

Aus dem Florence Nightingale Krankenhaus
Diakoniewerk Kaiserswerth
Chefarzt Professor Dr.Erckenbrecht

Wirkung von Hypnotika und Sedativa
auf die Funktion neutrophiler Granulocyten
im Endotoxinmodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
vorgelegt von

Martin Medve

2004

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

gez. Prof.Dr. Raab

Dekan

Referent: Prof.Dr. Erckenbrecht

Korreferent: Prof.Dr. Wettstein

GLOSSAR	6
<u>1</u> <u>EINLEITUNG</u>	<u>7</u>
<u>2</u> <u>FRAGESTELLUNG</u>	<u>8</u>
<u>3</u> <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>10</u>
3.1 MATERIAL	10
3.1.1 ARBEITSMATERIAL	10
3.1.2 GERÄTE	11
3.1.3 REAGENZIEN	11
3.1.4 MEDIKAMENTE	12
3.1.5 WIRKSUBSTANZFREIE LÖSUNGEN	13
3.1.6 FETTEMULSIONEN	14
3.1.7 ENDOTOXINE UND CYTOKINE	14
3.2 METHODEN	14
3.2.1 ISOLATION UND AUFBEREITUNG DER NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN	14
3.2.2 TESTANSATZ	16
3.2.3 LUMINOL-STAMMLÖSUNG	16
3.2.4 STIMULIERUNG NEUTROPHILER GRANULOCYTEN ZUR SAUERSTOFFRADIKALBILDUNG DURCH FMLP	17
3.2.5 HERSTELLUNG DER FMLP-STAMMLÖSUNG	18
3.2.6 STIMULIERUNG NEUTROPHILER GRANULOCYTEN ZUR SAUERSTOFFRADIKALBILDUNG DURCH FMLP	18
3.2.7 PRIMING	19
3.2.8 TNF- α	19
3.2.9 LIPID A	21
3.2.10 LIPOPOLYSACCHARID	21
<u>4</u> <u>VORVERSUCHE</u>	<u>22</u>
4.1 EINFLUß DER ZELLISOLIERUNG AUF DIE CHEMILUMINESZENZ NEUTROPHILER GRANULOZYTEN	22
4.2 ERFASSUNG DER SAUERSTOFFMETABOLITE DURCH CHEMILUMINESZENZMESSUNG	23
4.3 EINFLUß VON LUMINOL AUF DIE CHEMILUMINESZENZ	24
4.4 EINFLUß DES ZEITPUNKTES DER TESTSUBSTANZZUGABE AUF DIE CHEMILUMINESZENZ	25

4.5	VERDÜNNUNG DER MEDIKAMENTE, REINSUBSTANZEN UND WIRKSUBSTANZFREIEN LÖSUNGEN	26
4.6	MEDIKAMENTEN- UND LÖSUNGSMITTELKONZENTRATIONEN IM ENDOTOXINMODELL	26
4.6.1	KONZENTRATIONEN BEI LIPID A IN $\mu\text{G/ML}$	26
4.6.2	KONZENTRATIONEN BEI LPS IN $\mu\text{G/ML}$	27
4.6.3	KONZENTRATIONEN BEI TNF- α IN $\mu\text{G/ML}$	27
4.7	MINIMALE UND MAXIMALE STIMULATIONSNIVEAUS	28
4.7.2	INKUBATIONSZEITEN	31
4.7.3	VERSUCHSANSATZ ZUR BESTIMMUNG DES EINFLUSSES DER TESTSUBSTANZEN AUF DIE SAUERSTOFFRADIKALBILDUNG NEUTROPHILER GRANULOZYTEN	32
4.7.4	ERGEBNISSE DER VORVERSUCHE	32
4.8	AUSWERTUNG DER MEßDATEN	41
<u>5</u>	<u>STATISTIK</u>	<u>42</u>
<u>6</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>44</u>
6.1	STIMULATION DER NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN MIT LIPID A	44
6.1.1	DIAZEPAM	44
6.1.2	THIOPENTAL	45
6.1.3	ETOMIDATE	46
6.1.4	MIDAZOLAM	47
6.1.5	PROPOFOL	48
6.1.6	DIZEPAM LIPURO	49
6.1.7	METHOHEXITAL	50
6.2	STIMULATION DER NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN MIT LIPOPOLYSACCHARID	51
6.2.1	DIAZEPAM	51
6.2.2	THIOPENTAL	52
6.2.3	ETOMIDATE	53
6.2.4	MIDAZOLAM	54
6.2.5	PROPOFOL	55
6.2.6	DIAZEPAM-LIPURO	56
6.2.7	METHOHEXITAL	57
6.3	STIMULATION DER NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN MIT TNF-α	58
6.3.1	DIAZEPAM	58
6.3.2	THIOPENTAL	59
6.3.3	ETOMIDATE	60
6.3.4	MIDAZOLAM	61

6.3.5	PROPOFOL	62
6.3.6	DIAZEPAM-LIPURO	63
6.3.7	METHOHEXITAL	64
<u>7</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>65</u>
7.1	EINFLUß VON HYNOTIKA AUF NICHT GEPRIMTE BEZIEHUNGSWEISE DURCH CYTOKINE/ENDOTOXINE GEPRIMTE NEUTROPHILE GRANULOCYTEN	66
7.2	EINFLUß VON BENZODIAZEPINEN UND IHRER WIRKSUBSTANZFREIEN LÖSUNGEN AUF DIE CHEMILUMINESZENZ NEUTROPHILER GRANULOZYTEN	66
7.2.1	MIDAZOLAM (DORMICUM)	67
7.2.2	DIAZEPAM (VALIUM)	68
7.2.3	PERIPHERE BENZODIAZEPINBINDUNGSSTELLEN BEI DER HEMMUNG VON GRANULOZYTENFUNKTIONEN	70
7.2.4	DIAZEPAM-LIPURO	71
7.3	WIRKMECHANISMUS VON BARBITURATEN UND IHRER WIRKSUBSTANZFREIEN LÖSUNGEN AUF DIE CHEMILUMINESZENZ NEUTROPHILER GRANULOZYTEN	72
7.3.1	THIOPENTAL (TRAPANAL)	72
7.3.2	METHOHEXITAL (BREVIMYTAL@)	75
7.3.3	WIRKUNG DER BARBITURATE BEI DER HEMMUNG DER GRANULOZYTENFUNKTION	76
7.3.4	EINFLUß DER MCT / LCT-EMULSION LIPOFUNDIN MCT 20% AUF GRANULOZYTEN	76
7.3.5	EINFLUß VON INTRALIPID@ 10% AUF GRANULOZYTEN	79
7.4	EINFLUß VON ETOMIDAT UND SEINER WIRKSUBSTANZFREIEN LÖSUNGEN AUF NEUTROPHILE GRANULOZYTEN	81
7.4.1	ETOMIDAT-LIPURO	81
7.5	EINFLUß VON PROPOFOL UND SEINER WIRKSUBSTANZFREIEN LÖSUNG AUF DIE CHEMILUMINESZENZ NEUTROPHILER GRANULOZYTEN	82
7.6	KLINISCHE RELEVANZ DER ERGEBNISSE	84
<u>8</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>85</u>
<u>9</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>87</u>
<u>10</u>	<u>LEBENS LAUF</u>	<u>108</u>

Glossar

CL	Chemilumineszenz
cpm	Counts per minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FMLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
HBSS	Hank's balanced salt solution
IL	Interleukin
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
LA	Lipid A
LCT	Langkettige Triglyceride
LPS	Lipopolysaccharid
MCT	Mittelkettige Triglyceride
MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NCF	Neutrophilen-chemotaktischer Faktor
NK-Zellen	Natural Killer cells, natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PMN	Polymorphonuclear leukocytes, polymorphkernige neutrophile Granulozyten
RES	Retikuloendotheliales System
rpm.	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
TNF	Tumornekrosefaktor α
WSR	Wilcoxon Signed Rank Test

1 Einleitung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Anästhesiologischen Institut der Uni-Klinik Düsseldorf unter der Leitung von Professor Dr. Tarnow, Leiter der Anästhesiologischen Abteilung, durchgeführt und von PD Dr. Weiss, der zu Zeit in der Uni-Klinik Ulm tätig ist, beaufsichtigt.

„Respiratory Burst“ nennt man die Sauerstoffradikalbildung durch neutrophile Granulozyten. Durch reaktive Sauerstoffverbindungen werden biologische Membranen zerstört, Enzyme oder Nukleinsäuren verändert und Kollagenfibrillen und Hyaluronsäure in Bakterien depolymerisiert (Kappus, 1982). Bestimmte Strukturen, z.B. Mikroorganismen werden meist opsoniert. Als lösliche Stimulantien kommen verschiedene Verbindungen wie chemotaktische Faktoren, so zum Beispiel das in der vorliegenden Arbeit verwendeten N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP), Lipopolysaccharide (LPS, Endotoxin), Lipid A, Zytokine, wie der Tumornekrosefaktor (TNF- α), das Phorbol ester, der Komplementfaktor C5a, das Leukotrien LTB₄, und der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) in Frage (Klebanoff, 1992; Marasco, 1984). Durch Anlagerung des Stimulans kommt es über verschiedene Mechanismen zu einer Aktivierung der NADPH-Oxidase. Dieses in der Zellmembran gelegene Enzym katalysiert die Bildung der Superoxidanionen O₂⁻. In einer Folge von weiteren chemischen Reaktionen werden zahlreiche reaktive Sauerstoffmetabolite gebildet (Klebanoff, 1992).

Ein Beispiel für die klinische Bedeutung dieser Mechanismen bei der Abwehr bakterieller Infektionen wird an der "Septischen Granulomatose" deutlich, einer X-chromosomal bzw. autosomal rezessiv vererbten Erkrankung. Bei einer veränderten NADPH-Oxidase können die neutrophilen Granulozyten dieser Patienten nach Stimulation nicht mit einem „Respiratory Burst“ reagieren. Die betroffenen Patienten haben bereits im frühen Kindesalter schwer beherrschbare Infektionen mit pyogenen Krankheitserregern und haben eine deutlich verminderte Lebenserwartung (Babior, 1978; Gelb, 1987; Klebanoff, 1992; Segal, 1993; Tauber, 1987; Trush, 1978).

Im Rahmen des „Respiratory Burst“ werden Photonen emittiert (Allen, 1972). Dies bezeichnet man als Chemilumineszenz. Die genauen Licht-emittierenden Reaktionen wurden bisher noch nicht identifiziert. Es besteht eine enge Korrelation zwischen der mikrobiziden Aktivität der Zelle nach Stimulation mit löslichen Substanzen oder Partikeln und der entstehenden Chemilumineszenz (Gelb 1987; Trush 1978; Welch 1980). Durch Messung der Chemilumineszenz können Rückschlüsse auf die mikrobizide Aktivität der Neutrophilen gezogen werden.

Durch die chemiluminogene Substanz Luminol (5-Amino-2,3-Dihydrophthalazin-1,4-Dion), die durch Reaktion mit Sauerstoffmetaboliten wie O_2^- , H_2O_2 , OH^- , O_2 oder $HOCl$ in ein angeregtes Aminophthalat-Ion übergeht, können geringe Photonenmengen verstärkt und somit detektiert werden. Beim Übergang aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand wird in wässriger Lösung blaues Licht (425 nm) emittiert (Albrecht, 1928, Allen, 1976, Roswell, 1978, Wang, 1991). Durch die Verwendung von Luminol wird die entstehende Chemilumineszenz verstärkt, so daß nur eine geringe Anzahl von Zellen zur Durchführung der Versuche nötig ist (Trush, 1978).

2 Fragestellung

Snell und Mitarbeiter (Snell, 1903) äußerten in einer Publikation den Verdacht, daß sich Narkotika negativ auf die Immunabwehr des Körpers auswirken könnten. Watt beschrieb eine erhöhte Sterblichkeit bei schwerverletzten Patienten, die mit Etomidat sediert wurden (Watt, 1984). Die Ursache der erhöhten Sterblichkeit lag in einem Multiorganversagen auf dem Boden einer Sepsis. Unter Sepsis versteht man die systemische Antwort des Körpers auf eine Infektion. Mindestens zwei der folgenden klinischen Zeichen müssen neben einer Infektion erfüllt sein, um von einer Sepsis zu sprechen: Hypothermie oder Hyperthermie, Tachykardie, Tachypnoe, Leukozytose über 12.000/ μ l oder Leukopenie unter 4.000/ μ l (American College of Chest Physicians - Society of Critical Care Medicine, 2003).

Ward beschrieb erstmals 1985 (Ward, 1985) bei Patienten mit Schädel-Hirn-Verletzungen, die prophylaktisch Thiopental (Trapanal) erhielten, ein erhöhtes Risiko, eine Sepsis oder ZNS-Infektion zu entwickeln. Eberhardt (Eberhardt, 1992) fand eine dosisabhängig höhere Inzidenz nosokomialer Pneumonien bei Patienten mit Hirnödem und maschineller Beatmung, die mit Thiopental sediert wurden.

Mirow (Mirow, 1995) zeigte eine dosisabhängige Hemmung der Chemilumineszenz neutrophiler Granulozyten durch Hypnotika und Sedativa. Sie untersuchte unter

standardisierten Bedingungen in vitro die Sauerstoffradikalbildung isolierter Zellen gesunder Probanden nach Stimulation mit N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP) bzw. opsonisiertem Zymosan mit Luminol-verstärkten Chemilumineszenzmessungen. Im Rahmen dieser Experimente wurden handelsübliche Präparationen der Benzodiazepine Diazepam und Midazolam (Dormicum®), der Barbiturate Thiopental (Trapanal®), Pentobarbital (Nembutal®), Phenobarbital (Luminal®) und Methohexital (Brevimytal®), von Propofol (Disoprivan®) und Fentanyl (Fentanyl®) und ihre Auswirkungen auf den "Respiratory Burst" neutrophiler Granulozyten untersucht. Die meisten untersuchten handelsüblichen Medikamente zeigten eine hemmende Wirkung auf die Chemilumineszenz (CL).

Birkhahn (Birkhahn, 2000) zeigte in vorangegangenen Untersuchungen, daß Barbiturate und ihre wirksubstanzfreien Lösungen mit Ausnahme von Thiopental in therapeutisch relevanten Konzentrationen keine wesentlichen Effekte auf die Zymosan- und FMLP-induzierte CL von neutrophilen Granulozyten ausüben. Die Wirkung des Thiopental konnte durch eine Interaktion des Medikamentes mit den Zellen selbst erklärt werden, wobei auch Scavengereigenschaften eine Rolle spielen. Die CL-Hemmung wurde durch eine Hemmung der granulozytären Phospholipase C erklärt. Die Benzodiazepine Midazolam und Diazepam hemmten ebenfalls in therapeutisch relevanten Konzentrationen die FMLP-induzierte CL von PMN. Die Zymosan-induzierte CL wurde unter dem Einfluß von Diazepam in Konzentrationen jenseits des therapeutisch relevanten Plasmaspiegelbereiches gehemmt. Propofol hemmte wirksubstanzspezifisch in klinisch relevanten Konzentrationen die FMLP-induzierte CL, während die Zymosan-induzierte CL nicht signifikant beeinflusst wurde. Dieser Effekt wurde zum Teil dem wirksubstanzspezifischen Scavenging zugeschrieben. Ein direkter Einfluß von Etomidat auf die PMN konnte ausgeschlossen werden. Die Wirkungen von Etomidat und Diazepam in alkoholischer und Fettlösung unterschieden sich lösungsmittelbedingt. So zeigte sich, daß die Wirkung von Lipidemulsionen auf die Aktivität von PMN von der Zusammensetzung der Emulsion und der Konzentration der einzelnen Bestandteile abhing. Ketamin hemmte wirksubstanzspezifisch die CL in Konzentrationen. Hierbei entsprach die Wirkung des handelsüblichen Präparates den unterschiedlichen Enantiomeren. Die CL-Hemmung wurde als unspezifisch beschrieben (Birkhahn, 2000).

Es blieb offen, welche Bedeutung im Rahmen eines Endotoxinmodells immunmodulierende Substanzen wie die Endotoxine Lipid A, Lipopolysaccharid und das Cytokin TNF- α haben.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher folgende Fragen beantwortet werden:

- Welchen Einfluß hat das Cytokin TNF- α als Immunmodulator auf die Funktion der Neutrophilen ?
- Welchen Einfluß haben Endotoxine, wie Lipid A oder Lipopolysaccharid als Immunmodulator auf die Funktion der neutrophilen Granulozyten ?
- Welchen Einfluß hat Lipid A auf die Funktion der Neutrophilen ?
- Welchen Einfluß hat die Inkubationsdauer der Hypnotika und Sedativa mit den neutrophilen Granulozyten auf den beobachteten Effekt ?
- Welchen Einfluß hat eine unterschiedliche Inkubationsdauer der Immunmodulatoren ?
- Inwieweit wird das Priming mit Cytokinen beziehungsweise Endotoxinen durch das Medikament/das Lösungsmittel beeinflusst ?
- Haben FMLP und Cytokin/Endotoxin additive oder potenzierende Effekte ?
- Sind diese Effekte reversibel ?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Arbeitsmaterial

Monovette	Sarstedt	Nümbrecht
	(10 ml, Ammonium-Heparin 15 IE. Heparin ml Blut)	
Reagiergefäße	Sarstedt	
	(1,5 ml, No 72.690)	
PS-Röhrchen	Greiner Labortechnik,	Solingen
	(GLKL, 12 ml)	
Zentrifugenröhrchen	RISO	DK-Roskilde
	(50 ml, No 3-394997)	
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz,	
	(Varipetten unterschiedlicher Größen)	
Pipettenspitzen:	Standartips cristal	Eppendorf-Netheler-Hinz,
		Hamburg
	Pipettenspitzen blau	Greiner Labortechnik,
	Pipettenspitzen gelb	Solingen

Pasteurpipetten	Brand (150 mm)	Wertheim
Meßküvetten für den 6-Kanal-Biolumat		Berthold, Wildbad

3.1.2 Geräte

Zentrifuge	W.C. Heraeus GmbH (Microfuge)	Osterrode
Zellcounter	Coulter-Electronics (Coulter-Counter)	UK-Manchester
Inkubator	Menimer	Schwarzbach
Microwaage	Mettler	Nürnberg
Gefriertruhe	Labotect (Bio Freezer)	Göttingen
Automatik-Osmometer	Knauer	Wuppertal
Brutschrank	Memmert	Schwarzbach
Blutgasanalyse	Radiometer (ABL 5 10)	DK-Copenhagen
6-Kanal-Biolumat	Berthold (LB 9505)	Wildbad
Autolumat	Berthold (LB 953)	Wildbad

3.1.3 Reagenzien

Polymorphprep@ Nycomed Pharma AS, Norwegen, Oslo
(enthält: Sodium Metrizoate 13,8% (w/v)
Dextran 500 8,0% (w/v)

HBSSO GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein
(Hank's balanced salt solution;
enthält folgende Komponenten (g/l):

anorganische Salze: 0,14 CaCl₂

0,40 KCl

0,06 KH₂ PO₄

0,10 MgCl₂ 6H₂O

0,10 MgSO₄ 7H₂O

8,00 NaCl

0,35 NaHCO₃

0,09 Na₂ HPO₄ 7H₂O

andere Komponenten: 1,00 D-Glucose)

DMSO (Dimethylsulfoxide) Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Wasserstoffperoxid 30%

Merck, Dannstadt

1,2 Propylenglykol

Sigma Chemical Company, Deisenhofen

Luminol

Sigma Chemical Company, Deisenhofen

(5-Amino 2,3-Dihydro-1,4-Phthalazinedione)

Chemotaktisches Peptid

N-Formyl-Met-Leu-Phe / FMLP

Sigma Chemical Company, Deisenhofen

3.1.4 Medikamente

Brevimytal® Lilly GmbH, Bad Homburg

(1 Injektionsflasche enthält

500 mg Methohexital-Na)

Diazepam-Lipuro® B. Braun Melsungen AG, Melsungen

(2 ml Injektionsemulsion enthalten

10 mg Diazepam in Fettemulsion)

Disoprivan® ICI Pharma Arzneimittel, Plankstadt

(1 ml Injektionsemulsion enthält 10 mg Propofol)

Dormicum® Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen

(1 ml Injektionslösung enthält 5,56 mg Midazolam-HCl, entsprechend

5 mg Midazolam)

Etomidat-Lipuro@	Janssen GmbH, Neuss	
(1 ml enthält 2 mg Etomidat)		
Hypnomidate@	Janssen GmbH, Neuss	
(1 ml enthält 2 mg Etomidat)		
Ketanest@ 50 mg	Parke, Davis & Company, Freiburg	
(1 ml Injektionslösung enthält 57,67 mg Ketamin-HCl)		
Trapanal@	Byk Gulden Lomberg GmbH,	
(1 Durchstechflasche enthält 2,5 g Thiopental-Na-Trockensubstanz)		Konstanz
Valium@	Hoffmann-La Roche AG,	
(2 ml Injektionslösung enthalten 10 mg Diazepam)		Grenzach-Wyhlen

3.1.5 Wirkstofffreie Lösungen

Für Trapanal®	Apotheke HHU Düsseldorf
Natriumbicarbonatlösung (3%-ig)	
Für Etomidat-Lipuro®	B.Braun Melsungen AG
Lipofundin® MCT 20%	Melsungen
Für Disoprivan®	(Wirkstoff Sojabohnenöl)
Intralipid 20 %	Pfrimmer Kabi, Erlangen
Für Valium®	Hoffmann-La Roche AG
Diazepam-Ampullenlösung ohne Wirkstoff Grenzach Wyhlen	
Für Dormicum®	Hoffmann-La Roche AG
Midazolam-Ampullenlösung ohne Wirkstoff Grenzach Wyhlen	
Für Brevimytal®	Apotheke HHU Düsseldorf
Natriumbicarbonatlösung (3%-ig)	
Für Diazepam-Lipuro®	B.Braun Melsungen AG
Lipofundin® MCT 20%	D-3508 Melsungen

3.1.6 Fettemulsionen

Intralipid@ 20%	Pfrimmer Kabi GmbH
(1000 ml Infusionslösung enthalten	
200 g Sojabohnenöl (gereinigt von Phospholipiden)	
12 g (3-sn-Phosphatidyl) Cholin aus Hühnereigelb	
22 g Glycerol	
Aqua ad injectione, NaOH)	
Lipofundin@ MCT 20%	B. Braun Melsungen AG,
(1000 ml Infusionslösung enthalten	
100 g Sojabohnenöl,	
100 g mittelkettige Triglyceride (MCT),	
12 g Phospholipide aus Ei mit	
mind. 68% (3-sn-Phosphatidyl) Cholin,	
25 g Glycerol,	
Hilfsstoffe: Natriumoleat, Aqua ad injectione)	

3.1.7 Endotoxine und Cytokine

Lipopolysaccharid aus Escherichia coli	Sigma chemical co.
(LPS)	St.Louis, MO 63178 USA
Lipid A aus Escherichia coli	Sigma Chemie GmbH
(LA)	D-8024 Deisenhofen
Tumor necrosis factor aus Hefe	Boehringer Mannheim
(human recombinant TNF)	D-68307 Mannheim

3.2 Methoden

3.2.1 Isolation und Aufbereitung der neutrophilen Granulozyten

Wir untersuchten an jeweils 10 freiwilligen Probanden den Einfluß bestimmter Sedativa und Hypnotika auf die Funktion der polymorphkernigen Leukocyten (PMN). Dabei wurden die PMN mit drei verschiedenen Substanzen vorstimuliert: Tumornekrosefaktor- α (TNF), Lipid-A (LA) und Lipopolisaccharid aus E.coli (LPS). Die Proben wurden mit bestimmten Sedativa

und Hypnotika in zwei verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Danach wurde mittels eines Chemiluminometers die Aktivität, dargestellt als Photonen-Emissionen eines Luminogens nach Sauerstoffradikalbildung der PMN quantifiziert.

Die PMN wurden 15 Minuten lang mit den Cytokinen/Endotoxinen inkubiert. Nachfolgend wurden die vorstimulierten neutrophilen Granulocyten mit verschiedenen Medikamenten, beziehungsweise den zugehörigen Lösungsmitteln in jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Folgende Medikamente und dazugehörige Lösungsmittel wurden in den Messungen verwendet: Methohexital, Thiopental, Midazolam, Diazepam und Diazepam-Lipuro, Etomidate und Propofol. Die Bildung von Sauerstoffradikalen wurde durch die Zugabe von N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (FMLP) in der Konzentration 10^{-7} mol/l angeregt und die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz über den Verlauf von 15 Minuten gemessen.

Zur Messung der Chemilumineszenz von neutrophilen Granulozyten unter dem Einfluß von Hypnotika und Sedativa sowie ihren wirksubstanzfreien Lösungen wurden Granulozyten aus dem venösen Blut gesunder Blutspender verwendet. Von gesunden Normalspendern wurden je 10 ml Blut mit einer Heparin-beschichteten Monovette abgenommen. Die Isolation der Granulozyten erfolgte über Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurde die Blutprobe umgehend in zwei Portionen mit je 5 ml aufgeteilt, die jeweils mit 3 ml der Dextranlösung Polyprep überschichtet wurden. Durch dieses Vorgehen wurde für die folgenden Untersuchungen eine hohe Zellausbeute erzielt. Eine Auftrennung der unterschiedlichen Zellfraktionen erfolgte über 25-minütige Zentrifugation in der Kühlzentrifuge bei einer Umdrehungszahl von 1620 /min (entsprechend 540 g) bei 24°C. Nach dieser Auftrennung wurde die Granulozytenfraktion abpipettiert. Die Zellsuspensionen wurden in einem Röhrchen mit HBSSO auf 10 ml aufgefüllt und zweimal 10 Minuten lang bei 1280 U/min bei 24°C gewaschen. Nach jedem Waschvorgang wurde der Überstand abgegossen. Die Konzentration der Granulozytensuspension wurde über einen Zellzähler ermittelt und auf eine Standardkonzentration von 5×10^6 Zellen pro ml mit HBSSO verdünnt.

Ausstriche der Zellsuspensionen wurden angefertigt, um den Reinheitsgrad der Granulozytensuspension zu überprüfen. Dies geschah mit Hilfe der Vitalfärbungen LeukoGnost®-ALPA (Nachweis der alkalischen Leukozytenphosphatase-Aktivität in Leukozyten) und LeukoGnost EST (Nachweis der Alpha-Naphthylacetat-Esterasereaktion in Leukozyten). Es zeigte sich ein Granulozytenanteil von 95-98%.

Die verwendeten Granulocyten stammten von Blutspendern der Universitätsklinik Düsseldorf. Die Spender wurden über den Verwendungszweck ihres Blutes aufgeklärt. Nur Blut, welches auch von der Blutbank angenommen wurde, ist für die Versuche weiterverarbeitet worden.

3.2.2 Testansatz

In ein Chemilumineszenzröhrchen wurden 50 µl der Granulocytensuspension, 50 µl 0,2 molares Luminol, 50 µl HBSS-Puffer/Medikament/Lösungsmittel in niedriger oder hoher Konzentration, sowie 50 µl Lipid A oder LPS oder TNF gegeben.

$2,5 \times 10^6$ /ml Neutrophile Granulocyten wurden 15 Minuten lang bei 37°C mit dem Cytokin/Endotoxin inkubiert. Nachfolgend wurden 100 µl der vorstimulierten neutrophilen Granulocyten ($2,5 \times 10^6$ /ml) 30 Minuten lang bei 37°C mit 50 µl Luminol (0,2 mmol/l) sowie 50 µl des jeweiligen Medikamentes, beziehungsweise dem Lösungsmittel inkubiert. Die Endkonzentrationen der Medikamente und ihrer Lösungsmittel siehe unter 4.6.

3.2.3 Luminol-Stammlösung

Die Versuche zur Sauerstoffradikalbildung neutrophiler Granulozyten unter dem Einfluß der Testsubstanzen wurden unter Anwendung der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz durchgeführt.

Das für die Versuchsansätze benötigte Luminol wurde durch Verdünnung einer Stammlösung gewonnen, die im Kühlschrank bei 4°C lichtgeschützt gelagert und jeweils 4 Tage nach Zubereitung verwendet werden konnte. Innerhalb der ersten 4 Tage nach Herstellung der Stammlösung war die Aktivität des Luminol stark abnehmend und erreichte danach ein Plateau. Nach maximal 4 Wochen klang die Aktivität so stark ab, daß die Lösung nicht mehr einsetzbar war und neu zubereitet werden mußte. Die in den Testansätzen verwendete Konzentration von 0,2 n1 wurde durch tägliches Verdünnen von 10 µl Stammlösung mit 5 ml HBSS@ gewonnen.

Zur Herstellung der Stammlösung wurden 18 mg Luminol der Fa. Sigma in 360 µl einer 2-M-Ammoniumhydroxid-Lösung aufgeschüttelt und mit 640 µl Aqua pro injectione auf eine Konzentration von 0,1 mmol/l verdünnt.

3.2.4 Stimulierung neutrophiler Granulocyten zur Sauerstoffradikalbildung durch FMLP

FMLP ist ein von Mikroorganismen, insbesondere von Bakterien, gebildetes Peptid. Es führt bei den neutrophilen Granulocyten zur Chemotaxis, zu Degranulation, zur Bildung von Arachidonsäuremetaboliten und konsekutiv zur Bildung von Sauerstoffradikalen wie O_2^- , OH^- und H_2O_2 . Nach Bindung von FMLP an einen Rezeptor an der Granulozytenmembran, führt unter Einschaltung des G-I Proteins die Spaltung von GTP zur Aktivierung der Phospholipase C. Über Inositol-Triphosphat wird Calcium in der Zelle freigesetzt. Durch den intrazellulären Calciumanstieg wird die Proteinkinase C aktiviert und unter ATP-Verbrauch die NADPH-Oxidase aktiviert. Diese bildet unter Verbrauch von O_2 die zum „respiratory burst“ erforderlichen Sauerstoffradikale.

