav* 53:227-234, 1996
22. Bayon Y, Alonso A, Sanchez Crespo M: Stimulation of Fc gamma receptors in rat peritoneal macrophages induces the expression of nitric oxide synthase and chemokines by mechanisms showing different sensitivities to antioxidants and nitric oxide donors. *J Immunol* 159:887-894, 1997
23. Bayon Y, Alonso A, Sanchez Crespo M: Immunoglobulin-E/dinitrophenyl complexes induce nitric oxide synthesis in rat peritoneal macrophages by a mechanism involving CD23 and NF-kappa B activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 242:570-574, 1998
24. Behre G, Schedel I, Nentwig B, Wormann B, Essink M, Hiddemann W: Endotoxin concentration in neutropenic patients with suspected gram-negative sepsis: correlation with clinical outcome and determination of anti-endotoxin core antibodies during therapy with polyclonal immunoglobulin M-enriched immunoglobulins. *Antimicrob Agents Chemother* 36:2139-2146, 1992
25. Bellavite P: The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. *Free Radic Biol Med* 4:225-261, 1988
26. Bent JM, Paterson JL, Mashiter K, Hall GM: Effects of high-dose fentanyl anaesthesia on the established metabolic and endocrine response to surgery. *Anaesthesia* 39:19-23, 1984
27. Berger M, Birx DL, Wetzler EM, O'Shea JJ, Brown EJ, Cross AS: Calcium requirements for increased complement receptor expression during neutrophil activation. *J Immunol* 135:1342-1348, 1985
28. Berger M, O'Shea J, Cross AS, Folks TM, Chused TM, Brown EJ, Frank MM: Human neutrophils increase expression of C3bi as well as C3b receptors upon activation. *J Clin Invest* 74:1566-1571, 1984
29. Bergmann M, Gornikiewicz A, Sautner T, Waldmann E, Weber T, Mittlbock M, Roth E, Fugger R: Attenuation of catecholamine-induced immunosuppression in whole blood from patients with sepsis. *Shock* 12:421-427, 1999
30. Bian TH, Wang XF, Li XY: Effect of morphine on interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha production from mouse peritoneal macrophages in vitro. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao* 16:449-451, 1995
31. Bikoue A, George F, Poncelet P, Mutin M, Janossy G, Sampol J: Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression: normal adult values. *Cytometry* 26:137-147, 1996
32. Bilfinger TV, Fimiani C, Stefano GB: Morphines immunoregulatory actions are not shared by fentanyl. *Int.J Cardiol* 64:S61-66 1998

33. Blackwell TS, Blackwell TR, Holden EP, Christman BW, Christman JW: In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor-kappa B activation and neutrophilic lung inflammation. *J Immunol* 157:1630-1637, 1996
34. Blackwell TS, Christman JW: The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:3-9, 1997
35. Blix IJ, Helgeland K, Kahler H, Lyberg T: LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the expression of β_2 integrins and L-selectin in an ex vivo human whole blood system. *Eur J Oral Sci* 107:14-20, 1999
36. Bohmer RH, Trinkle LS, Staneck JL: Dose effects of LPS on neutrophils in a whole blood flow cytometric assay of phagocytosis and oxidative burst. *Cytometry* 13:525-531, 1992
37. Böhrer H, Qiu F, Zimmermann T, Zhang Y, Jllmer T, Mannel D, Bottiger BW, Stern DM, Waldherr R, Saeger HD, Ziegler R, Bierhaus A, Martin E, Nawroth PP: Role of NFkappaB in the mortality of sepsis. *J Clin Invest* 100:972-985, 1997
38. Bone RC: The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 115:457-469, 1991
39. Borregaard N, Tauber AI: Subcellular localization of the human neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* 259:47-52, 1984
40. Bossuyt X, Marti GE, Fleisher TA: Comparative analysis of whole blood lysis methods for flow cytometry. *Cytometry* 30:124-133, 1997
41. Brix-Christensen V, Tonnesen E, Sanchez RG, Bilfinger TV, Stefano GB: Endogenous morphine levels increase following cardiac surgery as part of the antiinflammatory response? *Int J Cardiol* 62:191-197, 1997
42. Brix-Christensen V, Tonnesen E, Sorensen J, Bilfinger TV, Sanchez RG, Stefano GB: Effects of anaesthesia based on high versus low doses of opioids on the cytokine and acute-phase protein responses in patients undergoing cardiac surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 42:63-70, 1998
43. Brostjan C, Anrather J, Csizmadia V, Stroka D, Soares M, Bach FH, Winkler H: Glucocorticoid-mediated repression of NFkappaB activity in endothelial cells does not involve induction of I kappa B alpha synthesis. *J Biol Chem* 271:19612-19616, 1996
44. Browder W, Ha T, Chuanfu L, Kalbfleisch JH, Ferguson DAJ, Williams DL: Early activation of pulmonary nuclear factor kappaB and nuclear factor interleukin-6 in polymicrobial sepsis. *J Trauma* 46:590-596, 1999
45. Brown K, Park S, Kanno T, Franzoso G, Siebenlist U: Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90:2532-2536, 1993
46. Bürgermeister E, Tibes U, Stockinger H, Scheuer WV: Activation of nuclear factor-kappaB by lipopolysaccharide in mononuclear leukocytes is prevented by inhibitors of cytosolic phospholipase A2. *Eur J Pharmacol* 369:373-386, 1999
47. Carter PH, Resto-Ruiz S, Washington GC: Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants and five cell preparations. *Cytometry* 13:68-74, 1992
48. Casey LC, Balk RA, Bone RC: Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 119:771-778, 1993
49. Cassatella MA, Anegón I, Cuturi MC, Giskey P, Trinchieri G, Perussia B: Fc gamma R(CD16) interaction with ligand induces Ca^{2+} mobilization and phosphoinositide turnover in human natural killer cells. Role of Ca^{2+} in Fc gamma R(CD16)-induced transcription and expression of lymphokine genes. *J Exp Med* 169:549-567, 1989

50. Chae BK, Lee HW, Sun K, Choi YH, Kim HM: The effect of combined epidural and light general anesthesia on stress hormones in open heart surgery patients. *Surg Today* 28:727-731, 1998
51. Chao CC, Hu S, Molitor TW, Zhou Y, Murtaugh MP, Tsang M, Peterson PK: Morphine potentiates transforming growth factor-beta release from human peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Pharmacol Exp Ther* 262:19-24, 1992
52. Chao CC, Molitor TW, Close K, Hu S, Peterson PK: Morphine inhibits the release of tumor necrosis factor in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Int J Immunopharmacol* 15:447-453, 1993
53. Chen CC, Wang JK, Lin SB: Antisense oligonucleotides targeting protein kinase C-alpha, -beta I, or -delta but not -eta inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages: involvement of a nuclear factor kappa B-dependent mechanism. *J Immunol* 161:6206-6214, 1998
54. Chen SY, Huo QL, Huang JB, Chen ZL, Shi XH, Liao XL: Morphine inhibited respiratory burst of neutrophils and scavenged oxygen free radicals. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao*. 16:445-448, 1995
55. Cheung K, Archibald AC, Robinson MF: The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. *J Immunol* 130:2324-2329, 1984
56. Chu SC, Marks-Konczalik J, Wu HP, Banks TC, Moss J: Analysis of the cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene: characterization of differences between human and mouse iNOS promoters. *Biochem Biophys Res Commun* 248:871-878, 1998
57. Chuang LF, Chuang TK, Killam KFJ, Chuang AJ, Kung HF, Yu L, Chuang RY: Delta opioid receptor gene expression in lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 202:1291-1299, 1994
58. Chuang TK, Killam KFJ, Chuang LF, Kung HF, Sheng WS, Chao CC, Yu L, Chuang RY: Mu opioid receptor gene expression in immune cells. *Biochem Biophys Res Commun* 216:922-930, 1995
59. Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB: Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest* 90:1116-1121, 1992
60. Colasanti M, Persichini T, Menegazzi M, Mariotto S, Giordano E, Caldarera CM, Sogos V, Lauro GM, Suzuki H: Induction of nitric oxide synthase mRNA expression. Suppression by exogenous nitric oxide. *J Biol Chem* 270:26731-26733, 1995
61. Collingridge GL, Singer W: Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 11:290-296, 1990
62. Conti L, Hiscott J, Papacchini M, Roulston A, Wainberg MA, Belardelli F, Gessani S: Induction of relA(p65) and I kappa B alpha subunit expression during differentiation of human peripheral blood monocytes to macrophages. *Cell Growth Differ* 8:435-442, 1997
63. Corriveau CC, Madara PJ, Van Dervort AL, Tropea MM, Wesley RA, Danner RL: Effects of nitric oxide on chemotaxis and endotoxin-induced interleukin-8 production in human neutrophils. *J Infect Dis* 177:116-126, 1998
64. Costa EM, Hoffmann BB, Loew GH: Opioid agonists binding and responses in SH-SY5Y cells. *Life Sci* 50:73-81, 1992
65. Crozier TA, Müller JE, Quittkat D, Sydow M, Wuttke W, Kettler D: Effect of anaesthesia on the cytokine responses to abdominal surgery. *Br J Anaesth* 72:280-285, 1994

