

**Der Einfluss von Ketamin, Thiopental, Propofol und Etomidat auf
die Expression leukozytärer Oberflächenrezeptoren in vitro**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereiches Humanmedizin der
Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von **Georg Hafer** aus Paderborn

Giessen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie
Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie
Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH
Standort Giessen
Leiter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Gunter Hempelmann

Gutachter: PD Dr. med. I. D. Welters

Gutachter: PD Dr. med. S. Immenschuh

Tag der Disputation: 31.01.08

Meinen Eltern und meinen Brüdern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Darstellung der Thematik.....	1
1.2	Granulozytenfunktion	1
1.3	Adhäsion, Extravasation, Diapedese und Chemotaxis	2
1.4	Phagozytose und Oxidativer Burst.....	3
1.5	Interleukin-8	4
1.6	L-Selektin (CD62-L).....	5
1.7	Oberflächenrezeptoren CR1, CR3 und CD16.....	6
1.8	Der NB1-Rezeptor (HNA-2a, CD177).....	8
1.9	Anästhetika	9
1.10	Zielsetzung der Studie	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Probenmaterial	13
2.1.1	Probandenkollektiv	13
2.1.2	Ausschlusskriterien	13
2.1.3	Probengewinnung und -aufarbeitung	13
2.1.4	Granulozytenisolierung aus Vollblut	14
2.1.5	Inkubation mit Testsubstanzen.....	14
2.1.6	Stimulation.....	15
2.2	Bestimmung der Oberflächenantigene CD11b, CD16, CD35 und CD62L	15
2.2.1	Testprinzip	15
2.2.2	Rezeptor-Markierung.....	15
2.3	Bestimmung des Oberflächenrezeptors NB1 (CD177)	16
2.3.1	Testprinzip	16
2.3.2	Aufarbeitung	16
2.3.3	Rezeptormarkierung	18
2.4	Bestimmung der spontanen und LPS-induzierten Produktion von Interleukin-8 mittels ELISA	19
2.4.1	Prinzip	19
2.4.2	Probenaufarbeitung	19
2.5	Prinzip der Durchflusszytometrie	20
2.5.1	Optik- und Detektionssystem	20
2.5.2	Flüssigkeitssystem	22
2.5.3	Signalverarbeitung	23
2.6	Darstellung der Messergebnisse	23
2.7	Auswertung der durchflusszytometrischen Daten	26
2.8	Statistische Auswertung	26

3	ERGEBNISSE	27
3.1	Vitalitätsprüfung	27
3.2	LPS-induzierte und medikamentenunabhängige Effekte auf die Expression von Oberflächenrezeptoren und der IL-8-Synthese	27
3.3	Ketamin	29
3.3.1	CR3 (CD11b/CD 18-Expression)	29
3.3.2	CD 16-Expression	30
3.3.3	CR1 (CD35)-Expression	31
3.3.4	CD62L-Expression	32
3.3.5	Interleukin-8-Expression	33
3.4	Thiopental	34
3.4.1	CR3 (CD11b/CD18-Expression)	34
3.4.2	CD16-Expression	35
3.4.3	CR1 (CD35)-Expression	36
3.4.4	CD62L-Expression	37
3.4.5	Interleukin-8-Expression	38
3.5	Propofol	39
3.5.1	CR3 (CD11b/CD18-Expression)	39
3.5.2	CD16-Expression	40
3.5.3	CR1 (CD35)-Expression	41
3.5.4	CD62L-Expression	42
3.5.5	Interleukin-8-Expression	43
3.6	Etomidat	44
3.6.1	CR3 (CD11b/CD18-Expression)	44
3.6.2	CD16-Expression	45
3.6.3	CR1 (CD35)-Expression	46
3.6.4	CD62L-Expression	47
3.6.5	Interleukin-8-Expression	48
3.7	NB1 (HNA-2a, CD177)	49
4	DISKUSSION	50
4.1	Diskussion der Methodik	50
4.1.1	Probenaufbereitung	50
4.1.2	Fluoreszenzfärbung	53
4.1.3	Durchflusszytometrie	54
4.1.4	Auswahl der Messparameter	55
4.2	Diskussion der Ergebnisse	55
4.2.1	Anästhetika- induzierte Veränderungen des Adhäsionsrezeptors CD62L (L-Selektin)	55
4.2.2	Anästhetika-induzierte Veränderungen der Komplementrezeptoren CR3 (CD11b/CD18), CR1 (CD35) und FcγRIII (CD16)	60
4.2.3	Fehlende Veränderungen des NB1-Rezeptors (HNA-2a, CD177) durch i.v. Anästhetika	64
4.2.4	Anästhetika-induzierte Effekte auf die Synthese von Interleukin-8 (IL-8)	65
4.3	Mögliche klinische Relevanz	68
5	ZUSAMMENFASSUNG	72
6	SUMMARY	74

7	LITERATURVERZEICHNIS	76
8	ANHANG	91
8.1	Ergebnistabellen	91
8.2	Abbildungsverzeichnis	100
8.3	Abkürzungen.....	103
8.4	Verwendete Materialien und Reagenzien.....	106
9	SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG.....	107
10	VERÖFFENTLICHUNG.....	108
11	DANKSAGUNG.....	109
12	LEBENS LAUF.....	110

1 Einleitung

1.1 Darstellung der Thematik

Sowohl postoperative als auch nosokomiale Infektionen stellen bei schwer kranken Patienten nach wie vor ein ernstzunehmendes Problem dar. Intravenöse Anästhetika und Barbiturate werden nicht nur während kurz dauernder Operationen eingesetzt, sondern dienen z.B. auch zur Langzeitsedation oder Analgesie auf Intensivstationen. Dabei kann es zu kumulativen Effekten der Substanzen im Blut und im entzündeten Gewebe kommen. Für einige dieser Substanzen, und zum Teil auch für ihre Lösungsvermittler, wurden in vorhergehenden Studien immunmodulatorische Effekte nachgewiesen^{1 2 3}, die einen Einfluss auf die Inzidenz und den Verlauf eines Infektionsgeschehens haben können⁴. Uns interessierten deshalb in dieser Studie die Auswirkungen von drei häufig verwendeten intravenösen Anästhetika sowie eines Barbiturats auf die spontane und die Lipopolysaccharid (LPS) -induzierte Expression funktionsrelevanter Oberflächenrezeptoren, die im Zusammenhang mit der Adhäsion und der Phagozytose stehen, sowie die Synthese von Interleukin-8, als wichtigstem, von Polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten (PMN) synthetisiertem Zytokin. Des Weiteren wurde der Einfluss klinisch relevanter Konzentrationen dieser Präparate auf die LPS-induzierte Expression des Entzündungsrezeptors NB1 untersucht. Um die Relevanz kumulativer Effekte abzuschätzen, testeten wir jeweils sowohl eine klinisch relevante, als auch eine supraklinische Dosis in 10-fach höherer Konzentration. Die Rekrutierung von Oberflächenrezeptoren aus intrazellulären Pools erfolgt innerhalb von 15 Minuten als unmittelbare Antwort auf proinflammatorische Stimuli⁵. Die de novo Synthese nach transkriptioneller Aktivierung stellt hingegen einen mehrstündigen Prozess dar. Um kurzfristig einsetzende Effekte von langfristigen zu unterscheiden, wurden deshalb Inkubationszeiten von 15 Minuten und drei Stunden gewählt.

1.2 Granulozytenfunktion

PMN spielen eine wichtige Rolle in der primären Abwehrreaktion des Organismus gegen die Invasion bakterieller Erreger. Sie gehen wie alle Blutkörperchen aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervor. Diese Zellen teilen sich in eine lymphatische Stammzellreihe, aus der sich später die Lymphozyten entwickeln, und in eine myeloische Stammzellreihe, aus der sich Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten

ableiten. Die Gruppe der Leukozyten umfasst Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen und Lymphozyten. Polymorphkernige Granulozyten (PMN) stellen mit 40 bis 65% den größten Anteil der weißen Blutkörperchen im Blut und liegen in einer Konzentration von $3-5 \times 10^6$ /ml Blut vor. Im Rahmen von Infektionen kann sich diese Zahl nahezu verzehnfachen. Sie werden anhand der histologischen Anfärbbarkeit ihrer spezifischen Granula durch panoptische Färbemethoden in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterteilt. Neutrophile Granulozyten stellen dabei über 90% der zirkulierenden Granulozyten und haben einen Durchmesser von ca. 10 μ m. Im Gewebe besitzen sie eine Lebensdauer von zwei bis drei Tagen, wobei die Halbwertszeit der im Blut zirkulierenden Granulozyten acht bis 20 Stunden beträgt. Dieser im Vergleich zu anderen Leukozytenpopulationen ausgesprochenen Kurzlebigkeit der Granulozyten steht eine Neubildungsrate von rund 80 Mio./Minute gegenüber ⁶.