Formylpeptide wie das Tripeptid FMLP bilden das N-terminale Ende neu synthetisierter bakterieller Proteine (Marasco, 1984). Die Anlagerung des FMLP an den spezifischen FMLP-Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten führt zu einer Aktivierung eines trimeren G-Proteins, eines GTP-bindenden Regulatorproteins. Dieses wiederum stimuliert die Membran-assoziierte Phospholipase C- β , die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in die intrazellulären Mediatoren Inositol-1,4,5 Triphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol hydrolysiert. PIP₂ ist wahrscheinlich in der inneren Lipidschicht der Plasmamembran lokalisiert. IP₃ diffundiert in das Zytosol und bewirkt die Freisetzung von Ca^{++} aus dem Endoplasmatischen Retikulum. 1,2-Diacylglycerol verbleibt in der Membran und kann zwei mögliche Signalfunktionen ausüben. Zum einen kann es zu Arachidonsäure umgesetzt werden zum anderen aktivieren 1,2-Diacylglycerol und Ca^{++} synergistisch die

Proteinkinase C (PKC) (Alberts, 1995; Badwey, 1986; Baggiolini, 1993; Klebanoff, 1992; Snyderman, 1986). Der von IP₃ ausgelöste Anstieg des zytosolischen Ca^{++} -Spiegels führt vermutlich zu einer Veränderung der PKC im Zytosol, so daß sie sich an der Innenseite der Plasmamembran anlagern kann. Dort wird sie unter dem gemeinsamen Einfluß von Ca^{++} , Diacylglycerol und dem negativ geladenen Membranphospholipid Phosphatidylserin aktiviert (Alberts, 1995; Berridge, 1984). Die aktivierte Proteinkinase C phosphoryliert zwei Gruppen von Proteinen. Erstens die Proteine der Mikrofilamente, deren Aktivierung zur phagozytären Aufnahme eines Partikels führt und zweitens die Proteine des NADPH-Oxidasekomplexes

(Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase), deren Aktivierung zu einer Produktion von O_2^- führt (Fülöp, 1988; Klein, 1991; Ortmeyer, 1993; Reinhold, 1990; Tauber, 1987; Tennenberg, 1988).

Die NADPH-Oxidase ist ein Proteinkomplex, welcher aus einem Flavoprotein, Ubichinon 50 und Cytochrom p besteht. Die Aktivierung der NADPH-Oxidase verläuft über die Phosphorylierung von p47P und p67Ph, zwei weiteren Enzymkomponenten, mit Hilfe eines GTP-bindenden Proteins, dem p21.

Im granulozytenhaltigen Testsystem folgt nach Stimulation der Zellen mit FMLP bereits innerhalb der ersten 2 Minuten das Chemilumineszenzmaximum. Danach fallen die Chemilumineszenzwerte rasch wieder ab. Auch Tanigawa und Mitarbeiter (Tanigawa et al., 1993) beschrieben 1993 diese Reaktionskinetik. Die Autoren führten als mögliche Erklärung an, daß die FMLP-Rezeptorkomplexe bei physiologischen Temperaturen rasch aggregieren und in die Zelle aufgenommen werden. Bei Raumtemperatur verläuft dieser Prozeß wesentlich langsamer. Da im Biolumat eine konstante Temperatur von 37°C gewährleistet war, zeigte sich bei den Untersuchungen eine schnelle Reaktionskinetik.

3.2.5 Herstellung der FMLP-Stammlösung

Zur Einleitung der Sauerstoffradikalbildung durch die neutrophilen Granulozyten, wurde im Testansatz N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP) als chemotaktisches Peptid zugegeben.

Die in den Testansätzen verwendete 0,5-Millimolare Lösung wurde durch tägliches Verdünnen einer Stammlösung gewonnen. Zur Herstellung der Stammlösung wurden 10 mg FMLP der Fa. Sigma in DMSO gelöst und mit 22,5 ml HBSSO verdünnt. Die 1-mMolare Stammlösung wurde portioniert, bei -80°C im Kühlschrank gelagert, und kurz vor der Weiterverarbeitung aufgetaut.

3.2.6 Stimulierung neutrophiler Granulocyten zur Sauerstoffradikalbildung durch FMLP

FMLP ist ein von Bakterien gebildetes Peptid welches bei neutrophilen Granulocyten zur Chemotaxis, zur Degranulation und zur Bildung von Arachidonsäuremetaboliten führt und zur Bildung von Sauerstoffradikalen wie O_2^- , OH^- und H_2O_2 . Nach Bindung von FMLP an einen Rezeptor an der Granulozytenmembran kommt es unter Einschaltung des G-I Proteins zur

Spaltung von GTP und zur Aktivierung von Phospholipase C. Über Inositol-Triphosphat wird Calcium in der Zelle freigesetzt und anschließend durch den intrazellulären Calciumanstieg die Proteinkinase C aktiviert und unter ATP-Verbrauch die NADPH-Oxidase aktiviert. Diese bildet unter Verbrauch von O₂ die zum „oxidative burst“ erforderlichen Sauerstoffradikale.

3.2.7 Priming

„Priming“ ist das erste Signal für den Aktivierungsprozeß der neutrophilen Granulocyten. Zum Priming wurden in den Versuchen LPS, Lipid A und TNF- α als Vertreter der vorwiegend nach Kontakt mit gramnegativen Erregern freigesetzten Zytokine beziehungsweise Endotoxine verwendet. Um das Geschehen bei einer Bakteriämie in vitro zu simulieren, wurden die neutrophilen Granulocyten nachfolgend durch FMLP aktiviert.

Die Produktion von Sauerstoffradikalen nach FMLP-Gabe wurde in dem 6-Kanal Biolumaten gemessen. Die Lichtemission konnte über 15 Minuten kontinuierlich als counts pro Minute gemessen werden. Das Integral unter der Kurve konnte dann quantitativ dargestellt und ausgewertet werden. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent verglichen mit der Chemilumineszenz der nicht vorstimulierten neutrophilen Granulocyten ohne Medikament, respektive Lösungsmittel.

3.2.8 TNF- α

Tumornekrosefaktor α ist ein 17 kDalton schweres Protein, ein Cytokin, das eine wichtige Rolle beim septischen Schock und bei Entzündungen spielt. Es wird von zahlreichen Zellen, so z.B. von Monozyten, Lymphozyten, natürlichen Killerzellen, Endothelzellen, Mastzellen, glatten Muskelzellen und von verschiedenen anderen Zellen gebildet. Auch neutrophile Granulocyten können TNF- α produzieren (van der Auwera, 1992). Die Bildung von Tumornekrosefaktor α wird hervorgerufen durch Mitogene, Phorbolester, Endotoxine, Viruseinfluß, Parasiten, Protozoen, Tumorzellen, sowie Interleukin 1 und 2 und durch Interferone. Menschliches TNF- α ist ein glykolisiertes Protein, welches aus 157 Aminosäuren, und einer vorgeschalteten Sequenz von 76 Aminosäuren, besteht. Zwei Cysteinmoleküle bilden eine Disulfidbrücke. Bis auf die roten Blutkörperchen besitzen fast alle Zellen des Körpers diese Rezeptoren. Es existiert eine Down-Regulation dieser Rezeptoren durch Lipopolysaccharide, Phorbolester, Glucokortikoide und Tumornekrosefaktor α selbst.

Bei massiven bakteriellen Infektionen werden durch Endotoxine (LPS) große Mengen von TNF- α in den Blutkreislauf freigesetzt, was zum letalen septischen Schock führen kann (Endotoxinschock) (Gogos, 2000; Lekkou, 2004). Das Auftreten von TNF- α im Serum in Konzentrationen über 1 ng/ml ist ein Hinweis für einen möglicherweise letalen Ausgang bei einer bakteriellen Sepsis. Unter normalen Umständen hat TNF- α jedoch eine protektive Rolle bei der Infektabwehr, indem es unter anderem die Makrophagen aktiviert und die Phagocytoseaktivität von neutrophilen Granulocyten stimuliert.

Tumornekrosefaktor α (Cachectin) wurde zuerst von Carswell und Mitarbeitern 1975 beschrieben. Die Gene für TNF- α liegen auf dem Chromosom Nr.6. Gebildet wird es überwiegend von Zellen des mononukleären Phagozytensystems, von Monozyten und von Makrophagen. Der wahrscheinlich stärkste Stimulus zur Bildung ist LPS, aber auch andere bakterielle Produkte und Viren haben eine stimulierende Wirkung. Intrazellulär bildet zyklisches GMP ein stimulierendes, zyklisches AMP ein hemmendes Signal für die Synthese von TNF- α . Im Körper wird ständig eine bestimmte Menge von mRNA für TNF- α gebildet, jedoch erst nach Zugabe von LPS translatiert und transkribiert. In Monozyten kann die Translation durch Dexamethason gehemmt und durch Interferon- γ gesteigert werden. Für einen wahrscheinlich löslichen Rezeptor, bestehend aus zwei Untereinheiten von 60 und 80 kDalton, ist bereits ein Inhibitor isoliert worden. Die Wirkungen von TNF- α zielen auf die Abwehr von bestimmten Mikroorganismen. So werden neutrophile Granulozyten zur Phagozytose angeregt, ihre zellvermittelte Zytotoxizität und die Adhärenz an Endothelzellen gesteigert. Die Synthese von IL1 in Monozyten und Makrophagen wird gefördert und dadurch die Interferon- γ -vermittelte Makrophagenaktivität ausgelöst. Weitere Wirkungen von TNF- α bestehen in der Freisetzung von Prostaglandin E_2 im Hypothalamus- dieses führt zu Fiebererzeugung- Steigerung der Zytotoxizität bei eosinophilen Granulocyten und Monocyten und Makrophagen, Reduktion der Expression von Thrombomodulin und konsekutive Verminderung von Protein C, Suppression der Lipoprotein-Lipase (Triglycerid-Anstieg mit konsekutiver Kachexie) (Gemsä, 1991). Okuda und Mitarbeiter zeigten, daß neutrophile Granulocyten, die durch LPS oder TNF- α geprimt wurden, über das Maß nicht-geprimter Granulocyten hinaus durch Methotrexat gehemmt werden konnten. Sie schrieben diese Wirkung zumindest teilweise einer Störung der Purinsynthese zu (Okuda, 1997).

3.2.9 Lipid A

Lipid A ist der chemisch aktive Anteil des Lipopolysaccharids, welches weiter unten erläutert wird. (Roitt, 1993)

3.2.10 Lipopolysaccharid

Gramnegative Bakterien setzen beim Absterben Endotoxin, das heißt Lipopolysaccharid (LPS) frei. Dieses ist essentieller Bestandteil ihrer äußeren Zellmembran. Es besteht aus einem hydrophilen, variablen Polysaccharid- und einem Lipid-A-Anteil, der streng konserviert ist (Freudenberg, 1990). Dieser wirkt direkt oder indirekt aktivierend auf CD14-Rezeptoren der Makrophagen. Dadurch wird eine Immunreaktion ausgelöst. Hilfreiche, von Makrophagen verursachte Effekte, sind mäßiges Fieber, Aktivierung des Immunsystems und Verhinderung der Ausbreitung der Erreger durch eine lokale Abschottung des infizierten Gewebes. Eine systemische Infektion jedoch führt zu hohem Fieber, Blutdruckabfall, Gerinnungsstörungen und letztlich zum letalen Schock. Lipopolysaccharide (LPS) oder bakterielle Endotoxine sind biologisch aktive Substanzen in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Bei gramnegativen Bakterien liegt über einer meist einschichtigen Peptidoglykanschicht eine zweite äußere Membran. Der nach innen gerichtete Teil dieser äußeren Membran besteht hauptsächlich aus Phospholipiden, die äußere Schicht aus Lipopolysacchariden (Morrison, 1978). Beim Polysaccharid können zwei Regionen voneinander unterschieden werden: das core-Oligosaccharid und die O-spezifische Kette. Die Polysaccharidkette ist kovalent mit dem Lipid A verbunden. Das Lipid A ist ein gemeinsamer Bestandteil der Lipopolysaccharide aller gramnegativer Bakterien und der biologisch aktive Teil dieser Moleküle, der für die meisten pathophysiologischen Effekte verantwortlich ist (Galanos, 1977). 1984 konnten Shiba et al. das erste chemisch synthetisierte Lipid A herstellen. Die pathophysiologischen Wirkungen des Lipid A werden nicht direkt verursacht, sondern durch die Wechselwirkungen der Lipopolysaccharide mit den Empfängerzellen. Als die primären Empfängerzellen für Lipopolysaccharide gelten die Zellen des mononukleären Phagozytensystems (Monozyten und Makrophagen), B-Lymphozyten, Granulozyten, Thrombozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Als Folge ihrer Wechselwirkung mit den Lipopolysacchariden bilden die primären Empfängerzellen Peptid- und Lipidmediatoren wie z.B. Tumornekrosefaktor α , Interleukin-1, Interleukin-8 und oxidative Metabolite von Fettsäuren. Die Synthese und Sekretion dieser Mediatoren sind für die pathophysiologischen Wirkungen der Endotoxine wie Fieber, Leukopenie, Hypotension und die Akute-Phase-Reaktion bis hin zum septischen Schock verantwortlich (Flad, 1993). Der Aktivierung von

Makrophagen durch LPS liegen Signalkaskaden zugrunde, an deren Ende die Regulation der Aktivität von Genen steht. So wurde gezeigt, daß durch LPS die Proteinphosphorylierung durch Proteinkinase A, Proteinkinase C und durch Protein-Tyrosinkinasen aktiviert wird. Weiterhin sind Signalübertragungswege über die Hydrolyse von Phosphatidylinositolbiphosphat durch die Phospholipase C für Makrophagen beschrieben. Dabei werden die Second Messenger Inositoltriphosphat und Diacylglycerin freigesetzt. Ersteres bewirkt eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels, letzteres aktiviert die Proteinkinase C.

Lipopolysaccharid aus gramnegativen Bakterien führt zur Freisetzung zytotoxischer und pyrogener Substanzen aus Granulocyten, die dort durch Peroxidasereaktionen gebildet werden. In Lymphocyten bewirken sie die Freisetzung von Lymphokinen, die ebenfalls zytotoxisch sein können (Roitt, 1993). Neutrophile Granulocyten bewirken eine Freisetzung von LPS aus gramnegativen Bakterien (Breyer, 1998). Durch Inkubation mit Bakterien anstatt von LPS kommt es zu einer gesteigerten Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ (Breyer, 1998).

Für die Aktivierung der extrazellulären signalabhängigen Proteinkinasen 1 und 2 der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (ERK 1 und 2) durch LPS ist Blutplasma erforderlich (Bonner, 2001). LPS ist nicht in der Lage, ohne plasmatische Bestandteile die neutrophilen Granulocyten zu stimulieren (Benbarek, 1998).

Es konnte gezeigt werden, daß die Hemmung der Migration neutrophiler Granulocyten durch Stickstoffmonoxid vermittelt wird. NO-Synthase setzt NO frei, welches die Migration, hervorgerufen durch LPS, vermindert (Nath 1997; Tavares-Murta, 2001). NO moduliert die Immunantwort und wird bei durch LPS-geprimten neutrophilen Granulocyten vermindert. NO spielt somit bei Entzündungsreaktionen eine protektive Rolle (Nath, 1997). Sowohl Interferon Gamma, als auch $\text{TNF-}\alpha$ bewirken eine stärkere Bindung von LPS an neutrophiler Granulocyten über CD-14-Rezeptoren (Takeshita, 1998).

4 Vorversuche

4.1 Einfluß der Zellisolierung auf die Chemilumineszenz neutrophiler Granulozyten

Zur Messung der Chemilumineszenz FMLP-stimulierter neutrophiler Granulozyten unter dem Einfluß unterschiedlicher Testsubstanzen wurde eine Granulozytensuspension mit 5×10^6 Zellen pro ml hergestellt. Die neutrophilen Granulozyten wurden durch

Dichtegradientenzentrifugation mit 8%-igem Dextran und 13,8%-igem Natriummetrizoat, dem Präparat Polyprep® der Firma Nycomed, aus venösem, antikoaguliertem Blut von gesunden Probanden isoliert.

Aufgrund der hohen Sensitivität der Chemilumineszenzmessung kann diese auch mit verdünntem, antikoaguliertem Vollblut durchgeführt werden. Der Nachteil dieser Methode besteht zum einen in nicht quantifizierbaren Serumeffekten, zum anderen in nicht kalkulierbaren Interaktionen der unterschiedlichen Zellen. Auch das Verhältnis der einzelnen Zelltypen zueinander ist nicht standardisierbar. So treten sogenannte Quench Effekte auf. Als solche bezeichnet man die Abnahme der Photonendichte durch Lichtabsorption und Streuung. Die praktische Bedeutung der Quench-Effekte liegt darin, daß durch ein variables Erythrozyten-Granulozyten-Verhältnis in unvorhersehbarer Menge Photonen durch die Erythrozyten aus dem Meßsystem abgefangen werden (Bruchelt, 1984). Durch die Verwendung einer Granulozytensuspension anstelle von verdünntem Vollblut war es in der vorliegenden Arbeit möglich, diese Probleme zu umgehen.

Tennenberg (Tennenberg, 1988) beschrieb, daß LPS zu einer gesteigerten Expression des FMLP-Rezeptors auf Granulozyten führt. Dieses Phänomen wurde auch in vivo bei septischen Patienten beobachtet (Tschakowsky, 1993). Koenderman et al. (1989) beschrieben ein Priming von neutrophilen Granulozyten durch einen passageren Anstieg der freien Calciumkonzentration im Zytosol (Koendermann et al., 1989).

Um ein Priming durch LPS in den oben genannten Trennmedien der Granulozyten zu vermeiden, wurde daher zur Zelltrennung in dieser Arbeit Polyprep® verwendet. Es gelang, durch Zentrifugation über einen Polyprep®-Dichtegradienten eine Granulozytenausbeute von 94-98 % zu erzielen.

4.2 Erfassung der Sauerstoffmetabolite durch Chemilumineszenzmessung

Neutrophile Granulozyten antworten auf Stimulation mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch und einer Umwandlung in hochreaktive Sauerstoffmetabolite. Dieser Vorgang dient der Abtötung phagozytierter Mikroorganismen und wird auch als respiratory burst bezeichnet (Welch, 1980; Badwey, 1986; Halliwell, 1990; Klebanoff, 1992;). Durch die chemischen Vorgänge des respiratory burst werden Photonen emittiert (Allen, 1972). Diesen Prozeß bezeichnet man als Chemilumineszenz. Es ist bekannt, daß eine Korrelation zwischen der mikrobiziden Aktivität der Zelle nach Stimulation und der entstehenden Chemilumineszenz besteht (Trush, 1978; Welch, 1980).

Die Messung der freigesetzten Sauerstoffmetabolite kann auf sehr unterschiedliche Weise durchgeführt werden: Zum einen kann mit Hilfe von spektrophotometrischen Messungen unter Verwendung von Fericytochrom C kontinuierlich die Bildung des Superoxidanionenradikals O_2^- erfaßt werden (Arthur, 1987; Gyllenhammer, 1989; Tennenberg, 1988).

Eine Messung der H_2O_2 -Konzentration kann unter Verwendung von Katalase über die Bestimmung einer intermediären Katalase- H_2O_2 -Verbindung auf photometrischem Wege durchgeführt werden (Smith, 1984). Mit Hilfe der genannten photometrischen Methoden kann jeweils eine Sauerstoffspezies erfaßt werden. Bei der Messung der Chemilumineszenz (CL) hingegen werden die unterschiedlichen reaktiven Sauerstoffverbindungen über die Photonenbildung registriert. Auf diese Weise war es möglich, alle mikrobizid wirkenden Sauerstoffradikale der neutrophilen Granulozyten zu erfassen.

Zur Messung der CL wurde ein 6-Kanalgerät der Firma Berthold verwendet. Dieses Gerät erlaubt eine kontinuierliche Parallelmessung von 6 Proben bei einer gleichbleibenden Temperatur zwischen 25,6°C und 50°C. Zur Durchführung der Versuche wurde eine Temperatur von 37°C gewählt. Da die Aktivität der Granulozyten durch die Umgebungstemperatur beeinflusst wird (Trush, 1978), wurde dieser Aspekt bei der Wahl des Meßgerätes berücksichtigt. Durch die unterschiedlichen Meßkanäle war es möglich, gleichzeitig Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz sowie eine Probe ohne Testsubstanz als Referenzprobe zu untersuchen.

4.3 Einfluß von Luminol auf die Chemilumineszenz

Die Messung der Chemilumineszenz (CL) kann direkt, beispielsweise über einen Flüssigkeitsszintillationszähler, oder indirekt mit Hilfe einer Lichtverstärkersubstanz wie Luminol, Luciferin, Scopoletin, Peroxioxalat oder Lucigenin erfolgen (Pick, 1980; Seitz, 1978; Trush, 1978). Aufgrund der relativ geringen Photonenemission der Granulozyten sind bei der direkten Chemilumineszenzmessung sehr hohe Zellzahlen zur Durchführung der Versuche nötig. Wird hingegen eine Lichtverstärkersubstanz verwendet, kann die Photonenausbeute etwa um den Faktor 1000 verstärkt werden. Dadurch steigt die Sensitivität des Meßsystems (Allen, 1976; White, 1983) und die benötigte Granulozytenzahl reduziert sich (Bruchelt, 1984). Die Verwendung von Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion) bietet gegenüber anderen Lichtverstärkern den Vorteil, daß sowohl O_2^- als auch H_2O_2 , $HOCl$, O_2 und $-OH$ als Oxidationsmittel und somit

Induktoren der Chemilumineszenzreaktion dienen können (Albrecht, 1928; Wang, 1991). Auf diese Weise wird eine umfassende Registrierung des respiratory burst möglich. Das Hydrazid Luminol geht durch Reaktion mit Sauerstoffmetaboliten in ein angeregtes Aminophthalat-Ion über. Beim Übergang aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand wird in wäßriger Lösung blaues Licht (425 nm) emittiert (Albrecht, 1928; Allen, 1976; Roswell, 1978; Wang, 1991). Das bei der nativen CL entstehende Licht unterschiedlicher Wellenlängen wird so in ein konstantes Photonenspektrum umgewandelt. In einer Öl-in-Wasser-Emulsion, wie sie durch die Verwendung von DMSO bei den Versuchen mit FMLP vorliegt, entsteht ein zweites Emissionsmaximum im langwelligeren Bereich um 500 nm (Roswell, 1978). Mit dem verwendeten 6-Kanal Biolumat ist es möglich, diesen gesamten Wellenlängenbereich zu erfassen.

4.4 Einfluß des Zeitpunktes der Testsubstanzzugabe auf die Chemilumineszenz

Vor der Stimulation wurden die neutrophilen Granulozyten mit Luminol und der Testsubstanz 30 Minuten lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Auf diese Weise gelang es, die Hintergrundchemilumineszenz zu minimieren, da in der Suspension enthaltene reaktive Sauerstoffverbindungen bereits vor Beginn der Messung mit dem Verstärker reagieren konnten. Ferner konnte durch die standardisierte Vorinkubation ein möglicher Einfluß unterschiedlicher Inkubationszeiten auf die Meßergebnisse ausgeschlossen werden. Gelb (Gelb und Lok, 1987) berichtete über den Einfluß der Inkubationsdauer bei Untersuchungen mit der Testsubstanz Etomidat auf die Chemilumineszenz Zymosan stimulierter neutrophiler Granulozyten. Er fand eine Chemiluminiszenzhemmung nach Zugabe klinisch relevanter Medikamentenkonzentrationen nur, wenn die Testsubstanz vor Stimulation der Zellen 50 Minuten lang mit der Zellsuspension inkubiert worden war. Bei kürzeren Inkubationszeiten kam es zu keiner Beeinflussung der Chemilumineszenz durch das Medikament. Aufgrund dieser Befunde wurden die Inkubationszeiten bei Etomidat modifiziert. Etomidat@-Lipuro wurde in je 2 Testreihen nach 30- und 60-minütiger Inkubation untersucht. Unter dem Einfluß von Etomidat@-Lipuro wird die FMLP-induzierte CL in Abhängigkeit von der Einwirkzeit zunehmend angeregt, so daß wir eine 60-minütige Inkubationszeit wählten.

4.5 Verdünnung der Medikamente, Reinsubstanzen und wirksubstanzfreien Lösungen

Der Einfluß der Medikamente, Reinsubstanzen und wirksubstanzfreien Lösungen auf die Chemilumineszenz von Granulozyten und im zellfreien Meßsystem wurde jeweils nach dem gleichen Schema bestimmt. Hierzu wurden die Testsubstanzen so verdünnt, daß die Konzentrationen im Endansatz den therapeutischen Plasmaspiegelkonzentrationen (niedriger und hoher Plasmaspiegelsbereich) entsprachen.

Hieraus ergeben sich folgende Konzentrationen in den Versuchsansätzen:

4.6 Medikamenten- und Lösungsmittelkonzentrationen im Endotoxinmodell

Medikamente	therapeutische Plasmaspiegel
Trapanal®	0,5 - 42 µg/ml
Etomidat-Lipuro®	0,1 - 0,5 µg/ml
Disoprivan®	0,8 - 15 µg/ml
Valium®	0,2 - 2,5 µg/ml
Dormicum®	0,04 - 4 µg/ml
Brevimytal®	1 - 18 µg/ml
Diazepam-Lipuro®	0,2-2,5 µg/ml

4.6.1 Konzentrationen bei Lipid A in µg/ml

Medikament	c1	c2
Brevimytal	25	500
Diazepam	1	10
Disoprivan	1,5	150
Dormicum	1	10
Etomidat Lipuro	0,5	50
Trapanal	5	500
Valium	1	10

Lösungsmittel	c1	c2
Lösungsmittel Brevimytal	25	500
Lipofundin	1	10
Intralipid	1,5	150
Lösungsmittel Dormicum	1	10
Lipofundin	0,5	50
Lösungsmittel Trapanal	5	500
Lösungsmittel Valium	1	10

4.6.2 Konzentrationen bei LPS in µg/ml

<u>Medikament</u>	<u>c1</u>	<u>c2</u>
Brevimytal	5	500
Diazepam	1	10
Disoprivan	1,5	150
Dormicum	1	10
Etomidat Lipuro	0,1	10
Trapanal	5	500
Valium	1	10

<u>Lösungsmittel</u>	<u>c1</u>	<u>c2</u>
Lösungsmittel Brevimytal	5	500
Lipofundin	1	10
Intralipid	1,5	150
Lösungsmittel Dormicum	1	10
Lipofundin	0,1	10
Lösungsmittel Trapanal	5	500
Lösungsmittel Valium	1	10

4.6.3 Konzentrationen bei TNF-α in µg/ml

<u>Medikament</u>	<u>c1</u>	<u>c2</u>
Brevimytal	25	500
Diazepam-Lipuro	5	50
Disoprivan	7,5	750
Dormicum	5	50
Etomidat Lipuro	0,5	50
Trapanal	25	2500
Valium	5	50

<u>Lösungsmittel</u>	<u>c1</u>	<u>c2</u>
Lösungsmittel Brevimytal	25	500
Lipofundin	5	50
Intralipid	7,5	750
Lösungsmittel Dormicum	5	50
Lipofundin	0,5	50
Lösungsmittel Trapanal	25	2500
Lösungsmittel Valium	5	50

4.7 Minimale und maximale Stimulationsniveaus

4.7.1.1 Für Lipid A

	minimale Stimulation in %	maximale Stimulation ohne Medikament
Medikament		
Brevimytal	111	575
Diazepam-Lipuro	126	663
Disoprivan	117	745
Dormicum	104	675
Etomidat-Lipuro	116	578
Trapanal	105	668
Valium	115	164
	minimale Stimulation in %	maximale Stimulation ohne Lösungsmittel
Lösungsmittel		
Lösungsmittel Brevimytal	152	446
Lipofundin	182	461
Intralipid	138	403
Lösungsmittel Dormicum	112	325
Lipofundin	107	553
Lösungsmittel Trapanal	130	446
Lösungsmittel Valium	113	190

4.7.1.2 Für LPS

	minimale Stimulation in %	maximale Stimulation ohne Medikament
Medikament		
Brevimytal	154	681
Diazepam-Lipuro	136	488
Disoprivan	120	339
Dormicum	117	847
Etomidat-Lipuro	117	397
Trapanal	143	233
Valium	154	494

	minimale Stimulation in %	maximale Stimulation ohne Lösungsmittel
Lösungsmittel		
Lösungsmittel Brevimytal	113	397
Lipofundin	147	312
Intralipid	147	377
LösungsmittelDormicum	113	325
Lipofundin	111	596
Lösungsmittel Trapanal	112	365
Lösungsmittel Valium	138	259

4.7.1.3 Für TNF- α

	minimale Stimulation in %	maximale Stimulation ohne Medikament
Medikament		
Brevimytal	119	253
Diazepam-Lipuro	368	790
Disoprivan	177	416
Dormicum	180	342
Etomidat-Lipuro	128	281
Trapanal	184	1110
Valium	220	801
	minimale Stimulation in % und	maximale Stimulation ohne Lösungsmittel
Lösungsmittel		
Lösungsmittel Brevimytal	110	164
Lipofundin	354	762
Intralipid	138	286
Lösungsmittel Dormicum	169	788
Lipofundin	118	260
Lösungsmittel Trapanal	261	1188
Lösungsmittel Valium	131	466

4.7.2 Inkubationszeiten

(in Minuten)

	PMN+TNF	Med.+Lum.	PMN+LPS	Med.+Lum.	PMN+LA	Med.+Lum.
Medikament						
Brevimytal	15	30	60	10	60	30
Diaz.-Lip.	15	30	60	10	60	30
Disoprivan	15	30	60	30	60	30
Dormicum	15	30	60	10	60	30
Etomidat-Lip.	15	60	60	60	60	60
Trapanal	15	30	60	10	60	30
Valium	15	30	60	10	60	30
	PMN+TNF	Med.+Lum.	PMN+LPS	Med.+Lum.	PMN+LA	Med.+Lum.
Lösungsmittel						
Lsg.Brevi	15	30	60	30	60	30
Lipofundin	15	30	60	30	60	30
Intralipid	15	30	60	30\10	60	30
Lsg.Dormicum	15	30	60	30	60	30
Lipofundin	15	60	60	60	60	60
Lsg.Trapanal	15	30	60	30/10	60	30
Lsg.Valium	15	30	60	30	60	30

4.7.3 Versuchsansatz zur Bestimmung des Einflusses der Testsubstanzen auf die Sauerstoffradikalbildung neutrophiler Granulozyten

Die Messungen im 6-Kanal-Biolumat wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

Meßkanal	1	2	3	4	5	6
HBSSO	-	-	-	-	-	-
Testsubstanz gemäß Konzentrationsreihe	-	-	-	-	-	-
Granulozyten-Suspension	-	-	-	-	-	-
Luminol	-	-	-	-	-	-
Endotoxin				-	-	-

Dieser Versuchsansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Granulozyten durch Zugabe von FMLP-Lösung (Konzentration 0,5 mMol/l) zur Sauerstoffradikalbildung angeregt und die Messung gestartet. Als Testsubstanzen wurden die oben angegebenen Medikamente und wirksubstanzfreien Lösungsmittel bzw. Reinsubstanzen verwendet. Über einen Zeitraum von 30 Minuten wurde die Chemilumineszenz in Form von cpm (counts per minute) registriert und elektronisch aufgezeichnet.