66. Crozier TA, Müller JE, Quittkatt D, Weyland W, Sydow M, Wuttke W, Kettler D: Interleukin-1 beta and interleukin-6-plasma concentrations in laparotomies. Interaction with neuroendocrine secretion and postoperative temperature regulation? *Anaesthesist* 42:343-349, 1993
67. Cuthbertson BH, Galley HF, Webster NR: Effect of exogenous nitric oxide and superoxide on interleukin-8 from human polymorphonuclear leucocytes. *Br J Anaesth* 78:714-717, 1997
68. Davidson JA, Boom SJ, Pearsall FJ, Zhang P, Ramsay G: Comparison of the effects of four i.v. anaesthetic agents on polymorphonuclear leucocyte function. *Br J Anaesth* 74:315-318, 1995
69. Dayton PG, Stiller RL, Cook DR, Perel JM: The binding of ketamine to plasma proteins: Emphasis on human plasma. *Eur J Clin Pharmacol* 24:825-831, 1983
70. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Plaisance S, Boone E, Haegeman G: Glucocorticoids repress NF-kappa B-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3919-3924, 2000
71. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao JK: Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 96:60-68, 1995
72. DeForge LE, Fantone JC, Kenney JS, Remick DG: Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin 8 production in human whole blood. *J Clin Invest* 90:2123-2129, 1992
73. DeForge LE, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG: Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem* 268:25568-25576, 1993
74. DelaTorre A, Schroeder RA, Bartlett ST, Kuo PC: Differential effects of nitric oxide-mediated S-nitrosylation on p50 and c-jun DNA binding. *Surgery* 124:137-141, 1998
75. Detmers PA, Zhou D, Powell D, Lichenstein H, Kelley M, Pironkova R: Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase. *J Immunol* 155:2085-2095, 1995
76. Dickenson AH: NMDA receptor antagonists: interactions with opioids. *Acta Anaesthesiol Scand* 41:112-115, 1997
77. Dokter WH, Esselink MT, Halie MR, Vellenga E: Interleukin-4 inhibits the lipopolysaccharide-induced expression of c-jun and c-fos messenger RNA and activator protein-1 binding activity in human monocytes. *Blood* 81:337-343, 1993
78. Dokter WHA, Koopmans SB, Vellenga E: Effects of IL-10 and IL-4 on LPS-induced transcription factors (AP-1, NF-IL6 and NF-kappa B) which are involved in IL-6 regulation. *Leukemia* 10:1308-1316, 1996
79. Domino EF, Zsigmond EK, Domino LE, Domino KE, Kothary SP, Domino SE: Plasma levels of ketamine and two of its metabolites in surgical patients using a gas chromatographic mass fragmentographic assay. *Anesth Analg* 61:87-92, 1982
80. Donabedian H, Sawyer T, Senitzer D: Inhibition of neutrophil shape change by an inhibitor of chemotaxis. *J Leukoc Biol* 42:510-518, 1987
81. Dooley DC, Simpson JF, Meryman HT: Isolation of large numbers of fully viable human neutrophils: A preparative technique using Percoll density gradient centrifugation. *Exp Hematol* 10:597-599, 1982

82. Dri P, Cramer R, Romano M, Spessotto P, Patriarca P: Effect of biological surfaces on neutrophil O₂⁻ production and its relationship to the CD11b/CD18 integrin-dependent adherence. *Int J Tissue React* 13:193-201, 1991
83. Eck SL, Perkins ND, Carr DP, Nabel GJ: Inhibition of phorbol ester-induced cellular adhesion by competitive binding of NF-kappa B in vivo. *Mol Cell Biol* 13:6530-6536, 1993
84. Edwards SW: Neutrophils and host defense. *Biochemistry and physiology of the neutrophil*. Edited by Edwards SW. Cambridge, Cambridge University Press, 1994a, pp 23-32
85. Edwards SW: The generation and recognition of neutrophil-activating factors: Structure and function of neutrophil receptors. *Biochemistry and physiology of the neutrophil*. Edited by Edwards SW. Cambridge, Cambridge University Press, 1994b, pp 77-127
86. Edwards SW: Cell signalling by integrins and immunoglobulin receptors in primed neutrophils. *Trends Biochem Sci* 20:362-367, 1995
87. Edwards SW, Watson F: The cell biology of phagocytes. *Immunol Today* 16:508-510, 1995
88. Edwards SW, Watson F, Gasmi L, Moulding DA, Quayle JA: Activation of human neutrophils by soluble immune complexes: role of Fc gamma RII and Fc gamma RIIIb in stimulation of the respiratory burst and elevation of intracellular Ca²⁺. *Ann N Y Acad Sci* 832:341-357, 1997
89. Emmendörffer A, Hecht M, Lohmann-Matthes M-L, Roesler J: A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J Immunol Meth* 131:269-275, 1990
90. Endo S, Inada K, Ceska M, Takakuwa T, Yamada Y, Nakae H, Kasai T, Yamashita H, Taki K, Yoshida M: Plasma interleukin 8 and polymorphonuclear leukocyte elastase concentrations in patients with septic shock. *J Inflamm* 45:136-142, 1995
91. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW: Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* 85:1341-1347, 1995
92. Fällmann M, Andersson R, Andersson T: Signaling properties of CR3 (CD11b/CD18) and CR1 (CD35) in relation to phagocytosis of complement-opsonized particles. *J Immunol* 151:338-345, 1993
93. Fecho K, Lysle DT: Phenotypic analysis of splenocyte subsets following acute morphine treatment in the rat. *Cell Immunol* 195:137-146, 1999
94. Fecho K, Maslonek KA, Dykstra LA, Lysle DT: Mechanisms whereby macrophage-derived nitric oxide is involved in morphine-induced suppression of splenic lymphocyte proliferation. *J Pharmacol Exp Ther* 272:477-483, 1995
95. Filatov MV, Varfolomeeva E-Y, Ivanov EI: Flow cytometric detection of inflammatory processes by measuring respiratory burst reaction of peripheral blood neutrophils. *Biochem Mol Med* 55:116-121, 1995
96. Filep JG, Beauchamp M, Baron C, Paquette Y: Peroxynitrite mediates IL-8 gene expression and production in lipopolysaccharide-stimulated human whole blood. *J Immunol* 161:5656-5662, 1998
97. Fimiani C, Magazine HI, Welters ID, Bilfinger TV, Tonnesen E, Stefano GB: Antagonism of LPS and IFN- induced iNOS expression in human atrial endothelia by morphine, anandamide and estrogen. *Acta Pharmacol Sin* 21:405-409, 2000

98. Fimiani, C, Mattocks, D, Cavani, F, Salzet, M, Deutsch, DG, Pryor, S, Bilfinger, TV, and Stefano, GB. Morphine and anandamide stimulate intracellular calcium transients in human arterial endothelial cells: Coupling to nitric oxide release. *Cell Signal* 11:189-193, 1999.
99. Finck AD, Ngai SH: Opiate receptor mediation of ketamine analgesia. *Anesthesiology* 56:291-297, 1982
100. Flaherty SF, Golenbock DT, Milham FH, Ingalls RR: CD11/CD18 leukocyte integrins: new signaling receptors for bacterial endotoxin. *J Surg Res* 73:85-89, 1997
101. Flores LR, Wahl SM, Bayer BM: Mechanisms of morphine-induced immunosuppression: effect of acute morphine administration on lymphocyte trafficking. *J Pharmacol Exp Ther* 272:1246-1251, 1995
102. Foletta VC, Segal DH, Cohen DR: Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J Leukoc Biol* 63:139-152, 1998
103. Forslund T, Sundqvist T: Nitric oxide reduces hydrogen peroxide production from human polymorphonuclear neutrophils. *Eur J Clin Invest* 25:9-14, 1995
104. Forslund T, Sundqvist T: Nitric oxide-releasing particles inhibit phagocytosis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 233:492-495, 1997
105. Forsyth KD, Levinsky RJ: Preparative procedures of cooling and re-warming increase leucocyte integrin expression and function on neutrophils. *J Immunol Meth* 128:159-163, 1990
106. Foulds S: Novel flow cytometric method for quantifying nuclear binding of the transcription factor nuclear factor kappa B in unseparated human monocytes and polymorphonuclear cells. *Cytometry* 29:182-186, 1997
107. Fowler AA, Fisher BJ, Sweeney LB, Wallace TJ, Natarajan R, Ghosh SS, Ghosh S: Nitric oxide regulates interleukin-8 gene expression in activated endothelium by inhibiting NF-kappaB binding to DNA: effects on endothelial function. *Biochem Cell Biol* 77:201-208, 1999
108. Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, Finlay BB, Wright SD: Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 176:1665-1671, 1992
109. Fricchione GL, Mendoza A, Stefano GB: Morphine and its psychiatric implications. *Adv Neuroimmunol* 4:117-131, 1994
110. Galley HF, Webster NR: Brain nitric oxide synthase activity is decreased by intravenous anesthetics. *Anesth Analg* 83:591-594, 1996
111. Gavériaux C, Peluso J, Simonin F, Laforet J, Kieffer B: Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcripts in immune cells. *Brain Res* 829:174-179, 1999
112. Gavériaux RC, Matthes HW, Peluso J, Kieffer BL: Abolition of morphine-immunosuppression in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6326-6330, 1998
113. George JM, Reier CE, Lanese RR, Rower M: Morphine anesthesia blocks cortisol and growth hormone response to surgical stress in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 38:736-741, 1974
114. Gertzberg N, Clements R, Jaspers I, Ferro TJ, Neumann P, Flescher E, Johnson A: Tumor necrosis factor-alpha-induced activating protein-1 activity is modulated by nitric oxide-mediated protein kinase G activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:105-115, 2000