Als Bestandteil des unspezifischen Immunsystems spielen PMN eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen während akuter Entzündungen. Mittels spezifischer Adhäsionsrezeptoren können PMN an Rezeptoren auf Endothelzellen binden, an ihnen „entlangrollen“ und aus den Gefäßen in das entzündete Interstitium auswandern. Diesen Vorgang bezeichnet man als Diapedese. Dabei folgen die PMN einem Konzentrationsgefälle von chemotaktischen Infektionsmediatoren in Richtung des Entzündungsherdes. Ihre Hauptaufgabe vor Ort ist die Phagozytose, die auf verschiedenen Stufen reguliert wird ⁷.

1.3 Adhäsion, Extravasation, Diapedese und Chemotaxis

Das Auswandern der Granulozyten aus dem Gefäßsystem zum Ort des Entzündungsgeschehens läuft im Wesentlichen in vier Schritten ab ⁸: Im ersten Schritt wird nach Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine eine schwache Bindung von neutrophilen Granulozyten an Gefäßendothelzellen vermittelt. Dies geschieht durch reversible Wechselwirkungen der auf den Endothelzellen (CD62E, CD62P) und der Oberfläche von PMN (CD62L) exprimierten Selektinen und ihren korrespondierenden Kohlenhydrat-Liganden auf der Oberfläche der Granulozyten bzw. Endothelzellen ^{9 10 11}. Aufgrund dieser schwachen Wechselwirkungen rollen die Granulozyten, den Scherkräften des Blutstroms folgend, an den Endothelwänden entlang (Rolling) ^{12 13}. Im darauf folgenden zweiten Schritt wird diese schwache Adhäsion durch Wechselwirkungen der auf den Granulozyten exprimierten Oberflächenrezeptoren CR3 (CD11b/CD18) und LFA-1 (CD18/11a) mit bestimmten Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und ICAM-2 auf den Endothelzellen

verfestigt, das Rolling endet und die Granulozyten haften fest an der Endothelwand^{14 15,16}. CR3 und LFA-1 hängen unter normalen Bedingungen nur schwach an ihren Liganden. Sie werden aber von Chemoattraktoren wie dem Zytokin Interleukin-8 (IL-8) in ihrer Konformation verändert, wodurch sich ihre Adhäsionskapazität stark erhöht und die Bindung an ihre Liganden verfestigt wird^{17 18}. Im dritten Schritt, der Diapedese, durchwandern die Phagozyten die Gefäßwand, indem sie sich zwischen die Endothelzellen drängen und mit Hilfe proteolytischer Enzyme die Basalmembran zerstören¹⁹. Auch hier spielen die Integrine CR3 und LFA-1 sowie weitere adhäsive Wechselwirkungen von Molekülen auf Granulozyten und Verbindungsstellen zwischen den Endothelzellen eine Rolle^{20 21}. Im vierten und letzten Schritt wandern die Phagozyten unter Einfluss von chemotaktischen Zytokinen, für die sie spezifische Rezeptoren besitzen, durch das Gewebe zum Ort der Infektion. Diese zielgerichtete Wanderung erfolgt entlang eines Konzentrationsgradienten von chemotaktischen Molekülen und wird als Chemotaxis bezeichnet. Als Chemoattraktoren am Ort der Entzündung für neutrophile Granulozyten und Makrophagen fungieren Stoffe wie IL-8, C5a, Fibrin, Peptid B, Thrombin und LTB₄, die von aktivierten Zellen am Ort der Immunreaktion gebildet werden^{22 23 9}.

1.4 Phagozytose und Oxidativer Burst

Für die Vernichtung von Erregern am Ort der Entzündung spielt die Phagozytose eine entscheidende Rolle. Zunächst binden Opsonine (Komplementfragmente, Imunglobuline, Fibronectin, Akute-Phase-Proteine) an die Oberfläche der eingedrungenen Erreger. Neutrophile Granulozyten erkennen und binden wiederum diese opsonierten Organismen, um sie anschließend in intrazellulären Vakuolen, die mit Lysosomen zu Phagolysosomen verschmelzen, mit Hilfe von bakteriziden und proteolytischen Faktoren zu lysieren^{24 25}. Diesen Prozess bezeichnet man als Phagozytose. Die zur intrazellulären Vernichtung der aufgenommenen Erreger benötigten Substanzen setzen sich vor allem zusammen aus Wasserstoff-Peroxid (H₂O₂), Superoxid-Anionen (O₂⁻) und freien Radikalen⁷. Im Vergleich zum Ruhezustand verbraucht die Synthese dieser Substanzen viel Sauerstoff, weshalb dieser Mechanismus auch Oxidativer Burst genannt wird. Die Aufnahme von opsonierten Erregern wird über die Bindung an Komplement- und IgG-Rezeptoren an der Oberfläche der Granulozyten vermittelt. Dabei werden im Rahmen ihrer Aktivierung präformierte Komplement- und IgG-Rezeptoren aus intrazellulären Granula freigesetzt und an ihrer Oberfläche präsentiert²⁶. Hierbei handelt es sich im Speziellen um die Imunglobulinrezeptoren für die Erkennung von mit IgG beladenen Partikeln (FcγRIII, CD16).

Sie werden zusammen mit CD14, einem Oberflächenrezeptor für die Erkennung von Lipopolysaccharid (LPS) in intrazellulären Pools gespeichert²⁷. LPS, ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, vermittelt im Zusammenspiel mit dem LPS-bindenden Protein LBP, dem transmembranären Signalrezeptor toll-like-receptor 4 (TLR4) und dem mit ihm assoziierten Protein MD2 die Induktion zellulärer Abwehrmechanismen in Leukozyten^{28,29}. Dabei kommt es zu einer gesteigerten Expression von Oberflächenrezeptoren und zu einer vermehrten Synthese proinflammatorischer Substanzen^{30 31 32 33}. Folge dessen ist eine erhöhte Phagozytoseaktivität am Ort der Entzündung und die Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite. Die Stimulation von isolierten Leukozytenpopulationen, aber auch von Vollblut mit LPS, stellt heute ein anerkanntes ex-vivo-Modell für die Untersuchung von Entzündungsreaktionen und septischen Krankheitsbildern dar^{32 34}. Auch die Komplementrezeptoren CR3 (CD11b/CD18) und CR1 (CD35) werden in intrazellulären Pools gespeichert. Nach Stimulation ist ihre Expression im Vergleich zu ruhenden, unstimulierten Granulozyten signifikant erhöht^{35 36}. Beide Rezeptoren vermitteln die Bindung von opsonierten Fremdkörpern über Spaltprodukte des aktivierten Komplementfaktors 3 (C3). Sie besitzen im Rahmen der Phagozytose synergistische Funktionen³⁷, und spielen eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von Granulozyten an Endothelien im Rahmen der Extravasation und Diapedese.