Hypnomidate® und Etomidat-Lipuro wurden in zwei Testreihen jeweils 30 bzw. 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Messung wie oben beschrieben gestartet.

Pro Versuchsansatz wurden jeweils 10 Messungen mit Zellen von 10 unterschiedlichen Probanden durchgeführt.

4.7.4 Ergebnisse der Vorversuche

Um die optimale Primingzeit der neutrophilen Granulocyten mit TNF- α zu ermitteln, wurde in einem Vorversuch zur Zeitkinetik die Inkubation mit 0 Minuten, 15 Minuten, 30 Minuten, 45 Minuten und 60 Minuten durchgeführt. Es zeigte sich, daß das beste Priming mit einer Vorinkubationszeit von 15 Minuten erzielt werden konnte. Um die optimale Dosis von TNF-

α herauszufinden, wurden drei verschiedene Konzentrationen eingesetzt: 0 ng/ml, 2,5 ng/ml und 25 ng/ml

Der stärkste Effekt zeigte sich bei einer Konzentration von 25 ng/ml, entsprechend 2.500 U/ml. Entsprechend wurden die neutrophilen Granulocyten in den nachfolgenden Experimenten 15 Minuten lang mit 25 ng/ml TNF- α voraktiviert. So führte das Priming mit TNF- α zu einem Anstieg der FMLP-induzierten Chemilumineszenz auf 177-437 %, verglichen mit nichtvorstimulierten Neutrophilen (als 100% definiert). Siehe auch Abbildung 4.1.

Die Konzentrationsstufe des FMLP spielte offensichtlich keine Rolle bei der Stimulation durch

TNF- α , was sich im Vergleich der Kurven aus der Abbildung 4.1. mit denen aus der Abbildung 4.2. erkennen läßt. Wir entschieden uns daher für die niedrigere FMLP-Konzentration .

4.7.4.1 Konzentrations- und Zeitkinetik für TNF

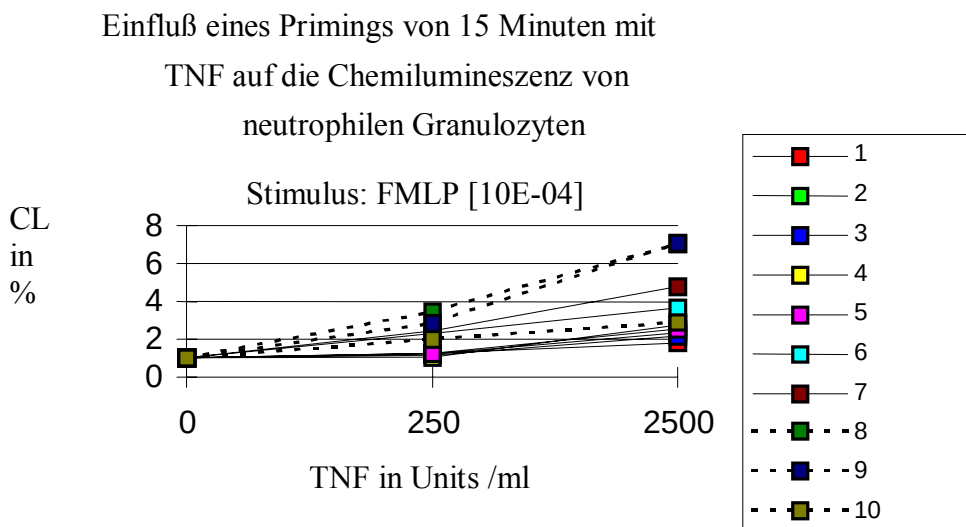


Abbildung 4.1

4.7.4.2 Konzentrations- und Zeitkinetik für TNF

Einfluß eines Primings von 15 Minuten mit
TNF auf die Chemilumineszenz von
neutrophilen Granulozyten

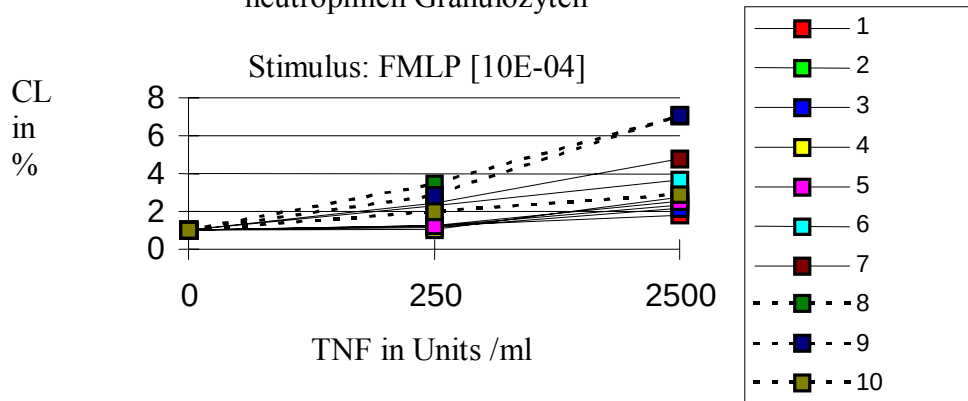


Abbildung 4.2

Einfluß eines Primings von 15 Minuten mit
TNF auf die Chemilumineszenz von
neutrophilen Granulozyten

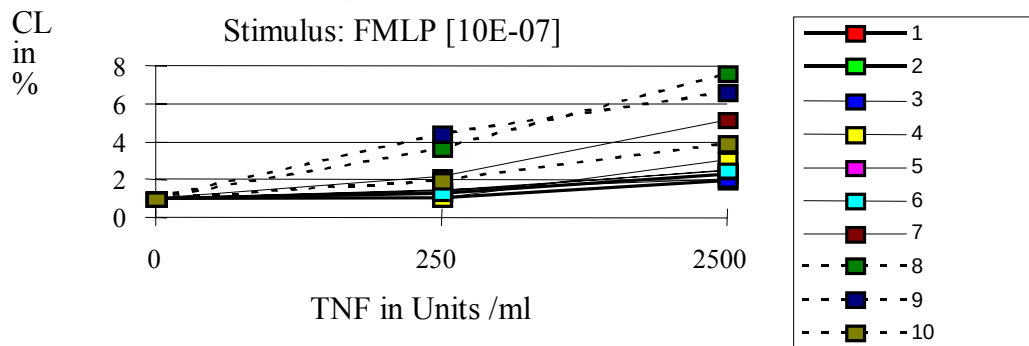


Abbildung 4.3

Einfluß eines Primings von 30 Minuten mit
TNF auf die Chemilumineszenz von
neutrophilen Granulozyten

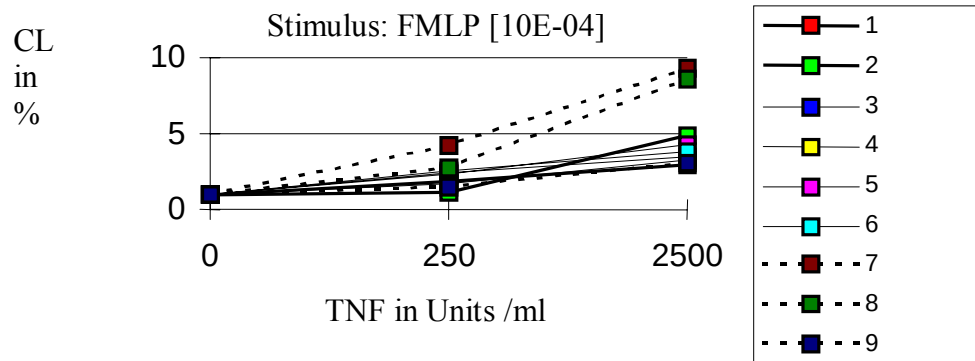


Abbildung 4.4

Einfluß der Dauer des Primings mit TNF auf
die Chemilumineszenz von neutrophilen
Granulozyten (n = 10/9/9)

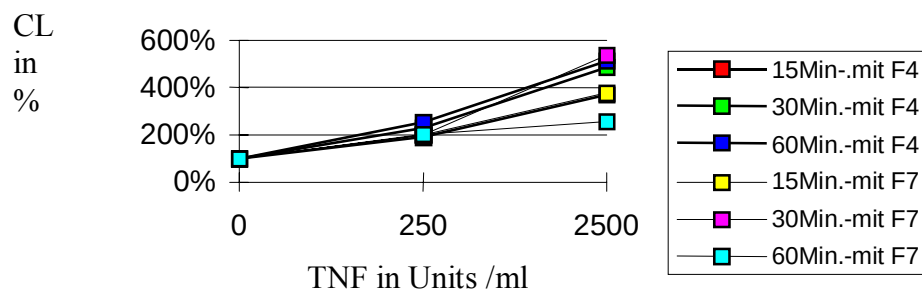


Abbildung 4.5

Einfluß eines Primings von 30 Minuten mit
TNF auf die Chemilumineszenz von
neutrophilen Granulozyten

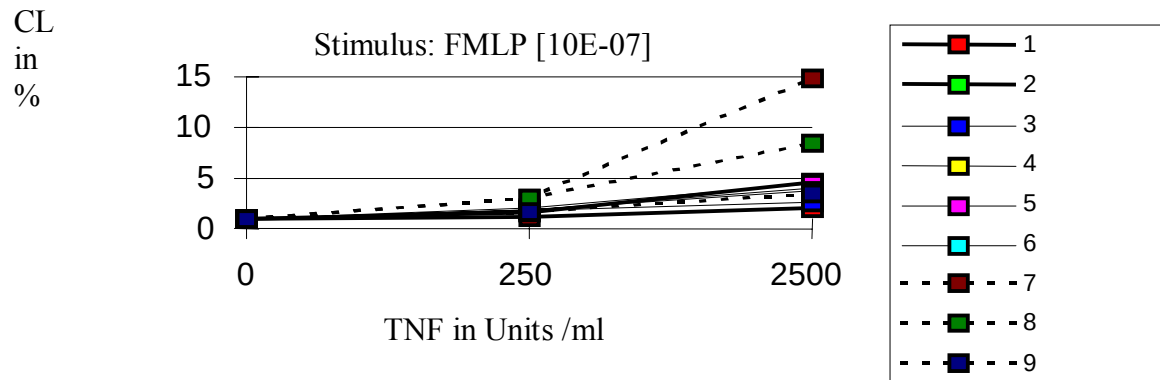


Abbildung 4.6

Einfluß der Dauer des Primings mit TNF auf
die Chemilumineszenz von neutrophilen
Granulozyten (n=10/9/9)

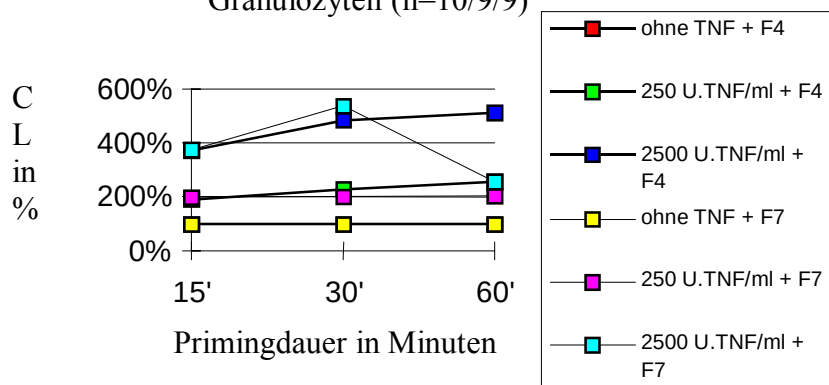


Abbildung 4.7

4.7.4.3 Kinetik Lipid A

Abbildung 4.8

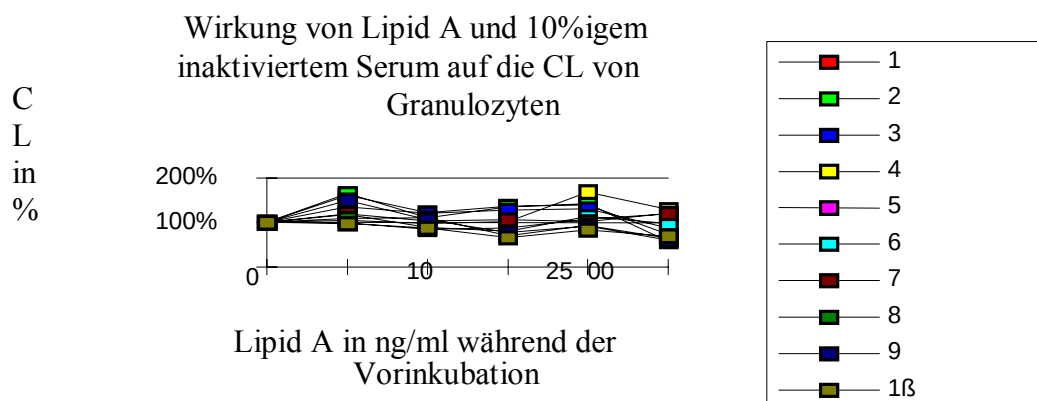
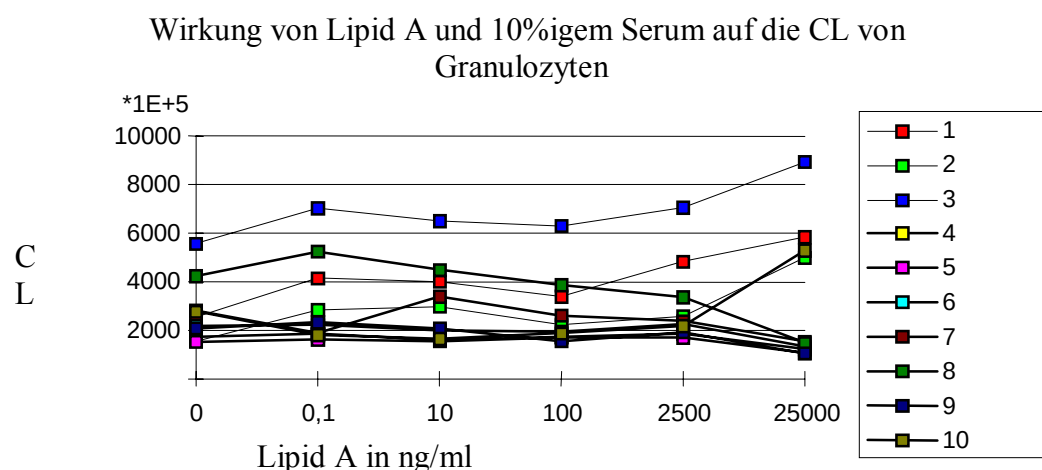


Abbildung 4.9



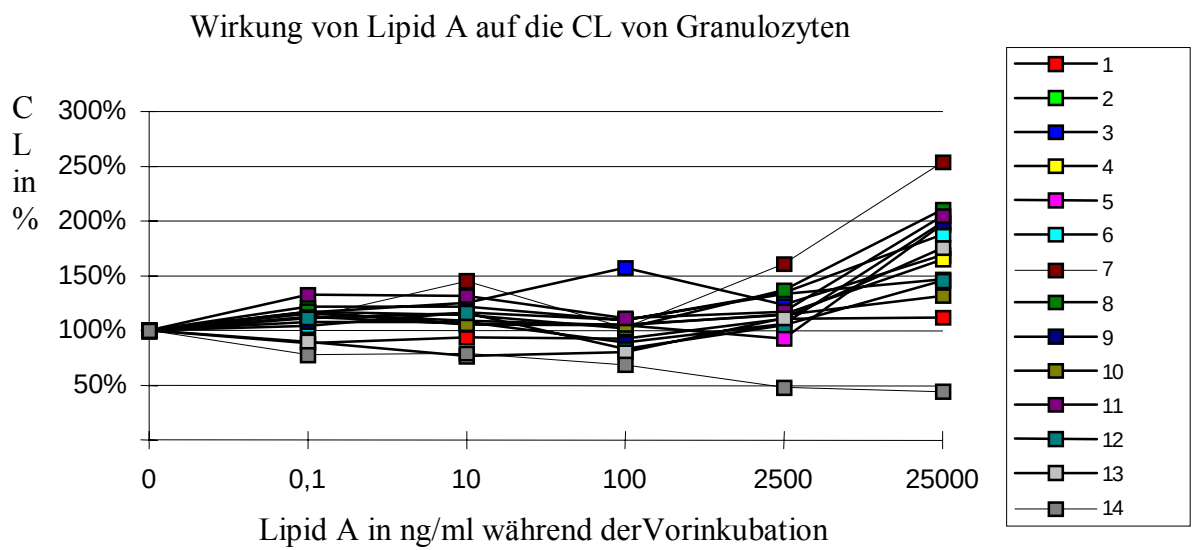


Abbildung 4.10

4.7.4.4 Kinetik LPS

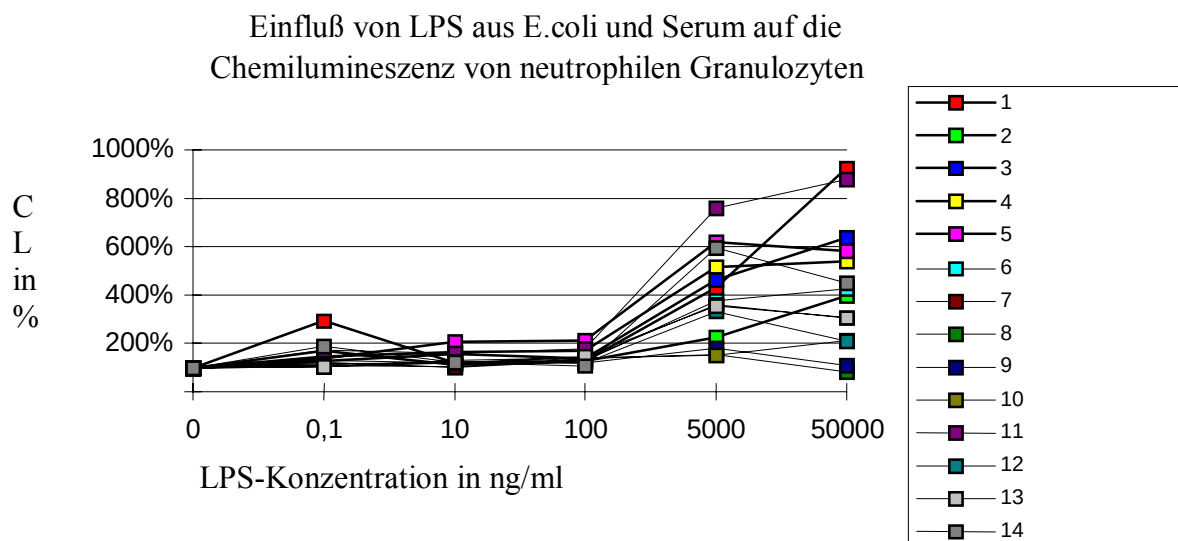


Abbildung 4.11

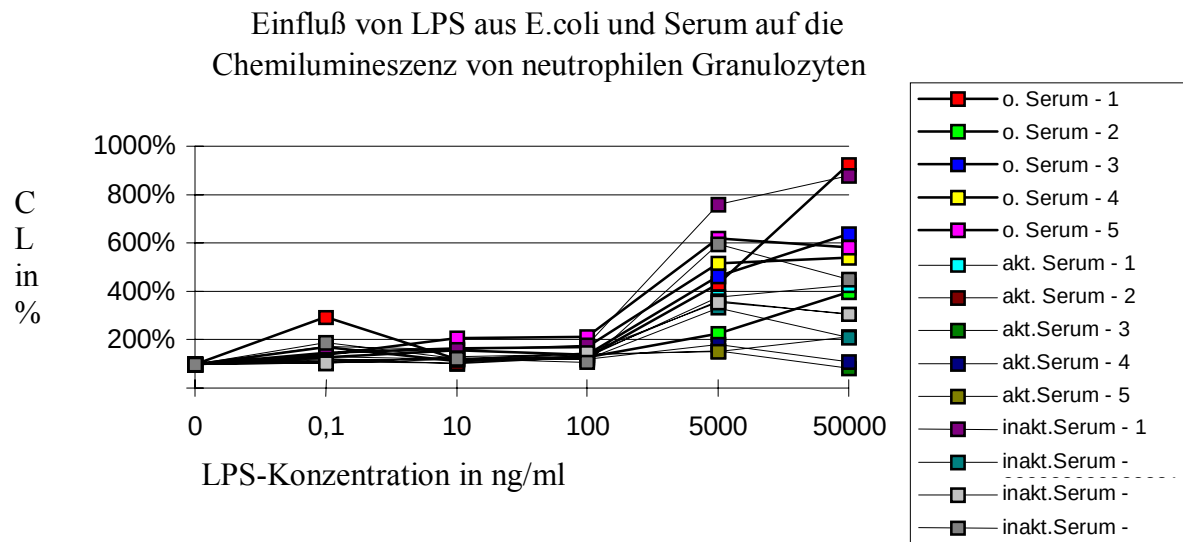


Abbildung 4.12

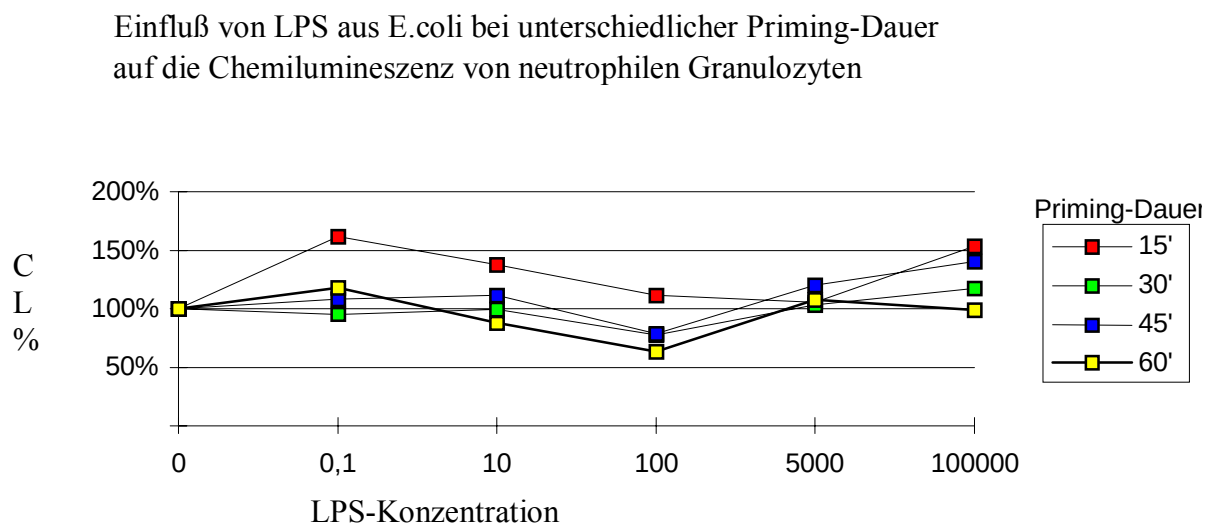


Abbildung 4.13

Einfluß von LPS aus E.coli bei unterschiedlicher Priming-Dauer
auf die Chemilumineszenz von neutrophilen Granulozyten

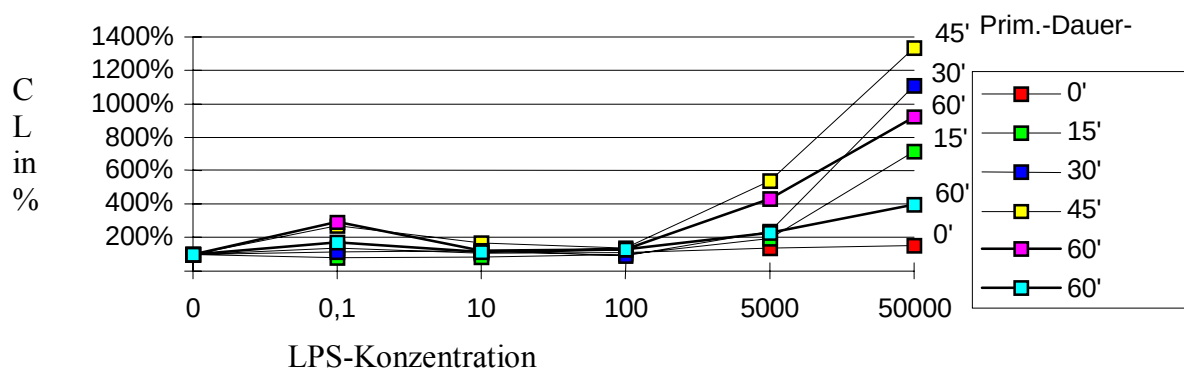


Abbildung 4.14

Einfluß von LPS aus E.coli bei unterschiedlicher Priming-Dauer
auf die Chemilumineszenz von neutrophilen Granulozyten

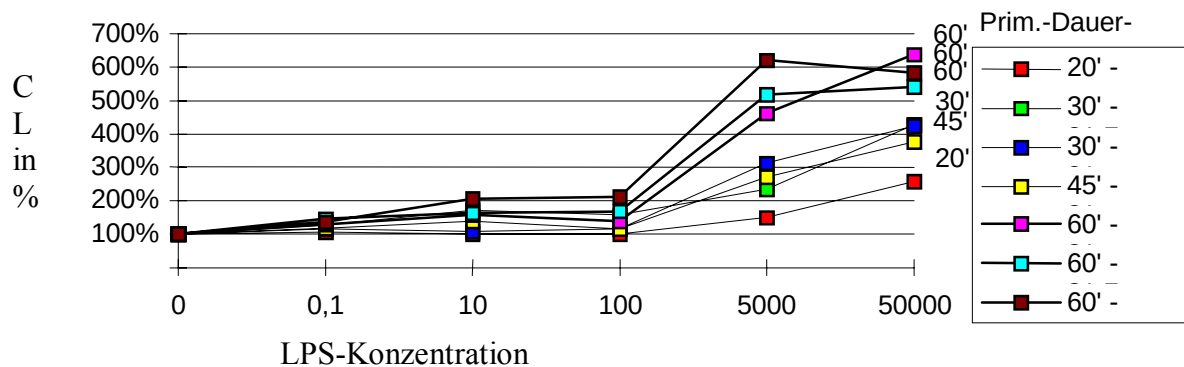


Abbildung 4.15

Einfluß von LPS aus E.coli und Serum auf die Chemilumineszenz von neutrophilen Granulozyten

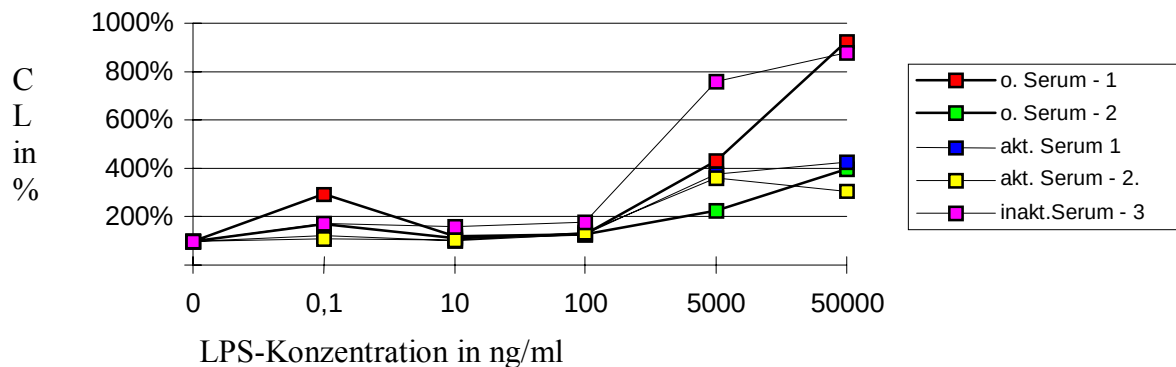


Abbildung 4.16

4.8 Auswertung der Meßdaten

Die Chemilumineszenz wurde wegen der schnelleren Reaktionsgeschwindigkeit über einen Zeitraum von 15 Minuten gemessen. Sie wurde als Integral der cpm über die Zeit registriert und aufgezeichnet. In jedem Meßsystem wurden pro Versuchsansatz 10 Messungen durchgeführt.

Die gebildeten Photonen wurden über einen Zeitraum von 15 Minuten registriert und als gemittelte "counts per minute" in Abhängigkeit von der Zeit grafisch dargestellt. Die Fläche unter der Aktivitätskurve (AUC) entspricht der Gesamtphotonenemission. Es zeigt sich, daß bei der Verwendung der Integralwerte im Meßzeitraum geringere Fehler auftreten als bei der Verwendung des Peakwertes (maximale Chemilumineszenz während der Messung). Zur Interpretation der Ergebnisse wurden die Integralwerte zum Leerwert in Beziehung gesetzt, das heißt, dem ohne Zugabe der Testsubstanz gemessenen Wert. Die Untersuchungsergebnisse werden im Weiteren in Prozent der Kontrollaktivität angegeben.

Pro Meßserie wurden mindestens 10 Messungen mit den Granulozyten unterschiedlicher Probanden durchgeführt.

5 Statistik

In den Vorversuchen sieht man, daß die Chemilumineszenzwerte von neutrophilen Granulozyten nicht normalverteilt sind. Daher wurden die einzelnen Meßwerte mit Hilfe eines nichtparametrischen Tests, des Wilcoxon-Tests (Wilcoxon signed rank Test, WSR), untersucht. Auf diese Weise war es möglich, die bei den unterschiedlichen Testkonzentrationen erhaltenen Ergebnisse mit dem jeweiligen Kontrollwert zu vergleichen. Der WSR wurde ebenfalls eingesetzt, um zu erfassen, ob die Unterschiede in den Effekten zwischen der handelsüblichen Präparation und der wirksubstanzfreien Lösung der einzelnen getesteten Präparate signifikant waren.

Als Signifikanzniveaus wurden 0,05 und 0,01 gewählt. Dies bedeutet, daß die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 %, respektive 1 % ist, wenn eine Veränderung der Chemilumineszenzreaktion durch eine Testsubstanz als nicht signifikant bezeichnet wird (α -Fehler). Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 1 % wurden die beobachteten Effekte als hochsignifikant bezeichnet. Im Text und in den Graphiken werden signifikante Veränderungen der Chemilumineszenz im Bezug auf die Kontrollaktivität mit einem Stern (*) ($p < 0,05$) beziehungsweise mit zwei Sternen (**) ($p < 0,01$) bezeichnet.

Vor Durchführung des Wilcoxon signed rank Tests wurde mit allen Daten der Man-Whitney-Test zur Ermittlung zweiseitiger p-Werte und auch eine Faktorenanalyse jedes einzelnen Medikaments gegen jeden einzelnen Lösungsmittelwert nach Kruskal-Wallis durchgeführt. Diese Tests zeigten bezüglich der Ergebnisse im Wilcoxon-Test plausible Ergebnisse.