115. Gille J, Paxton LL, Lawley TJ, Caughman SW, Swerlick RA: Retinoic acid inhibits the regulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 by cultured dermal microvascular endothelial cells. *J Clin Invest* 99:492-500, 1997
116. Gono T, Mizuno N, Inagaki N, Kuromi H, Seino Y, Miyazaki J, Seino S: Functional neuronal ionotropic glutamate receptors are expressed in the non-neuronal cell line MIN6. *J Biol Chem* 269:16989-16992, 1994
117. Gonzales JM, Loeb AL, Reichard PS, Irvine S: Ketamine inhibits glutamate-, N-methyl-D-aspartate-, and quisqualate- stimulated cGMP production in cultured cerebral neurons. *Anesthesiology* 82:205-213, 1995
118. Goto M, Katayama KI, Shirakawa F, Tanaka I: Involvement of NF-kappaB p50/p65 heterodimer in activation of the human pro-interleukin-1beta gene at two subregions of the upstream enhancer element. *Cytokine* 11:16-28, 1999
119. Grimm MC, Ben Baruch A, Howard OMZ, Wang JM, Oppenheim JJ: Opiate inhibition of chemokine-induced chemotaxis. *Ann N Y Acad Sci* 840:9-20, 1998
120. Grimm MC, Ben Baruch A, Taub DD, Howard OM, Resau JH, Wang JM, Ali H, Richardson R, Snyderman R, Oppenheim JJ: Opiates transdeactivate chemokine receptors: delta and mu opiate receptor-mediated heterologous desensitization. *J Exp Med* 188:317-325, 1998
121. Haberstock H, Marotti T: The relevance of intact enkephalin molecule in predominantly delta opioid receptor mediated superoxide anion release. *Neuropeptides* 29:357-365, 1995
122. Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD: Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 179:269-277, 1994
123. Haines KA, Reibman J, Callegari PE, Abramson SB, Philips MR, Weissmann: Cocaine and its derivatives blunt neutrophil functions without influencing phosphorylation of a 47-kilodalton component of the reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase. *J Immunol* 144:4757-4764, 1990
124. Hall R, Adderley N, MacLaren C, McIntyre A, Barker R, Imrie D, Allen C, Glenn J, Fairhurst K, McLaren R: Does intrathecal morphine alter the stress response following coronary artery bypass grafting surgery? *Can J Anaesth* 47:463-466, 2000
125. Hamann L, Schumann RR, Flad HD, Brade L, Rietschel ET, Ulmer AJ: Binding of lipopolysaccharide (LPS) to CHO cells does not correlate with LPS-induced NF-kappaB activation. *Eur J Immunol* 30:211-216, 2000
126. Hamblin A, Taylor M, Bernhagen J, Shakoov Z: A method of preparing blood leucocytes for flow cytometry which prevents upregulation of leucocyte integrins. *J Immunol Meth* 146:219-228, 1992
127. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K: Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 56:559-564, 1994
128. Haslett C, Guthrie LA, Kopaniak MM, Johnston RB, Henson PM: Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace contamination of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol* 119:101-110, 1985
129. Heesen M, Menges T, Dietrich GV, Zeiler D, Hempelmann G: Increase in interleukin-6 plasma concentrations following hypotensive anesthesia with sodium nitroprusside. *Anaesthesist* 44:328-333, 1995
130. Heine J, Leuwer M, Scheinichen D, Arseniev L, Jaeger K, Piepenbrock S: Flow cytometry evaluation of the in vitro influence of four i.v. anaesthetics on respiratory burst of neutrophils. *Br J Anaesth* 77:387-392, 1996

131. Heller A, Heller S, Blecken S, Urbaschek R, Koch T: Effects of intravenous anesthetics on bacterial elimination in human blood in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* 42:518-526, 1998
132. Henderson LM, Chappell JB: Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur J Biochem* 217:973-980, 1993
133. Hermens JM, Ebertz JM, Hanifin JM, Hirshman CA: Comparison of histamine release in human skin mast cells induced by morphine, fentanyl, and oxymorphone. *Anesthesiology* 62:124-129, 1985
134. Hill GE, Whitten CW, Landers DF: The influence of cardiopulmonary bypass on cytokines and cell-cell communication. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 11:367-375, 1997
135. Ho WK, Cheung KW, Leung KN, Wen HL: Suppression of immunological functions in morphine addicted mice. *NIDA Res Monogr* 75:599-602, 1986
136. Hofbauer R, Moser D, Salfinger H, Frass M, Kapiotis S: Sufentanil inhibits migration of human leukocytes through human endothelial cell monolayers. *Anesth Analg* 87:1181-1185, 1998
137. Horsburgh CRJ, Anderson JR, Boyko EJ: Increased incidence of infections in intravenous drug users. *Infect Control Hosp Epidemiol* 10:211-215, 1989
138. House RV, Thamas PT, Bhargava HN: In vitro evaluation of fentanyl and meperidine for immunomodulatory activity. *Immunol Lett* 46:117-124, 1995
139. Hynes RO: Integrins: versality, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25, 1992
140. Ikewaki N, Tamauchi H, Inoko H: Modulation of cell surface antigens and regulation of phagocytic activity mediated by CD11b in the monocyte-like cell line U937 in response to lipopolysaccharide. *Tissue Antigens* 42:125-132, 1993
141. Imai T, Takahashi K, Masuo F, Goto F: Anaesthesia affects outcome of sepsis in mice. *Can J Anaesth* 45:360-366, 1998
142. Inagaki N, Kuromi H, Gono T, Okamoto Y, Ishida H, Seino Y, Kaneko T, Iwanaga T, Seino S: Expression and role of ionotropic glutamate receptors in pancreatic islet cells. *FASEB J* 9:686-691, 1995
143. Jaeger K, Scheinichen D, Heine J, Andre M, Bund M, Piepenbrock S, Leuwer M: Remifentanyl, fentanyl, and alfentanil have no influence on the respiratory burst of human neutrophils in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* 42:1110-1113, 1998
144. Jain J, Loh C, Rao A: Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 7:333-342, 1995
145. Jessop DS, Lightman SL, Chowdrey HS: Effects of a chronic inflammatory stress on levels of pro-opiomelanocortin-derived peptides in the rat spleen and thymus. *J Neuroimmunol* 49:197-203, 1994
146. Johnson DR, Douglas I, Jahnke A, Ghosh S, Pober JS: A sustained reduction in I kappa B-beta may contribute to persistent NF-kappa B activation in human endothelial cells. *J Biol Chem* 271:16317-16322, 1996
147. Kanellopoulos A, Lenz G, Mühlbauer B: Stereoselective differences in the vasorelaxing effects of S(+) and R(-) ketamine on rat isolated aorta. *Anesthesiology* 88:718-724, 1998
148. Kansas GS: Selectins and their ligands. *Blood* 88:3259-3287, 1996
149. Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Ogata J, Inoue Y, Shigematsu A: Ketamine suppresses proinflammatory cytokine production in human whole blood in vitro. *Anesth Analg* 89:665-669, 1999

150. Keller HU, Fedier A, Rohner R: Relationship between light scattering in flow cytometry and changes in shape, volume, and actin polymerization in human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* 58:519-525, 1995
151. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM: Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9114-9119, 1996
152. Kimes AS, Smith WJ, Winchell CJ, London ED: Effects of morphine on the phenotypic expression of cell surface markers on murine lymphocytes. *Life Sci* 51:807-815, 1992
153. Kontny E, Ziolkowska M, Ryzewska A, Maslinski W: Protein kinase c-dependent pathway is critical for the production of pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha, IL-1beta, IL-6). *Cytokine* 11:839-848, 1999
154. Kremer JP, Jarrar D, Steckholzer U, Ertel W: Interleukin-1, -6 and tumor necrosis factor-alpha release is down-regulated in whole blood from septic patients. *Acta Haematol* 95:268-273, 1996
155. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V: Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 113:147-156, 1998
156. Krumholz W, Demel C, Jung S, Meuthen G, Hempelmann G: The influence of fentanyl and alfentanil on functions of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* 37:386-389, 1993
157. Krumholz W, Demel C, Jung S, Meuthen G, Knecht J, Hempelmann G: The effects of thiopentone, etomidate, ketamine and midazolam on several bactericidal functions of polymorphonuclear leucocytes in vitro. *Eur J Anaesthesiol* 12:141-146, 1995
158. Krumholz W, Endrass J, Hempelmann G: Inhibition of phagocytosis and killing of bacteria by anaesthetic agents in vitro. *Br J Anaesth* 75:66-70, 1995
159. Krumholz W, Endrass J, Knecht J, Hempelmann G: The effects of midazolam, droperidol, fentanyl, and alfentanil on phagocytosis and killing of bacteria by polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* 39:624-627, 1995
160. Krumholz W, Käbisch S, Biscoping J, Hempelman G: Change in the adhesiveness of polymorphonuclear neutrophilic granulocytes by the intravenous anesthetics midazolam and ketamine. *Anaesth Intensivther Notfallmed* 22:211-213, 1987
161. Krumholz W, Weber C, Käbisch S, Hempelmann G: Effect of opioids on granulocyte adherence. *Anaesth Intensivther Notfallmed* 23:313-315, 1988
162. Kubes P, Kurose I, Granger DN: NO donors prevent integrin-induced leukocyte adhesion but not P-selectin-dependent rolling in postischemic venules. *Am J Physiol* 267:H931-H937, 1994
163. Kunsch C, Rosen CA: NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol* 13:6137-6146, 1993
164. Landmann R, Reber AM, Sansano S, Zimmerli W: Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock. *J Infect Dis* 173:661-668, 1996
165. Larsen B, Hoff G, Wilhelm W, Buchinger H, Wanner GA, Bauer M: Effect of intravenous anesthetics on spontaneous and endotoxin-stimulated cytokine response in cultured human whole blood. *Anesthesiology* 89:1218-1227, 1998
166. Ledbetter JA, Grosmaire LS, Hollenbaugh D, Aruffo A, Nadler SG: Agonistic and antagonistic properties of CD40 mAb G28-5 are dependent on binding valency. *Circ Shock* 44:67-72, 1994