1.5 Interleukin-8

Interleukin-8 (IL-8) ist ein proinflammatorisches Zytokin und gehört zur Gruppe der Chemokine. Proinflammatorische Zytokine werden von einer Vielzahl von Zelltypen als Reaktion auf verschiedene inflammatorische Stimuli wie bakterielle Produkte (LPS), Viren und physikalische Schäden gebildet. Hierzu zählen u.a. Monozyten, Granulozyten, endotheliale Zellen und Fibroblasten. Auch andere proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-6 und IL-1 β sowie physikalische Reize und Viren stimulieren die Synthese von IL-8³⁸³⁹. Interleukin-8 stellt einen potenten und spezifischen Entzündungsmediator dar, der durch Demargination, Aktivierung und Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten proinflammatorische Vorgänge verstärkt. Es ist das wichtigste insbesondere von Granulozyten produzierte Chemokin und steigert und erhält im Rahmen eines autokrinen Regulationsmechanismus die Granulozytenaktivierung aufrecht^{40 41 42}. Es besitzt zwei Hauptaufgaben: Zum einen dirigiert es Leukozyten im Rahmen der Chemotaxis entlang eines steigenden Konzentrationsgradienten zum Infektionsort^{43 44}. Zum anderen wandelt es die rollenden Interaktionen der Leukozyten mit den Endothelzellen in eine stabile Verbindung

um ¹⁸. Es ist nachgewiesen, dass proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-6, und IL-8 bei Patienten mit Sepsis, Trauma oder Verbrennungen signifikant ansteigen ^{45 46 47 48 49 50}. Nach LPS Stimulation wird TNF- α als erstes Zytokin freigesetzt und stimuliert danach die Synthese der Zytokine IL-6 und IL-8 ⁴¹. LPS ist ein potenter Auslöser der Entzündungsreaktion, die für die Pathogenese der Sepsis verantwortlich ist und wurde bereits in mehreren Studien erfolgreich zur Induktion der IL-8-Synthese in Vollblut verwendet ^{51 52}. Die physiologische Regulation der IL-8-Expression geschieht auf transkriptioneller Ebene und wird über die Bindung von Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, AP-1 und NF-IL-6 an Sequenzen im IL-8-Promoter vermittelt ⁵³. Die genauen Mechanismen der Sekretion sind dabei noch nicht genau bekannt.

1.6 L-Selektin (CD62-L)

Zur Gruppe der Selektine (CD62) zählen die auf vaskulären Endothelien exprimierten Adhäsionsmoleküle P-Selektin (CD62P, GMP-140) und E-Selektin (CD62E, ELAM-1) sowie das auf Leukozyten exprimierte L-Selektin (CD62L, MEL-14) ^{54 55}. Sie vermitteln den ersten Schritt der Adhäsion von Leukozyten an das Gefäßendothel und sind somit von zentraler Bedeutung für die Initialisierung von Diapedese und Migration (homing) von aktivierten Phagozyten. Selektine sind transmembranäre Moleküle. Sie unterscheiden sich durch die N-terminale Kette ihres extrazellulären Bereiches, mit der sie an spezifische Kohlenhydratgruppen an der Zelloberfläche binden ⁵⁶. Im Falle des L-Selektins stellt das im Kohlenhydratanteil sulfatisierte Sialyl-Lewis-X Blutgruppen-Antigen den wesentlichen Liganden dar. Lektine kommen auf Endothelzellen (CD34), in Venolen mit hohem Endothel (GlyCam-1) und in Venolen in lymphatischem Schleimhautgewebe (MAdCAM-1) vor ^{57 58 59} ⁶⁰. Werden Endothelzellen durch Zytokine wie LTB₄, C5a, Histamin oder andere proinflammatorische Substanzen wie TNF- α oder Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert, so induziert dies nach wenigen Minuten die Expression des adhäsiven P-Selektins und nach einer Dauer von vier bis zwölf Stunden die Expression von E-Selektin ^{61 62}. Diese Selektine wirken auf die Asialo-Lewis-X-Determinante der Oberflächenglykoproteine neutrophiler Granulozyten und bewirken deren reversible Anheftung an das Endothel. L-Selektin initiiert somit zusammen mit P-Selektin den Kontakt von zirkulierenden Leukozyten mit der Gefäßwand, der zum charakteristischen „Rolling“ am Endothel unter physiologischem, hydrodynamischem Fluss führt ¹³. E-Selektin spielt vermutlich eine Rolle in der späteren Verfestigung dieser Interaktionen ⁶³. Nach Aktivierung mit verschiedenen inflammatorischen

Substanzen, wie zum Beispiel LPS *in vitro*, und während Thioglycollat-induzierter Peritonitis *in vivo*, konnte in vorhergehenden Studien eine proteolytische Spaltung mit anschließendem Abwerfen (shedding) von L-Selektin innerhalb von Sekunden von der Oberfläche neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten nachgewiesen werden^{64 65 66 67}. Die genaue Bedeutung dieses Phänomens ist bislang nicht geklärt. Ein Grund mag in der physiologischen Limitierung einer leukozytär-leukozytären Aggregation und Akkumulation während des Rolling-Prozesses liegen, um eine zielgerichtete Migration erst zu ermöglichen⁶⁷. Es wurde vermutet, dass das Shedding von der granulozytären Oberfläche notwendig für die Migration durch das Endothelium ist⁶⁵, jedoch bewirkt gerade ein blockiertes Shedding von L-Selektin eine gesteigerte Adhärenz und Transmigration⁶⁸. Gewebe-Inhibitoren der Metalloprotease 3⁶⁹, Morphine⁷⁰ und Hydroxi-Säure-Derivate⁷¹ verhindern das Shedding von L-Selektin wahrscheinlich über Proteasen-Hemmung. Es wurde gezeigt, dass eine Inhibierung der Down-Regulation von L-Selektin auf aktivierten PMN durch Metalloprotease-Inhibitoren zu einer Verlangsamung des Leukozyten-Rollings am Gefäßendothel mit konsekutiver Akkumulation führt⁶⁷. Diese Hemmung resultiert in einer signifikanten Steigerung der leukozytären Adhäsion und Transmigration⁶⁸. Crosslinking⁷² und Aktivierung durch Chemoattraktoren und einige nichtsteroidale antiphlogistische Pharmaka⁷³, sowie IL-8¹⁴ führen hingegen zur proteolytischen Spaltung mit entsprechender Zunahme der Leukozytenmobilität und -geschwindigkeit während des Rolling-Prozesses^{74 67}. Ligandenbindung und Crosslinking führen zur leukozytären Aktivierung^{75 76 77 78} im Sinne einer gesteigerten β 2-Integrin-abhängigen Adhäsion. Dies erfolgt über eine gesteigerte Aktivierung der β 2-abhängigen Liganden LFA-1 und ICAM-1 und eine gesteigerten Expression des CD11b/CD18-Rezeptors^{68 76 75 77}. Andere Studien belegen eine generelle intrazelluläre Aktivierung von PMN nach Ligandenbindung oder Crosslinking mit CD62L im Sinne einer intrazellulären Kalziumfreisetzung, Superoxidproduktion und Induktion von mRNA zur Zytokinproduktion^{79 80 76}.

1.7 Oberflächenrezeptoren CR1, CR3 und CD16

Der CR3-Rezeptor gehört zur Gruppe der CD11b/CD18 Adhäsionsmoleküle^{35 81 7} und kommt auf den Zellen der myeloischen Reihe vor. Er verfestigt die Selektin-vermittelten Bindungen zwischen Leukozyten und Endothel und vermittelt so den zweiten Schritt in der Adhäsion und der Migration ins Gewebe⁸². Als wichtigster Rezeptor für die Phagozytose von mit iC3b-opsonierten Partikeln oder Bakterien besitzt er eine Brückenfunktion zwischen extrazellulären Vorgängen und intrazellulären Aktivierungsprozessen⁷, wobei seine

Aktivierung eine Stimulation der Phagozytose²⁴, sowie die granulozytäre Chemotaxis und Aggregation neutrophiler Granulozyten bedingt⁷. CR3 bindet auch direkt, das heißt ohne Komplementaktivierung Mikroorganismen wie Staphylokokkus aureus, E. Coli sowie einige Hefen über membranständige Zuckerphosphate. Er gehört zu einer Familie von drei Oberflächenmolekülen, die kollektiv als Leukozytenintegrine bezeichnet werden. Es handelt sich hierbei um Heterodimere, die aus einer gemeinsamen β_2 -Kette und jeweils einer der drei verschiedenen α -Ketten (CD11a, -11b, -11c) aufgebaut sind. Die beiden anderen Mitglieder dieser Gruppe sind das lymphozytenfunktionsassoziierte Antigen Typ 1 (LFA-1) mit der Zusammensetzung CD18/11a und das p150-95 (CR4) mit der Zusammensetzung CD18/11c. LFA-1 (CD18/11a) ermöglicht die Adhäsion zytotoxischer T-Zellen an Pathogene und spielt eine Rolle in der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten⁷. P150-95 (CD18/11c) ermöglicht im Zusammenspiel mit CR3 die Bindung der Granulozyten an das Endothel der Gefäße und ist wahrscheinlich ebenfalls an der Bindung von iC3b beteiligt⁷. Diese drei Moleküle gehören einer Superfamilie von strukturell verwandten Oberflächenrezeptoren und Adhäsionsmolekülen an, zu denen des weiteren die Fibronectin- und Vitronectin- (-S-Protein-) Rezeptoren, sowie der auf Thrombozyten exprimierte Fibrinogenrezeptor gehören. Sie binden kalziumabhängig an ihre Liganden und besitzen anscheinend eine gemeinsame Bindungsspezifität für die Tripeptide Arg-Gly-Asp. Zusätzliche Sequenz- oder Konformationsdeterminanten beeinflussen ihre individuellen ligandenbindenden Eigenschaften⁸³. Im Ruhezustand wird CD11b/CD18 in sehr geringer Menge auf der Zelloberfläche von PMN, Monozyten und Natürlichen Killerzellen exprimiert^{84 85}. Nach Stimulation wird der Rezeptor jedoch schnell aus präformierten intrazellulären Pools freigesetzt und an der Oberfläche präsentiert^{86 87 88 89 90 91}. Dieser Vorgang ist im Gegensatz zur Expression des CR1 auch von der Aufnahme extrazellulären Kalziums abhängig⁹². Ruhende Granulozyten beinhalten intrazelluläre, membranassoziierte Kalziumspeicher, welche nach Stimulation durch Bindung z.B. von FMLP an Membranrezeptoren schnell in das Zytoplasma ausgeschüttet werden. Diese intrazelluläre Kalziumfreisetzung bewirkt einen zusätzlichen Einstrom von extrazellulärem Kalzium, welcher auch für die Initiierung des Oxidativen Burst notwendig ist⁹³.