Das Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ wurde gewählt, um bei einem vorgegebenen Stichprobenumfang n (Anzahl der Messungen pro Versuchsserie) die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 2. Art möglichst gering zu halten, die um so größer wird, je kleiner α vorgegeben wird. Als Fehler 2. Art (β -Fehler) bezeichnet man im vorliegenden Fall die Annahme, daß ein Medikament die CL signifikant hemmt, obwohl dies nicht der Fall ist. β kann geschätzt werden: Im Falle eines parametrischen Tests wäre bei vorgegebenem $\alpha = 0,05$ für einen Fehler 1. Art und einem festgelegten Stichprobenumfang n der Wert β annähernd so groß wie α . Für den WSR-Test gilt sowohl bei kleinen als auch bei großen Stichprobenumfängen eine Effizienz von 95% (Sachs 1992). Das heißt, dieser nichtparametrische Test benötigt bei gleichem Signifikanzniveau α eine um etwa 5% größere Stichprobenanzahl n , um die Teststärke eines entsprechend trennschärferen parametrischen Tests zu erreichen. Auch das Risiko für einen Fehler 2. Art liegt somit bei 5%.

Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus 10 Messungen mit Standardabweichung dargestellt. Wenn die Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis und Man-Whitney signifikante Werte ergab,

wurde der zweiseitige Wilcoxon-Test durchgeführt um die Wirkung des Medikamentes mit der wirksubstanzfreien Lösung bei den verschiedenen Konzentrationen zu vergleichen. Werte von $p < 0,05$ wurden als signifikant, $p < 0,01$ als hochsignifikant bewertet.

6 Ergebnisse

6.1 Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit Lipid A

6.1.1 Diazepam

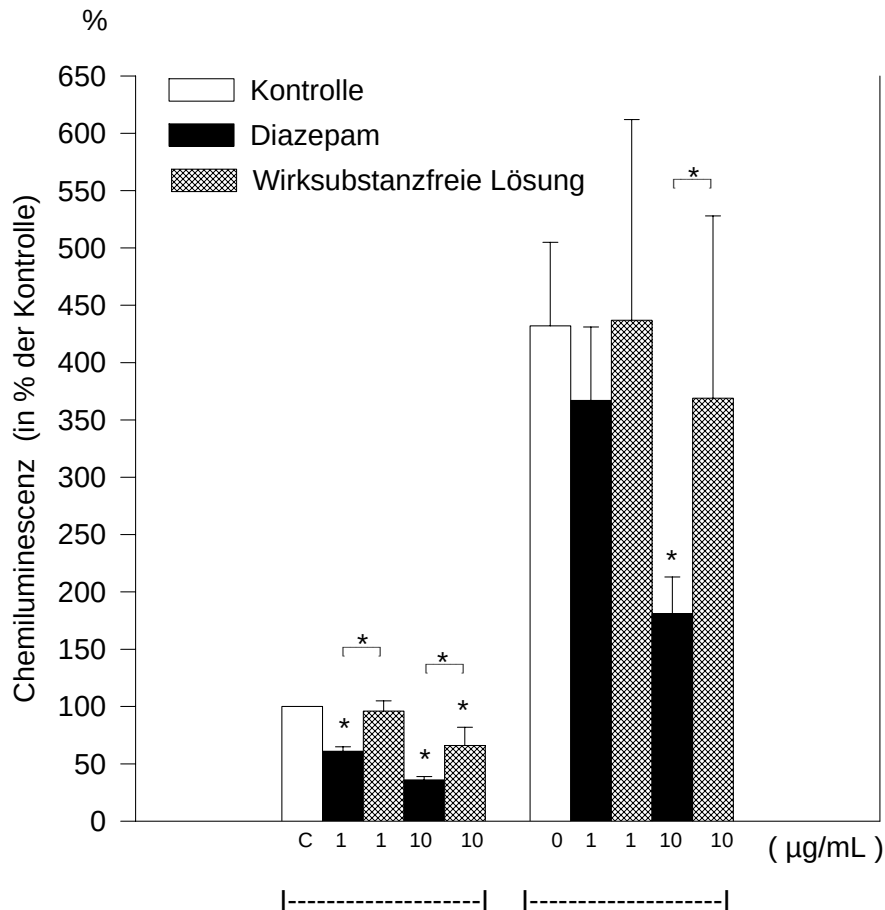


Abbildung 6.1

Diazepam bewirkt eine signifikante Abnahme der Chemilumineszenz in beiden Konzentrationen ohne Priming mit LA, in der höheren Konzentration eine signifikante Hemmung nach Priming (jeweils bezüglich der Kontrollen, immer an den gleichen Probanden gemessen). Wie ersichtlich, hat die Lösung des Wirkstoffes allein keinen Einfluß. Die Klammern zwischen Wirkstoff und Lösungsmittel zeigen jeweils das Signifikanzniveau, das heißt: Diazepam vermindert (im linken Teil der Graphik) die Aktivität sowohl im Vergleich

zur Kontrolle, als auch verglichen zur Lösung. Interessanterweise hemmt das Lösungsmittel – im Medium ohne Priming – in der höheren Konzentration die Chemilumineszenz signifikant.

6.1.2 Thiopental

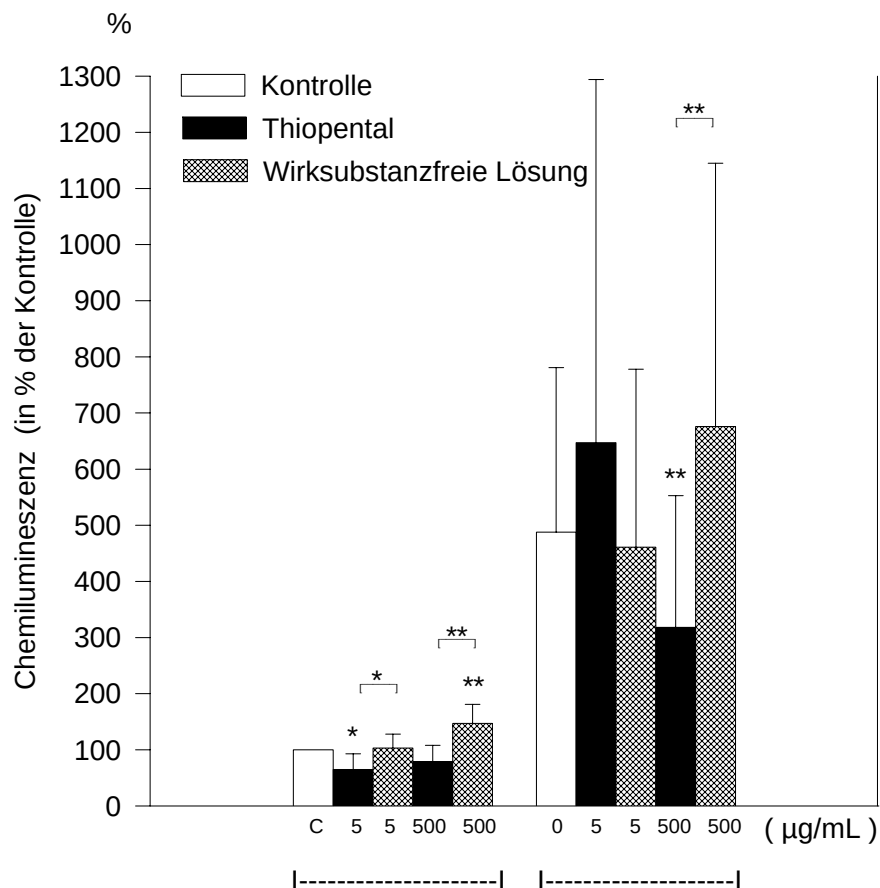


Abbildung 6.2

Bei Thiopental sehen wir ohne Priming eine Hemmung der Chemilumineszenz, wobei lediglich die niedrigere Konzentration signifikant hemmt. Das Lösungsmittel hingegen aktiviert; in der höheren Konzentration sogar hochsignifikant im Vergleich zur Kontrolle. Dementsprechend ergeben sich natürlich signifikante Unterschiede zwischen Wirkstoff und Lösungsmittel. Nach Priming mit LA hingegen bewirkt Thiopental eine Aktivierung in der niedrigeren Konzentration, und diesmal in der hohen Konzentration eine hochsignifikante Hemmung. Das Lösungsmittel zeigt gegenüber der Kontrolle nach Priming keine signifikante

Veränderung gegenüber der Kontrolle. Unter Berücksichtigung der Aktivierung (speziell in höherer Konzentration, und nach Priming) durch die Lösung ist davon auszugehen, daß der Wirkstoff die Chemilumineszenz noch wesentlich stärker hemmt, als es in der Graphik erscheint.

6.1.3 Etomidate

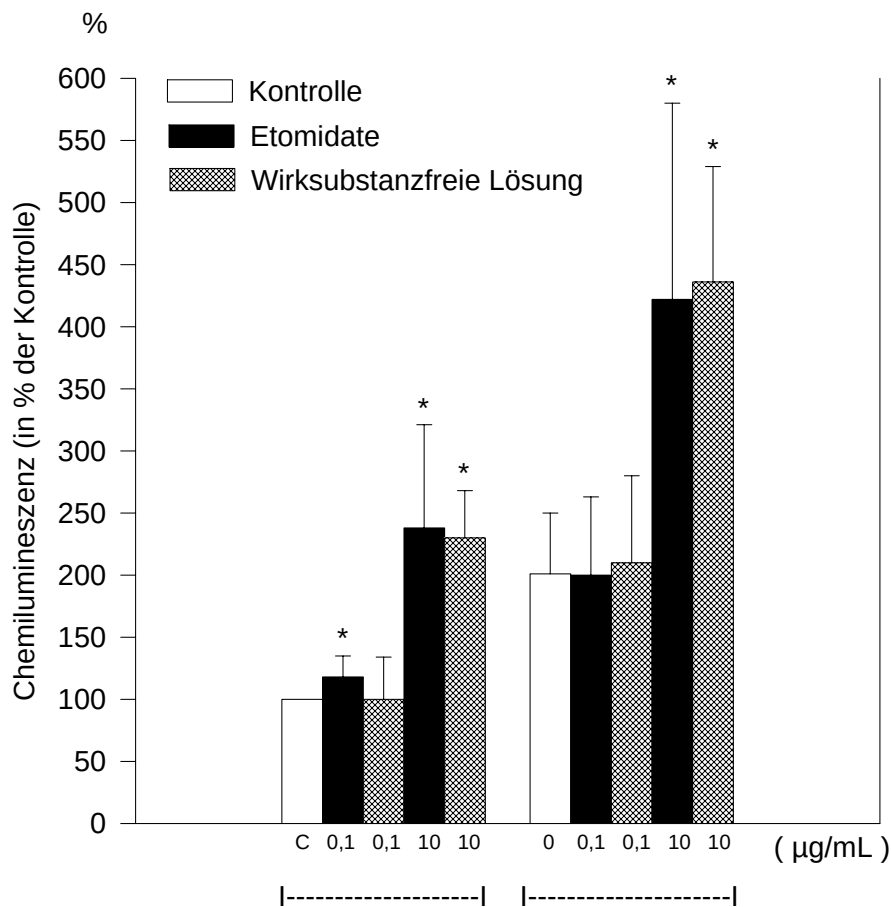


Abbildung 6.3

Etomidate hat eine aktivierende Wirkung, bereits ohne Priming signifikant bei beiden Konzentrationen, nach Priming signifikant bei der höheren Konzentration. Da in der höheren Konzentration auch die wirksbstanzfreie Lösung einen annähernd gleichen Effekt zeigt, ist die Wirkung dem Lösungsmittel zuzuschreiben. In der niedrigeren Konzentration sehen wir

nach dem Priming keinen Effekt, ohne Priming lediglich eine geringfügige - jedoch signifikante - Aktivierung durch den Wirkstoff.

6.1.4 Midazolam

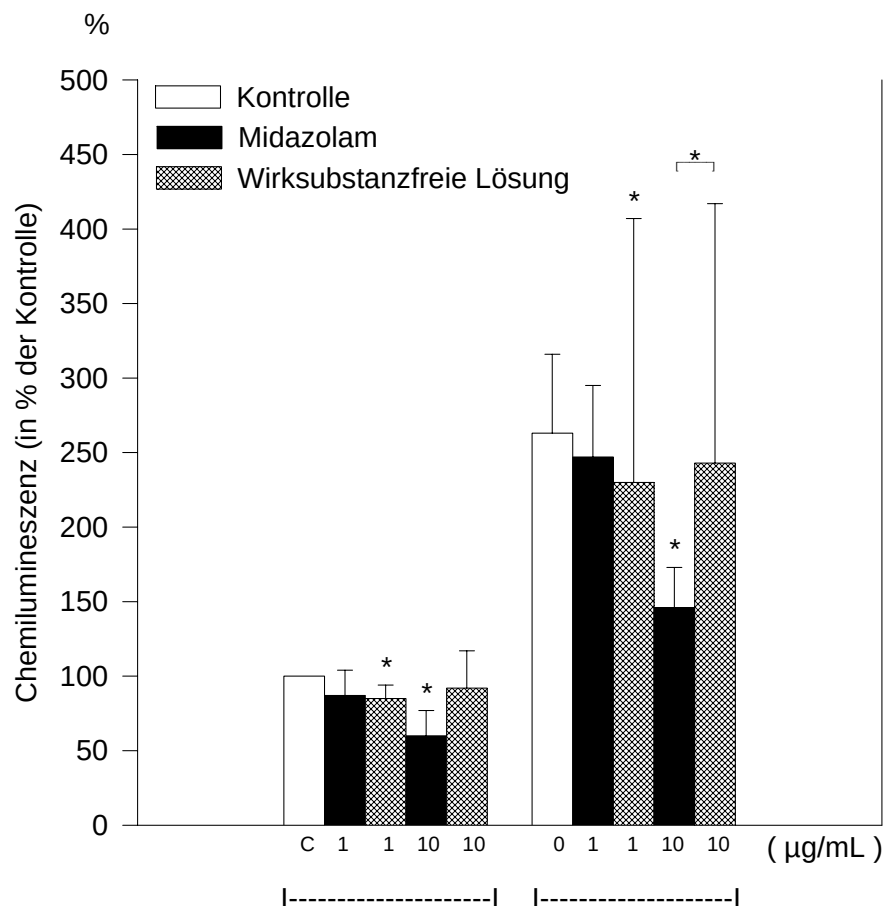


Abbildung 6.4

Midazolam hemmt die Chemilumineszenz mit und ohne Priming in signifikanter Weise, jedoch nur in der höheren Konzentration. Das Lösungsmittel bewirkt zwar auch eine Hemmung, diese ist jedoch nicht so ausgeprägt wie beim Wirkstoff, so daß ein additiver Effekt nahe liegt. Insbesondere sehen wir einen signifikanten Unterschied zwischen Lösungsmittel und Wirkstoff in der höheren Konzentration nach Priming. Signifikante

Hemmung der Chemilumineszenz sehen wir ohne, sowie mit Priming bei dem Lösungsmittel in niedriger, bei Midazolam in hoher Konzentration.

6.1.5 Propofol

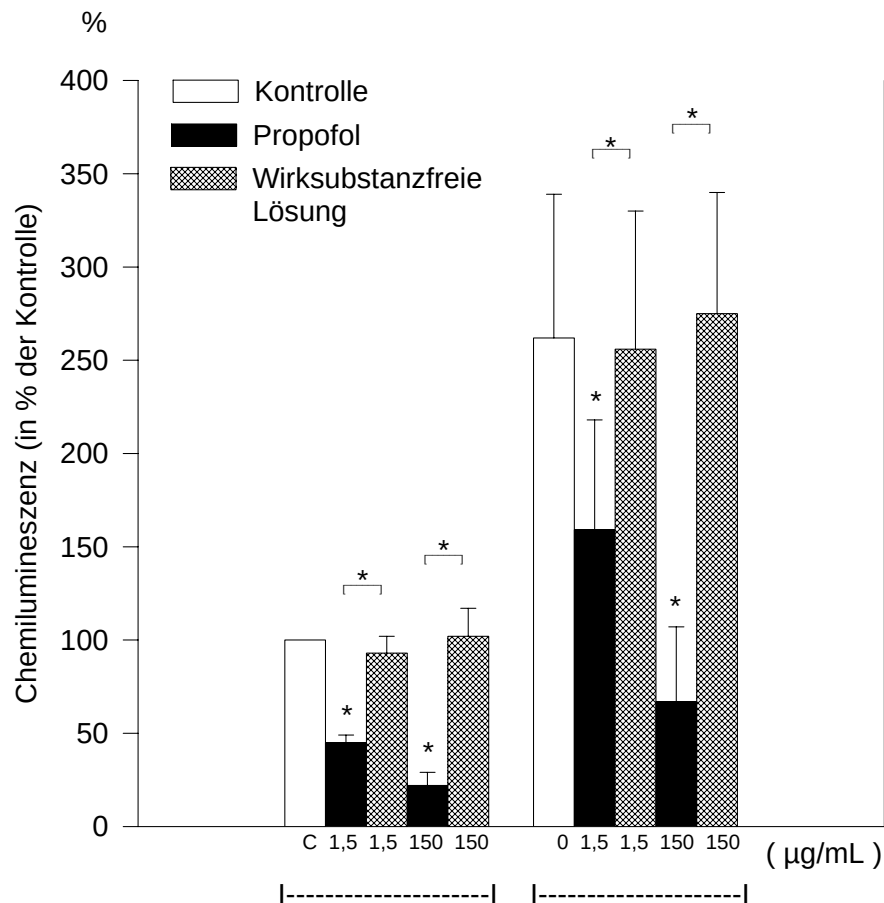


Abbildung 6.5

Bei Propofol und seinem Lösungsmittel sehen wir ein recht einheitliches Bild. Propofol selbst hemmt die Chemilumineszenz sowohl ohne, als auch mit vorherigem Priming in signifikanter Weise. In der höheren Konzentration jeweils etwas stärker. Das Lösungsmittel hat keinen Einfluß. Somit liegt die Annahme einer wirksubstanzspezifischen konzentrationsabhängigen Hemmung nahe. Die Signifikanzniveaus zwischen Wirksubstanz und Lösungsmittel erklären sich aus oben Genanntem von selbst.

6.1.6 Dizepam Lipuro

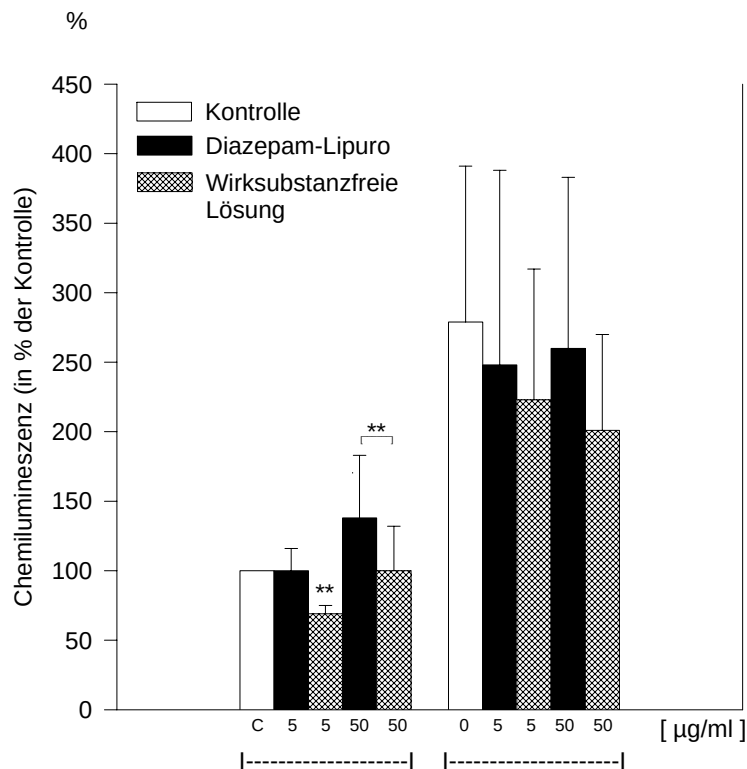


Abbildung 6.6

Diazepam-Lipuro bewirkt in beiden Konzentrationen – mit oder ohne Priming- eine hochsignifikante Hemmung. Das Lösungsmittel wirkt aktivierend, so daß von einer starken, wirksubstanzspezifischen Hemmung der Chenilumineszenz auszugehen ist. Die Hemmung ist bereits ohne Priming sehr ausgeprägt und wird nicht durch die offensichtlich gegenteilige Wirkung der Lösung ausgeglichen.

6.1.7 Methohexital

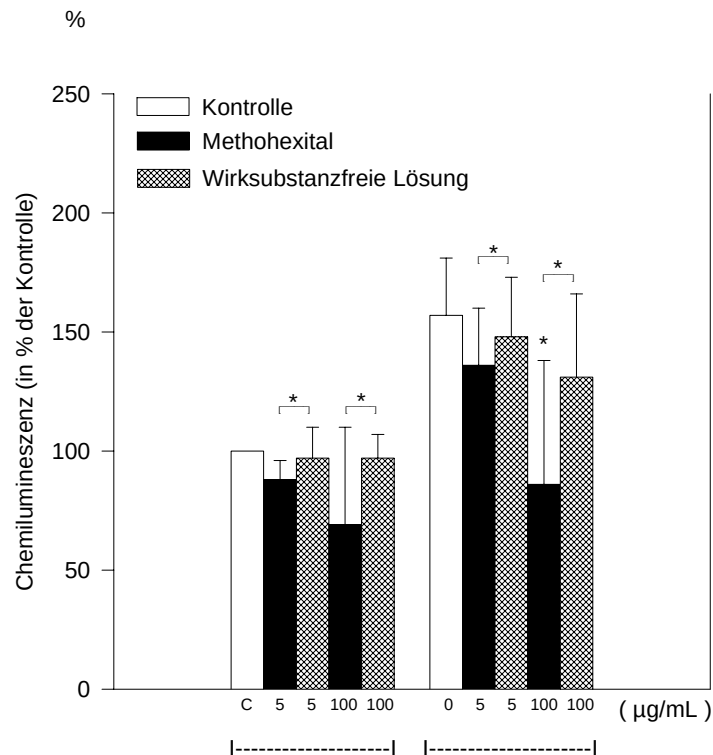


Abbildung 6.7

Methohexital bewirkt offensichtlich eine Abnahme der Chemilumineszenz, die jedoch lediglich nach Priming, und nur in der höheren Konzentration signifikant versus der Kontrolle ist. Die Lösung hat gegenüber der Kontrolle keinen Einfluß. Die tendentiell hemmende Wirkung von Methohexital spiegelt sich auch im – signifikanten – Vergleich zwischen Wirksubstanz und Lösungsmittel.

6.2 Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit Lipopolysaccharid

6.2.1 Diazepam

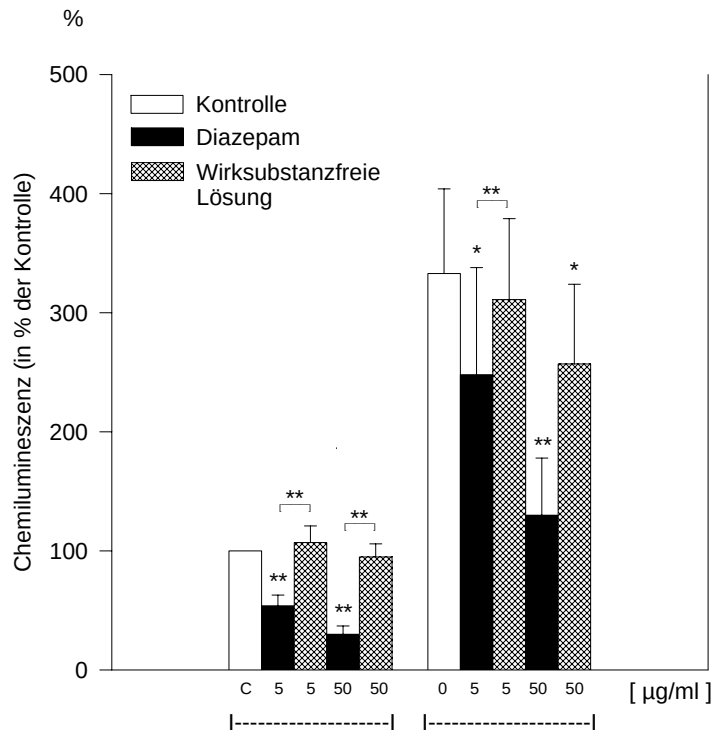


Abbildung 6.8

Diazepam bewirkt hier eine hochsignifikante Abnahme der Chemilumineszenz in beiden Konzentrationen ohne Priming mit LPS; weiterhin auch in der höheren Konzentration nach Priming eine hochsignifikante Hemmung, in der niedrigeren Konzentration noch eine signifikante Hemmung. Das Lösungsmittel hemmt – nach Priming – in der höheren Konzentration die Chemilumineszenz signifikant, hat jedoch in den übrigen Ansätzen keinen eindeutigen Einfluß auf die Aktivität der neutrophilen Granulozyten. Hauptsächlich liegt also eine wirkspezifische und konzentrationsabhängige Hemmung vor.

6.2.2 Thiopental

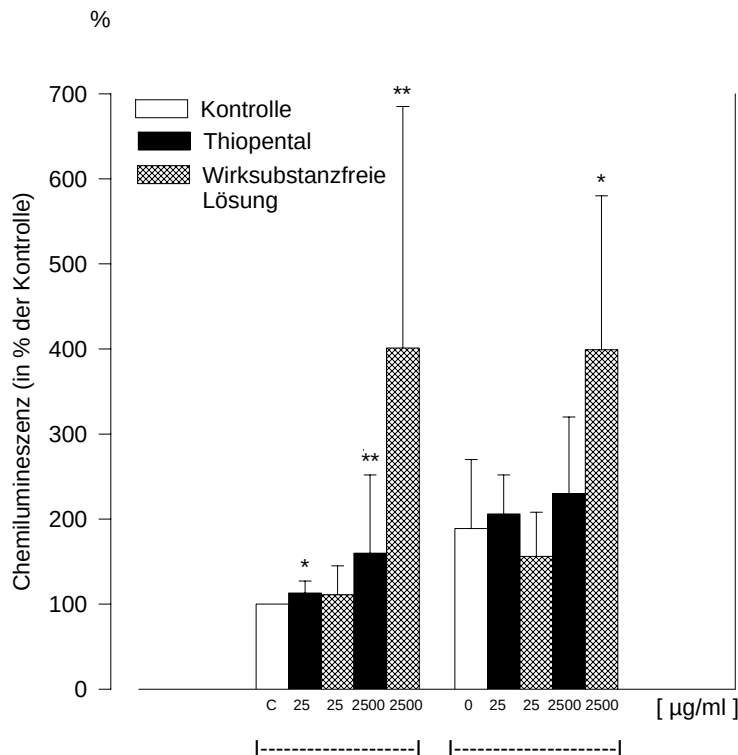


Abbildung 6.9

Bei Thiopental sehen wir, diesmal ohne Priming, eine Steigerung der Chemilumineszenz, was auf die diesmal höher gewählte Konzentration zurückzuführen sein könnte (evtl. wirkt sich hierbei die aktivierende Wirkung des Lösungsmittels stärker aus, als die angenommene hemmende der Wirksubstanz) - die Ursache ist jedoch letztlich unklar. Das Lösungsmittel aktiviert, in der niedrigeren Konzentration signifikant, in der höheren Konzentration sogar hochsignifikant im Vergleich zur Kontrolle. Nach Priming zeigt Thiopental allenfalls eine Tendenz in Richtung Aktivierung wobei jedoch unter Berücksichtigung der Aktivierung durch die Lösung davon auszugehen ist, daß der Wirkstoff die Chemilumineszenz insgesamt eher hemmt.

6.2.3 Etomidate

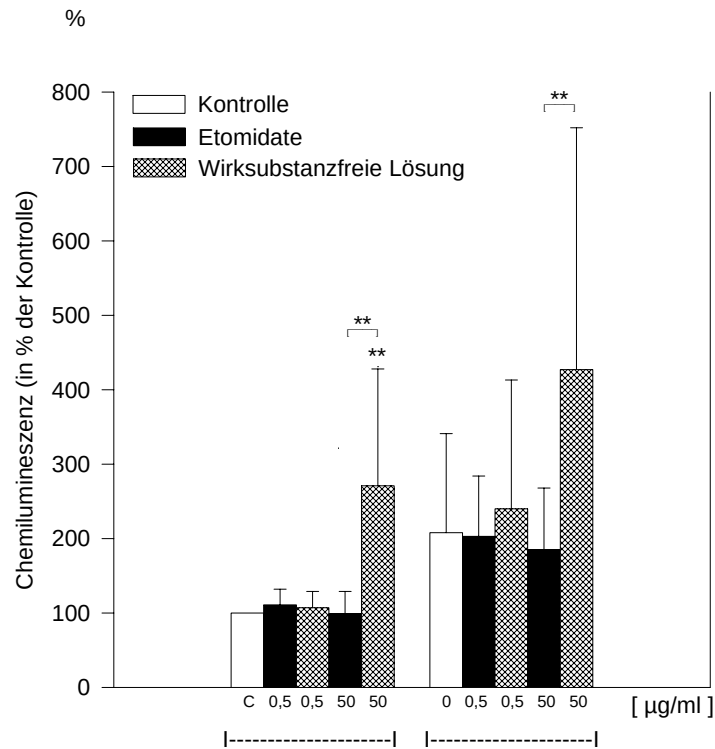


Abbildung 6.10

Bei Etomidate hat die wirksubstanzfreie Lösung bei der höheren Konzentration eine aktivierende Wirkung – bereits ohne Priming signifikant bei beiden Konzentrationen, nach Priming signifikant. In der höheren Konzentration hoch signifikant, jeweils unabhängig vom Priming. Die Substanz allein hat keinen relevanten Einfluß auf die Lumineszenz. Somit ist auch hier der Effekt auf die Neutrophilen dem Lösungsmittel zuzuschreiben.