167. Lee DH, Tam SS, Wang E, Taylor GR, Plante RK, Lau CY: The NF-kappa B inhibitor, tepoxalin, suppresses surface expression of the cell adhesion molecules CD62E, CD11b/CD18 and CD106. *Immunol Lett* 53:109-113, 1996
168. Lee JD, Kato K, Tobias PS, Kirkland TN, Ulevitch RJ: Transfection of CD14 into 70Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *J Exp Med* 175:1697-1705, 1992
169. Lentsch AB, Shanley TP, Sarma V, Ward PA: In vivo suppression of NF-kappa B and preservation of I kappa B alpha by interleukin-10 and interleukin-13. *J Clin Invest* 100:2443-2448, 1997
170. Lepoivre M, Fieschi F, Coves J, Thelander L, Fontecave M: Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 179:442-448, 1991
171. LeVier DG, McCay JA, Stern ML, Harris LS, Page D, Brown RD, Musgrove DL, Butterworth LF, White KL, Jr., Munson AE: Immunotoxicological profile of morphine sulfate in B6C3F1 female mice. *Fundam Appl Toxicol* 22:525-542, 1994
172. Li CY, Chou TC, Wong CS, Ho ST, Wu CC, Yen MH, Ding YA: Ketamine inhibits nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated rat alveolar macrophages. *Can J Anaesth* 44:989-995, 1997
173. Lieberman MM, Sachanandani DM, Pinney CA: Comparative study of neutrophil activation by chemiluminescence and flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* 3:654-662, 1996
174. Limb GA, Hamblin AS, Wolstencroft RA, Dumonde DC: Selective up-regulation of human granulocytes integrins and complement receptor 1 by cytokines. *Immunology* 74:696-702, 1991
175. Lin KT, Xue JY, Nomen M, Spur B, Wong PY: Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *J Biol Chem* 270:16487-16490, 1995
176. Liu SF, Ye X, Malik AB: In vivo inhibition of nuclear factor-kappa B activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock. *J Immunol* 159:3976-3983, 1997
177. Liu SF, Ye X, Malik AB: Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents in vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation* 100:1330-1337, 1999
178. Lotsch J, Weiss M, Kobal G, Geisslinger G: Pharmacokinetics of morphine-6-glucuronide and its formation from morphine after intravenous administration. *Clin Pharmacol Ther* 63:629-639, 1998
179. Lund-Johansen F, Olweus J: Signal transduction in monocytes and granulocytes measured by multiparameter flow cytometry. *Cytometry* 13:693-702, 1992
180. Lynn WA, Raetz CR, Qureshi N, Golenbock DT: Lipopolysaccharide-induced stimulation of CD11b/CD18 expression on neutrophils. Evidence of specific receptor-based response and inhibition by lipid A-based antagonists. *J Immunol* 147:3072-3079, 1991
181. Macey MG, McCarthy DA, Newland AC: The ex vivo function and expression of function-associated antigens of peripheral blood neutrophils and monocytes. *Exp Hematol* 22:967-972, 1994
182. Madara JL: Migration of neutrophils through epithelial monolayers. *Trends Cell Biol* 4:4-7, 1994

183. Magazine HI, Liu Y, Bilfinger TV, Fricchione GL, Stefano GB: Morphine-induced conformational changes in human monocytes, granulocytes, and endothelial cells and in invertebrate immunocytes and microglia are mediated by nitric oxide. *J Immunol* 156:4845-4850, 1996
184. Makman MH, Bilfinger TV, Stefano GB: Human granulocytes contain an opiate alkaloid-selective receptor mediating inhibition of cytokine-induced activation and chemotaxis. *J Immunol* 154:1323-1330, 1995
185. Makman MH, Dobrenis K, Surratt CK: Properties of mu 3 opiate alkaloid receptors in macrophages, astrocytes, and HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Adv Exp Med Biol* 437:137-148, 1998
186. Marcoli M, Ricevuti G, Mazzone A, Bekkering M, Lecchini S, Frigo GM: Opioid-induced modification of granulocyte function. *Int J Immunopharmacol* 10:425-433, 1988
187. Marie C, Fitting C, Muret J, Payen D, Cavaillon JM: Interleukin-8 production in whole blood assays: Is interleukin-10 responsible for the downregulation observed in sepsis? *Cytokine* 12:55-61, 2000
188. Marie C, Muret J, Fitting C, Losser MR, Payen D, Cavaillon JM: Reduced ex vivo interleukin-8 production by neutrophils in septic and nonseptic systemic inflammatory response syndrome. *Blood* 91:3439-3446, 1998
189. Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE: The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 197:517-532, 1976
190. Massotte D, Kieffer BL: A molecular basis for opiate action. *Essays Biochem* 33:65-77, 1998
191. Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL: Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383:819-823, 1996
192. Matthews JR, Botting CH, Panico M, Morris HR, Hay RT: Inhibition of NF-kappa B DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res* 24:2236-2242, 1996
193. Mayer AM, Brenic S, Glaser KB: Pharmacological targeting of signaling pathways in protein kinase C- stimulated superoxide generation in neutrophil-like HL-60 cells: effect of phorbol ester, arachidonic acid and inhibitors of kinase(s), phosphatase(s) and phospholipase A2. *J Pharmacol Exp Ther* 279:633-644, 1996
194. McDonald PP, Bald A, Cassatella MA: Activation of the NF-kappa B pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood* 89:3421-3433, 1997
195. McDonald PP, Bovolenta C, Cassatella MA: Activation of distinct activation factors in neutrophils by bacterial LPS, interferon- γ , and GM-CSF and the necessity to overcome the action of endogenous proteases. *Biochemistry* 37:13165-13173, 1998
196. Medvedev AE, Flo T, Ingalls RR, Golenbock DT, Teti G, Vogel SN, Espevik T: Involvement of CD14 and complement receptors CR3 and CR4 in nuclear factor-kappa B activation and TNF production induced by lipopolysaccharide and group B streptococcal cell walls. *J Immunol* 160:4535-4542, 1998
197. Meyer M, Pahl HL, Baeuerle PA: Regulation of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 by redox changes. *Chem Biol Interact* 91:91-100, 1994
198. Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA: H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* 12:2005-2015, 1993

199. Miller LS, Morita Y, Rangan U, Kondo S, Clemens MG, Bulkley GB: Suppression of cytokine-induced neutrophil accumulation in rat mesenteric venules in vivo by general anesthesia. *Int J Microcirc Clin Exp* 16:147-154, 1996
200. Moll T, Czyz M, Holzmüller H, Hofer-Warbinek R, Wagner E, Winkler H, Bach FH, Hofer E: Regulation of the tissue factor promoter in endothelial cells. Binding of NF kappa B-, AP-1-, and Sp1-like transcription factors. *J Biol Chem* 270:3849-3857, 1995
201. Morel F, Doussière J, Vignais PV: The superoxide-generation oxidase of phagocytic cells: physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* 201:523-546, 1991
202. Mori N, Oishi K, Sar B, Mukaida N, Nagatake T, Matsushima K, Yamamoto N: Essential role of transcription factor nuclear factor-kappa B in regulation of interleukin-8 gene expression by nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory epithelial cells. *Infect Immun* 67:3872-3878, 1999
203. Moudgil GC: Effect of premedicants, intravenous anaesthetic agents and local anaesthetics on phagocytosis in vitro. *Can Anaesth Soc J* 28:597-602, 1981
204. Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K: Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 56:554-558, 1994
205. Nebe, C. T. Durchflußzytometrische Meßtechnik und Datenauswertung. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin* 23:111-113, 1996
206. Nikitovic D, Holmgren A, Spyrou G: Inhibition of AP-1 DNA binding by nitric oxide involving conserved cysteine residues in Jun and Fos. *Biochem Biophys Res Commun* 242:109-112, 1998
207. Nishina K, Akamatsu H, Mikawa K, Shiga M, Maekawa N, Obara H, Niwa Y: The inhibitory effects of thiopental, midazolam, and ketamine on human neutrophil functions. *Anesth Analg* 86:159-165, 1998
208. Noviello L, Papadia S, Capobianchi MR, Negri L: Immunomodulatory responses to delta-opioid receptor ligands in human lymphocytes. *Eur J Pharmacol* 332:R1-R2, 1997
209. O'Shea JJ, Brown EJ, Seligmann BE, Metcalf JA, Frank MM, Gallin JI: Evidence for distinct intracellular pools of receptors for C3b and C3bi in human neutrophils. *J Immunol* 134:2580-2587, 1985
210. Ohlsson K, Linder C, Lundberg E, Axelsson L: Release of cytokines and proteases from human peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells following phagocytosis and LPS stimulation. *Scand J Clin Lab Invest* 56:461-470, 1996
211. Ostermann ME, Keenan SP, Seiferling RA, Sibbald WJ: Sedation in the intensive care unit: a systematic review. *JAMA* 283:1451-1459, 2000
212. Pahl HL, Baeuerle PA: Activation of NF-kappa B by ER stress requires both Ca₂₊ and reactive oxygen intermediates as messengers. *FEBS Lett* 392:129-136, 1996
213. Pahl HL, Baeuerle PA: The ER-overload response: activation of NF-kappa B. *Trends Biochem Sci* 22:63-67, 1997
214. Pahl HL, Scheibe RJ, Zhang DE, Chen HM, Galson DL, Maki RA, Tenen DG: The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *J Biol Chem* 268:5014-5020, 1993
215. Park SK, Lin HL, Murphy S: Nitric oxide regulates nitric oxide synthase-2 gene expression by inhibiting NF-kappa B binding to DNA. *Biochem J* 322:609-613, 1997

216. Paugam C, Chollet-Martin S, Dehoux M, Chatel D, Brient N, Desmonts JM, Philip I: Neutrophil expression of CD11b/CD18 and IL-8 secretion during normothermic cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 11:575-579, 1997
217. Peng HB, Libby P, Liao JK: Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem* 270:14214-14219, 1995
218. Perschel WT, Langefeld T, Yildiz M: Beschreibung einer Methode zur Quantifizierung der granulozytären Phagozytose von *Staphylococcus aureus* K 807 mittels Flow-Zytometrie. *Med Welt* 45:100-105, 1994
219. Perticarari S, Presani G, Banfi E: A new flow cytometric assay for the evaluation of phagocytosis and the oxidative burst in whole blood. *J Immunol Methods* 170:117-124, 1994
220. Perticarari S, Presani G, Mangiarotti MA, Banfi E: Simultaneous flow cytometric method to measure phagocytosis and oxidative products by neutrophils. *Cytometry* 12:687-693, 1991
221. Peterson PK, Gekker G, Brummitt C, Pentel P, Bullock M, Simpson M, Hitt J, Sharp B: Suppression of human peripheral blood mononuclear cell function by methadone and morphine. *J Infect Dis* 159:480-487, 1989
222. Peterson PK, Molitor TW, Chao CC: The opioid-cytokine connection. *J Neuroimmunol* 83:63-69, 1998
223. Peterson PK, Sharp BM, Gekker G, Portoghese PS, Sannerud K, Balfour HH, Jr.: Morphine promotes the growth of HIV-1 in human peripheral blood mononuclear cell cocultures. *AIDS* 4:869-873, 1990
224. Piros ET, Hales TG, Evans CJ: Functional analysis of cloned opioid receptors in transfected cell lines. *Neurochem Res* 21:1277-1285, 1996
225. Radtke, H. Quantitative Durchflußzytometrie: Absolutzahlmessung in Vollblut und Blutkomponenten. *Infusionsther Transfusionsmed* 23, 114. 1996.
226. Raychaudhuri B, Dweik R, Connors MJ, Buhrow L, Malur A, Drazba J, Arroliga AC, Erzurum SC, Kavuru MS, Thomassen MJ: Nitric oxide blocks nuclear factor-kappa B activation in alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:311-316, 1999
227. Read MA, Cordle SR, Veach RA, Carlisle CD, Hawiger J: Cell-free pool of CD14 mediates activation of transcription factor NF- kappa B by lipopolysaccharide in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9887-9891, 1993
228. Repo H, Jansson SE, Leirisalo Repo M: Flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo. *J Immunol Methods* 164:193-202, 1993
229. Rest RF: Measurement of human neutrophil respiratory burst activity during phagocytosis of bacteria. *Methods Enzymol* 236:119-136, 1994
230. Robinson JM, Badwey JA: The NADPH oxidase complex of phagocytic leucocytes: a biochemical and cytochemical view. *Histochemistry* 103:163-180, 1995
231. Roebuck KA: Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappa B. *Int J Mol Med* 4:223-230, 1999
232. Roebuck KA: Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 19:429-438, 1999