Im Gegensatz dazu bindet der auf Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen und Erythrozyten vorkommende Opsoninrezeptor CR1 (CD35) mit hoher Affinität C3b beladene Partikel, sowie auch C4b^{24 7}. Er verstärkt ähnlich wie der CR3 schon bei geringsten Mengen dieser Komplementfaktoren die Phagozytose und dient ebenfalls der Immunadhärenz. Anders als die Bindung von C3bi an CR3 reicht die Bindung von C3b an CR1 jedoch nicht aus, um die

Phagozytose zu stimulieren. Nach Aktivierung durch verschiedene Chemoattraktoren und auch spontan bei 37°C^{84 85 94} wird auch er durch Verlagerung bereits präformierter Rezeptorproteine aus intrazellulären Granula auf der Oberfläche von PMN, Makrophagen, Monozyten und Erythrozyten exprimiert^{88 89 90 91}. Hierfür ist eine alleinige intrazelluläre Kalziumfreisetzung ausreichende Voraussetzung⁹². Neben C3-Spaltprodukten stellt Immunglobulin-G (IgG) ein weiteres, sehr effizientes Opsonin dar. Neutrophile Granulozyten exprimieren Oberflächenrezeptoren für die Fc-Domäne von IgA und IgG^{81 95 96 97}. Dabei werden im Rahmen der PMN-Aktivierung präformierte Komplement- und IgG-Rezeptoren aus intrazellulären Granula freigesetzt und an ihrer Oberfläche präsentiert²⁶. Hierbei handelt es sich im Speziellen um die Immunglobulinrezeptoren für die Erkennung von IgG beladenen Partikeln (FcγRIII, CD16). Sie werden zusammen mit CD14, einem Oberflächenrezeptor für die Erkennung von LPS in intrazellulären Pools gespeichert²⁷ und nach Aktivierung gemeinsam auf der Oberfläche exprimiert. Fcγ-Rezeptoren sind transmembranäre Glykoproteine und gehören zur Immunglobulin-Gen-Superfamilie. Sie binden spezifisch IgG-opsonierte Erreger oder Partikel und initiieren intrazelluläre, vor allem kalziumabhängige Signaltransduktionen. In Kooperation mit CR3 induzieren sie ebenfalls die Phagozytose^{98 95} und den Oxidativen Burst³⁷. Die Fcγ-Rezeptoren werden entsprechend ihrer Affinität zum IgG in drei Klassen unterteilt: FcγRI (CD64) mit hoher Affinität, FcγRII (CD32) mit mittlerer Affinität und FcγRIII (CD16) mit niedriger Affinität. Mit einer Größenordnung von 100000 bis 200000 Rezeptoren pro Zelle stellt der FcγRIII trotz seiner niedrigen Affinität jedoch den wichtigsten IgG-Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten dar⁷.

1.8 Der NB1-Rezeptor (HNA-2a, CD177)

Das Neutrophil-spezifische Antigen NB1 wurde erstmals im Serum alloimmunisierter, schwangerer Frauen entdeckt⁹⁹ und wird von 97% der gesunden Individuen auf neutrophilen Granulozyten, neutrophilen Metamyelozyten und Myelozyten exprimiert^{100 101}. Etwa 56% - 64% der neutrophilen Subpopulationen exprimieren den Rezeptor^{100 102 103 101}, was ihn diesbezüglich einzigartig macht. Er wurde als HNA-2a in die Liste der Humanen Neutrophilen Alloantigene (HNAs) aufgenommen, mit CD177 eingeordnet und der Ly-6 Superfamilie unterstellt. NB1 ist ein 58 kDa bis 64 kDa großes Glykosyl-Phosphatidylinositol verankertes Plasmamembran-Glykoprotein^{102 104} mit 3 N-verbundenen Seitenketten¹⁰⁵, welches auf Plasmamembranen und sekundären Granula exprimiert wird^{102 106}. Seine Funktion ist bisher noch nicht genau geklärt, jedoch wird eine Bedeutung als

Rezeptormolekül im Entzündungsgeschehen angenommen. So wurde die Expression nach Stimulation mit FMLP hochreguliert^{102 104}, wobei dies nicht mit einer Zunahme des Prozentsatzes der CD177-exprimierenden Zellen einherging. Signifikant erhöhte Expressionswerte fanden sich außerdem bei ernsthaften bakteriellen Infektionen, bei Polycythämia vera, sowie nach Behandlung mit granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). Virale Hepatitiden sowie Rheumatoide Arthritis führten zu keiner signifikant vermehrten Expression¹⁰⁷. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor via Bindung an das endotheliale Zelladhäsionsmolekül PECAM-1 eine Rolle in der Transmigration von Granulozyten spielt¹⁰⁸. Die Expression ist vermindert bei Patienten mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie sowie chronisch myeloischer Leukämie, wobei eine mögliche, klinische Relevanz weder bei diesen Erkrankungen, noch bei gesunden, CD177-negativen Menschen bekannt ist^{102 101}. Eine Studie fand für Frauen einen höheren Prozentsatz an CD177-positiven Subpopulationen¹⁰³. Während der Schwangerschaft erhöht sich die Expression des HNA-2a-Antigens ebenfalls¹⁰⁹. Die Rate der Antikörper bindenden Granulozyten war hierbei sowohl im Kollektiv der schwangeren Frauen, als auch im Kollektiv der gesunden Vergleichsgruppe intraindividuell zu mehreren gemessenen Zeitpunkten identisch und scheint konstant zu sein^{100 103}. Weiterhin wurde gezeigt, dass CD177-negative, schwangere Frauen spezifische Antikörper gegen CD177-positive Föten produzieren, was zu mehrwöchigen Neutropenien der Neugeborenen führte⁹⁹. Bluttransfusionen, welche Alloantikörper gegen CD177 enthielten, verursachten schwere TRALI (transfusion related acute lung injury)-Zwischenfälle bei einem CD177-positiven Empfänger¹¹⁰. Auch nach Transfusion von Granulozytenkonzentraten können Antikörper gegen CD177 gebildet werden, was zu fieberhaften Reaktionen und verminderter Lebensdauer der verabreichten Granulozyten führen kann¹¹¹. Es stehen drei monoklonale Antikörper zur Verfügung, 7D8, 1B5 und MEM 166, welche mit Neutrophilen von CD177-positiven, nicht aber negativen Menschen reagieren¹¹².

1.9 Anästhetika

Ketamin gehört in die Gruppe der Kurznarkotika, wobei sich sein Wirkbild erheblich von dem anderer Injektionsnarkotika unterscheidet. Es hemmt den NMDA-Rezeptor, einen Rezeptorsubtyp des erregenden Transmitters Glutamat. Dieses Rezeptorprotein umfasst einen unspezifischen Ionenkanal (Ca^{2+} , Na^+ , K^+), der durch Ketamin im Sinne eines nicht-kompetitiven Antagonismus gehemmt wird. Konzentrationsabhängig kommt es bei Dosen von 2 mg/kg innerhalb einer Minute zu Bewusstlosigkeit, die bis zu 15 Minuten anhält.