6.2.4 Midazolam

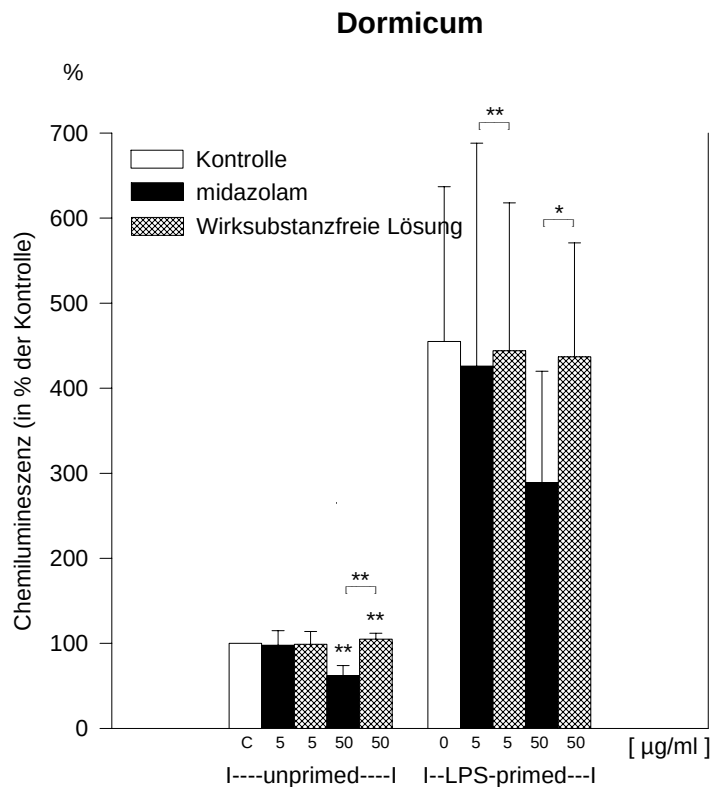


Abbildung 6.11

Midazolam hemmt die Chemilumineszenz mit und ohne Priming mit LPS, jedoch nur in der höheren Konzentration und ohne Priming in signifikanter Weise. Das Lösungsmittel hat hier keinen wesentlichen Einfluß auf die Chemilumineszenz. Insgesamt ist also von einer substanzspezifischen Hemmung auszugehen, die sich jedoch erst bei höherer Konzentration ausgeprägt bemerkbar macht. Das Lösungsmittel scheint keinen Einfluß zu haben. (Man beachte die relativ hohen Standardabweichungen mit Priming gegenüber den Ansätzen ohne Priming.)

6.2.5 Propofol

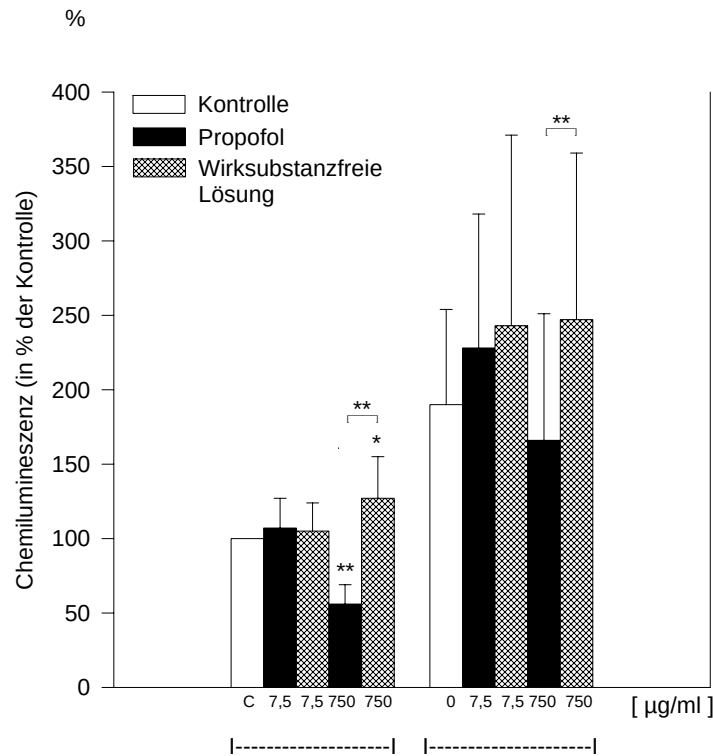


Abbildung 6.12

Propofol hemmt die Chemilumineszenz sowohl ohne, als auch mit vorherigem Priming in der höheren Konzentration. In der höheren Konzentration ohne LPS sogar hochsignifikant. Das Lösungsmittel hat jeweils einen geringfügig aktivierenden Einfluß, signifikant mit Priming. Somit liegt die Annahme einer wirkspezifischen, konzentrationsabhängigen Hemmung durch Propofol nahe. Verdeutlicht wird dieses auch durch die durch Klammern über Wirkstoff und Lösungsmittel angegebenen hochsignifikanten Unterschiede bei der jeweilig höheren Konzentration.

6.2.6 Diazepam-Lipuro

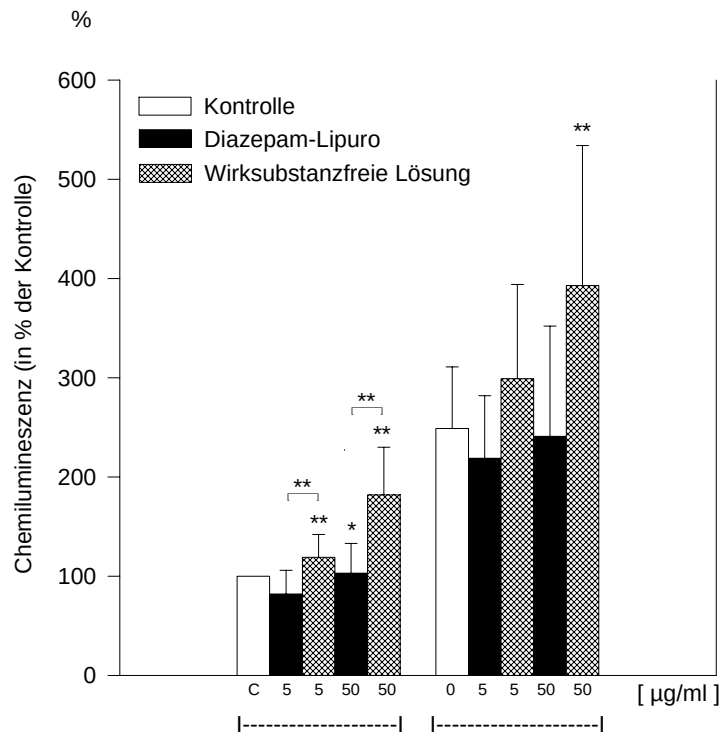


Abbildung 6.13

Diazepam Lipuro hat weder vor, noch nach Priming einen signifikanten Einfluß auf die Chemilumineszenz. Die wirksubstanzfreie Lösung hingegen bewirkt ohne vorherige Stimulation mit LPS bei beiden Konzentrationsstufen eine hochsignifikante Aktivierung der Chemilumineszenz, nach Stimulation mit LPS eine tendentielle – jedoch nicht signifikante – Aktivierung in der niedrigeren, eine hochsignifikante Aktivierung in der höheren Konzentration.

6.2.7 Methohexital

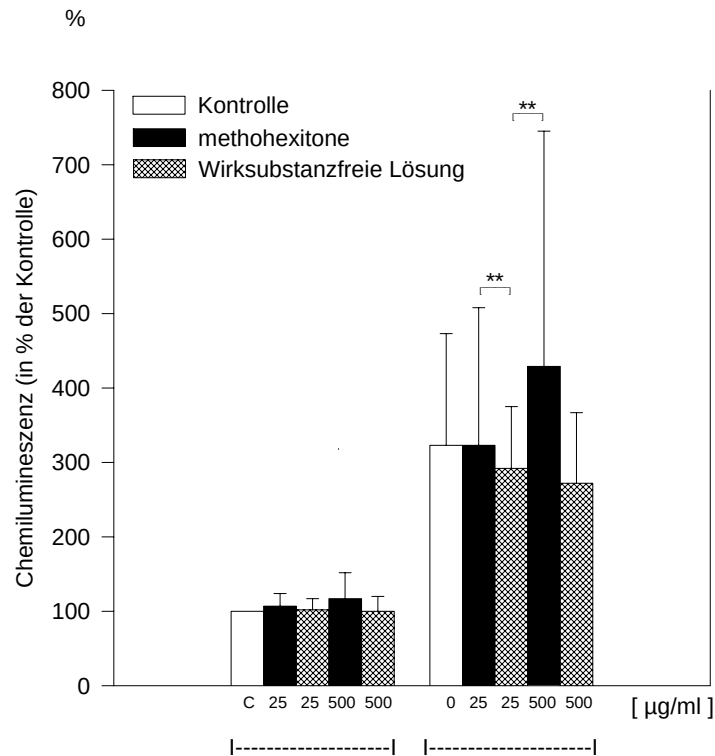


Abbildung 6.14

Methohexital hat hier in den angegebenen Konzentrationen offensichtlich keinen Einfluß auf die Chemilumineszenz. Die Lösung hat gegenüber der Kontrolle ebenfalls keinen Einfluß. Die signifikanten Unterschiede zwischen Wirkstoff und Lösungsmittel nach Priming lassen sich durch den tendentiell (!) stimulierenden Effekt des Wirkstoffes versus dem – ebenfalls tendentiell – hemmenden Effekt der Lösung erklären und sollten nicht überbewertet werden. Auch hier sind hohe Standardabweichungen zu vermerken.

6.3 Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit $\text{TNF-}\alpha$

6.3.1 Diazepam

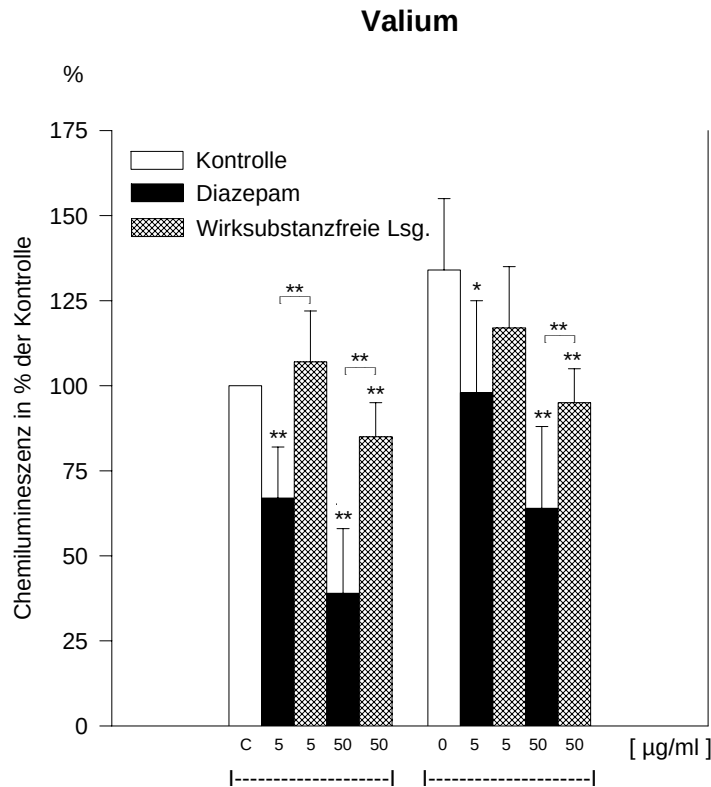


Abbildung 6.15

Auch hier bewirkt Diazepam eine hochsignifikante Abnahme der Chemilumineszenz in beiden Konzentrationen ohne Priming, diesmal mit $\text{TNF}\alpha$. Nach Priming erfolgt in der höheren Konzentration eine hochsignifikante Hemmung – in der niedrigeren Konzentration noch eine signifikante Hemmung. Das Lösungsmittel hemmt – vor und nach Priming – in der höheren Konzentration die Chemilumineszenz signifikant, hat jedoch in den übrigen Ansätzen keinen eindeutigen Einfluß auf die Aktivität. Die Signifikanzniveaus zwischen Wirkstoff und Lösung erklären sich aus dem oben genannten. Hauptsächlich liegt also auch hier eine wirksubstanzspezifische und konzentrationsabhängige Hemmung vor. Man beachte die unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zu Diazepam-Lipuro.

6.3.2 Thiopental

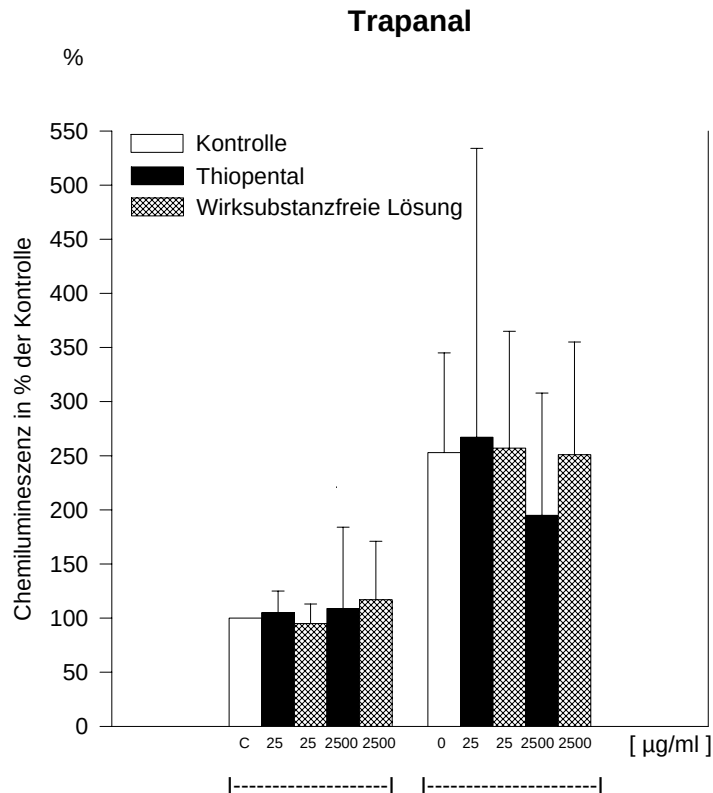


Abbildung 6.16

Bei Thiopental sehen wir diesmal keine signifikante Beeinflußung der Chemilumineszenz. Das Lösungsmittel zeigt ebenfalls weder mit noch ohne Priming eine relevante Veränderung der Chemilumineszenz, wobei das Ergebnis in Anbetracht der hohen Standardabweichungen kritisch zu würdigen ist.

6.3.3 Etomidate

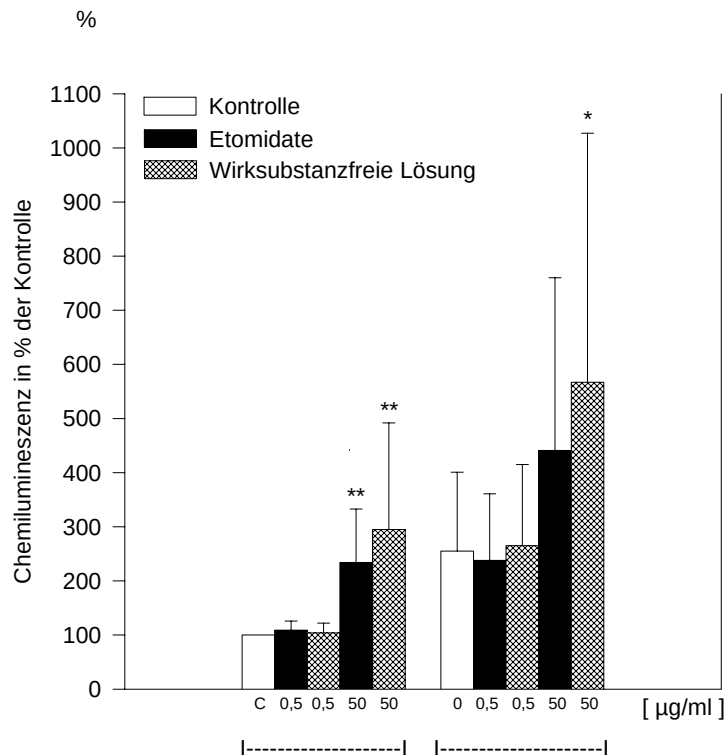


Abbildung 6.17

Bei Etomidate sehen wir ohne und mit Priming bei der höheren Konzentration eine signifikante Steigerung der Chemilumineszenz – ohne Priming sogar hochsignifikant. Das Lösungsmittel aktiviert, in der hohen Konzentration signifikant, ohne Priming hochsignifikant, mit Priming signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Nach Priming zeigt Thiopental allenfalls eine tendentielle Aktivierung bei der höheren Konzentration.

6.3.4 Midazolam

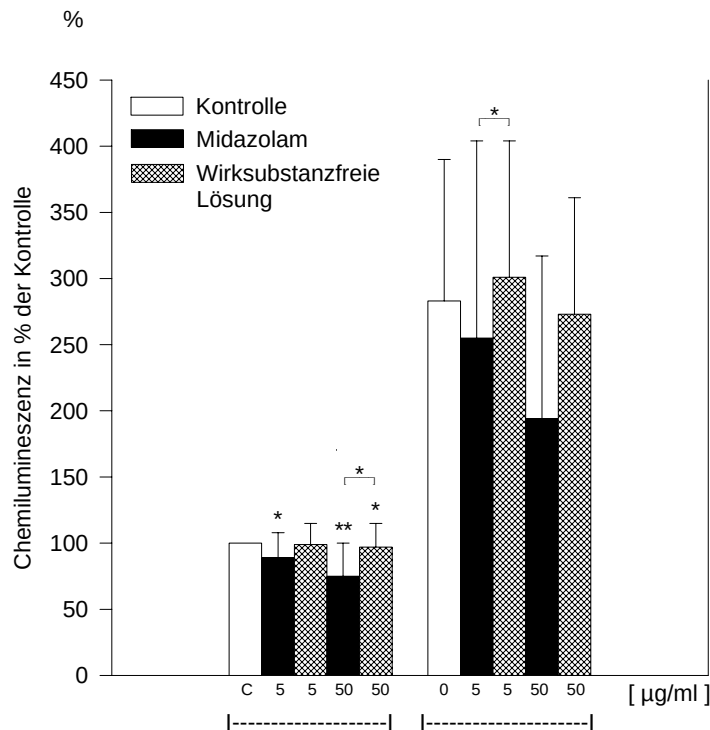


Abbildung 6.1 8

Midazolam hemmt die Chemilumineszenz mit und ohne Priming mit $\text{TNF}\alpha$, in der höheren Konzentration und ohne Priming in hochsignifikanter Weise, in der niedrigeren Konzentration mit und ohne vorherige Stimulation jeweils noch signifikant. Das Lösungsmittel hat auch hier keinen wesentlichen Einfluß auf die Chemilumineszenz. Es liegt also auch hier insgesamt ein substanzspezifischer hemmender Effekt des Midazolams vor. Das Lösungsmittel scheint keinen Einfluß zu haben. (Bemerkenswert sind erneut die relativ hohen Standardabweichungen mit Priming gegenüber den Ansätzen ohne Priming.)

6.3.5 Propofol

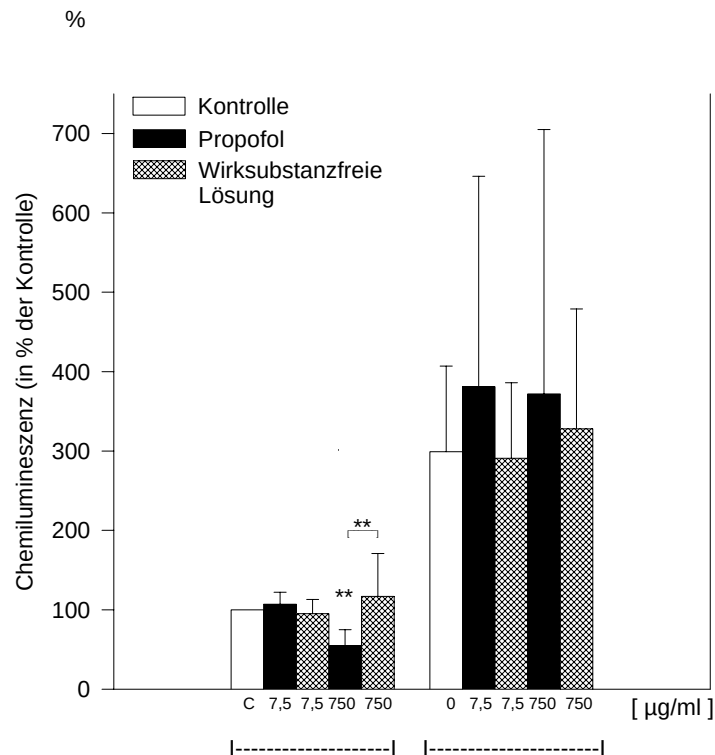


Abbildung 6.29

Propofol hemmt die Chemilumineszenz ohne vorheriges Priming in der höheren Konzentration hochsignifikant. Nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ ist keine klare Beeinflussung der Chemilumineszenz festzumachen. Das Lösungsmittel hat ebenfalls keinen faßbaren Einfluß. Das Ergebnis ist in Anbetracht der hohen Standardabweichungen kritisch zu würdigen.

6.3.6 Diazepam-Lipuro

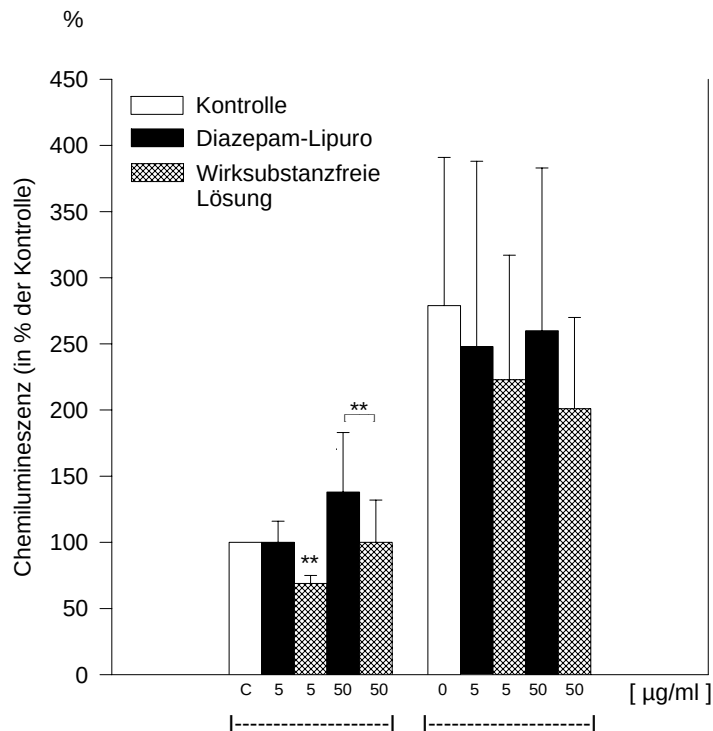


Abbildung 6.20

Diazepam-Lipuro hat weder vor, noch nach Priming einen signifikanten Einfluß auf die Chemilumineszenz. Die wirksbstanzfreie Lösung hingegen bewirkt ohne vorherige Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ – diesmal jedoch lediglich in der niedrigeren Konzentrationsstufe – eine hochsignifikante Aktivierung der Chemilumineszenz.

6.3.7 Methohexital

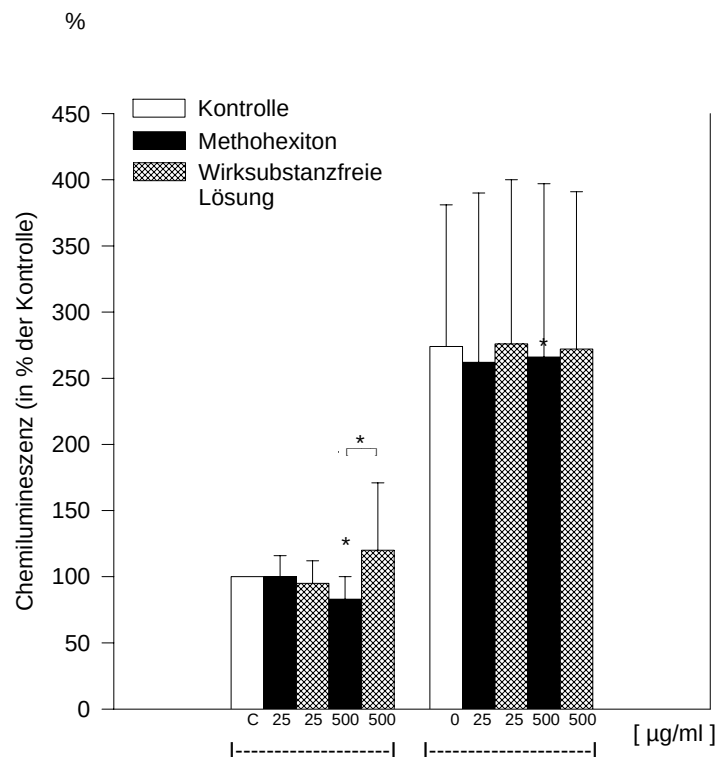


Abbildung 6.21

Methohexital hat auch hier in den angegebenen Konzentrationen offensichtlich kaum Einfluß auf die Chemilumineszenz. Einzig in dem Ansatz ohne vorherige Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ sieht man bei der höheren Konzentration eine einfach signifikante Hemmung der Chemilumineszenz. Die Lösung von Methohexital verhält sich neutral.

7 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß das Priming mit Lipid A, Lipopolysaccharid und TNF- α einen signifikanten Anstieg der Sauerstoffradikalbildung in vitro bewirkt. Innerhalb therapeutischer Plasmaspiegel hemmen Trapanal®, Valium® und Disoprivan® die FMLP-induzierte Chemilumineszenz von nicht voraktivierten neutrophilen Granulocyten. Die relative Hemmung der nicht vorstimulierten Neutrophilen und der durch TNF- α vorgeprimten neutrophilen Granulocyten war vergleichbar. Dies deutet darauf hin, daß die Medikamente unabhängig von der Stimulation durch TNF- α die Sauerstoffradikalbildung vermindern. Nach der Aktivierung durch TNF- α waren die Hypnotika und Sedativa nicht mehr in der Lage, die Chemilumineszenz unter das Niveau nicht vorstimulierter neutrophiler Granulocyten zu verringern. Das bedeutet, daß das Priming mit TNF- α entweder die Zahl der FMLP-Rezeptoren (Tennenberg, 1990) beziehungsweise deren Affinität (Atkinson, 1988) oder aber die Signaltransduktion beeinflußt und diese Wirkung durch Hypnotika und Sedativa nicht völlig umgekehrt werden kann. Überschneidungen innerhalb der Signaltransduktion könnten dazu führen, daß die Sedativa und Hynotika und auch TNF- α in die FMLP-induzierte Radikalbildung der neutrophilen Granulocyten eingreifen. Formyl-Methionyl-Peptide, wie FMLP sind Derivate bakterieller Proteine (Marasco, 1984). Durch den entsprechenden Kontakt mit diesen bakteriellen Proteinen, wie FMLP, stimuliert TNF- α die neutrophilen Granulocyten zur vermehrten Freisetzung von Sauerstoffradikalen. Die Bindung von FMLP an seine Rezeptoren auf den Neutrophilen bewirkt die Aktivierung einer Proteinkinase C (PKC), den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und der Arachidonsäuremetaboliten und die Aktivierung bestimmter Mitglieder der mitogen aktivierten Protein (MAP) - Kinase Familie. Dies führt zu einer Aktivierung der reduzierten Nikotinamid-Adenin Dinucleotid Phosphat (NADPH) Oxidase, dem Enzym, welches für die O₂⁻-Produktion verantwortlich ist (Gyllenhammer, 1989; Gerard, 1994; Füllöp, 1988). TNF- α induziert zudem die Hydrolyse von Sphingomyelin, wodurch dessen Metabolit Sphingosin-1-Phosphat freigesetzt wird. Die Inkubation von PMN mit Sphingomyelinase führt zu einem ähnlichen Effekt wie das Priming mit TNF- α . C2-Ceramide bewirken eine konzentrationsabhängige Hemmung der FMLP-stimulierten Superoxidbildung. Dieses deutet auf eine mögliche Rolle von Sphingomyelin bei der Signaltransduktion des TNF- α -vermittelten Primings der neutrophilen Granulocyten (Niwa, 2000).

7.1 Einfluß von Hypnotika auf nicht geprimte beziehungsweise durch Cytokine/Endotoxine geprimte neutrophile Granulocyten

Brevimytal®, Trapanal®, Dormicum®, Valium® und Disoprivan® zeigten sowohl bei nichtgeprimten als auch bei durch TNF vorstimulierten Neutrophilen eine Hemmung der FMLP induzierten Chemilumineszenz. Die Stimulation der nichtgeprimten und der geprimten Neutrophilen durch Etomidate® in der Konzentration von 10µ/ml lag bei 238% ± 83% (ohne TNF-α) beziehungsweise 422% ± 158% (mit TNF-α). Dies unterschied sich nicht signifikant von der Stimulation des entsprechenden Lösungsmittels: 230% ± 38% (ohne TNF-α) und 436% ± 93% (mit TNF-α).

Das bedeutet, daß die Wirkung von Etomidate durch den Effekt seines Lösungsmittels kaum bewertet werden kann. Innerhalb therapeutischer Plasmaspiegel zeigte nur Trapanal®, Valium® und Disoprivan® eine Hemmung der Chemilumineszenz um mehr als 35 %. Nur Disoprivan® hatte auch auf die durch TNF-α geprimten neutrophilen Granulocyten einen hemmenden Effekt. Trotz der hemmenden Wirkung durch die Hypnotika und Sedativa blieb das Integral der Chemilumineszenz bei den durch TNF-α vorstimulierten neutrophilen Granulocyten signifikant oberhalb oder war zumindest nicht signifikant unterhalb (Disoprivan®, Brevimytal®) der Kontrolle, das heißt unter den Werten nicht vorstimulierter neutrophiler Granulocyten ohne Medikament oder Lösungsmittel. Verglichen mit den entsprechenden wirksubstanzfreien Lösungsmitteln hemmten Brevimytal®, Trapanal®, Dormicum®, Valium® und Disoprivan® sowohl die ungeprimten als auch die durch TNF-α geprimten neutrophilen Granulocyten in relativ vergleichbarem Maße.

7.2 Einfluß von Benzodiazepinen und ihrer wirksubstanzfreien Lösungen auf die Chemilumineszenz neutrophiler Granulozyten

Mirow (Mirow, 1995) beobachtete eine dosisabhängige Hemmung der Chemilumineszenz FMLP-stimulierter neutrophiler Granulozyten unter dem Einfluß von Diazepam in alkoholischer Lösung (Valium®) und Midazolam (Dormicum®) bereits in therapeutisch relevanten Konzentrationsbereichen. Die Zymosan-induzierte CL hingegen wurde unter dem Einfluß von Diazepam in alkoholischer Lösung (Valium®) und Midazolam (Dormicum®)

erst in Konzentrationen, die eine bzw. zwei Zehnerpotenzen oberhalb des therapeutischen Bereiches lagen, gehemmt (Mirow, 1995).

Es konnte gezeigt werden, daß Midazolam und Diazepam im Endotoxinmodell bereits in therapeutisch relevanten Konzentrationsbereichen die FMLP-induzierte CL neutrophiler Granulozyten hemmen. Es scheint denkbar, daß dieser Effekt über periphere Benzodiazepin-Bindungsstellen auf den Granulozyten vermittelt wird.