233. Roebuck KA, Carpenter LR, Lakshminarayanan V, Page SM, Moy JN, Thomas LL: Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *J Leukoc Biol* 65:291-298, 1999
234. Rokita E, Menzel EJ: Characteristics of CD14 shedding from human monocytes. Evidence for the competition of soluble CD14 (sCD14) with CD14 receptors for lipopolysaccharide (LPS) binding. *APMIS* 105:510-518, 1997
235. Romeu MA, Mestre M, Gonzalez L, Valls A, Verdaguer J, Corominas M, Bas J, Massip E, Buendia E: Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults. Comparison of fresh blood lysis technique, Ficoll-Paque separation and cryopreservation. *J Immunol Methods* 154:7-10, 1992
236. Rosenberg JS, Melnicoff MJ, Wilding P: Fc receptors for IgG on human neutrophils: analysis of structure and function by using monoclonal antibody probes. *Clin Chem* 31:1444-1448, 1985
237. Rothe G, Oser A, Valet G: Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* 75:354-355, 1988
238. Rothe G, Valet G: Flow cytometric assays of oxidative burst activity in phagocytes. *Methods Enzymol* 233:539-548, 1994
239. Roy S, Cain KJ, Chapin RB, Charboneau RG, Barke RA: Morphine modulates NF kappa B activation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 245:392-396, 1998
240. Roy S, Cain KJ, Charboneau RG, Barke RA: Morphine accelerates the progression of sepsis in an experimental sepsis model. *Adv Exp Med Biol* 437:21-31, 1998
241. Roy S, Chapin RB, Cain KJ, Charboneau RG, Ramakrishnan S, Barke RA: Morphine inhibits transcriptional activation of IL-2 in mouse thymocytes. *Cell Immunol* 179:1-9, 1997
242. Roy S, Charboneau RG, Barke RA: Morphine synergizes with lipopolysaccharide in a chronic endotoxemia model. *J Neuroimmunol* 95:107-114, 1999
243. Roytblat L, Talmor D, Rachinsky M, Greemberg L, Pekar A, Appelbaum A, Gurman GM, Shapira Y, Duvdenani A: Ketamine attenuates the interleukin-6 response after cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 87:266-271, 1998
244. Sacerdote P, Panerai AE: Analysis of the beta-endorphin structure-related activity on human monocyte chemotaxis: importance of the N- and C-terminal. *Peptides* 10:565-569, 1989
245. Sachs L: Verteilungsunabhängige Verfahren. *Angewandte Statistik*. Edited by Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York, 1997, pp 380-393
246. Salden HJ, Bas BM: Endotoxin binding to platelets in blood from patients with a sepsis syndrome. *Clin Chem* 40:1575-1579, 1994
247. Sasaki DT, Dumaas SE, Engleman EG: Discrimination of viable and non-viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence. *Cytometry* 8:413-420, 1987
248. Schmidt H, Ebeling D, Bauer H, Bach A, Böhrer H, Gebhard MM, Martin E: Ketamine attenuates endotoxin-induced leukocyte adherence in rat mesenteric venules. *Crit Care Med* 23:2008-2014, 1995
249. Schmidt KN, Traenckner EB, Meier B, Baeuerle PA: Induction of oxidative stress by okadaic acid is required for activation of transcription factor NF-kappa B. *J Biol Chem* 270:27136-27142, 1995

250. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10:2247-2258, 1991
251. Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W: Rapid detection of octamer binding proteins with mini-extracts prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17:6419, 1989
252. Sedqi M, Roy S, Ramakrishnan S, Elde R, Loh HH: Complementary DNA cloning of a mu-opioid receptor from rat peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 209:563-574, 1995
253. Sen CK, Roy S, Packer L: Involvement of intracellular Ca^{2+} in oxidant-induced NF kappa B activation. *FEBS Lett* 385:58-62, 1996
254. Sharp BM, McKean DJ, McAllen K, Shahabi NA: Signaling through delta opioid receptors on murine splenic T cells and stably transfected Jurkat cells. *Ann N Y Acad Sci* 840:420-424, 1998
255. Shimada M, Winchurch RA, Beloucif S, Robotham JL: Effect of anesthesia and surgery on plasma cytokine levels. *J Crit Care* 8:109-116, 1993
256. Shimaoka M, Iida T, Ohara A, Taenaka N, Mashimo T, Honda T, Yoshiya I: Ketamine inhibits nitric oxide production in mouse-activated macrophage-like cells. *Br J Anaesth* 77:238-242, 1996
257. Shin WS, Hong YH, Peng HB, De Caterina R, Libby P, Liao JK: Nitric oxide attenuates vascular smooth muscle cell activation by interferon-gamma. The role of constitutive NF-kappa B activity. *J Biol Chem* 271:11317-11324, 1996
258. Sibinga NE, Goldstein A: Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune system. *Annu Rev Immunol* 6:219-249, 1988
259. Singh VK, Bajpai K, Narayan P, Yadav VS, Dhawan VC, Haq W, Mathur KB, Agarwal SS: Delta-opioid receptor antagonist inhibits immunomodulation by Met-enkephalin analogs. *Neuroimmunomodulation* 6:355-360, 1999
260. Singhal PC, Reddy K, Franki N, Sanwal V, Gibbons N: Morphine induces splenocyte apoptosis and enhanced mRNA expression of cathepsin-B. *Inflammation* 21:609-617, 1997
261. Smith DJ, Pekoe GM, Martin LL, Coalgate B: The interaction of ketamine with the opiate receptor. *Life Sci* 26:789-795, 1980
262. Smith JA, Weidemann MJ: Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J Immunol Methods* 162:261-268, 1993
263. Sobel RM, Morgan BW, Murphy M: Ketamine in the ED: medical politics versus patient care. *Am J Emerg Med* 17:722-725, 1999
264. Sokoloski JA, Sartorelli AC, Rosen CA, Narayanan R: Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B block CD11b expression and alter adhesion properties of differentiated HL-60 granulocytes. *Blood* 82:625-632, 1993
265. Sorensen AN, Claesson MH: Effect of the opioid methionine enkephalinamide on signal transduction in human T-lymphocytes. *Life Sci* 62:1251-1259, 1998
266. Spiecker M, Darius H, Kaboth K, Hubner F, Liao JK: Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J Leukoc Biol* 63:732-739, 1998

267. Speiecker M, Peng HB, Liao JK: Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of I kappa B alpha. *J Biol Chem* 272:30969-30974, 1997
268. Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434, 1990
269. Stefano GB, Christensen VB, Tonnesen E, Liu Y, Hughes TK, Jr., Bilfinger TV: Interleukin-10 stimulation of endogenous nitric oxide release from human saphenous veins diminishes immunocyte adherence. *J Cardiovasc Pharmacol* 30:90-95, 1997
270. Stefano GB, Digenis A, Spector S, Leung MK, Bilfinger TV, Makman MH, Scharrer B, Abumrad NN: Opiate-like substances in an invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90:11099-11103, 1993
271. Stefano GB, Goumon Y, Bilfinger TV, Welters ID, Cadet P: Basal nitric oxide limits immune, nervous and cardiovascular excitation: human endothelia express a mu opiate receptor. *Prog Neurobiol* 60:513-530, 2000
272. Stefano GB, Hartman A, Bilfinger TV, Magazine HI, Liu Y, Casares F, Goligorsky MS: Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation. *J Biol Chem* 270:30290-30293, 1995
273. Stefano GB, Kushnerik V, Rodriguez M, Bilfinger TV: Inhibitory effect of morphine on granulocyte stimulation by tumor necrosis factor and substance P. *Int J Immunopharmacol* 16:329-334, 1993
274. Stefano GB, Melchiorri P, Negri L, Hughes TK, Jr., Scharrer B: [D-Ala2]deltorphin I binding and pharmacological evidence for a special subtype of delta opioid receptor on human and invertebrate immune cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89:9316-9320, 1992
275. Stefano GB, Scharrer B: Endogenous morphine and related opiates, a new class of chemical messengers. *Adv Neuroimmunol* 4:57-67, 1994
276. Stefano GB, Scharrer B, Smith EM, Hughes TK, Jr., Magazine HI, Bilfinger TV, Hartman AR, Fricchione GL, Liu Y, Makman MH: Opioid and opiate immunoregulatory processes. *Crit Rev Immunol* 16:109-144, 1996
277. Stein B, Baldwin ASJ, Ballard DW, Greene WC, Angel P, Herrlich P: Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J* 12:3879-3891, 1993
278. Stephens LA, Thomas HE, Kay TW: Protection of NIT-1 pancreatic beta-cells from immune attack by inhibition of NF-kappa B. *J Autoimmun* 10:293-298, 1997
279. Stewart CC: Multiparameter analysis of leukocytes by flow cytometry. *Methods Cell Biol* 33:427-450, 1990
280. Sucic M, Kolevska T, Kopjar B, Kosanovic M, Drobnyak M, Zalud I, Marusic M: Accuracy of routine flow-cytometric bitmap selection for three leucocyte populations. *Cytometry* 10:442-447, 1989
281. Sueoka E, Sueoka N, Kai Y, Suganuma M, Kanematsu K, Yamamoto T, Fujiki H: Anticancer activity of morphine and its synthetic derivative, KT-90, mediated through apoptosis and inhibition of NF-kappa B activation. *Biochem Biophys Res Commun* 252:566-570, 1998
282. Sugita N, Kimura A, Matsuki Y, Yamamoto T, Yoshie H, Hara K: Activation of transcription factors and IL-8 expression in neutrophils stimulated with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *Inflammation* 22:253-267, 1998

283. Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC: NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259:1912-1915, 1993
284. Szekely A, Heindl B, Zahler S, Conzen PF, Becker BF: S(+)-ketamine, but not R(-)-ketamine, reduces postischemic adherence of neutrophils in the coronary system of isolated guinea pig hearts. *Anesth Analg* 88:1017-1024, 1999
285. Tabuchi A, Sano K, Oh E, Tsuchiya T, Tsuda M: Modulation of AP-1 activity by nitric oxide (NO) in vitro: NO-mediated modulation of AP-1. *FEBS Lett* 351:123-127, 1994
286. Takashiba S, Van Dyke TE, Amar S: Inhibition of nuclear factor kappa B subunit p65 mRNA accumulation in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells treated with sodium salicylate. *Oral Microbiol Immunol* 11:420-424, 1996
287. Takenaka I, Ogata M, Koga K, Matsumoto T, Shigematsu A: Ketamine suppresses endotoxin-induced tumor necrosis factor alpha production in mice. *Anesthesiology* 80:402-408, 1994
288. Taylor NM, Lacoumenta S, Hall GM: Fentanyl and the interleukin-6 response to surgery. *Anaesthesia* 52:112-115, 1997
289. Thieblemont N, Haeffner-Cavaillon N, Haeffner A, Cholley B, Weiss L, Kazatchkine MD: Triggering of complement receptors CR1 (CD35) and CR3 (CD11b/CD18) induces nuclear translocation of NF-kappa B (p50/p65) in human monocytes and enhances viral replication in HIV-infected monocytic cells. *J Immunol* 155:4861-4867, 1995
290. Thom SR, Ohnishi ST, Ischiropoulos H: Nitric oxide released by platelets inhibits neutrophil B2 integrin function following acute carbon monoxide poisoning. *Toxicol Appl Pharmacol* 128:105-110, 1994
291. Trinkle LS, Wellhausen SR, McLeish KR: A simultaneous flow cytometric measurement of neutrophil phagocytosis and oxidative burst in whole blood. *Diagn Clin Immunol* 5:62-68, 1987
292. Tubaro E, Avico U, Santiangeli C, Zuccaro P, Cavallo G, Pacifici R, Croce C, Borelli G: Morphine and methadone impact on human phagocytic physiology. *Int J Immunopharmacol* 7:865-874, 1985
293. Tubaro E, Borelli G, Croce C, Cavallo G, Santiangeli C: Effect of morphine on resistance to infection. *J Infect Dis* 148:656-666, 1983
294. Tubaro E, Santiangeli C, Belogi L, Borelli G, Cavallo G, Croce C, Avico U: Methadone vs morphine: comparison of their effect on phagocytic functions. *Int J Immunopharmacol* 9:79-88, 1987
295. van Amersfoort ES, van Strijp JAG: Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leucocytes. *Cytometry* 17:294-301, 1994
296. van Pelt LJ, van Zwieten R, Weening RS, Roos D, Verhoeven AJ, Bolscher BG: Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst. *J Immunol Methods* 191:187-196, 1996
297. Verhoef J, Visser MR: Neutrophil phagocytosis and killing: normal function and microbial evasion. *The neutrophil*. Edited by Abramson JS, Wheeler JG. New York, Oxford University Press, 1993, pp 110-137
298. Villarete LH, Remick DG: Nitric oxide regulation of IL-8 expression in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 211:671-676, 1995

299. Villarete LH, Remick DG: Nitric oxide regulation of interleukin-8 gene expression. *Shock* 7:29-35, 1997
300. Vlahopoulos S, Boldogh I, Casola A, Brasier AR: Nuclear factor-kappa B-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor alpha: evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. *Blood* 94:1878-1889, 1999
301. von Knethen A, Brune B: Superinduction of cyclooxygenase-2 by NO(*) and agonist challenge involves transcriptional regulation mediated by AP-1 activation. *Biochemistry* 39:1532-1540, 2000
302. Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit M, Fleisher TA: Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J Immunol Meth* 178:89-97, 1995
303. Wang Y, Marsden PA: Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol* 34:71-90, 1995
304. Watson F, Robinson JJ, Edwards SW: Neutrophil function in whole blood and after purification: changes in receptor expression, oxidase activity and responsiveness to cytokines. *Bioscience Reports* 12:123-133, 1992
305. Wehlin L, Gustavsson K, Hallden G, Emilson A, Svensson A, Hild M, Lundahl J: Complement activation during blood sampling procedures alters the expression of CD11b/CD18 on human neutrophils. *Vox Sang* 74:21-26, 1998
306. Weigand MA, Schmidt H, Zhao Q, Plaschke K, Martin E, Bardenheuer HJ: Ketamine modulates the stimulated adhesion molecule expression on human neutrophils in vitro. *Anesth Analg* 90:206-212, 2000
307. Weiss M, Birkhahn A, Mettler S, Schneider M, Wernet P: Stereoselective suppression of neutrophil function by ketamine? *Immunopharmacol Immunotoxicol* 17:91-107, 1995
308. Welters I, Menges T, Ballesteros M, Sablotzki A, Görlach G, Hempelmann G: Acute phase and opsonin response in cardiac surgery patients: influence of underlying cardiac disease. *Perfusion* 13:447-454, 1998
309. Welters ID, Fimiani C, Bilfinger TV, Stefano GB: NF- κ B, nitric oxide and opiate signaling. *Med Hypotheses* 54:1-6, 2000
310. Welters ID, Spangenberg U, Menzebach A, Engel J, Menges T, Langefeld TW, Hempelmann G: Der Einfluß verschiedener Volumenersatzmittel auf die Funktion von neutrophilen Granulozyten in vitro. *Anaesthesist* 49:196-201, 2000
311. Wessels BC, Wells MT, Gaffin SL, Brock-Utne JG, Gathiram P, Hinshaw LB: Plasma endotoxin concentration in healthy primates and during E. coli-induced shock. *Crit Care Med* 16:601-605, 1988
312. White-Owen C, Alexander JW, Sramkoski RM, Babcock GF: Rapid whole-blood microassay using flow cytometry for measuring neutrophil phagocytosis. *J Clin Microbiol* 30:2071-2076, 1992
313. White IW, Gelb AW, Wexler HR, Stiller CR, Keown PA: The effects of intravenous anaesthetic agents on human neutrophil chemiluminescence. *Can Anaesth Soc J* 30:506-511, 1983
314. Wilson BM, Severn A, Rapson NT, Chana J, Hopkins P: A convenient human whole blood culture system for studying the regulation of tumour necrosis factor release by bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol Methods* 139:233-240, 1991

315. Wilsson A, Lundqvist H, Gustafsson M, Stendahl O: Killing of phagocytosed *Staphylococcus aureus* by human neutrophils requires intracellular free calcium. *J Leukoc Biol* 59:902-907, 1996
316. Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB: Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9813-9817, 1993
317. Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS: DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254:1001-1003, 1991
318. Wisdom R: AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res* 253:180-185, 1999
319. Wissink S, van de Stolpe A, Caldenhoven E, Koenderman L, van der Saag PT: NF-kappa B/Rel family members regulating the ICAM-1 promoter in monocytic THP-1 cells. *Immunobiology* 198:50-64, 1997
320. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433, 1990
321. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C: Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269:4705-4708, 1994
322. Yasui K, Becker EL, Sha'afi RI: Lipopolysaccharide and serum cause the translocation of G-protein to the membrane and prime neutrophils via CD14. *Biochem Biophys Res Commun* 183:1280-1286, 1992
323. Youssef PP, Mantzioris BX, Roberts Thomson PJ, Ahern MJ, Smith MD: Effects of ex vivo manipulation on the expression of cell adhesion molecules on neutrophils. *J Immunol Methods* 186:217-224, 1995
324. Zablocka B, Lukasiuk K, Lazarewicz JW, Domanska-Janik K: Modulation of ischemic signal by antagonists of N-methyl-D-aspartate, nitric oxide synthase, and platelet-activating factor in gerbil hippocampus. *J Neurosci Res* 40:233-240, 1995
325. Zhou MJ, Brown EJ: CR3 (Mac-1, $\alpha_m\beta_2$, CD11b/CD18) and Fc γ RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc γ RII and tyrosine phosphorylation. *J Cell Biol* 125:1407-1416, 1994

7 ANHANG

7.1 Abkürzungverzeichnis

Abkürzung	Voller Name
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Ammoniumsulfat
A	Adenosin
AEBSF	4-(2-Aminoäthyl)benzensulfonyl-Fluorid
AP-1	Aktivator-Protein 1
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	Bovines Serum-Albumin
C	Cytosin
cAMP	Zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cNOS	Constitutive nitric oxide synthase
CO_2	Kohlendioxid
CPA	Cyclopiazonsäure
CR 3	Komplementrezeptor
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosin-Triphosphat
dGTP	Desoxy-Guanin-Triphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidin-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dest	Destilliert
DFP	Diisopropyl-Fluorophosphat
DHR	Dihydrorhodamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -amino-ethyläther)-N,N,N',N'-Tetra-Essigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMSA	Electric mobility shift assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	Forward light scatter
G	Guanosin
h	Stunde
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure

HEPES	(N-[2-Hydroxyäthyl]piperazin-N'-[Ethansulfonsäure])
HRP	Horse-raddish peroxidase
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
LBP	LPS-bindendes Protein
L-NAME	N _ω -Nitro-L-Arginin-Methylester
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MFI	Median der Fluoreszenzintensität
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minuten
MOR	μ-Opiat-Rezeptor
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃ ⁻	Natriumbikarbonat
NF-κB	Nuclear Factor κB
NLA	N _ω -Nitro-L-Arginin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoff-Monoxid
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumjodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
PMN	Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PVDF	Polyvinyliden-Fluorid
RA	All-trans-retinoic acid
ROI	Reactive oxygen intermediates
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SNAP	S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamin
SSC	Sideward light scatter
T	Thymin
ZNS	Zentralnervensystem

7.2 Verwendete Materialien und Reagenzien

Substanz bzw. Material	Hersteller
(NH ₄) ₂ SO ₄	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
[γ- ³² P] ATP	Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA
12-Well-Zellkulturplatten	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
1-Bromo-3-Chloropropan	Molecular Research Center Inc., Cincinnati, Ohio, USA
1-step-Polymorphs	Accurate Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
AEBSF	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Agarose	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Anti-AP-1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Anti-CD11b-Antikörper	Serotec-Biozol, Eching, Deutschland
Anti-CD14-Antikörper	Serotec-Biozol, Eching, Deutschland
Anti-CD16-Antikörper	Serotec-Biozol, Eching, Deutschland
Anti-CD35-Antikörper	Serotec-Biozol, Eching, Deutschland
Anti-IκBα	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Anti-IgG-Antikörper (Ziege, Kaninchen, Mensch)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anti-NF-κB	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Blutentnahmeröhrchen (Na-Heparinat)	Kabe-Labortechnik, Nümbrecht-Eisenroth, Deutschland
Borsäure	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Cycletest Plus DNA Reagent-Kit [®]	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA
DC Protein Assay	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
DFP	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
DNA Quality Control Particles Kit	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
DTT	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA
EDTA	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
EGTA	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Ethanol	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
FACS-Brand-Lysing [®] -Lösung	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACSscan [®] -Reagenzröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS-Flow [®]	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Fentanyl	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
FITC	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
FMLP	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
First Strand Buffer	Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA
Glukose	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Glycerol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Glycin	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
H ₂ SO ₄	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
HEPES	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Isopropanol	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Kaleidoscope Protein Marker	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Substanz bzw. Material	Hersteller
KCl	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Ketamin, S(+)-Ketamin	Sigma, St. Louis, Missouri, USA bzw. Parke-Davis GmbH, Berlin, Deutschland
Kodak BioMax Light Film	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
L-Glutamin	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
L-NAME	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
LPS	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Methanol	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
MgCl ₂	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Morphinsulfat	Sigma, St. Louis, Missouri, USA Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland
NaCl	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Naloxon	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
NLA	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
OptEIA-Set human IL-8,	Pharmingen, San Diego, CA, USA
PBS	Sigma, St. Louis, Missouri, USA bzw. BAG, Lich, Deutschland
Penicillin	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Phagoburst [®] -Testkit	Orpegen, Heidelberg, Deutschland
PMA	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
PMSF	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Poly[dl-dC]	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Poly-L-Lysin	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Propidiumjodid	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
PVDF-Membran	Millipore, Bedford, Mass., USA
Pyruvat	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Random Hexadeoxynukleotid-Primer	Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA
Retinolsäure	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
RNase-Inhibitor	Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA
RPMI-Medium	Cellgro, Herndon, VA, USA
SDS	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Sense Reaktionspuffer	Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA
SNAP	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Streptomycin	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Superscript [™] II RNase H ⁻ Reverse Transkriptase	Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA
T4 Polynukleotid Kinase	Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA
Taq-DNA-Polymerase	Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA
Tri-Reagent	Molecular Research Center Inc., Cincinnati, Ohio, USA
Tris Base	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Tris-Cl-Gel	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Trypanblau-Lösung	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Türks-Lösung	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Tween 20	Sigma, Deisenhofen, Deutschland bzw. Sigma, St. Louis, Missouri, USA

7.3 Auflistung der Experimente

7.3.1 Meßparameter: Phagozytose

Testsubstanz	Konzentration	Verfahren	Inkubationszeiten	LPS	n	Abbildung/ Tabelle
Morphin	50 nM, 1 µM, 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 4
SNAP	1 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 4
NLA + Morphin	500 µM 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 4
Naloxon + Morphin	50 nM, 50 µM 50 nM, 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Tab. 3
Fentanyl	10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	15	Abb. 24
Naloxon + Fentanyl	100 ng/ml 100 ng/ml	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	15	Abb. 24
Ketamin	100 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Abb. 29
L-NAME	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Abb. 29
L-NAME	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min,	-	6	Abb. 29
Ketanest	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min,	-	6	Abb. 29

7.3.2 Meßparameter: Oxidativer Burst

Testsubstanz	Konzentration	Verfahren	Inkubationszeiten	LPS	n	Abbildung/ Tabelle
Morphin	50 nM, 1 µM, 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 5
SNAP	1 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 5
NLA + Morphin	50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 5
Naloxon + Morphin	50 nM, 50 µM 50 nM, 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Tab. 3
Fentanyl	10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	15	Abb. 25
Naloxon + Fentanyl	100 ng/ml 100 ng/ml	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	15	Abb. 25
Ketamin	100 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Abb. 29
L-NAME	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Abb. 29
L-NAME	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min,	-	6	Abb. 29
Ketanest	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min,	-	6	Abb. 29

7.3.3 Meßparameter: CD16

Testsubstanz	Konzentration	Verfahren	Inkubationszeit n	LPS	n	Abbildung / Tabelle
Morphin	50 nM, 1 µM, 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 6
SNAP	1 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 6
NLA + Morphin	500 µM 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 6
Naloxon + Morphin	50 nM, 50 µM 50 nM, 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Tab. 4
Fentanyl	10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	15	Abb. 26
Naloxon + Fentanyl	100 ng/ml 100 ng/ml	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	15	Abb. 26
Ketamin	100 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Tab. 9
L-NAME	500 µM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Tab. 9
L-NAME	500 µM	Durchflußzytometrie	10 min,	-	6	Tab. 9
Ketanest	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min,	-	6	Tab. 9

7.3.4 Meßparameter CD35

Testsubstanz	Konzentration	Verfahren	Inkubationszeiten	LPS	n	Abbildung/ Tabelle
Morphin	50 nM, 1 µM, 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 7
SNAP	1 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 7
NLA + Morphin	500 µM 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 7
Naloxon + Morphin	50 nM, 50 µM 50 nM, 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Tab. 4
Fentanyl	10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	15	Abb. 26
Naloxon + Fentanyl	100 ng/ml 100 ng/ml	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	15	Abb. 26
Ketamin	100 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Abb. 30
L-NAME	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Abb. 30
L-NAME	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Abb. 30
Ketanest	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Abb. 30

7.3.5 Meßparameter CD11b

Testsubstanz	Konzentration	Verfahren	Inkubationszeiten	LPS	n	Abbildung/ Tabelle
Morphin	50 nM, 1 µM, 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 8
SNAP	1 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 8
NLA + Morphin	500 µM 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 8
Naloxon + Morphin	50 nM, 50 µM 50 nM, 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Tab. 6
Fentanyl	10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	15	Abb. 27
Naloxon + Fentanyl	100 ng/ml 100 ng/ml	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	15	Abb. 27
Ketamin	100 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Abb. 31
L-NAME	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Abb. 31
L-NAME	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Abb. 31
Ketanest	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Abb. 31

7.3.6 Meßparameter CD14

Testsubstanz	Konzentration	Verfahren	Inkubationszeiten	LPS	n	Abbildung/ Tabelle
Morphin	50 nM, 1 µM, 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 9
SNAP	1 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 9
NLA + Morphin	500 µM 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 9
Naloxon + Morphin	50 µM 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min, 2,5 h	-	12	Abb. 9
Ketamin	100 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Abb. 32
L-NAME	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Abb. 32
L-NAME	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min,	-	6	Abb. 32
Ketanest	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min,	-	6	Abb. 32

7.3.7 Meßparameter: NF-κB

Testsubstanz	Konzentration	Verfahren	Inkubationszeiten	LPS	n	Zellen	Abbildung/ Tabelle
Morphin	50 nM, 50 µM	EMSA	2,5 h	100 ng/ml	3	HL-60	Abb. 10
Morphin	50 nM, 50 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	2,5 h	100 ng/ml	12	Monozyten, PMN	Abb. 12
Morphin	50 nM, 50 µM, 1 mM, 5 mM	Durchflußzytometrie	10 min	100 ng/ml	10	Monozyten, PMN	Tab. 7
Morphin	50 nM, 50 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	2,5 h	-	10	Monozyten, PMN	Tab. 8
SNAP	1 µM	Durchflußzytometrie	2,5 h	-	10	Monozyten, PMN	Tab. 8
Morphin	50 nM, 50 µM,	Durchflußzytometrie	10, 20 ,40, 60, 90, 120, 150 min	100 ng/ml	6	PMN	Abb. 13
Naloxon + Morphin	50 nM	Durchflußzytometrie	2,5 h	100 ng/ml	10	PMN	Abb. 14
Naloxon + Morphin	50 µM	Durchflußzytometrie	2,5 h	100 ng/ml	10	PMN	Abb. 14
Naloxon + Morphin	50 nM	Durchflußzytometrie	2,5 h	100 ng/ml	10	Monozyten	Abb. 15
Naloxon + Morphin	50 µM	Durchflußzytometrie	2,5 h	100 ng/ml	10	Monozyten	Abb. 15
L-NAME + Morphin	100 µM	Durchflußzytometrie	2,5 h	100 ng/ml	10	PMN, Monozyten	Abb. 16
NLA + Morphin	500 µM	Durchflußzytometrie	2,5 h	100 ng/ml	10	PMN, Monozyten	Abb. 16
Ketamin	100 µM, 1 mM	EMSA	10 min	100 ng/ml	3	U937	Abb. 33
Ketamin	100 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	100 ng/ml	3	U937	Abb. 34
Ketamin	100 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	100 ng/ml	6	PMN, Monozyten	Abb. 35
Ketamin	100 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	2,5 h	100 ng/ml	6	PMN, Monozyten	Abb. 36
-	-	Durchflußzytometrie		100 ng/ml, 10 ng/ml		PMN	Abb. 40
Ketamin	100 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	10 ng/ml	6	PMN, Monozyten	Abb. 43
Ketamin S	100 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	100 ng/ml	6	PMN, Monozyten	Abb. 44