Anschließend wird eine Analgesie von ½ bis 1 Stunde beobachtet ¹¹³. Wegen seines stimulierenden kardiovaskulären Effekts wird Ketamin gerne bei septischen oder schwer kranken Patienten verwendet ^{114 115}, wobei dieser Effekt nicht auf einer eigenen adrenergen Wirkung beruht, sondern durch Catecholamine vermittelt wird ¹¹³. Darüber hinaus gibt es in vitro Hinweise auf einen myokardprotektiven Effekt, welcher im Rahmen einer Hemmung der postischämischen Adhäsion möglicherweise zu reduzierten Reperfusionsschäden führt ¹¹⁶. Über den immunmodulativen Einfluss von Ketamin, insbesondere auf die granulozytären Funktionen der Phagozytose und der Adhärenz liegen differente Studienergebnisse vor. So wurden konzentrationsabhängig inhibierende, als auch neutrale Effekte beobachtet ^{117 118 119 120 121 122 123}. Auch über Inhaltsstoffe von handelsüblichen Präparaten liegen Ergebnisse über hemmende immunmodulative Wirkungen vor ¹¹⁷.

Auch Thiopental-Natrium wird zur Einleitung einer Narkose eingesetzt. Durch ausgeprägte Umverteilung im Organismus hält die Narkose nur kurzfristig an. Der eigentliche Wirkungsmechanismus der Barbiturate ist bisher nicht vollständig bekannt, jedoch scheinen sie die Membranen von Nervenzellen zu stabilisieren. Dies mag u.a. über Förderung der Funktion inhibitorischer GABA_A-Rezeptoren zu verminderter Erregbarkeit der Neurone durch Überträgersubstanzen führen ¹¹³. Ähnlich wie für Ketamin konnte auch für Thiopental ein möglicherweise myokardprotektiver Effekt durch eine Hemmung der postischämischen Adhäsion am isolierten Meerschweinchenherzen postuliert werden ¹¹⁶. Für Thiopental sind mehrheitlich supprimierende Effekte auf leukozytäre Funktionen beschrieben worden, welche u.a. auf eine transkriptionelle Hemmung zurückgeführt werden ¹²⁴. Insbesondere für die Phagozytose und die Adhärenz von PMN konnten in Vollblut-Assays ^{122 120}, wie auch an isolierten PMN ^{117 118 125 126 127} inhibierende Effekte beschrieben werden. Uneinigkeit herrscht dabei jedoch über den Einfluss klinisch relevanter bzw. supraklinischer Konzentrationen. Weiterhin gibt es Hinweise auf einen immunmodulativen Einfluss des in handelsüblichen Präparaten enthaltenen Zusatzstoffes Natriumcarbonat ¹¹⁷. Allgemein konnte eine um 40% erhöhte Inzidenz für pulmonale Infektionen bei beatmeten Patienten mit Hirnödem festgestellt werden, welche Thiopental verabreicht bekommen hatten ⁴, was die klinische Relevanz dieser Thematik deutlich macht.

Propofol wird ebenfalls zur Narkoseeinleitung verwendet. Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit des Wirkstoffes liegt das Arzneimittel in einer wässrigen Sojaöl-/Triglyceridemulsion vor, welche den intravenösen Einsatz und den Transport einer lipophilen Wirksubstanz zum Wirkort in einem hydrophilen Milieu gewährleistet. Dem Wirkmechanismus liegen wahrscheinlich physikochemische Ursachen zugrunde. Seine ZNS-

dämpfende Wirkung wird, wie bei den übrigen Hypnotika über eine Aktivierung des GABA_A-Rezeptorkomplexes hervorgerufen¹²⁸. Nach Bolusgabe kann es zu Blutdruckabfällen (MAP) in der Größenordnung von 30 bis 40% des Ausgangswertes kommen, was mit einer Reduktion des Herzzeitvolumens und des peripheren Widerstandes um jeweils 15% einhergeht. Trotzdem wird Propofol aufgrund seines myokardprotektiven Effekts klinisch gerne zur Anästhesie herzinsuffizienter Patienten eingesetzt. Hierfür verantwortlich ist u.a. die antioxidative und hemmende Wirkung auf freie Sauerstoffradikale. Dies bedingt einen protektiven Effekt gegen Reperfusionsschäden¹²⁹. Wegen der raschen Verteilung zeichnet es sich durch einen schnellen Wirkungseintritt sowie eine kurze Wirkdauer aus. Der Effekt tritt nach ca. 1 Minute ein, während die Halbwertszeit $t_{1/2}$ ca. 2 Stunden beträgt. Durch starke Aufnahme ins Gewebe ist die Eliminationshalbwertszeit deshalb wesentlich länger, als aus der Narkosedauer geschlossen werden kann. Durch Nachinjektionen kann die Narkose über längere Zeit unterhalten werden¹¹³. Über immunmodulatorische Effekte auf granulozytäre Funktionen wie Adhärenz, Phagozytose und oxidativen Burst durch Propofol liegen unterschiedliche Studienergebnisse vor. So kam es bei der langkettigen Lipidemulsion in klinisch relevanten Konzentrationen zu einer Hemmung der postischämischen Adhäsion am Meerschweinchenherzen sowie der Phagozytose und des oxidativen Burst¹¹⁶. Die mittelkettige Fettemulsion hingegen aktivierte in klinisch relevanter Konzentration die Phagozytose und in supraklinischer Konzentration auch den oxidativen Burst². Eine andere Studie konnte jedoch weder in klinisch relevanter noch in supraklinischer Konzentration einen Effekt auf die Phagozytose oder den Oxidativen Burst nachweisen¹²⁰. Auf die thrombozytär-neutrophile Aggregation konnte lediglich in supraklinischer Konzentration ein inhibierender Effekt dargestellt werden, der nicht emulsionsabhängig war¹³⁰. Differente immunmodulatorische Einflüsse der Emulsionsbestandteile Intralipid als langkettiges Triglycerid und der mittelkettigen Form Lipuro gelten jedoch als gesichert^{131 3}. Wir verwendeten in dieser Studie *Propofol*-[®] *Lipuro* 2%, (B. Braun Melsungen AG, Deutschland), welches zu 45% aus mittelkettigen Fettsäuren sowie zu 54% aus langkettigen Fettsäuren besteht.

Etomidat entfaltet seine primäre ZNS-depressive Wirkung über eine funktionell reversible Hemmung der Formatio reticularis im Hirnstamm, wobei es auf spinaler Ebene auch zu enthemmenden Effekten kommen kann. Auch hierbei spielen GABA-mimetische Reaktionen eine wesentliche Rolle¹³². Es besitzt im Vergleich zu den bislang klinisch eingesetzten Hypnotika den geringsten kardiovaskulären Einfluss¹³³, senkt den intrakraniellen Druck und kann deshalb auch bei kardiovaskulären und hämodynamisch instabilen Risikopatienten

eingesetzt werden. Die klinische Relevanz einer gezeigten reversiblen, dosisabhängigen Minderung der Cortisolbiosynthese ist fraglich^{134 135}. Etomidat zeichnet sich, ähnlich wie die Thiobarbiturate, durch einen schnellen Wirkungseintritt sowie eine kurze Wirkdauer aus. Dieser Effekt beruht ebenfalls auf einem Umverteilungsphänomen und deutet auf eine Akkumulation im Gewebe hin¹¹³. Ähnlich wie bei Propofol existieren differente Studienergebnisse über den immunmodulativen Einfluss von Etomidat auf die Granulozytenfunktion. So kam es in supraklinischen Konzentrationen zu einer Verstärkung des Oxidativen Burst durch LCT/MCT gelöstem Etomidat³ wie auch durch Intralipid¹¹⁶. Zudem kam es konzentrationsabhängig auch zu einer verminderten Adhärenz¹²⁷, wobei eine postischämische Hemmung der Adhärenz am Meerschweinchenherzen im Sinne eines myokardprotektiven Effekts für Etomidat nicht gezeigt werden konnte¹¹⁶. Auch hier scheinen die verschiedenen Lösungsvermittler der handelsüblichen Präparate eine entscheidende Rolle zu spielen^{136 117 137 2 3}. Wir verwendeten *Etomidat-Lipuro*[®] (B. Braun, Melsungen AG, Deutschland), eine gemischt mittel- und langkettige Fettsäureemulsion.