7.2.1 Midazolam (Dormicum)

Die dosisabhängige Hemmung der CL unter dem Einfluß von Midazolam (Dormicum®) wird nicht durch die wirksubstanzfreie Lösung des handelsüblichen Präparates bedingt. Sie wird also durch die Wirksubstanz selbst verursacht (Birkhahn, 2000).

Krumholz und Mitarbeiter (Krumholz, 1978) kamen in ihren Untersuchungen zu ähnlichen Ergebnissen: sie fanden jedoch erst in Konzentrationen oberhalb des bei therapeutischer Anwendung gemessenen Plasmaspiegelbereiches eine Hemmung der Bildung von Superoxidanionen durch PMN.

In einer anderen Versuchsreihe testeten Krumholz et al. (Krumholz, 1978) die Adhärenz neutrophiler Granulozyten unter dem Einfluß von Midazolam an Säulen aus Nylonwatte. Sie beschrieben eine dosisabhängige Hemmung der Adhärenz neutrophiler Granulozyten durch Midazolam in therapeutisch relevanten Konzentrationen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Krumholz wiesen auch Kress et al. (Kress, 1990) eine dosisabhängige Hemmung der CL FMLP-stimulierter neutrophiler Granulozyten unter dem Einfluß von Midazolam in Konzentrationen oberhalb des therapeutisch relevanten Konzentrationsbereiches nach. In einem zellfreien System mit Meerrettichperoxidase schlossen sie Scavengereigenschaften, Lichtabsorption oder eine Interaktion des Medikamentes mit Luminol als Ursache des beobachteten Effektes aus. In Übereinstimmung mit Kress et al. registrierten Fröhlich et al. (Fröhlich, 1996) eine Hemmung der Wasserstoffperoxidproduktion FMLP-stimulierter Neutrophiler durch Midazolam in Konzentrationen oberhalb des therapeutischen Spiegelbereiches. Durchflußzytometrisch stellten sie fest, daß nur mehr ein Teil der Neutrophilen nach submaximaler Stimulation mit FMLP unter hohen Konzentrationen von Midazolam mit einem Respiratory Burst reagiert. Sie fanden also Hinweise darauf, daß es nicht zu einer gleichmäßigen CL-Hemmung aller Zellen kommt, sondern die Zellen vielmehr nach dem "Alles-oder-Nichts-Prinzip" reagieren. Heine et al. (Heine et al., 1996) untersuchten die Wirkung von Midazolam auf den PMA induzierten

Respiratory Burst neutrophiler Granulozyten. Durchflußzytometrisch bestimmten sie die intrazelluläre oxidative Umwandlung von Dihydrorhodarnin-123 zu dem fluoreszierenden Rhodamin-123. Im Gegensatz zu den vorgenannten Autoren fanden sie selbst bei Verwendung hoher Konzentrationen des Medikamentes keine relevante Suppression des Respiratory Burst. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Davidson und Mitarbeitern (Davidson, 1995) überein, die bei durchflußzytometrischen Untersuchungen mit Vollblut keine signifikante Hemmung der Sauerstoffradikalproduktion oder der Phagozytoseaktivität durch Midazolam fanden. Sie untersuchten therapeutisch relevante sowie 10 und 100-fach höhere Konzentrationen.

Heller beobachtete bei Midazolam eine signifikant gehemmte respiratory burst bezogen auf PMN und Monocyten bei durchflußzytometrischen Messungen (Heller, 1998).

Es konnte gezeigt werden, daß Midazolam in klinisch relevanten Konzentrationen zu einer signifikanten Hemmung der Sauerstoffradikalbildung, der Chemotaxis und der Phagocytose führt (Nishina, 1998). Weiterhin bewirkt Midazolam eine verminderte Expression von Interleukin-8, welches die Chemotaxis und Adhäsionsfähigkeit bei PMN anregt (Galley, 1998).

7.2.2 Diazepam (Valium)

Die Ergebnisse von Birkhahn (Birkhahn, 2000) zeigen, daß die von Mirow (Mirow 1995) beobachtete dosisabhängige Hemmung der CL neutrophiler Granulozyten unter dem Einfluß von Diazepam in alkoholischer Lösung als Valium in den beiden hohen Konzentrationen zum Teil durch Effekte der wirksubstanzfreien Lösung bedingt ist. Der Hydroxylradikalfänger Natriumbenzoat hemmt die Staphylococcus aureus-stimulierte Chemilumineszenz, Superoxidanionenproduktion und Lysozymfreisetzung neutrophiler Granulozyten (Johansen, 1983; Nguyen, 1983; Ginsburg, 1993). Ebenso beeinträchtigt es die Fähigkeit, Bakterien aufzunehmen und abzutöten (Johansen, 1983). Dahlgren (Dahlgren, 1991) wies nach, daß Benzoat die extrazelluläre CL FMLP-stimulierter Neutrophiler um 50% und die intrazelluläre CL um mehr als 90% hemmt. Allen und Loose (Allen 1976) beobachteten ein Abfangen von freien Hydroxylradikalen durch Natriumbenzoat in einem Granulozyten- bzw. Peritonealmakrophagenhaltigen Testsystem. Bei dieser Reaktion entstehen im wäßrigen Medium Salizylate. Birkhahn konnte mit den Untersuchungen im zellfreien System diese Effekte der wirksubstanzfreien Lösung von Valium nachweisen. Auch Äthanol ist ein Hydroxylradikalfänger und beeinflusst die CL neutrophiler Granulozyten negativ.

Wahrscheinlich sind diese Effekte nur bei in vitro-Untersuchungen und nicht in vivo von Bedeutung, da das Lösungsmittel Äthanol in vivo nicht nachgewiesen werden kann.

Zusammenfassend zeigt sich bei Valium innerhalb des therapeutischen Konzentrationsbereiches eine Hemmung der FMLP-induzierten Chemilumineszenz durch die Wirksubstanz selbst.

Goldfarb et al. (Goldfarb, 1984) beobachteten eine dosisabhängige Hemmung der oxidativen Aktivität Zymosan-stimulierter neutrophiler Granulozyten unter dem Einfluß von Diazepam. Sie bestimmten in vitro den Sauerstoffverbrauch sowie die Nitroblautetrazolium-Reduktion nach Stimulation der Zellen mit Zymosan. Es ergab sich eine signifikante Hemmung beider Variablen in Konzentrationen innerhalb des therapeutischen Plasmaspiegelbereiches.

Covelli und Mitarbeiter (Covelli, 1989) registrierten eine Hemmung der Phagozytose und Abtötung von Bakterien durch neutrophile Granulozyten unter Diazepam in Konzentrationen innerhalb des bei therapeutischer Verwendung nachgewiesenen Plasmaspiegelbereiches. Kress et al. (Kress, 1987) untersuchten den Einfluß von Diazepam auf die in vitro-Motilität neutrophiler Granulozyten und zeigte eine dosisabhängige reversible Hemmung der zufälligen und chemotaktischen Migration.

Galdiero und Mitarbeiter (Galdiero, 1995) stellten fest, daß Granulozyten von Mäusen, die 90 Tage lang mit Diazepam behandelt worden waren, eine gestörte Chemotaxis und Phagozytose für *Saccharomyces cerevisiae* zeigten. Bereits nach einer 7-tägigen Behandlung fiel eine verringerte Adhärenz der neutrophilen Granulozyten auf. Weiterhin wiesen die Autoren nach, daß die Monozyten der Mäuse mehr IL-1 α sezernierten als die entsprechender Kontrollmäuse. Auch waren verminderte Antikörpertiter nachweisbar. Al-Sawaf et al. hingegen (Al-Sawaf, 1993) prüften die Wirkung einer einmaligen und auch chronischen intraperitonealen Applikation von Diazepam an Ratten. Sie stellten fest, daß es zu einer dosisabhängigen Verarmung der neutrophilen Granulozyten an Taurin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Methionin kam. Andererseits führte die chronische Gabe zu einer Erhöhung des intrazellulären Gehaltes an basischen Aminosäuren (Lysin, Histidin und Arginin). Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, daß die Gabe von 1,0-8,0 mg/kg Diazepam einmalig oder chronisch mit dem Transport bestimmter Aminosäuren und/oder dem Protein-Turnover in neutrophilen Granulozyten interferiert. Der erhöhte intrazelluläre Gehalt an basischen Aminosäuren könnte mit den pH-Veränderungen, mit denen der Respiratory Burst einhergeht, interagieren und so zu der beobachteten Chemilumineszenzhemmung führen.

7.2.3 Periphere Benzodiazepinbindungsstellen bei der Hemmung von Granulozytenfunktionen

Laghi Pasini und Mitarbeiter (Laghi Pasini, 1987) dokumentierten in ihren Untersuchungen wie in dieser Arbeit einen Hemmeffekt von Diazepam auf die FMLP induzierte CL und Superoxidanionenproduktion neutrophiler Granulozyten in klinisch relevanten Konzentrationsbereichen. In einem zellfreien Meßsystem mit Xanthinoxidase und Acetaldehyd kam es selbst bei Zugabe hoher Dosen von Diazepam nicht zur Ausbildung eines Scavengereffektes durch die Wirksubstanz. Zusätzlich fanden sie einen hemmenden Effekt von Diazepam auf die Degranulation neutrophiler Granulozyten. Auf der Suche nach dem zugrunde liegenden Mechanismus konnten sie zeigen, daß Ro 5-4864, ein spezifischer Ligand der peripheren Benzodiazepinbindungsstelle, dosisabhängig die FMLP-induzierte Superoxidproduktion hemmt, während Clonazepam, ein selektiver Agonist der zentralen Benzodiazepinbindungsstelle, keinen signifikanten Effekt bewirkt. Daraus kann geschlossen werden, daß Benzodiazepine ihre Wirkung auf neutrophile Granulozyten über periphere Benzodiazepinbindungsstellen vermitteln.

Die spezifische Bindung von Benzodiazepinen wurde in unterschiedlichen Geweben und an verschiedenen Zelltypen beobachtet und kann pharmakologisch in zwei Klassen eingeteilt werden. Die erste Klasse stellen die zentralen Benzodiazepinbindungsstellen dar, die an γ -Aminobuttersäure-Rezeptoren (GABA-Rezeptoren) und Chloridkanäle gekoppelt sind. Die zweite Klasse stellen die peripheren Bindungsstellen dar, die in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe und Zellen, einschließlich Nieren, Herz, Gehirn, Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und Thymozyten gefunden wurden. Die physiologische Bedeutung der peripheren Benzodiazepinbindungsstellen (PBR) ist noch weitgehend unklar (Bessler, 1992; Wang, 1984; Zavala, 1991). Wang et al. (Wang, 1991) vermuteten einen generalisierten antiproliferativen Effekt der Benzodiazepine an der PBR. Eine Reihe von Hinweisen lassen eine Beteiligung der PBR an Immunvorgängen wahrscheinlich erscheinen. PBR wurden an unterschiedlichen Immunzellen nachgewiesen (s.o.). Mittels autoradiografischer Studien wurde die anatomische Verteilung von PBR in Organen des Immunsystems von Ratten lokalisiert. Periphere und gemischte Liganden, nicht jedoch Liganden der zentralen Benzodiazepinbindungsstellen, potenzieren die humorale Antwort gegen Schaferythrozyten (Bessler, 1992). PBR werden in hoher Dichte auf Makrophagen gefunden. Nanomolare Konzentrationen von Liganden der PBR stimulieren signifikant den Arachidonsäure-stimulierten Respiratory Burst von P388DI-Makrophagen.

Studien von Zavala et al. (Zavala, 1991 und 1992) an Makrophagen von Patienten mit X-chromosomal vererbter Septischer Granulomatose zeigten eine verminderte Expression von PBR. Diese Beobachtung legt einen Zusammenhang zwischen PBR und der Cytochrom b558-Expression auf der Granulozytenmembran nahe.

Eine mögliche Erklärung für das Zusammenwirken der PBR und dem cyt b558 ist eine gegenseitig stabilisierende Interaktion zwischen der PBR, die mit hoher Affinität Porphyrine bindet, und der Häm-tragenden x-Kette des cyt b558. Somit könnte es sich bei der PBR um eine bis dahin unbekannte NADPH-Oxidasekomponente handeln. Die Anlagerung eines Benzodiazepins an die PBR könnte auf diese Weise eine Konformationsänderung des Rezeptors bewirken und den Respiratory Burst behindern (Zavala, 1992).

Weiterhin wurde postuliert, daß Liganden der PBR an Bindungsstellen in einem spannungsregulierten Calciumkanalkomplex gekoppelt werden (Bessler, 1992). Diese Vermutung ist vereinbar mit der Beobachtung von Laghi Pasini et al. (Laghi Pasini, 1987), daß der dosisabhängige Hemmeffekt von Diazepam auf die Superoxidproduktion von PMN durch Erhöhung des extrazellulären Calciumgehaltes antagonisierbar ist. Es wurde gezeigt, daß Diazepam und Flurazepam, beides Benzodiazepine, die an zentrale und periphere Benzodiazepinbindungsstellen binden, den Ca^{++} -Einstrom in intestinale glatte Muskelzellen hemmen. Mikromolare Benzodiazepin-Bindungsstellen regulieren spannungsabhängige Ca^{++} -Kanäle in Gehirnmembranen und Blutegelneuronen und fungieren so als Calciumkanalblocker. Calcium-abhängige Mechanismen könnten also bei der hemmenden Wirkung von Benzodiazepinen auf die Neutrophilenfunktion eine entscheidende Rolle spielen (Laghi Pasini, 1987).

Die zitierten Daten sprechen dafür, daß die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Hemmung der CL unter dem Einfluß von Midazolam und Diazepam über periphere Benzodiazepin-Bindungsstellen vermittelt wird.

Bidri und Mitarbeiter zeigten, daß Benzodiazepine die Mastzellaktivierung vermindern. Außerdem hemmen sie die IGE-vermittelte Freisetzung von Betahexosaminidasen und von $\text{TNF-}\alpha$ und NO (Bidri, 1999).

7.2.4 Diazepam-Lipuro

Zur Klärung der Frage, wie sich Diazepam in einem anderen Lösungsvermittler verhält, wurde Diazepam-Lipuro® in der vorliegenden Arbeit in der gleichen Konzentrationsreihe wie Valium® untersucht. Ähnlich wie bei Valium® zeigte sich bereits innerhalb des

therapeutisch relevanten Konzentrationsbereiches ein hemmender Effekt des handelsüblichen Medikamentes.

7.3 Wirkmechanismus von Barbituraten und ihrer wirksubstanzfreien Lösungen auf die Chemilumineszenz neutrophiler Granulozyten

Mirow (Mirow, 1995) beobachtete eine dosisabhängige Hemmung der Chemilumineszenz FMLP-stimulierter Granulozyten durch Thiopental (Trapanal®), Pentobarbital (Nembutal®) und Phenobarbital (Luminal®). Nembutal® und Luminal® zeigten diesen Effekt in Konzentrationen oberhalb des therapeutischen Plasmaspiegelbereiches; Trapanal® beeinflusste die Chemilumineszenz bereits in Konzentrationen im oberen therapeutischen Wirkspiegelbereich. Methohexital (Brevimytal®) hatte keine Wirkung auf die FMLP-induzierte Chemilumineszenz neutrophiler Granulozyten (Mirow, 1995).

Weiterhin zeigte Mirow eine dosisabhängige Verminderung der CL Zymosanstimulierter Granulozyten durch Thiopental (Trapanal®) und Phenobarbital (Luminal®). Bei Trapanal® beobachtete sie diesen Effekt bereits im oberen therapeutischen Plasmaspiegelbereich, bei Luminal® trat er zwei Zehnerpotenzen oberhalb des therapeutischen Spiegelbereiches auf. Pentobarbital (Nembutal®) und Methohexital (Brevimytal) zeigten keinen Einfluß auf die CL Zymosan-stimulierter Granulozyten (Mirow 1995).

Die Ergebnisse von Birkhahn (Birkhahn, 2000) zeigten, daß Barbiturate und ihre wirksubstanzfreien Lösungen mit Ausnahme von Thiopental in therapeutisch relevanten Konzentrationen keine wesentlichen Effekte auf die Zymosan- und FMLP-induzierte Chemilumineszenz neutrophiler Granulozyten ausüben. Die Wirkung von Thiopental kann daher durch eine Interaktion des Medikamentes mit den Zellen selbst erklärt werden. Des weiteren konnte Birkhahn zeigen, daß Thiopental reaktive Sauerstoffmetabolite abfängt.

7.3.1 Thiopental (Trapanal)

Mirow (Mirow, 1995) wies nach, daß Trapanal® (Thiopental) bereits in therapeutisch relevanten Konzentrationsbereichen dosisabhängig die CL Zymosan- oder FMLP-induzierter Granulozyten hemmt.

Es konnte gezeigt werden, daß auch bei Einsatz der wirksubstanzfreien Lösung eine Suppression der CL auftritt. Die handelsübliche Präparation zeigte außerdem bereits innerhalb

des therapeutisch relevanten Konzentrationsbereiches einen hemmenden Einfluß auf die CL. Bei Untersuchung der wirksubstanzfreien Lösung trat dieser Hemmeffekt nicht auf. Bei dem beobachteten Effekt handelt es sich daher um Scavanger- oder Quencheffekte durch die Wirksubstanz selbst.

In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigte Krumholz (Krumholz, 1991) eine dosisabhängige Hemmung der Sauerstoffradikalbildung neutrophiler Granulozyten durch Thiopental. Er beobachtete diese Wirkung in der klinisch relevanten Konzentration von 15 µg/ml. Bei der Interpretation seiner Ergebnisse vernachlässigte Krumholz allerdings mögliche Einflüsse durch Scavengereffekte. Auch White et al. (White, 1983) registrierten eine dosisabhängige Verminderung der Chemilumineszenz Zymosan-stimulierter Neutrophiler unter dem Einfluß von Thiopental in therapeutisch relevanten Konzentrationen. Sie vermuteten eine globale Reduktion der Sauerstoffradikalproduktion durch die Granulozyten als Ursache der verminderten CL. Es ist unklar, ob die Autoren die handelsüblichen Lösungen der Medikamente oder Reinsubstanzen verwendeten. Die beobachteten hemmenden Effekte durch Thiopental konnten bei White et al. durch zusätzliches Waschen der Zellen nach der Inkubation mit dem Medikament wieder aufgehoben werden. Der Autor zog daher den Schluß, daß die Chemilumineszenzhemmung durch eine Interaktion an der Granulozytenoberfläche zustande kommt und nicht im Inneren der Zelle geschieht.

Nishina beobachtete bei Thiopental in klinisch relevanten Konzentrationen eine signifikante Hemmung der Sauerstoffradikalbildung, der Chemotaxis und der Phagocytose. Er führte die Wirkung auf einen verminderten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration bei FMLP-geprimten PMN zurück (Nishina, 1998).

Kellermann (Kellermann, 1992) wies durchflußzytometrisch eine Minderung der intrazellulären Myeloperoxidaseaktivität FMLP- und TNF-stimulierter Neutrophiler unter Thiopental nach. Er registrierte bei Thiopental eine Hemmung der Myeloperoxidaseaktivität in den Granulozyten.

Neben der Fähigkeit zur Sauerstoffradikalbildung werden auch eine Reihe weiterer Funktionen der Granulozyten durch Thiopental beeinflusst.

Davidson et al. (Davidson, 1995) beobachteten durchflußzytometrisch eine Hemmung der Sauerstoffradikalproduktion und der Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten durch Thiopental in Konzentrationen, die zwei Zehnerpotenzen oberhalb des therapeutisch relevanten Konzentrationsbereiches lagen. Moudgil (Moudgil, 1981) hingegen beobachtete eine dosisabhängige Verminderung der Phagozytoseaktivität von PMN schon unter dem Einfluß therapeutisch eingesetzter Konzentrationen von Thiopental. Smith (Smith, 1992)

registrierte einen Hemmeffekt von Thiopental auf die Migration von Leukozyten in therapeutisch relevanten Konzentrationen. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Knudsen und Mitarbeiter (Knudsen, 1987): Auch sie fanden eine Hemmung der spontanen und gerichteten Migration von Granulozyten unter dem Einfluß von Thiopental innerhalb des bei therapeutischem Einsatz gemessenen Plasmaspiegelbereiches.

Im Gegensatz zu den hemmenden Effekten durch Thiopental beobachteten Ruud und Mitarbeiter (Ruud, 1988) im niedrigen therapeutisch eingesetzten Plasmaspiegelbereich eine leichte Stimulation des Sauerstoffverbrauchs nativer und FMLP-stimulierter PMN. Hohe Thiopentaldosen führten zu einer Verminderung des Sauerstoffverbrauches, der Aggregation und der Volumenzunahme FMLP-stimulierter neutrophiler Granulozyten. Aggregation und Zellschwellung stellen frühe Ereignisse im Rahmen einer Entzündungsreaktion, wie sie auch bei der Infektabwehr durch neutrophile Granulozyten auftritt, dar.

Kress et al. (Kress, 1989) untersuchten die unterschiedliche Wirkung von Thiobarbituraten (u.a. Thiopental) und ihren analogen Oxybarbituraten (Pentobarbital, Phenobarbital und Methohexital) auf die Aktivität neutrophiler Granulozyten. In Thiobarbituraten ist das Sauerstoffatom des Pyrimidinrings der Oxybarbiturate durch ein Schwefelatom ersetzt. Die Autoren stellten fest, daß Thiopental und andere Thiobarbiturate die Migration polymorphkemiger Leukozyten 10- bis 100-fach stärker hemmen als ihre analogen Oxybarbiturate. Ähnliche Resultate ergaben die Versuche zur Chemilumineszenz neutrophiler Granulozyten nach Stimulation mit FMLP und Zymosan. Es zeigte sich eine signifikante Hemmung der FMLP-induzierten CL unter dem Einfluß von Thiopental. Mirow (Mirow, 1995) wies eine Hemmung der CL bei Thiopental nach (Weiss, 1994). Für die Stimulation mit Zymosan dokumentierten Kress et al. (Kress, 1989) eine Beeinträchtigung der CL. Dies entspricht im wesentlichen den von Mirow (Mirow, 1995) gewonnenen Ergebnissen. Die Autoren vermuten, daß die unterschiedliche Hemmwirkung von Thio- und Oxybarbituraten auf dem strukturellen Unterschied des Pyrimidinrings beruht. Kress (Kress, 1989) untersuchte zusätzlich in einem zellfreien Meßsystem unter Verwendung von Meerrettichperoxidase die Barbiturate auf Sauerstoffradikal abfangende Eigenschaften, Quencheffekte oder Lichtabsorption durch die zum Teil gelb gefärbten Lösungen und konnte keinerlei derartige Eigenschaften feststellen. Die bei Birkhahn gewonnenen Ergebnisse wiesen auf Sauerstoffradikal abfangende Eigenschaften von Thiopental hin. Pentobarbital und Phenobarbital zeigten einen solchen Effekt im zellfreien System. Es war nicht sicher zu klären, worauf diese Wirkung zurückzuführen ist (Birkhahn, 2000).

Heine beobachtete eine dosisabhängige Hemmung der respiratory burst und der FMLP-vermittelten Chemotaxis bei PMN bei Thiopental in physiologischer und zehnfach erhöhter Konzentration. Er zeigte einen direkten Effekt auf das intrazelluläre Enzymsystem der respiratory burst und widerlegte die zuvor postulierten Scavengereigenschaften von Thiopental auf freie Sauerstoffradikale (Heine, 1997).

Heller zeigte eine signifikant verminderte respiratory burst bezogen auf PMN und Monocyten bei durchflußzytometrischen Messungen sowie eine verminderte bakterielle Clearance von E.coli für Thiopental (Heller, 1998).

Es konnte gezeigt werden, daß die NO-Synthase in ihrer Aktivität signifikant vermindert wird. Dieses ist auch für Etomidate und Midazolam gültig (Galley, 1996). NO vermittelt eine deutliche Hemmung der Migration von PMN (Tavares, 2001).

Larsen zeigte nach Inkubation mit Thiopental bei LPS-geprimten PMN eine verminderte Freisetzung von TNF- α um 12,8%, weiterhin wurde nach Inkubation mit Thiopental die Expression von CD14 vermindert, was wiederum eine Immunreaktion bei Makrophagen auslöst (Larsen, 1998).

7.3.2 Methohexital (Brevimytal)

Mirow beschrieb keine Beeinflussung der FMLP- und Zymosan-induzierten CL neutrophiler Granulozyten durch Methohexital (Mirow, 1995).

In Ergänzung zu diesen Ergebnissen wurde durch Birkhahn nachgewiesen, daß auch die wirksubstanzfreie Lösung von Brevimytal® keinen Einfluß auf die CL von Neutrophilen ausübt (Birkhahn 2000). Im Endotoxinmodell zeigte sich keine Beeinflussung der Chemilumineszenz. Dieser Befund entspricht den Ergebnissen von White (White et al., 1983). In dem therapeutisch relevanten Konzentrationsbereich zwischen 1,25 und 20 ng/ml registrierten sie keinen Einfluß auf die CL Zymosan-stimulierter neutrophiler Granulozyten. Auch Heine und Mitarbeiter (Heine, 1996) berichteten über keine wesentliche Hemmung der PMA-induzierten CL unter dem Einfluß von Methohexital in therapeutisch erzielten Konzentrationsbereichen und eine Zehnerpotenz darüber. Sie untersuchten den Respiratory Burst durchflußzytometrisch unter Verwendung von Dihydrorhodamin-123. Im Gegensatz dazu beobachtete Krumholz (Krumholz, 1991) bei einer Konzentration von 170 ng/ml, das heißt oberhalb des therapeutisch relevanten Bereiches, eine Hemmung der CL neutrophiler Granulozyten auf 67% der testsubstanzfreien Kontrollaktivität. Diese unterschiedlichen Ergebnisse dürften am ehesten methodisch bedingt sein.

7.3.3 Wirkung der Barbiturate bei der Hemmung der Granulozytenfunktion

Deshmukh und Mitarbeiter (Deshmukh, 1991) wiesen nach, daß Barbiturate die Phospholipase C- β und Proteinkinase C hemmen. Auf diese Weise kommt es zu einer verminderten Bildung von IP₃ und Diacylglycerol. Die verringerte Entstehung dieser intrazellulären second messenger führt zu einer reduzierten intrazellulären Ca⁺⁺-Mobilisation und zu einer Störung der PKC-Aktivierung. Möglicherweise kommt die Hemmung der intrazellulären IP₃ und Ca⁺⁺-Freisetzung durch eine Hemmung der Resynthese von PIP₂ zustande. Die Zelle würde so an IP₃ verarmen, das für die Ca⁺⁺-Freisetzung benötigt wird. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit wäre eine Aktivitätsveränderung des G-Proteins unter dem Einfluß von Barbituraten, das die PIP₂-Hydrolyse durch die Phospholipase C reguliert. Die Autoren stellten außerdem fest, daß das Hemmpotential von Barbituraten weitgehend mit der Fettlöslichkeit der Substanzen korreliert und fanden dementsprechend eine stärkere Hemmung des Thrombin-induzierten Calciumeinstroms in Rattenthrombozyten durch Thiopental im Vergleich zu Pentobarbital. Dieses wiederum zeigte eine ausgeprägtere Hemmung als Phenobarbital. Mirow (Mirow, 1995) dokumentierte eine stärkere Chemilumineszenzminderung durch Thiopental als durch Pentobarbital (siehe oben). Ihre Untersuchungen belegten eine Minderung der FMLP-induzierten CL unter dem Einfluß von Nembutal während die Zymosan-induzierte CL unverändert blieb. Dieses Phänomen könnte durch die oben beschriebenen Mechanismen erklärt werden: das Ausmaß der FMLP-induzierten CL hängt unmittelbar von der Phospholipase C-Aktivität ab. Die Zymosan-induzierte Auslösung des Respiratory Burst hingegen erfolgt, wie oben beschrieben, auf unterschiedlichen Wegen. Somit kann die Hemmung bestimmter Signaltransduktionswege durch andere Reaktionswege kompensiert werden.

7.3.4 Einfluß der MCT / LCT-Emulsion Lipofundin MCT 20% auf Granulozyten

In vitro-Experimente an Granulozyten zeigen, daß Arachidonsäure, Ölsäure (in Lipofundin MCT 20% enthalten) und andere oxygenierte Fettsäurederivate die NADPH-Oxidase direkt aktivieren. Möglicherweise kommt es über eine Veränderung der Membranfluidität in der Umgebung der NADPH-Oxidase zur Aktivierung des Respiratory Burst (Tauber, 1987). Segal (Segal, 1993) vermutete, daß die Aktivierung der NADPH-Oxidase durch Arachidonsäure über eine Trennung des p21^{c'} von rhoGDI (GDP-Dissoziations-Inhibitionsfaktor) erfolgt. Erst

nach der Abkopplung des Inhibitionsfaktors von p21^c kann p21 mit p47^{Ph} und p67^{Ph} einen Aktivatorkomplex bilden und zur Plasmamembran wandern (Bastian, 1994). Abramson und Mitarbeiter (Abramson, 1991) zeigten, daß Arachidonsäure sowie andere cis-ungesättigte Fettsäuren wie Öl- und Linolensäure (in Lipofundin® MCT 20% enthalten) die GTP-Bindung an Granulozytenmembranen verstärken. Trans-ungesättigte Fettsäuren sowie die gesättigte Fettsäure Palmitinsäure (in Lipofundin® MCT 20% enthalten) zeigen diese Wirkung nicht. Die Eigenschaft, die GTP-Bindung an Granulozytenmembranen zu fördern, korrelierte mit der Fähigkeit, den Respiratory Burst neutrophiler Granulozyten zu stimulieren. Die Autoren stellten fest, daß ab einer bestimmten Arachidonsäurekonzentration die Superoxidanionenproduktion jedoch gehemmt wurde, oder sogar der Zelltod eintrat. Ferner ist bekannt, daß Arachidonsäure und andere Fettsäuren den Ca^{++} -Ausstrom aus Makrophagen aktivieren, den mitochondrialen Calciumausstrom anregen und die liposomale Aufnahme von Calcium fördern. Cis-ungesättigte Fettsäuren bewirken außerdem eine Zunahme der Fluidität von Zellmembranen (Abramson, 1991).