7.3.8 Meßparameter: AP-1

Testsubstanz	Konzentration	Verfahren	Inkubationszeiten	LPS	n	Zellen	Abbildung/ Tabelle
Morphin	50 nM, 50 µM	EMSA	2,5 h	100 ng/ml	3	HL-60	Abb. 18
Morphin	50 nM, 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min	100 ng/ml	6	Monozyten, PMN	Abb. 19
Morphin	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Monozyten, PMN	Abb. 19
SNAP	1 µM	Durchflußzytometrie	10 min	100 ng/ml	6	Monozyten, PMN	Abb. 20
Naloxon + Morphin	50 µM 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min	100 ng/ml	6	PMN	Abb. 20
L-NAME + Morphin	500 µM 50 µM	Durchflußzytometrie	10 min	100 ng/ml	6	PMN, Monozyten	Abb. 20
SNAP	1 µM	Durchflußzytometrie	2,5 h	100 ng/ml	6	Monozyten, PMN	Abb. 21
Morphin	50 µM	Durchflußzytometrie	2,5 h	100 ng/ml	6	Monozyten, PMN	Abb. 21
Naloxon + Morphin	50 µM 50 µM	Durchflußzytometrie	2,5 h	100 ng/ml	6	Monozyten, PMN	Abb. 21
Ketamin	100 µM, 1 mM	EMSA	10 min	100 ng/ml	3	U937	Abb. 37
Ketamin	100 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	100 ng/ml	6	Monozyten, PMN	Abb. 38
Ketamin	1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	-	6	Monozyten, PMN	Abb. 38
Ketamin	100 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	2,5 h	100 ng/ml	6	Monozyten, PMN	Abb. 39
Ketamin	1 mM	Durchflußzytometrie	2,5 h	-	6	Monozyten, PMN	Abb. 39
-	-	Durchflußzytometrie		100 ng/ml, 10 ng/ml		PMN	Abb. 40
Ketamin	10 µM, 100 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	100 ng/ml	6	Monozyten, PMN	Abb. 41
Ketamin	10 µM, 100 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	2,5 h	10 ng/ml	6	Monozyten, PMN	Abb. 42
Ketamin S	100 µM, 1 mM	Durchflußzytometrie	10 min	100 ng/ml	6	PMN, Monozyten	Abb. 45

7.3.9 Meßparameter: $I\kappa B\alpha$

Testsubstanz	Konzentration	Verfahren	Inkubationszeiten	LPS	n	Zellen	Abbildung/ Tabelle
Morphin	50 μ M	Western Blot	2,5 h	100 ng/ml	3	HL-60	Abb. 11
Ketamin	1 mM	Western Blot	10 min	100 ng/ml	3	U937	Abb. 51
Ketamin	1 mM	RT-PCR	10 min	100 ng/ml	3	PMN	Abb. 52

7.3.10 Meßparameter: p65

Testsubstanz	Konzentration	Verfahren	Inkubationszeiten	LPS	n	Zellen	Abbildung/ Tabelle
Morphin	50 nM, 50 μ M	Western Blot	2,5 h	100 ng/ml	3	PMN	Abb. 11
Morphin	50 nM, 50 μ M	Western Blot	2,5 h	-	3	PMN	Abb. 11
NLA + Morphin	100 μ M 50 nM, 50 μ M	Western Blot	2,5 h	-	3	PMN	Abb. 11
Ketamin	100 μ M, 1 mM	RT-PCR	10 min	100 ng/ml	3	PMN	Abb. 50

7.3.11 Meßparameter: μ -Rezeptor

Zellen	Differenzierung	Verfahren	n	Abbildung
SH-SY5Y	-	RT-PCR	3	Abb. 22
U937	-	RT-PCR	3	Abb. 22
U937	monozytär	RT-PCR	3	Abb. 22
HL-60	-	RT-PCR	3	Abb. 22
HL-60	granulozytär	RT-PCR	3	Abb. 22

7.3.12 Meßparameter: NMDA1-Rezeptor

Zellen	Differenzierung	Verfahren	n	Abbildung
SH-SY5Y	-	RT-PCR	3	Abb. 46
U937	-	RT-PCR	3	Abb. 46

7.3.13 Meßparameter: Interleukin-8

Testsubstanz	Konzentration	Verfahren	Inkubationszeiten	LPS	n	Zellen	Abbildung/ Tabelle
Morphin	50 nM, 50 µM	ELISA	2,5 h	-	8	Vollblut	Abb. 23
Morphin	50 nM, 50 µM	ELISA	2,5 h	100 ng/ml	8	Vollblut	Abb. 23
SNAP	1 µM	ELISA	2,5 h	-	8	Vollblut	Abb. 23
SNAP	1 µM	ELISA	2,5 h	100 ng/ml	8	Vollblut	Abb. 23
Ketamin	100 µM, 200 µM, 400 µM, 1 mM	ELISA	10 min	100 ng/ml	8	Vollblut	Abb. 47
Ketamin	100 µM, 200 µM, 400 µM, 1 mM	ELISA	10 min	10 ng/ml	7	Vollblut	Abb. 48
Ketamin	100 µM, 1 mM	RT-PCR	10 min	100 ng/ml	7	PMN	Abb. 49

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Welters
Vornamen: Ingeborg Dorothea Maria
Geburtsdatum: 22. Februar 1968
Geburtsort: Bonn, Bundesrepublik Deutschland
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Verheiratet mit Martin Mogk

Ausbildung:

Grundschule:	August 1974 - Juli 1978	Grundschule, Darmstadt
Gymnasium:	August 1978 - Februar 1985	Edith-Stein-Schule, Darmstadt, Staatlich anerkanntes Gymnasium
	Februar 1985 - Juni 1987	Ludwig-Georgs-Gymnasium, Darmstadt, Humanistisches Gymnasium
Schulabschluß:	Juni 1987	Allgemeine Hochschulreife
Hochschulstudium:	Oktober 1987-November 1993	Justus-Liebig-Universität Gießen Fachbereich Humanmedizin
Auslandspraktika:	März 1992 - Mai 1992	Famulatur in Bogota, Kolumbien
	Juni 1993 – Oktober 1993	Praktisches Jahr, University of Alberta, Edmonton, Canada
Staatsexamina:	September 1989 August 1990 September 1992 November 1993	Ärztliche Vorprüfung Erstes Staatsexamen Zweites Staatsexamen Drittes Staatsexamen

Klinischer Werdegang:

	Dezember 1993 – Mai 1995	Ärztin im Praktikum, Abteilung für Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin, Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen
	Juni 1995 – Mai 1999	Assistenzärztin, Abteilung für Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin, Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen
Facharztprüfung	Juni 1999	Fachärztin für Anaesthesiologie
	Seit Juni 2000	Ärztin für Anaesthesiologie, Abteilung für Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin, Klinikum der Justus-Liebig- Universität Gießen

Wissenschaftliche Tätigkeit:

Promotion:	Mai 1996	Der Einfluß verschiedener Priming-Lösungen, unterschiedlicher kardialer Grunderkrankungen und des Geschlechtes auf plasmatische Kaskadensysteme bei herzchirurgischen Eingriffen
Stipendien:	September 1998 – Dezember 1998	NIH Fogarty Fellowship Neuroscience Research Institute, SUNY Old Westbury, New York, USA
	Juni 1999 bis Mai 2000	Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Neuroscience Research Institute, SUNY Old Westbury, New York, USA
Kooperationen:	Seit Dezember 1999	Senior Research Scientist, Mind/Body Medical Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

7.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Gunter Hempelmann danke ich für die Überlassung des Themas, die umfangreichen Laboreinrichtungen, die mir zur Durchführung der Arbeit zur Verfügung gestellt wurden und für seine Hilfestellung bei der Präsentation und Veröffentlichung der Ergebnisse. Bei der Planung und Organisation meines Amerika-Aufenthaltes hat er wesentliche Impulse gesetzt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Axel Menzebach, ohne den diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht entstanden wäre. Durch außerordentliches Engagement und überdurchschnittlichen Fleiß sowie Sorgfalt und Fachkenntnis bei der Durchführung der Experimente hat er einen unschätzbaren Beitrag geleistet. Zudem war er an der Erstellung und Verwaltung der Literaturdatenbanken maßgeblich beteiligt.

Bei Herrn Prof. George Stefano möchte ich mich für die stets freundliche und zugewandte Unterstützung bei Publikationen, fachlichen und organisatorischen Problemen und für ein tolles Jahr in Amerika bedanken. Während meines Aufenthalts am Neuroscience Research Institute in Old Westbury, USA, konnten wichtige Experimente für diese Arbeit durchgeführt werden. Dabei gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe in Old Westbury, insbesondere Herrn Dr. Patrick Cadet und Herrn Dr. Yannick Goumon für Beratung und Hilfestellung bei labortechnischen Fragestellungen.

Herr Prof. Dr. H. Teschemacher hat mir mit fachlichem Rat zum Themenkreis „Opiate“ stets zur Seite gestanden.

Dem Büro für Statistik Mogk und Reitze GbR danke ich für die Auswertung und graphische Verarbeitung der Daten.

Bei Frau Birgit Weber möchte ich mich für ihre Mitarbeit im Labor der Abteilung Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin in Giessen bedanken.

Herr Dr. Axel Mogk hat mit Durchsicht und Korrektur der Arbeit sowie durch inhaltliche und methodische Anregungen einen wichtigen Beitrag zum Gelingen der Arbeit geleistet.