1.10 Zielsetzung der Studie

In Form eines Vollblut-Assays, bei dem die Neutrophilen Granulozyten in ihrem physiologischen Milieu verbleiben, sollen bei dieser in vitro Studie anhand eines gesunden, männlichen Probandenkollektivs folgende Fragen geklärt werden:

- Welchen Einfluss besitzen die Anästhetika Ketamin, Propofol und Etomidat, sowie das Barbiturat Thiopental auf die spontane und LPS-induzierte Expression der Rezeptoren CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), FcγRIII (CD16) und L-Selektin (CD62L) auf PMN
- Wird die LPS-induzierte Expression des NB1-Rezeptors (HNA-2a, CD177) durch klinisch relevante Konzentrationen der genannten Substanzen beeinflusst?
- In wie weit beeinflussen die genannten Substanzen die spontane und LPS-induzierte Synthese des Zytokin Interleukin-8?
- Welche Unterschiede ergeben sich bezüglich kurzer und langer Inkubationszeiten bzw. klinisch relevanter und supraklinischer Konzentrationen?

2 Material und Methoden

Für die vorliegende Studie wurde mittels Durchflusszytometrie Vollblut auf die Expression der Oberflächenrezeptoren NB1 (CD 177), CD11b, CD16, CD35 und CD62L untersucht. Mittels ELISA wurde die Produktion von Interleukin-8 ermittelt.

2.1 Probenmaterial

2.1.1 Probandenkollektiv

Untersucht wurde das Blut von 12 gesunden, männlichen Probanden im Alter zwischen 20 und 50 Jahren. Sie wurden jeweils vor Versuchsbeginn über Inhalt, Ablauf und Studienziel aufgeklärt und nach Einverständniserklärung in die Studie aufgenommen. Die Studie wurde von der Ethikkommission Giessen genehmigt.

2.1.2 Ausschlusskriterien

Um mögliche Störfaktoren von vornherein einzugrenzen, wurden folgende Ausschlusskriterien für diese Studie festgesetzt:

- akute oder chronische Infekte
- Allergien
- Immunsuppressive Therapien
- Rauchen

2.1.3 Probengewinnung und -aufarbeitung

Die Probenentnahme erfolgte bei allen Probanden zwischen 8 und 11 Uhr morgens. Aus einer peripheren Vene der Ellenbeuge wurden über ein Butterflysystem 10 ml Blut gewonnen, sorgfältig durchmischt und mit EDTA antikoaguliert. Lediglich zur Bestimmung von Interleukin-8 mittels ELISA diente Lithium-Heparinat als Antikoagulanzen. Unmittelbar danach wurden die Proben aufgearbeitet.

2.1.4 Granulozytenisolierung aus Vollblut

Um das Verhältnis von vitalen zu nekrotischen Zellen in Abhängigkeit zur Inkubationszeit *in vitro* zu ermitteln, wurden in Vorversuchen Granulozyten aus dem Vollblut isoliert. Hierzu wurden 4 ml EDTA-antikoaguliertes Blut auf Percoll Gradienten gegeben und anschließend zentrifugiert (4°C, 300 x g, 10 min., ungebremst). Dadurch kam es zu einer Sedation der Granulozyten in einer Bande oberhalb der pelletierten Erythrozyten am Boden des Reagenzröhrchens. Der Überstand mit den darin enthaltenen Granulozyten wurde abpipettiert, in 7 ml PBS-Puffer gelöst und zentrifugiert (4°C, 300 x g, 10 min., ungebremst). Anschließend wurden die restlichen akzidentell übertragenen Erythrozyten mit 4 ml Aqua dest. lysiert. Nach 40 Sekunden wurde die Lyse durch Zugabe von 2 ml NaCl 2,7% abgestoppt und die Proben erneut zentrifugiert (4°C, 300 x g, 10 min, ungebremst). Nachdem der Überstand dekantiert worden war, konnten die nun isolierten Granulozyten in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt werden. Die darauf folgende Verdünnung mit PBS ergab eine Lösung von 10⁶ Granulozyten/ml. Zuletzt wurden die Zellen mit Trypitanblau-Lösung angefärbt und erneut ausgezählt, um die vitalen von den nekrotischen Zellen zu unterscheiden.

2.1.5 Inkubation mit Testsubstanzen

Jeweils 100 µl Vollblut wurden mit folgenden Substanzen inkubiert:

- Ketamin (100 µM, 1mM)
- Thiopental (40 µg/ml, 400 µg/ml)
- Propofol (10 µg/ml, 100 µg/ml)
- Etomidat (0,5 µg/ml, 5 µg/ml)

Die gewünschten Konzentrationen wurden durch standardisierte Verdünnung mit PBS-Puffer erreicht. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37° Celsius.

Als Standardinkubationszeiten wurden 15 und 180 Minuten gewählt, um zwischen sofort und verzögert einsetzenden Effekten unterscheiden zu können.

2.1.6 Stimulation

Nach erfolgter Inkubation mit den Testsubstanzen wurden die Proben 30 Minuten bei 37° Celsius im Brutschrank mit jeweils 10 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) (Fa. Sigma, Serotyp 026:B6) stimuliert.

Um einen möglichen Unterschied der rezeptorregulierenden Effekte der Testsubstanzen bei stimulierten und nichtstimulierten neutrophilen Granulozyten zu erkennen, wurde gleichzeitig eine zweite, unstimulierte Testreihe in supraklinischer medikamenten-inkubierter Konzentration untersucht.

2.2 Bestimmung der Oberflächenantigene CD11b, CD16, CD35 und CD62L

2.2.1 Testprinzip

Beim Testprinzip zur Bestimmung der Oberflächenantigene CR3 (CD11b/CD18), FcγRIII (CD16), CR1 (CD35) und CD62L handelt sich um ein in-vitro-Assay, mit dem die qualitative Expression dieser Oberflächenantigene auf Leukozyten im Vollblut nachgewiesen wird. Als Marker für diese Rezeptoren dienten Fluorescein-Iso-Thiocyanat-(FITC-) markierte monoklonale Antikörper, deren Grünfluoreszenz durchflusszytometrisch bestimmt wurde. Die Negativkontrolle bestand aus unmarkierten Antikörpern gegen diese Oberflächenantigene.

2.2.2 Rezeptor-Markierung

Es wurden jeweils 100 µl Vollblut in ein Probenröhrchen gegeben. Wie unter 2.1.5 und 2.1.6 beschrieben, wurden die Ansätze mit den Testsubstanzen inkubiert sowie mit LPS stimuliert. Zu jeder Probe wurden anschließend 5 µl FITC-markierte Antikörper gegeben, die Negativkontrollen wurden mit jeweils 5 µl unmarkiertem Antikörper beimpft. Für die Bestimmung der Rezeptoren CD11b, CD16 und CD62L verwendeten wir monoklonale Antikörper der Firma Sigma, der Antikörper gegen CD35 wurde von der Firma Santa Cruz bezogen. Um falsche Messergebnisse durch unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper auszuschließen, wurde jeweils ein Ansatz mit FITC-markiertem unspezifischem Anti-Human-IgG Antikörper von PharMingen inkubiert, wobei sich hier im Vergleich zur Bindung des unmarkierten Antikörpers keine Differenzen bezüglich der granulozytären Autofluoreszenz ergaben. Die Ansätze wurden gut durchmischt und für 15 Minuten

lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Lyse und Fixierung der Erythrozyten wurden dann in jedes Röhrchen 2 ml *FACS*[®]-*Brand-Lysing-Solution* gegeben, gemischt und wiederum für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (5 Minuten, 1200 U/min) und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden die Ansätze zweimal mit je 2 ml PBS-Puffer aufgefüllt, gemischt, zentrifugiert (5 Minuten, 1200 U/min) und dekantiert. Um die Fluoreszenzintensität nun durchflusszytometrisch darstellen zu können, wurde in jedes Röhrchen abschließend je 500 µl PBS-Puffer gegeben. Der beschriebene Arbeitsablauf galt für die Darstellung der Oberflächenrezeptoren CD11b, CD16, CD35 und CD62L. Die Ansätze wurden unmittelbar nach Aufarbeitung am FACS gemessen.