Da die Lipidzusammensetzung der Zellmembran in erheblichem Maße durch die exogene Fettzufuhr bestimmt wird, können Fettsäuren als struktureller Bestandteil der Phospholipidmembranen auch die Zellfunktion und somit die Immunantwort der Neutrophilen modulieren. Der zunehmende Einbau von gesättigten Fettsäuren bewirkt eine erhöhte Stabilität, während ein hoher Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit einer gesteigerten Membranfluidität einhergeht. Diese Änderungen in der Mikroviskosität und Fluidität können die Barrierefunktion der Neutrophilermembran beeinflussen. Auch die Aktivität membrangebundener Enzyme, die Expression von Rezeptoren und die Verteilung von Strukturproteinen werden verändert (Karsten 1996). Auf diese Weise lassen sich eine Vielzahl von Funktionsveränderungen durch den vermehrten Einbau von bestimmten Lipiden oder Fettsäuren in die Zellmembran erklären. So fand Corrocher (Corrocher 1995) eine enge Korrelation zwischen der Fettsäurezusammensetzung der Membran neutrophiler Granulozyten und ihrer Fähigkeit zur FMLP-induzierten Sauerstoffradikalbildung. Der Autor beschrieb eine inverse Korrelation zwischen dem Gehalt an Linolensäure und Palmitinsäure (in Lipofundin® MCT 20% enthalten) und der Superoxidionenproduktion, während Arachidonsäure eine positive Korrelation zeigte. Der Gehalt an anderen Fettsäuren wie Ölsäure und Linolsäure korrelierte nicht mit dem Respiratory Burst.

Lipofundin MCT 20% stellt eine MCT/LCT-Mischemulsion dar. Aus diesem Grunde dürfen sich Überlegungen zum Einfluß der Bestandteile der Emulsion auf neutrophile Granulozyten nicht auf den LCT-Anteil beschränken.

Monico et al. (Monico, 1988) untersuchten die Wirkung einer einmaligen intravenösen Lipofundin® MCT 10%-Gabe an gesunden Probanden. Sie fanden keinen Einfluß der Lipidinfusion auf die Chemotaxis, Phagozytose oder Adhärenz neutrophiler Granulozyten. Auch die Granulozytenmorphologie und Zytochemie wies keine signifikanten Veränderungen auf. Bellinati-Pires et al. (Bellinati-Pires 1992) hingegen beobachteten eine reduzierte Chemotaxis und Phagozytose sowie eine verminderte Sauerstoffradikalproduktion durch MCT-behandelte neutrophile Granulozyten. Langkettige Triglyzeride hingegen führten zu keiner signifikanten Veränderung dieser Zellfunktionen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Waitzberg und Mitarbeiter (Waitzberg, 1996). Sie untersuchten in vivo und in vitro den Effekt von LCT sowie einer MCT/LCT-Emulsion auf neutrophile Granulozyten von Ratten. Sie fanden einen inhibitorischen Effekt von MCT-haltigen Emulsionen auf die Chemotaxis und Phagozytose von PMN sowie deren Fähigkeit zur Abtötung von Bakterien. LCT-Emulsionen hingegen beeinflussen nur die Phagozytose. Die parenterale Gabe von Fettemulsionen führte zu keiner Beeinflussung der genannten Granulozytenfunktionen.

Heine beobachtete in der Durchflußzytometrie einen Anstieg der respiratory burst nach Inkubation von PMN, die zuvor mit FMLP und TNF- α geprimt wurden, mit MCT/LCT-Emulsionen (Heine, 1999).

Kruimel und Mitarbeiter fanden bei MCT und MCT/LCT-Emulsionen gegenüber LCT eine hochsignifikant schnellere und stärkere Sauerstoffradikalproduktion bei PMN, gemessen durch Chemilumineszenz (Kruimel, 2000).

Sedman et al. (Sedman, 1991) beobachteten, daß die Aktivität natürlicher Killerzellen und Lymphokin-aktivierter Killerzellen unter vollständiger parenteraler Ernährung (TPN) mit MCT/LCT-Emulsionen signifikant höher ist als unter TPN mit LCT-Emulsionen. Der Interleukin-2-Gehalt im Überstand von aktivierten T-Lymphozyten hingegen ist unter TPN mit einer LCT-haltigen Lösung signifikant erhöht. Gogos und Mitarbeiter (Gogos, 1990) beschrieben eine Verminderung des Verhältnisses von T-Helferzellen zu T-Supressorzellen unter TPN mit langkettigen Triglyceriden. Die Applikation einer gemischten MCT/LCT-Emulsion führte zu keinen Veränderungen der unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen. Weiterhin scheinen MCT/LCT-Lösungen, im Gegensatz zu reinen LCT-Lösungen, die Eicosanoidsynthese nicht zu beeinflussen. Sie führen außerdem zu einer verminderten Produktion von Tumornekrosefaktor α durch mononukleäre und andere Entzündungszellen (Gogos, 1994; Ulrich, 1996). Untersuchungen von Karsten (Karsten, 1996) zum Einfluß unterschiedlicher Fettsäuren auf die Aktivität menschlicher Lymphozyten zeigen, daß die immunmodulierende Wirkung der Fettsäuren durch deren Konzentration,

Kettenlänge und Sättigungsgrad bestimmt wird. Mittelkettige Fettsäuren zeigen nur in sehr hohen Konzentrationen immunsuppressive Effekte. Demgegenüber sind langkettige Fettsäuren in niedrigen Konzentrationen (entsprechend den in vivo gemessenen Blutplasmakonzentrationen) Stimulatoren und in hohen Konzentrationen Inhibitoren der DNA-Synthese. Die Interferon- γ -Konzentrationen in Lymphozytenkulturen werden unter dem Einfluß von Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolsäure, ähnlich den Untersuchungen zur DNA-Synthese, konzentrationsabhängig erhöht oder vermindert. Die TNF- α -Freisetzung wird durch höhere Konzentrationen von Palmitin- oder Ölsäure inhibiert, durch Linolsäure stimuliert; Stearinsäure zeigt konzentrationsabhängig beide Effekte. Durch Palmitinsäure wird der IL-2-Gehalt erhöht; Zusatz von Stearin-, Öl oder Arachidonsäure führt zu einer deutlichen Abnahme des IL-2-Gehaltes, Linolsäure hat keinen Effekt auf die Interleukin-2-Bildung von Lymphozyten (Karsten, 1996). Mono- und Polyungesättigte Fettsäuren wirken synergistisch mit TNF- α bei der Sauerstoffradikalbildung von PMN (Li, 1996).

Heine führte Untersuchungen mit neutrophilen Granulocyten, die mit FMLP und TNF- α geprimt wurden, im Durchflußzytometer durch. Hierbei zeigte sich, daß MCT/ LCT-Lösungen, im Gegensatz zu reinen LCT-Lösungen oder der alkoholischen Lösung, als Lösungsmittel für Diazepam, Etomidate und Propofol die hemmenden Effekte der Wirksubstanzen vermindern (Heine, 2001).

7.3.5 Einfluß von Intralipid 10% auf Granulozyten

Bezüglich des Einflusses der LCT-haltigen Emulsion Intralipid® 10% auf die Sauerstoffradikalbildung durch Granulozyten ist die Untersuchung von Wiernik und Mitarbeitern (Wiernik, 1983) von Bedeutung, die feststellten, daß die NitroblauTetrazolium-Reduktion durch polymorphkernige Granulozyten, ein indirektes Maß des oxidativen Zellstoffwechsels, durch Inkubation mit Intralipid® in Konzentrationen zwischen 20 und 100 mg/ml gehemmt wird.

Wiernik et al. (Wiernik, 1983) beobachteten ebenfalls, daß die Phagozytose von Hefepartikeln und die spontane und chemotaktische Migration neutrophiler Granulozyten durch Intralipid® beeinträchtigt wird. Die Adhärenz von Hefepartikeln an die Zellen hingegen wird unter dem Einfluß von Intralipid® verbessert. In vorangehenden Untersuchungen fanden die Autoren, daß Granulozyten Intralipid® in das Zellinnere aufnehmen. Die aufgenommenen Partikel werden von einem Teil der Plasmamembran umgeben, wodurch eine Reduktion der Zelloberfläche resultiert. Auf diese Weise könnte es zu einer Hemmung der Migration der

betroffenen Zellen kommen. Möglicherweise führt die Überladung der Zellen mit Lipiden auch zu einer Störung der weiteren Phagozytose z. B. von Hefepartikeln (Wiernik 1983). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Cleary et al. (Cleary, 1981): Sie wiesen nach, daß die Inkubation von PMN mit Intralipid® zu einer verminderten Phagozytose von Bakterien führt. Ferner fanden sie eine Stimulation ruhender PMN unter geringen Dosen Intralipid in der Weise, daß sowohl die Nitroblau-Tetrazolium-Reduktion als auch die Hexosemonophosphat-Aktivität und der Sauerstoffverbrauch dosisabhängig zunahmen. Hohe Dosen Intralipid führten jedoch zu einer signifikanten Hemmung dieser Funktionen. Die Autoren zeigten, daß die Inkubation von neutrophilen Granulozyten mit Intralipid® zu einer Verminderung der Zymosan-stimulierten Hexosemonophosphat-Aktivität führt.

English et al. (English, 1981) demonstrierten, daß die hemmende Wirkung von Intralipid® auf die chemotaktische Migration und die PMA- sowie Zymosan-induzierte CL von neutrophilen Granulozyten durch Zugabe von NaCl antagonisierbar ist. Die Autoren zeigten, daß eine Glycerinlösung (Propan-1,2,3-triol) der entsprechenden Konzentration ebenfalls zu den beschriebenen Effekten führt. Auch diese Wirkung ist durch Zugabe von Kochsalz antagonisierbar. Dialysiertes Intralipid® führt nicht zu einer Beeinträchtigung der Neutrophilenfunktion. Die Autoren folgerten aus diesen Ergebnissen, daß der beobachtete Effekt auf den Glycerinanteil in der Fettemulsion zurückzuführen ist. Glycerin penetriert als kleines organisches Molekül frei die Granulozytemembran. Als osmotisch wirksames Molekül führt es zu einem Wassereinstrom in die Zellen. Die Autoren beobachteten eine vermehrte Zellyse unter Einwirkung der Lipidemulsion. Da der beobachtete Effekt durch Kochsalz antagonisierbar ist, schlossen die Autoren, daß die Funktion von Neutrophilen in vivo durch Intralipid® nicht beeinträchtigt werden dürfte. Ergänzend zeigten Bellinati-Pires und Mitarbeiter (Bellinati-Pires, 1992), daß verdünnte LCT-Emulsionen (20 mg/ml Fett), die durch Zugabe von NaCl isoton waren, die Migration und Chemotaxis von Neutrophilen nicht beeinflussen. MCT-haltige Emulsionen hingegen beeinträchtigen dosisabhängig die Chemotaxis und Migration der Zellen.

Fischer und Mitarbeiter beschrieben eine erhöhte Infektanfälligkeit von Mäusen, denen Intralipid® über 3 Tage in einer Dosierung von 2,5 g/kg je Dosis intraperitoneal injiziert wurde. Die betreffenden Tiere waren deutlich empfänglicher für die Infektion durch intraperitoneal injizierte Bakterien (Fischer, 1979). Die Autoren zeigten an Mäusen, daß Intralipid® zu einer Blockade des retikuloendothelialen Systems und einer verminderten Clearance von pathogenen Bakterien und Erythrozyten aus der Zirkulation führen kann (Fischer, 1979).

Schauder und Mitarbeiter (Schauder, 1993) konnten in einer klinischen Studie an 100 postoperativen Patienten zeigen, daß diejenigen Patienten, die eine Fettinfusion im Rahmen der parenteralen Ernährung erhielten, weniger an bakteriellen Infektionen erkrankten bzw. weniger Wundheilungsstörungen entwickelten.

Mathy-Hartert zeigte in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, daß Intralipid auf geprimte PMN in chemiluminometrischen Messungen keinen signifikanten Einfluß hatte (Mathy-Hartert, 1998).

In einer großen amerikanischen Studie mit über 500 knochenmarkstransplantierten Patienten wurde der Einfluß einer höheren Fettdosierung (25-30% der täglichen Gesamtkalorienmenge), die der gängigen Standardtherapie entspricht, mit einer niedriger Fettdosierung von 6-8% verglichen. Hinsichtlich der Entstehung von bakteriellen Infektionen bzw. Pilzinfektionen konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden, obwohl die untersuchte Patientengruppe ein sehr hohes Infektrisiko aufgrund ihrer Grunderkrankung aufwies (Lenssen, 1994).

Heine sah bei Intralipid durchflußzytometrisch keine Veränderung der respiratory burst nach Inkubation von PMN, die zuvor mit FMLP und TNF- α geprimt wurden (Heine, 1999).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das in Fett emulgierte Hypnotikum Propofol wirksubstanzspezifisch und in klinisch relevanten Konzentrationen die FMLP-induzierte Chemilumineszenz neutrophiler Granulozyten hemmt, während der Emulgator diesen Effekt nicht aufweist. Die Zymosan-induzierte CL wird in therapeutisch relevanten Konzentrationsbereichen nicht beeinflusst. Dieser Effekt kommt zum Teil durch ein wirksubstanzspezifisches Scavenging der gebildeten Sauerstoffradikale zustande.

7.4 Einfluß von Etomidat und seiner wirksubstanzfreien Lösungen auf neutrophile Granulozyten

7.4.1 Etomidat-Lipuro

Etomidat in seiner Zubereitung als Fettemulsion (Etomidat-Lipuro®) stimuliert die FMLP-induzierte CL neutrophiler Granulozyten bereits in Konzentrationen innerhalb des therapeutischen Plasmaspiegelsbereiches.

Watt und Ledingham (Watt, 1984) untersuchten retrospektiv die Krankengeschichte von 428 polytraumatisierten und maschinell beatmeten Patienten und fanden eine deutlich erhöhte

Letalität derjenigen Patienten, die länger als 5 Tage mit Etomidat sediert worden waren. Diese Patienten starben überwiegend im Rahmen einer Sepsis mit Multiorganversagen. Die Autoren belegten einen deutlichen zeitlichen Zusammenhang zwischen der Etomidatapplikation und signifikant erniedrigten Plasmacortisolspiegeln. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß Etomidat die basale Cortisolproduktion in der Nebennierenrinde hemmt und so die physiologische Streßreaktion verhindert. In vitro-Untersuchungen an Ratten bestätigten diesen Verdacht.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß die erhöhte Infektanfälligkeit unter Etomidat nicht auf eine wirksubstanzspezifische Hemmung der Sauerstoffradikalbildung durch Granulozyten im Endotoxinmodell zurückzuführen ist.

7.5 Einfluß von Propofol und seiner wirksubstanzfreien Lösung auf die Chemilumineszenz neutrophiler Granulozyten

Mirow (Mirow, 1995) beobachtete eine dosisabhängige Hemmung der Chemilumineszenz FMLP-stimulierter neutrophiler Granulozyten unter dem Einfluß von Propofol (2,6-Diisopropylphenol), (Disoprivan®) bereits in therapeutisch relevanten Konzentrationsbereichen. Die Zymosan-induzierte CL hingegen wurde unter dem Einfluß von Propofol erst in Konzentrationen, die eine Zehnerpotenz oberhalb des therapeutisch relevanten Konzentrationsbereiches lagen, gehemmt. Diese Ergebnisse wurden durch Mikawa bestätigt, der auch in klinisch relevanten Konzentrationen eine dosisabhängige Hemmung zeigte (Mikawa, 1998).

Die Untersuchungen im zellfreien System zeigen, daß Quencheffekte durch die trübe Fettemulsion und Scavengereffekte durch die Wirksubstanz selbst eine weitere wichtige Rolle spielen (Birkhahn, 2000).

Mathy-Hartert bestätigte die dosisabhängige, hemmende Wirkung von Propofol auf geprimte PMN durch chemiluminometrische Messungen (Mathy-Hartert, 1998).

Heller beobachtete bei Propofol eine signifikante Hemmung der respiratory burst bei PMN und Monocyten bei durchflußzytometrischen Messungen und eine verminderte bakterielle Clearance von E.coli (Heller, 1998).

Die Ergebnisse von Mirow (Mirow, 1995) wurden durch Fröhlich et al. (Fröhlich, 1996) bestätigt. Die Autoren untersuchten durchflußzytometrisch die Wirkung von Propofol auf die FMLP-induzierte Chemilumineszenz neutrophiler Granulozyten. Sie bemerkten eine konzentrationsabhängige Hemmung des Respiratory Burst durch Propofol bereits in

therapeutisch relevanten Konzentrationsbereichen. Weiterhin beobachteten sie, daß dieser Effekt durch eine Verminderung der Zahl derjenigen Granulozyten zustande kommt, die an der Sauerstoffradikalbildung teilnehmen, und nicht durch eine gleichmäßige Hemmung aller Zellen. Die Autoren untersuchten jedoch nicht den Einfluß der wirksubstanzfreien Lösung auf die CL und machten keine Aussage zu möglichen Scavengereffekten durch die Lipidlösung und die Wirksubstanz selbst. Murphy et al. (Murphy, 1996) konstatierten ebenfalls eine Hemmung der CL FMLP-stimulierter neutrophiler Granulozyten durch Propofol in Konzentrationen innerhalb des therapeutisch relevanten Plasmaspiegelbereiches. Sie beobachteten jedoch eine stärkere Hemmung der CL durch das Medikament als in den vorgelegten eigenen Untersuchungen. Heine und Mitarbeiter (Heine, 1996) bestimmten durchflußzytometrisch die intrazelluläre oxidative Umwandlung von Dihydrorhodamin-123 zu Rhodamin-123 in neutrophilen Granulozyten. In Übereinstimmung mit den vorgenannten Autoren beschrieben sie ebenfalls eine dosisabhängige Verminderung des Respiratory Burst durch Propofol in therapeutisch relevanten Plasmakonzentrationen. Auch Krumholz et al. (Krumholz, 1991), die den Einfluß von Propofol auf die Bakterizidie und Adhärenz neutrophiler Granulozyten untersuchten, stellten eine Hemmung der Bakterizidie neutrophiler Granulozyten fest. Die Fähigkeit der Zellen, *Staphylococcus aureus*-Bakterien abzutöten, wurde bereits in klinisch relevanten Konzentrationen hochsignifikant gehemmt. Die Adhärenz hingegen wurde erst in Konzentrationen beeinträchtigt, die oberhalb des bei therapeutischem Einsatz gemessenen Spiegelbereiches liegen.

Die Ergebnisse der vorgenannten Autoren stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen von Davidson et al. (Davidson, 1995). Die Autoren untersuchten (durchflußzytometrisch) die Wirkung von Propofol auf den Respiratory Burst und die Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten. Sie stellten keine hemmende Wirkung des Propofol fest, weder in therapeutisch relevanten Konzentrationen noch zwei Zehnerpotenzen darüber.

Die Wirkung von Propofol kann auf eine Hemmung von zyklischem GMP zurückgeführt werden. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl Propofol, als auch Midazolam mit Rezeptoren exzitatorischer Amine interagieren und dadurch verminderte Spiegel von zyklischem GMP bewirken (Miyawaki, 1997). Demiryurek beobachtete eine dosisabhängige Hemmung der CL bei PMN, die zuvor mit FMLP, Xanthinoxidase HOCL- und Eisenionen inkubiert wurden. Er schloss aus seinen Ergebnissen, daß Scavengereffekte die Einflüsse auf die neutrophilen Granulozyten bewirkten (Demiryurek, 1998).

Heine beobachtete eine signifikant verminderte respiratory burst bei Propofol nach Priming mit FMLP und TNF- α im Durchflußzytometer (Heine, 2000).

Propofol bewirkt eine verminderte Expression von Interleukin-8, das bei der Immunabwehr als wichtiges Cytokin die Chemotaxis und Adhäsionsfähigkeit bei PMN erhöht (Galley, 1998).

Zudem vermindert Propofol die Phosphorylierung von p42 mitogen aktivierter Proteinkinase (MAP-Kinase) bei FMLP-stimulierten PMN, und dadurch deren Fähigkeit zur Chemotaxis (Nagata, 2001).

7.6 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Der sogenannte Respiratory Burst, bei dem neutrophile Granulozyten Sauerstoffradikale, wie zum Beispiel Superoxid, produzieren, stellt einen Hauptmechanismus bei der Abwehr gegen Infektionen dar (van der Auwera, 1992). TNF- α erzeugt ein Priming bei neutrophilen Granulozyten, das heißt es sensibilisiert sie gegenüber anderen Agonisten (van der Auwera). Es wurde gezeigt, daß TNF- α das Priming von Superoxidbildung durch FMLP induzieren kann (Berkow, 1987). Die Entstehung von Sauerstoffradikalen kann durch die kinetische Analyse der Chemilumineszenz von neutrophilen Granulocyten quantifiziert werden (Gyllenhammer, 1989). Die durch FMLP hervorgerufene Produktion von Sauerstoffradikalen durch NG wird signifikant durch Hypnotika und Sedativa wie zum Beispiel Thiopental (Kress, 1989) und Benzodiazepine (Weiss, 1994) gehemmt, auch während der Frühphase des septischen Schocks bei intensivstationären Patienten (Vespasiano, 1993). Diese verminderte Funktion der Neutrophilen durch Hypnotika und Sedativa könnte von klinischer Bedeutung sein, da bei maschinell beatmeten Patienten eine steigende Zahl von nosokomialen Pneumonien beschrieben wurde, die Thiopental erhielten (Eberhardt, 1992). TNF- α spielt eine Schlüsselrolle bei der normalen Immunantwort gegenüber Infektionen durch Limitierung der Verbreitung der Pathogene (Beutler, 1993). Weiterhin spielt TNF- α eine Hauptrolle im systemic inflammatory response syndrome, welches sekundär bei Infektionen, Verbrennungen, Traumen, beim hämorrhagischen Schock und bei Pankreatitis auftritt (Strieter, 1993). Wir verglichen den hemmenden Effekt von ausgesuchten Hypnotika und Sedativa auf die Sauerstoffradikalbildung von Neutrophilen, die wir mit hohen Konzentrationen von TNF- α geprimt haben mit Neutrophilen, die kein Priming erfuhren.

Im Bereich der therapeutischen Plasmakonzentrationen wurde die Chemilumineszenz der nicht vorstimulierten PMN lediglich durch Thiopental, Diazepam und Propofol gehemmt. Nur Propofol hemmte die durch TNF- α geprimten Neutrophilen. Die angeführten Medikamente

hemmten die Radikalproduktion nicht über das Maß der Aktivität der Kontrollen, welche bei PMN ohne Medikament oder Lösungsmittel nach Zugabe von FMLP, gemessen wurden. Der Einfluß von Etomidate konnte jedoch wegen des Einflusses seines Lösungsmittels nicht bewertet werden. Im zellfreien System zeigten Thiopental und Propofol einen Scavenger-Effekt bezüglich freier Sauerstoffradikale.

Das Priming mit TNF- α beeinflusst die hemmende Wirkung bestimmter Medikamente auf die Sauerstoffradikalbildung bei FMLP-stimulierten NG. Das heißt TNF- α und FMLP entwickeln additive Effekte bei der Stimulation der Radikalbildung bei den Neutrophilen. Thiopental, Diazepam und Propofol beeinflussen dosisabhängig diese biochemischen Wege. Zusätzlich haben Thiopental und Propofol effektive Scavenger-Eigenschaften und können so die Radikal-vermittelte Gewebszerstörung bei Hyperinflammatorischen Syndromen abschwächen.

8 Zusammenfassung

Bei der Respiratory Burst sind Neutrophile Granulozyten durch die Bildung und Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetabolite an der körpereigenen Abwehr von Bakterien beteiligt, indem sie auf einen Reiz mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch und der Umwandlung von Sauerstoff in hochreaktive Sauerstoffmetabolite antworten. Eine Hemmung dieser Reaktion unter dem Einfluß häufig eingesetzter Hypnotika und Sedativa kann das Ausmaß bakterieller Infektionen und somit auch einer Sepsis begünstigen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die bekannten Hemmeffekte von Hypnotika und Sedativa auf die Sauerstoffradikalbildung neutrophiler Granulozyten im Endotoxinmodell, daß heißt nach Inkubation mit Lipopolysaccharid, Lipid A und Tumornekrosefaktor- α näher analysiert. In die Untersuchung eingeschlossen wurden die in der Intensivmedizin häufig eingesetzten handelsüblichen Präparationen unterschiedlicher Barbiturate (Methohexital, Thiopental), Benzodiazepine (Midazolam, Diazepam in alkoholischer Lösung als Valium und als Emulsion im handelsüblichen Diazepam-Lipuro), Propofol, Etomidate (in alkoholischer Lösung als Hypnomidate und als Emulsion im handelsüblichen Etomidat-Lipuro). Dazu wurden mit der N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin-induzierten und Luminol-verstärkten Chemilumineszenz die Einflüsse der jeweiligen Substanzen und wirksubstanzfreien Lösungen auf die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten untersucht.

Im Bereich der therapeutischen Plasmakonzentrationen wurde die Chemilumineszenz der nicht vorstimulierten Neutrophilen lediglich durch Thiopental, Diazepam und Propofol um mehr als 35 % gehemmt. Nur Diazepam hemmte die durch Tumornekrosefaktor- α geprimten Neutrophilen. Die angeführten Medikamente hemmten die Radikalproduktion nicht über das Maß der Aktivität der Kontrollen, welche bei Neutrophilen ohne Medikament oder Lösungsmittel nach Zugabe von N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin gemessen wurden. Die Stimulation der nichtgeprimten und der geprimten Neutrophilen durch Etomidate in der Konzentration von 10 μ g/ml lag bei 238% $\pm$ 83% (ohne Tumornekrosefaktor- α) beziehungsweise 422% $\pm$ 158% (mit Tumornekrosefaktor- α). Dies unterschied sich nicht signifikant von der Stimulation des entsprechenden Lösungsmittels: 230% $\pm$ 38% (ohne Tumornekrosefaktor- α) und 436% $\pm$ 93% (mit Tumornekrosefaktor- α).

Das bedeutet, daß die Wirkung von Etomidate durch den Effekt seines Lösungsmittels entsprechend kaum bewertet werden kann. Im zellfreien System zeigten Thiopental und Propofol einen Scavenger-Effekt bezüglich freier Sauerstoffradikale, das heißt das Priming mit Endotoxinen beeinflußt die hemmende Wirkung bestimmter Medikamente auf die Sauerstoffradikalbildung bei N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin-stimulierten Neutrophilen. Das heißt, Lipid A, Lipopolysaccharid, Tumornekrosefaktor- α und N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin entwickeln additive Effekte bei der Stimulation der Radikalbildung bei den Neutrophilen. Thiopental, Diazepam und Propofol beeinflussen dosisabhängig diese biochemischen Wege. Zusätzlich haben Thiopental und Propofol effektive Scavenger-Eigenschaften und können so die radikalvermittelte Gewebeerstörung bei hyperinflammatorischen Syndromen abschwächen.

9 Literaturverzeichnis

- (1) Abramson, S.B.; Leszczynska-Piziak, J.; Weissmann, G.
Arachidonic acid as a second messenger: Interactions with a GTP-binding protein of human neutrophils.
Journal of Immunology. 1991; 147: 231-236
- (2) Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, L; Raff, M.; Roberts, K.; Warson, J.D.
Signalübertragung in der Zelle.
In: Jaenicke, L. (Herausgeber): Molekularbiologie der Zelle. S. 853-928
Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft; 1995
- (3) Albrecht, H.
Über die Chemilumineszenz des Aminophthalsäurehydrazids.
Zeitschrift für physikalische Chemie. 1928; 136: 321-330
- (4) Alexander, W.; Stinnet, D.; Ogle, C.; Ogle, J.; Morris, M.
A comparison of immunologic profiles and their influence on bacteremia in surgical patients with high risk of infection.
Surgery. 1979; 86: 94-104
- (5) Allen, R.C.; Loose, LD.
Phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages.
Biochemical and Biophysical Research Communications. 1976; 69: 245-252
- (6) Allen, R.C.; Stjernhohn, R.L.; Steele, R.H.
Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bacterial activity.
Biochemical and Biophysical Research Communications. 1972; 47: 679-684

- (7) Al-Sawaf, H.A.; Gharndi, al, M.A.; Bekairi, al, A.M.; Tawfik, A.F.; Abu-Jayyab, A.R.
Changes in free amino acids in peripheral blood (PB) lymphocytes and polymorphnuclear (PMN) leukocytes after treatment with diazepam.
International Journal of Immunopharmacology. 1993; 15: 455-462
- (8) American College of Chest Physicians - Society of Critical Care Medicine:
Consensus Conference Committee. Definitions for sepsis and multiple organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis.
Intensive Care Med. 2003 Apr; 29(4): 530-8
- (9) Arthur, M.J.; Kowalski-Saunders, P.; Gurney, S.; Tolcher, R.; Bull, F.G.; Wright, R.
Reduction of ferricytochrome C may underestimate superoxide production by monocytes.
Journal of Immunological Methods. 1987; 98: 63-69
- (10) Atkinson Yh, Marasco WA, Lopez AF, et al: Recombinant tumor necrosis factor- α .
Regulation of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine receptor affinity and function on human neutrophils. J Clin Invest 1988; 81:759-765
- (11) Babior, B.M.
Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes.
New England Journal of Medicine. 1978; 298: 721-725
- (12) Badwey, J.A.; Karnovsky, M.L.
Production of superoxide by phagocytic leukocytes: A paradigm for stimulus response phenomena.
Trends Topics in Cellular Regulation. 1986; 28: 183-208
- (13) Baggiolini, M.; Boulay, F.; Badwey, J.A.; Cumutte, J.T.
Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst.
FASEB Journal. 1993; 7:1004-1010

- (14) Benbarek H., Deby-Dupont G., Caudron I., Grulke S., Deby C., Lamy M., Serteyn D.
Interactions between lipopolysaccharides and blood factors on the stimulation of equine polymorphonuclear neutrophils.
Vet Immunol Immunopathol 1998 Aug 31;64(4):313-22
- (15) Berkow R.L., Wang D., Larrick J.W., et al.
Enhancement of neutrophil superoxide production by preincubation with recombinant human necrosis factor. J Immunol 1987;139:3783-3791
- (16) Beutler B., Grau G.E.
Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. Crit Care Med 1993; 21: 423-435
- (17) Bidri M., Royer B, Averlant G, Bismuth G., Guillosson JJ, Arock M.
Inhibition of mouse mast cell proliferation and proinflammation mediator release by benzodiazepines.
Immunopharmacology. 1999 Jun;43(1):75-86
- (18) Birkhahn, A.J.
Hypnotika und Sedativa hemmen die Sauerstoffradikalbildung neutrophiler Granulozyten
Dissertation. Düsseldorf. Heinrich-Heine-Universität; 2000
- (19) Bonner S., Yan S.R., Byers D.M., Bortolussi R.
Activation of extracellular signal-related protein kinases 1 and 2 of the mitogen-activated protein kinase family by lipopolysaccharide requires plasma in neutrophils from adults and newborns.
Infect Immun 2001 May;69(5):3143-9
- (20) Breyer I., Vulcano M., Alves Rosa M.F., Isturiz M.A.
Human polymorphonuclear neutrophils (PMN) induce lipopolysaccharide (LPS) liberation from gram-negative bacteria
Medicina (B Aires) 1998;58(1):61-4

- (21) Cleary T.G., Getz S.L., Pickering L.K.
Effect of Intralipid on oxidative metabolic & functional activities of polymorphnuclear leukocytes (PMNL).
Pediatric Research. 1981; 15: 529
- (22) Corrocher R.
Correlations between the intensity of FMLP-dependent respiratory burst and cellular fatty acid composition in human neutrophils.
British Journal of Haernatology. 1995; 89: 271-276
- (23) Covelli, V.; Decandia, P.; Altarnura, M.; Jirillo, E.
Diazepam inhibits phagocytosis and killing exerted by polymorphnuclear cells and monocytes from healthy donors. In vitro studies.
Immunopharmacology and Immunotoxicology. 1989; 11: 701-714
- (24) Dahlgren, C.
Effect of different inhibitors on the intracellularly and extracellularly generated chemiluminescence induced by formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in polymorphnuclear leukocytes. Cellular response in the presence of mannitol, benzoate, taurine, indomethacin and NDGA.
Journal of Bioluminescence and Chemilurninescence. 1991; 6: 29-34
- (25) Davidson, J.A.; Boom, S.J.; Pearsall, F.J.; Zhang, P.; Ramsay, G.
Comparison of the effects of four i.v. anaesthetic agents on polymorphnuclear leucocyte function.
British Journal of Anaesthesia. 1995; 74: 315-318
- (26) Demiryurek A.T., Cinel I., Kahraman S., Tecder-Unal M., Gogus N., Kanzik I.
Propofol and intralipid interact with reactive oxygen species chemiluminescence study.
Br J Anaesth. 1998 May ;80(5):649-54
- (27) Deshmukh D.S., Kuizon S., Brockerhoff H.
Barbiturates inhibit intracellular Ca²⁺ rise induced by thrombin in rat platelets.
Cell Calcium. 1991; 12: 645-654

- (28) Eberhardt K.E.W., Thimm, B.M., Spring, A., Maskos, W.R.
Dose-dependent rate of nosocomial pulmonary infection in mechanically ventilated patients with brain oedema receiving barbiturates: a prospective study.
Infection. 1992; 20: 12-18
- (29) English D., Roloff J.S., Lukens J.N., Parker P., Greene H.L., Ghishan F.K.
Intravenous lipid emulsions and human neutrophil function.
Journal of Pediatrics. 1981; 99: 913-916
- (30) Ferrante A., Thong Y.H.
Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human peripheral blood by the Ficoll-Hypaque method.
Journal of Immunological Methods. 1980; 36: 109-117
- (31) Fischer G.W., Hunter K.W., Wilson S.R., Mease A.D.
Inhibitory effect of Intralipid on reticuloendothelial function and neutrophil bactericidal activity.
Pediatric Research. 1979; 13: 494
- (32) Fischer G.W., Hunter K.W., Wilson S.R., Mease A.D.
Diminished bacterial defences with Intralipid.
Lancet. 1980; 2: 819-820
- (33) Flad H.-D., Loppnow E., Rietschel TH., Ulmer A.J.
Agonists and antagonists for lipopolysaccharide-induced cytokines.
Immunobiol. 1993, 187, 303-316
- (34) Foote C.S., Abakerli R.B., Clough R.L.
On the question of singlet oxygen production in polymorphonuclear leukocytes.
In: De Luca, M.A. (Herausgeber): *Bioluminescence and Chemiluminescence: Basic chemistry and analytical applications*. S. 81-88
New York: Academic Press; 1981

(35) Freudenberg, M.A., Galanos C.