2.3 Bestimmung des Oberflächenrezeptors NB1 (CD177)

2.3.1 Testprinzip

Beim Testprinzip zur Bestimmung des Oberflächenrezeptors NB1 (HNA-2a, CD177) handelt es sich ebenfalls um ein in-vitro-Assay. Bei diesem Verfahren wird mittels einer Eichkurve mit einem Kit definierter Antigendichte (*Dako*[®] *Quifikit Beads für quantitative [Granulozyten] Messungen*) eine quantitative Bestimmung der Rezeptordichte für NB1 auf in Vollblut enthaltenen Leukozyten ermöglicht. Als spezifischer Primärmarker für diesen Rezeptortyp diente der unmarkierte monoklonale Antikörper 7D8, der von Prof. Jürgen Bux, Abteilung für Klinische Immunologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bezogen wurde. Für 7D8 ergibt sich üblicherweise ein positiver und ein negativer Peak, so dass eine M1- (negativ) und eine M2- (positiv) Messung erfolgt. Als Negativkontrolle wurde ein unmarkierter monoklonaler IgG-Antikörper verwendet, die Positivkontrolle bestand aus einem unmarkierten monoklonalen CD16 Antikörper (Klon 3G8). Als Sekundärantikörper diente schließlich ein FITC- konjugierter Anti-Rabbit-IgG-Antikörper, der mit seinem F_{ab}-Fragment an das F_c- Fragment der Primärantikörper bindet, und dessen Grünfluoreszenz durchflusszytometrisch gemessen wurde.

2.3.2 Aufarbeitung

Für diesen Ansatz steht ein Kit *Dako*[®] *Quifikit Beads für quantitative (Granulozyten) Messungen* zur Verfügung. Er besteht aus zwei Reagenzien, den Calibration-Beads zur

Darstellung der definierten Antigendichte bestehend aus 5 Peaks (M1 bis M5) sowie den Set-Beads zur korrekten Festlegung des Negativbereichs (M1) und des Positivbereichs (M2).

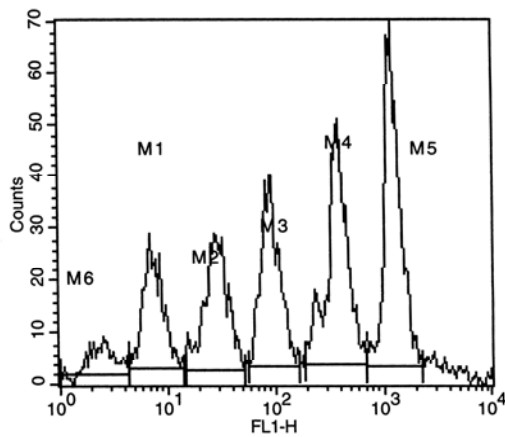


Abbildung 1: Calibration-Beads (Originalregistrierung) zur Darstellung der definierten Antigendichte

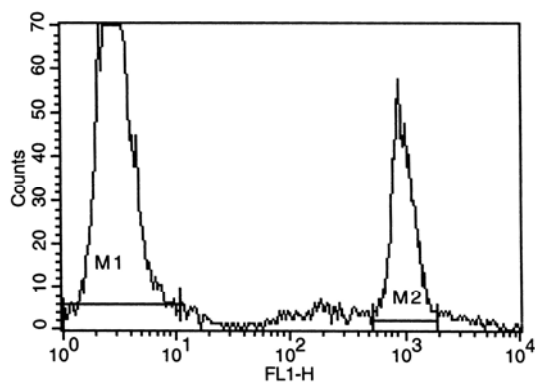


Abbildung 2: Set-Beads (Originalregistrierung) zur Festlegung des Negativbereichs (M1) und des Positivbereichs (M2)

Pro Testreihe wurden je zwei Probenröhrchen mit 3 ml PBS (Kalzium- und Magnesiumfrei) aufgefüllt. In den ersten Ansatz wurden 100 µl Set-Beads gegeben, in den zweiten 100 µl Calibration-Beads. Die Ansätze wurden leicht gemischt, zentrifugiert (5 Minuten bei 1400 U/min) und dekantiert. Anschließend wurden 100 µl eines Sekundärantikörpers (*Dako*[®] *Rabbit-anti-Mouse IgG*, FITC-konjugiert, Stammlösung verdünnt auf 1/40) hinzupipettiert und 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurden die Röhrchen mit PBS aufgefüllt, zentrifugiert (5 Minuten bei 1400 U/min), dekantiert, nochmals mit PBS aufgefüllt, zentrifugiert (5 Minuten bei 1400 U/min), und dekantiert. Zum sofortigen Messen der Ansätze am Durchflusszytometer wurden jeweils 500 µl PBS in beide Röhrchen gegeben.

2.3.3 Rezeptormarkierung

Es wurden jeweils 100 µl EDTA-antikoaguliertes Vollblut in ein Probenröhrchen gegeben. Die Proben wurden wie unter 2.1.5 und 2.1.6 beschrieben mit den Testsubstanzen inkubiert sowie mit LPS (Lipopolysaccharid) stimuliert. Die Proben wurden jeweils mit 25 µl unmarkiertem monoklonalem 7D8-Antikörper beimpft. Um eine Referenz zum erwarteten negativen und positiven Peak zu erhalten, wurden in die Negativkontrolle 20 µl unmarkierter monoklonaler IgG-Antikörper pipettiert und in die Positivkontrolle 20 µl unmarkierter monoklonaler CD16-Antikörper gegeben. Die Ansätze wurden gut gemischt und für 30 Minuten im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Zur Erythrozytenlyse wurden anschließend in jedes Röhrchen 1800 µl Aqua dest. gegeben. Die Ansätze wurden gemischt und die Lyse nach 60 Sekunden durch Zugabe von jeweils 200 µl 10-fach konzentriertem PBS (w/o Kalzium²⁺ + Magnesium²⁺) unterbrochen. Nach erneutem Mischen wurden die Röhrchen mit 1-fach konzentriertem PBS (w/o Kalzium²⁺ + Magnesium²⁺) aufgefüllt, zentrifugiert (5 Minuten bei 800 U/Min), dekantiert, wiederum mit PBS aufgefüllt, gemischt, erneut zentrifugiert (5 Minuten bei 800 U/Min) und dekantiert. Anschließend wurden je 100 µl Sekundärantikörper (*Dako*[®] *Rabbit-anti-Mouse IgG*, FITC-konjugiert, Stammlösung verdünnt auf 1/40) zu jedem Ansatz gegeben, gemischt und 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Röhrchen wieder jeweils zweimal hintereinander mit PBS aufgefüllt, zentrifugiert (5 Minuten bei 800 U/Min) und dekantiert. Zur sofortigen Messung am Durchflusszytometer wurden zum Schluss 500 µl PBS in jedes Röhrchen gegeben. Zunächst wurde dabei die Granulozytenpopulation, ähnlich wie bei der Messung der übrigen Oberflächenmoleküle, durch entsprechendes Setzen eines Gates eingegrenzt. Die Kontrollwerte für den Positiv- und Negativbereich dienten in Bezug zu den ermittelten Set-Beads zur definitiven Festlegung der Referenzbereiche für 7D8. Anhand der durch die Calibration-Beads definierten Antigendichte konnten somit durch den Vergleich der entsprechenden Peaks genaue quantitative Aussagen über Veränderungen in der Expression des NB1-Rezeptors gemacht werden.

2.4 Bestimmung der spontanen und LPS-induzierten Produktion von Interleukin-8 mittels ELISA

2.4.1 Prinzip

Mittels des ELISA-Verfahrens (enzyme-linked immuno sorbent assay) kann mit Hilfe einer enzymvermittelten Reaktion die Wechselwirkung einer Vielzahl von Antigen- und Antikörperreaktionen nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der Interleukin-8-Konzentration im Plasma wurde in dieser Studie ein Sandwich-ELISA-Verfahren angewandt. Hierbei handelt es sich um ein standardisiertes Verfahren, bei dem ein an den Kunststoff einer Mikrotiterplatte fixierter Antikörper einen Immunkomplex mit dem im Probenplasma enthaltenen Interleukin-8-Molekül bildet. Ein zweiter enzymmarkierter Antikörper bindet an eine weitere antigene Determinante des Interleukin-8, sodass die Immunkomplexe nach Zugabe eines chromogenen Substrates identifiziert und mit der Konzentrationseinheit pg/ml quantifiziert werden können.