Bacterial lipopolysaccharides: Structure, metabolism and mechanism of action.

Intern. Rev. Immunol. 1990, 6, 207-221

(36) Fröhlich D., Rothe G., Schwall B., Schmitz G., Hobbhahn J., Taeger K.

Thiopentone and propofol, but not methohexitone nor midazolam, inhibit neutrophil oxidative responses to the bacterial peptide FMLP.

European Journal of Anaesthesiology. 1996; 13: 582-588

(37) Füllöp T., Varga Z, Nagy J.T., Förös G.

Studies on opsonized zymosan, FMLP, carbachol, PNIA and A231,7 stimulated respiratory burst of human PMNIs.

Biochemistry International. 1988; 17: 419-426

(38) Galanos C., Lüderitz O. , Rietschel E.TH., Westphal O.

Intern. Rev. of Biochem., Biochemistry of lipids 2

University Park Press, Baltimore, London, Tokyo

Bacterial lipopolysaccharides: Structure, metabolism and mechanism of action.

Intern. Rev. Immunol. 1977, 6, 207-221

(39) Galdiero E, Bentivoglio C., Nuzzo L, Ianniello R., Capasso C., Mattera S. et al.

Effects of benzodiazepines on immunodeficiency and resistance in mice.

Life Sciences. 1995; 57: 2413-2423

(40) Galley H.F., Webster N.R.

Brain nitric oxide synthase activity is decreased by intravenous anesthetics.

Anesth Analg. 1996 Sep;83(3):591-4

(41) Galley H.F., Dubbels A.M., Webster N.R.

The effect of midazolam and propofol on interleukin-8 from human polymorphonuclear leukocytes.

Anesth Analg. 1998 Jun;86(6):1289-93

(42) Gelb A.W., Lok P.

Etomidate reversibly depresses human neutrophil chemiluminescence.

Anesthesiology. 1987; 66: 60-63

(43) Gemsa D., Kalden J.R., Resch K.

Immunologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1991

(44) Gerard C., Gerard N.P.

The pro-inflammatory seven-transmembrane segment receptors of the leukocyte.

Curr Opin Immunol 1994; 6:140-145

(45) Ginsburg L., Misgav R., Gibbs D.F., Varani L, Kohen R.

Chemiluminescence in activated human neutrophils: role of buffers and scavengers.

Inflammation. 1993; 17: 227-243

(46) Gogos C.A., Kalfarentzos F.E., Zoumbos N.C.

Effect of three different types of total parenteral nutrition on T-lymphocyte subpopulations and NK cells.

American Journal of Clinical Nutrition. 1990; 51: 119-122

(47) Gogos C.A., Drosou E., Bassaris H.P., Skoutelis A.

Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options.

J Infect Dis. 2000 Jan; 181(1):176-80

(48) Gogos C.A., Zoumbos N., Makri M., Kalfarentzos F.

Medium- and long-chain triglycerides have different effects on the synthesis of tumor necrosis factor by human mononuclear cells in patients under total parenteral nutrition.

Journal of the American College of Nutrition. 1994; 13: 40-44

(49) Goldfarb G., Belghiti J., Gautero H., Boivin P.

In vitro effect of benzodiazepines on polymorphnuclear leukocyte oxidative activity.

Anesthesiology. 1984; 60: 57-60

(50) Gyllenhammer H.

Correlation between neutrophil superoxide formation, luminol-augmented chemiluminescence and intracellular Ca²⁺ levels upon stimulation with leukotriene B₄, formylpeptide and phorbol ester.

Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. 1989; 49: 317-322

(51) Halliwell B., Gutteridge J.M.

Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview.

In: Packer, L.: Glazer, A.N.: Methods in enzymology. Radicals in biological systems. Part B: Oxygen radicals and antioxidants. Vol. 186: 1-85.

San Diego: Academic press; 1990.

(52) 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.

British Journal of Anaesthesia. 1996; 77: 387-392

(53) Heine J., Jaeger K., Osthaus A., Weingaertner N., Munte S., Piepenbrock S., Leuwer M.

Anaesthesia with propofol decreases FMLP-induced neutrophil respiratory burst but not phagocytosis compared with isoflurane.

Br J Anaesth. 2000 Sep 85(3):424-30

(54) Heine J., Jaeger K., Weingaertner N., Scheinichen D., Marx G., Piepenbrock S.

Effects of different preparations of propofol, diazepam, and etomidate on human neutrophils in vitro.

Acta Anaesthesiol Scand. 2001 Feb;45(2):213-20

(55) Heine J., Scheinichen D., Jaeger K., Andre M., Leuwer M.

In vitro influence of parenteral lipid emulsions on the respiratory burst of neutrophils.

Nutrition. 1999 Jul-Aug; 15(7-8):540-5

(56) Heine J., Scheinichen D., Jaeger K., Emmendoerffer A., Leuwer M.

Inhibition of neutrophil respiratory burst and chemotaxis in vitro by thiopentone but not methohexitone.

Neurosurg Focus. 1997 Jun 15;2(6):e 1.

(57) 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. 1998 May;42(5):518-26

(58) Johansen, K.S., Berger E.M.

Effect of sodium benzoate on polymorphonuclear leukocyte function.

Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica. 1983; 91: 361365

(59) Kappus, H.

Toxizität von Sauerstoffradikalen - Biologische Funktion und schädliche Wirkung auf das Gewebe.

In: Puhl, W.; Sies, H. (Herausgeber): Abakterielle und periartrikuläre Entzündungen. Superoxid-Dismutase - Biochemie und therapeutischer Einsatz. S.19-25.

Erlangen: Perimed Fachbuch-Verlagsgesellschaft; 1982

(60) Karsten, S.

Fettsäuren aus immunologischer Sicht.

Ernährungs-Umschau. 1996; 43: 166-171

(61) Kellermann W., Rothe G., Briegel L, Nebauer A., Doenicke A.

Beeinflussung des Respiratory Burst neutrophiler Granulozyten durch Etomidat und Thiopental.

Der Anaesthesist. 1992; 41 [Suppl. 1]: S 186

(62) Klebanoff S.J.

Microbicidal mechanisms, oxygen-dependent.

In: Roitt, I.M.; Delves, P.J. (Herausgeber): Encyclopedia of immunology. S. 10641068.

London: Academic press; 1992

(63) Klein J.

Immunologie. S. 330-345.

Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft; 1991

(64) Knudsen E., Klausen N.O., Ferguson A.H., Pedersen J.O.

In vitro effect of etomidate and thiopental on granulocyte migration.

Acta Anaesthesiologica Scandinavica. 1987; 31: 93-95

(65) Koenderman L., Yazdanbakhsh M., Roos D., Verhoeven A.J.

Dual mechanisms in priming of the chemoattractant-induced respiratory burst in human granulocytes.

Journal of Immunology. 1989; 142: 623-628

(66) Kress H.G., Eberlein T., Hörber B., Weis K.H.

Suppression of neutrophil migration and chemiluminescence is due to the sulphur atom in the thiobarbiturate molecule.

Acta Anaesthesiologica Scandinavica. 1989; 33: 122-128

(67) Kress H.G., Segmüller R.

Intravenöse Anästhetika und Motilität humaner neutrophiler Granulozyten in vitro.

Anaesthesist. 1987; 36: 356-361

(68) Kress H.G., Weiler R.

Effects of benzodiazepines and the antagonist flumazenil on oxidative microbicidal capacity of human neutrophils.

Anesthesia and Analgesia. 1990; 70: S 219

(69) Kruimel J.W., Naber A.H., Curfs J.H., Wenker M.A., Jansen J.B.

With medium-chain triglycerides, higher and faster oxygen radical production by stimulated polymorphonuclear leukocytes occurs.

J Parenter Enteral Nutr. 2000 Mar-Apr;24(2):107-12

(70) Krumholz W., Demel C., Jung S., Meuthen G., Knecht J., Hempelmann G.

The effects of thiopentone, etomidate, ketamine and midazolain on several bactericidal functions of polymorphnuclear leucocytes in vitro.

European Journal of Anaesthesiology. 1995; 12: 141-146

(71) Krumholz W., Jung S., Jorgall H., Bachmann-M B.

Der Einfluß von Thiopental und Methohexital auf die Wasserstoffperoxidproduktion neutrophiler Granulozyten.

Der Anaesthesist. 1991; 40 [Suppl. 1]: S 139

(72) Krumholz W., Käbisch S., Biscoping L, Hempelmann G.

Über Veränderung der Adhärenz polymorphkerniger Granulozyten durch die intravenösen Anästhetika Midazolam und Ketamin.

Anaesthesie Intensivtherapie Notfallmedizin. 1978; 22: 211-213

(73) Krumholz W., Knecht J., Endrass J., Kebeiks B.

Der Einfluß von Propofol auf die Adhärenz und Bakterizidie neutrophiler Granulozyten in vitro.

Der Anaesthesist. 1991; 40 [Suppl. 1]: S 133

(74) Krumholz W., Demel C., Jung S., Meuthen G., Knecht J., Hempelmann G.

The effects of thiopentone, etomidate, ketamine and midazolain on several bactericidal fimctions of polymorphnuclear leucocytes in vitro.

European Journal of Anaesthesiology. 1995; 12: 141-146

(75) Krumholz W., Jung S., Jorgall H., Bachmann B.

Der Einfluß von Thiopental und Methohexital auf die Wasserstoffperoxidproduktion neutrophiler Granulozyten.

Der Anaesthesist. 1991; 40 [Suppl. 1]: S 139

(76) Krumholz W., Käbisch S., Biscoping L, Hempelmann G.

Über Veränderung der Adhärenz polymorphkerniger Granulozyten durch die intravenösen Anästhetika Midazolam und Ketamin.

Anaesthesie Intensivtherapie Notfallmedizin. 1978; 22: 211-213

(77) Krumholz W., Knecht J., Endrass J., Kebeiks B.

Der Einfluß von Propofol auf die Adhärenz und Bakterizidie neutrophiler Granulozyten in vitro.

Der Anaesthesist. 1991; 40 [Suppl. 1]: S 133

(78) Laghi Pasini E, Ceccatelli L., Capecci P.L., Orrico A., Pasqui A.L.

Benzodiazepines inhibit in vitro free radical formation from human neutrophils induced by FMLP and A23187.

Immunopharmacology and Immunotoxicology. 1987; 9: 101-114

(79) Larsen B., Hoff G., Wilhelm W., Buchinger H., Wanner G.A., Bauer M.

Effect of intravenous anesthetics on spontaneous and endotoxine stimulated cytokine response in cultured human whole blood

Anesthesiology. 1998 Nov;89(5):1218-27

(80) Lekkou A., Karakantza M., Mouzaki A., Kalfarentzos F., Gogos C.A.

Cytokine production and monocyte HLA-DR expression as predictors of outcome for patients with community-acquired severe infections.

Clin Diagn Lab Immunol. 2004 Jan; 11(1): 161-7

(81) Lenssen, P.; Bruemmer, B.; Aker, S.; Bowden, R.; Mattson, D.

Relationship between i.v. lipid dose and incidence of bacteremias and fungemias in 492 marrow transplant (MT) patients.

Journal of Parenteral and Enteral Nutrition. 1994; 18 [Suppl.]: 34

(82) Li Y., Ferrante A., Poulos A., Harvey D.P.

Neutrophil oxygen radical generation. Synergistic responses on tumor necrosis factor and mono/polyunsaturated fatty acids

J Clin Invest. 1996 Apr 1;97(7):1605-9

(83) Lindsay A.G., McPhail L.C., Henson P.M., Johnston JR.

Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme.

Journal of Experimental Medicine. 1984; 160: 1656-1671

(84) Marasco W.A., Phan S.H., Kratzsch H., Showell H.J., Feltner D.E., Naim R. et al.
Purification and identification of Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the
major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*.
Journal of Biological Chemistry. 1984; 259: 5430-5439

(85) Mather L.E., Rutten A.J.
Stereochemistry and its relevance in anaesthesiology.
Current Opinion in Anaesthesiology. 1991; 4: 473-479

(86) Mathy-Hartert M., Deby-Dupont G., Hans P., Deby C., Lamy M.
Protective activity of propofol, Diprivan and intralipid against active oxygen species.
Mediators Inflamm. 1998;7(5):327-33

(87) Mikawa K., Akamatsu H., Nishina K., Shiga M., Maekawa N., Obara K., Niwa Y.
Propofol inhibits human neutrophil functions.
Anesth Analg. 1998 Sep;87(3):695-700

(88) Mirow N.
Beeinträchtigen Sedativa und Analgetika die Sauerstoffradikalbildung
menschlicher Granulozyten ?
Dissertation, Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität; 1995

(89) Miyawaki I., Nakamura K., Yokubol B., Kitamura R., Mori K.
Suppression of cyclic guanosine monophosphate formation in cerebellar slices by propofol,
ketamine and midazolam.
Can J Anaesth. 1997 Dec;44(12):1301

(90) Monico R., Dominioni L., Interdonato E, Festi L., Dionigi R.
Effects of i.v. administration of an MCT-containing fat emulsion on neutrophil
function and chemistry.
Beitrag zur Infusionstherapie. 1988; 20: 36-43

- (91) Morisaki H., Tanaka T., Ishimura Y., Takeda L., Sekiguchi H., Nagano M.
In vitro effect of additives in benzodiazepine solutions on the superoxide anion generating system in polymorphonuclear leukocytes.
British Journal of Anaesthesia. 1991; 66: 97-102
- (92) Morrison D.C., Ulevitch R.J.
The effects of bacterial endotoxins on host mediating systems.
Am. J. Pathol. 1978, 93, 526-617
- (93) Moudgil G.C.
Effect of premedicants, intravenous anaesthetic agents and local anaesthetics on phagocytosis in vitro.
Canadian Anaesthetist's Society Journal. 1981; 28: 597-601
- (94) Murphy P.G., Ogilvy A.J., Whiteley S.M.
The effect of propofol on the neutrophil respiratory burst.
European Journal of Anaesthesiology. 1996; 13: 471-473
- (95) Nagata T., Kansha M., Irita K., Takahashi S.
Propofol inhibits FMLP-stimulated phosphorylation of p42 mitogen-activated protein kinase and chemotaxis in human neutrophils.
Br J Anaesth. 2001 Jun;86(6):853-8
- (96) Nath J., Powledge A.
Modulation of human neutrophil inflammatory responses by nitric oxide: studies in unprimed and LPS-primed cells.
J Leukoc Biol 1997 Dec;62(6):805-16
- (97) Nguyen A.T., Golub R., Feuillet-Fieux M.N., Descamps-Latscha B.
Modulation of human granulocyte and monocyte chemiluminescence responses: evidence for distinct free radical generating systems.
Journal of Clinical and Laboratory Immunology. 1983; 12: 47-55

- (98) Nishina K., Akamatsu H., Mikawa K., Shiga M., Maekawa N., Obara K., Niwa Y.
The inhibitory effects of thiopental, midazolam, and ketamine on human neutrophil functions.
Anesth Analg. 1998 Jan;86(1):159-65
- (99) Niwa M., Kozawa O., Matsuno H., Kanamori Y., Hara A., Uematsu T.
Tumor necrosis factor-alpha-mediated signal transduction in human neutrophils: involvement of sphingomyelin metabolism in the priming effect of TNF-alpha on the fMLP-stimulated superoxide production.
Life Sci. 2000;66(3):245-56
- (100) Okuda A., Kubota M., Watanabe K., Sawada M., Koishi S., Kataoka A., Usami I., Lin Y.W., Furusho K.
Inhibition of superoxide production and chemotaxis by methotrexate in neutrophils primed by TNF-alpha or LPS.
Eur J Haematol 1997 Sep;59(3):142-7
- (101) Ortmeyer J., Mohsenin V.
Glucose suppresses superoxide generation in normal neutrophils: interference in phospholipase D activation.
American Journal of Physiology. 1993; 264: C402-410
- (102) Palmblad L., Broström O., Lahnborg G., Uden A.-M., Venizelos N.
Neutrophil functions during total parenteral nutrition and Intralipid infusion. American Journal of Clinical Nutrition. 1982; 35: 1430-1436
- (103) Pekoe G.M., Peden D., Dyke van K.
Impairment of leukocyte myeloperoxidase bactericidal mechanisms with ketamine.
Agents and Actions (Basel). 1983; 13: 59-62
- (104) Pick E., Keisari Y.
A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture.
Journal of Immunological Methods. 1980; 38: 161-170

- (105) Reinhold S.L., Prescott S.M., Zimmerman G.A., McIntyre T.M.
Activation of human neutrophil phospholipase D by three separable mechanisms.
FASEB J. 1990; 4: 208-214
- (106) Roitt I.M.
Die erworbene Immunantwort: II. Produktion von Effektoren.
Roitt, I.M.: Leitfaden der Immunologie. S. 131-155.
Berlin: Blackwell Wissenschaft; 1993
- (107) Roswell D., White E.
The chemiluminescence of luminol and related hydralazines.
De Luca, M.A. (Herausgeber): Methods in enzymology. Bioluminescence and chemiluminescence. Vol. 36, S. 409-423. New York: Academic press; 1978
- (108) Ruud B., Benestad H.B., Opdahl H.
Dual effect of thiopentone on human granulocyte activation. Non-intervention by ketamine and morphine. Acta Anaesthesiologica Scandinavica. 1988; 32: 316-322
- (109) Sachs L.
Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden. S. 41 Off Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 1992
- (110) Schauder P., Neu L., Blei A., Schäfer G., Korf G., Schenk H.D.
No association between lipid infusion, infection rate and bacteremia in postoperative patients treated by elective colorectal surgery. In: Eckard, L; Wofrwn, G. (Herausgeber): Fett in der parenteralen Ernährung 4. S.143. München: Zuckschwerdt-Verlag; 1993
- (111) Sedman P.C., Somers S.S., Ramsden C.W., Brennan T.G., Guillou PJ.
Effects of different lipid emulsions on lymphocyte function during total parenteral nutrition. British Journal of Surgery. 1991; 78: 1396-1399
- (112) Segal A.W., Abo A.
The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. Trends in Biochemical Sciences. 1993; 18: 43-47

(113) Seitz, W.R.

Chemiluminescence detection of enzymically generated peroxide.

De Luca M.A. (Herausgeber): Methods in enzymology. Bioluminescence and chemiluminescence. Vol. 57, S. 445-462. New York: Academic press; 1978

(114) Smith C.J., Edwards A.E., Gower D.E., Ferguson B.J.M., Williams, C.P.

Leukocyte migration: effects of in vitro exposure to anaesthetic agents: possible potentiation of effects by adrenaline. European Journal of Anaesthesiology. 1992; 9: 463-472

(115) Smith M.T., Thor H., Orrenius S.

Detection and measurement of drug-induced oxygen radical formation. In: De Luca, M.A. (Herausgeber): Methods in enzymology. Bioluminescence and chemiluminescence. Vol. 105, S. 505-510. New York: Academic press; 1984

(116) Snell J.J.

Immunität und Narkose.

Berliner Klinische Wochenschriften. 1903; 40: 212-214

(117) Snyderman R., Smith C.D., Verghese M.W.

Model for leukocyte regulation by chemoattractant receptors: Roles of a guanine nucleotide regulatory protein and polyphosphoinositide metabolism. Journal of Leukocyte Biology. 1986; 40: 785-800

(118) Stevenson G., Hall S., Rudnick S., Seleny E., Stevenson, H.

The effect of anesthetic agents on the human immune response.

Anesthesiology. 1990; 72: 542-552

(119) Strieter R.M., Kunkel S.L., Bone R.C.

Role of tumor necrosis factor- α in disease states and inflammation.

Crit Care Med 1993; 21:447-463

- (120) Takeshita S., Nakatani K., Takata Y., Kawase H., Sekine I., Yoshioka S.
Interferon-gamma (IFN-gamma) and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) enhance lipopolysaccharide binding to neutrophils via CD14.
Inflamm Res 1998 Mar;47(3):101-3
- (121) Tanigawa T., Kotake Y., Reinke L.A.
Spin trapping of superoxide radicals following stimulation of neutrophils with fMLP is temperature dependent. Free Radical Biology and Medicine. 1993; 15: 425-433
- (122) Tauber A.I.
Protein kinase C and the activation of the human neutrophil NADPH-oxidase.
Blood. 1987; 69: 711-720
- (123) Tavares-Murta B.M., Machado J.S., Ferreira S.H., Cunha F.Q.
Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS.
Inflammation 2001 Aug;25(4):247-53
- (124) Tennenberg S.D., Solomkin J.S.
Activation of neutrophils by cachectin/tumor necrosis factor: priming of N-formyl-leucyl-phenylalanine-induced oxidative responsiveness via receptor mobilization without degranulation.
J Leukoc Biol 1990;47:217-223
- (125) Tennenberg S.D., Zemlan F.P., Solomkin J.S.
Characterization of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine receptors on human neutrophils. Effects of isolation and temperature on receptor expression and functional activity.
Journal of Immunology. 1988; 141: 3937-3944

(126) Tizard I.R.

Immunology. An introduction. Second edition.

Saunders college publishing; 1988

(127) Toyota S., Moriyama M., Otake T., Kono L., Shudou Y., Satake T. et al.

Effect of anaesthetic agents on the phagocytic function of human polymorphnuclear leukocytes through analysis with a phagocytic plaque method.

Inflamation Research. 1995; 44: 204-206

(128) Trush M.A. et al.

The generation of chemiluminescence by phagocytic cells.

De Luca, M.A. (Herausgeber): Methods in enzymology. Bioluminescence and chemiluminescence. Vol. 57, S. 462-494 New York: Academic press; 1978

(129) Tschakowsky K., Sittl R., Braun G.G., Hering W., Rugheimer E.

Increased fMet-Leu-Phe receptor expression and altered superoxide production of neutrophil granulocytes in septic and posttraumatic patients. Clinical Investigation. 1993; 72: 18-25

(130) Ulrich H., McCarthy Pastores S., Katz D.P., Kvetan V.

Parenteral use of medium-chain triglycerides: A reappraisal.

Nutrition. 1996; 12: 231-238

(131) Van der Auwera P.

Interactions between TNF- α and human polymorphnuclear leukocytes.

Yearbook of intensive Care and Emergency Medicine.

Vincent JL(Ed). Springer, Berlin Heidelberg New York,1992, S.49-56

(132) Vespasiano M.C., Lewandowski J.R., Zimmermann J.J.

longitudinal analysis of neutrophil superoxid anion generation in patients with septic shock.

Crit Care Med 1993; 21:666-672

(133) Waitzberg D.L., Bellinati-Pires R., Yamaguchi N., Massili-Oku S., Salgado M.M., Hypolito I.P. et al.

Influence of medium-chain triglyceride-based lipid emulsion on rat polymorphnuclear cell functions. Nutrition. 1996; 12: 93-99

- (134) Wang J.-F., Komarov P., Sies H., Groot de H.
Contribution of nitric oxide synthase to luminol-dependent chemiluminescence generated by phorbol-ester-activated Kupffer cells.
Biochemical Journal. 1991, 279: 311-314
- (135) Wang J.K.T., Morgan J.I., Spector S.
Benzodiazepines that bind at peripheral sites inhibit cell proliferation.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1984; 81: 753-756
- (136) Ward J.D., Becker D.P., Miller J.D., Choi S.C., Marmarou A., Wood C.
Failure of prophylactic barbiturate coma in the treatment of severe head injury.
Journal of Neurosurgery. 1985; 62: 383-388
- (137) Watt L., Ledingham I.
Mortality amongst multiple trauma patients admitted to an intensive therapy unit.
Anaesthesia. 1984; 39: 973-981
- (138) Weiss M., Buhl R., Birkhahn A., Mirow N., Schneider M., Wernet P.
Do barbiturates and their solutions suppress FMLP-induced neutrophil chemiluminescence?
European Journal of Anaesthesiology. 1994; 11: 371-379
- (139) Weiss M., Buhl R., Medve M., Schneider E.M.
Tumor necrosis factor-alpha modulates the selective interference of hypnotics and sedatives to suppress N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced oxidative burst formation in neutrophils.
Critical care medicine. 1997; 25(1): 128-134
- (140) Weiss M., Buhl R., Mirow N., Birkhahn A., Schneider M., Wernet P.
Do barbiturates impair zymosan-induced granulocyte function?
Journal of Critical Care. 1994; 9: 83-89

- (141) Weiss M., Mirow N., Birkhahn A., Schneider M., Wernet P.
Benzodiazepines and their solvents influence neutrophil granulocyte function.
British Journal of Anaesthesia. 1993; 70: 317-321
- (142) Welch, W.D.
Correlation between measurements of the luminol-dependent chemiluminescence response
and bacterial susceptibility to phagocytosis.
Infection and Immunity. 1980; 30: 370-374
- (143) White I.W.C., Gelb A.W., Wexler H.R., Stiller C.R., Keown P.A.
The effects of intravenous anaesthetic agents on human neutrophil chemiluminescence.
Canadian Anaesthetists Society Journal. 1983; 30: 506-511
- (144) Wiernik A., Jarstrand C., Julander I.
The effect of Intralipid on mononuclear and polymorphonuclear phagocytes.
American Journal of Clinical Nutrition. 1983; 37: 256-261

10 Lebenslauf

Name	Medve
Vorname	Martin
Geboren	02.01.1967 in Budapest
Anschrift	Marschallstraße 1 40477 Düsseldorf
Familienstand	verheiratet, 1 Kind
Ehefrau	Nicole, Magistra artium
Nationalität	deutsch
Konfession	katholisch
Eltern	Andreas und Kristina Medve
Schul Ausbildung	
1974-1978	Städt. Grundschule Benrath, Düsseldorf
1978-1980	Gymnasium Koblenzer Straße, Düsseldorf
1980-1987	Gymnasium Leibniz, Düsseldorf
	Abitur 1987
Zivildienst	
	Florence-Nightingale-Krankenhaus, Düsseldorf
Berufsausbildung	
April 1989	Humanmedizinisches Studium an der Heinrich-Heine-
Universität	Düsseldorf
1991	Physikum
1992	1.Staatsexamen
1994	2.Staatsexamen
10/94-10/95	Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Düsseldorf
	Chirurgie: Gefäßchirurgie/Allgemeinchirurgie
	Wahlfach: Gynäkologie und Geburtshilfe
	Innere Medizin: Gastroenterologie

Arzt im Praktikum

12/1995 - 06/1997

AIP in der Uniklinik Düsseldorf, Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Direktor Prof. Dr. Häussinger

Assistenzarzttätigkeit

07/97 - 12/98

Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Direktor Prof.Dr. Häussinger.

01/99 - 4/99

Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin, Krkhs. Kamp-Lintfort,
Chefärztin Frau Dr. Voß

11/99 – 7/2002

Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin, St. Martinus Krankenhaus, Düsseldorf, Chefarzt Dr. Haas

seit 8/2002

Assistenzarzt in der inneren Abteilung des Krankenhauses der Kaiserswerther Diakonie, Chefarzt Prof. Dr. Erckenbrecht zur Weiterbildung in Gastroenterologie

9/2003

Facharztprüfung innere Medizin

Düsseldorf, 28.03.2004