2.4.2 Probenaufarbeitung

Die Entnahme der Blutproben erfolgte wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben. Das gewonnene Vollblut wurde mit RPMI Medium im Verhältnis 1:5 verdünnt, in Culture Plates pipettiert und wie in Kapitel 2.1.5 beschrieben mit den jeweiligen Testsubstanzen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zur Zytokinsyntheseinduktion wurden die entsprechenden Proben im Anschluss, wie in Kapitel 2.1.6 dargelegt, mit 10 ng/ml LPS beimpft und anschließend über einen Zeitraum von 8 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Gemisch in einzelne Eppendorf-Hütchen umpipettiert, bei 2500 Umdrehungen/Minute über 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand anschließend als Plasma abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C tiefgefroren.

Die folgende Aufarbeitung erfolgte streng nach der Arbeitsanleitung des ELISA-Kits *OptEIA™ Human Il-8 Sets* (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Am Vortag wurde der Anti-Human Il-8 Capture Antikörper mit einem entsprechend angesetzten Coating Buffer (0,1 Mol Carbonat + 8,4g NaHCO³ + 3,56g Na²CO³ mit Aqua Dest aufgefüllt auf 1 Liter, pH 9,5; bei 2-8°C haltbar bis zu 7 Tagen) verdünnt, die entsprechenden Mikrotiterplatten mit je 100 µl dieser Antikörperlösung pro Impfzylinder beschichtet, bei 4°C über Nacht inkubiert und somit fixiert.

Am Folgetag wurden die Platten zunächst dreimal mit je 300 µl pro Impfzylinder einer Waschlösung (PBS, Fa. BAG, Lich + 0,05% Tween-20) gewaschen und anschließend mit je 200 µl Assay-Diluent (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um die Antikörper-Antigen-Reaktion zu blockieren. In dieser Zeit wurden Interleukin-8-Standardkonzentrationen im Sinne einer absteigenden geometrischen Verdünnungsreihe von 200 pg/ml bis 3,125 pg/ml sowie ein unverdünnter Nullstandard erzeugt, anhand derer bei der späteren Messung die Standarddeichkurve erstellt wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten zunächst erneut dreimal mit jeweils 300 µl Waschlösung gewaschen. Anschließend wurden die Standards mit je 100 µl hinzupipettiert und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. 15 Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit wurde der Working Detector (Lösung aus Avidin-HRP-Konjugat und biotinyliertem Antikörper gegen eine weitere Determinante des Il-8) angesetzt, die Platten dann erneut fünfmal mit jeweils 300 µl Waschlösung gewaschen, um anschließend mit je 100 µl Working Detector beimpft zu werden. Nach einstündiger Inkubation bei Raumluft wurden die Platten siebenmal mit Waschlösung gewaschen. Daraufhin wurden je 100 µl Substratlösung (Tetramethylbenzidin und Hydrogenperoxid) hinzupipettiert und die Platten für 30 Minuten im Dunkel inkubiert. Die Farbreaktion von blau nach gelb wurde dann mit je 50 µl einer Stopplösung (2NH₂SO₄) unterbrochen und die Proben anschließend mit einem *ELISA-Reader* (Bio-Rad, USA) mit einer Wellenlänge von 450 nm gegen die Standardverdünnungsreihe gemessen. Das Errechnen der Konzentrationen sowie das Erstellen der Standarddeichkurve erfolgte automatisch durch die Software des Plattenphotometers. Alle Bestimmungen wurden in Doppelansätzen durchgeführt, um etwaige Aufarbeitungsfehler anhand des Variationskoeffizienten zu erkennen. Die jeweiligen Standards wurden für jede Platte separat erstellt.

2.5 Prinzip der Durchflusszytometrie

2.5.1 Optik- und Detektionssystem

Das zur Probenanalyse verwendete *FACSCalibur*[®]-Durchflusszytometer (Fa. Becton Dickinson) besitzt einen Argon-Ionenlaser mit einer 488 nm Emissionslinie, der mit einer Leistung von 15 mW betrieben wird. Das Gerät ist mit einem *Power-Mac*[®]-Computer der Fa. *Apple* verbunden, über den die Datenauswertung der Messungen mit dem Programm *Cell Quest*[®] (Fa. Becton Dickinson) erfolgte. Grundprinzip der durchflusszytometrischen Untersuchung ist die Analyse von Fluoreszenz und Streulicht als Signal einer einzelnen Zelle

bei Kontakt mit einem Lichtstrahl. Dazu werden die Zellen in einer Suspension von Einzelzellen der Reihe nach zu einem Messpunkt geleitet, an dem sie von einer Lichtquelle durchleuchtet werden. Ihre jeweils spezifische Fluoreszenz- und Streulichtemission wird anschließend von Detektionssystemen erfasst, quantifiziert und in ihrer Summe analysiert. Der Anregungsteil besteht aus einem gleichphasigen (kohärent) überwiegend monochromatischen Laserlicht einheitlicher Amplitude der Wellenlänge 488 nm. Damit ist es in der Lage, spezifische Fluoreszenzfarbstoffe anzuregen. Der Laserstrahl zeigt in seinem Querschnitt eine Gauß'sche Energieverteilung mit dem Maximum in der Mitte. Er wird in seinem Verlauf von prismatischen Linsen verformt und besitzt am Messpunkt einen elliptischen Durchmesser von ca. $20 \times 60 \mu\text{m}$, um einen Kompromiss zwischen hoher räumlicher Auflösung und Signalintensität zu erreichen. Beim Auftreffen auf die sich in der Messkapillare befindlichen Einzelzellen wird das Licht durch die morphologischen Eigenschaften der jeweiligen Zelle in seinem gradlinigen Verlauf beeinflusst und gestreut. In den Detektionsbereichen wird diese Streustrahlung dann von Fotozellen und -dioden in elektrische Signale umgewandelt. Verantwortlich für diese Streuung sind vor allem Zellgröße, -form, -granularität und -oberfläche. Diese Parameter ermöglichen in der durchflusszytometrischen Analyse eine spezifische Charakterisierung der physikalischen und funktionalen Eigenschaften der jeweiligen Zelle. Der Detektionsteil gliedert sich in zwei Bereiche auf, die auf Grund des Streuwinkels des Lichts rechtwinklig zueinander angebracht sind. Der eine Teil misst das Vorwärtsstreulicht, auch *Forward Angle Light Scatter* (FSC) genannt, dessen Streuung hauptsächlich im Winkelbereich von $0-10^\circ$ erfolgt. Das FSC wird primär durch die Größe der Zelle beeinflusst. Der andere Teil misst einerseits das Seitwärtsstreulicht, *Side Scatter* (SSC), das in einem 90° Winkel abgelenkt wird und von der Dichte bzw. Granularität der Zelle abhängt, sowie die Fluoreszenz. Das SSC wird beeinflusst durch Oberflächenbeschaffenheit, Granularität und Zelldichte. Auf Grund dieser für jede Zellpopulation charakteristischen Streulichtparameter lassen sich Zellpopulationen, wie z.B. Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten voneinander unterscheiden. Prinzipiell ist somit jede Art von Zelle geeignet, durchflusszytometrisch untersucht und klassifiziert zu werden, solange sie in einer Einzelzellsuspension vorliegt. Als Fluoreszenz bezeichnet man die Lichtemission von Molekülen nach Absorption energiereicher Strahlung. Dabei werden die Elektronen eines Atoms durch ein geeignetes Anregungslicht auf ein höheres Energieniveau gehoben. Bei der spontanen Rückkehr dieses Atoms auf sein Ausgangsniveau wird ein Photon emittiert. Die Gesamtzahl der emittierten Photonen ist dem entstehenden Fluoreszenzsignal proportional. Zur Spezifizierung der hier zu untersuchenden

Oberflächenrezeptoren wurden fluorochromkonjugierte Antikörper verwendet. Fluorochrome sind fluoreszierende Verbindungen, die einen jeweils für sie charakteristischen Wellenlängenbereich besitzen, in dem sie Lichtenergie absorbieren. Der für sie spezifische Exzitationsbereich (Anregungsbereich), in dem sie von einer Lichtquelle angeregt werden können, muss mit dem Exzitationsbereich des verwendeten Lasers (488 nm) weitestgehend übereinstimmen. In dieser Studie wurde deshalb FITC (Fluoreszein-Iso-Thiocyanat) als Fluorochrom gewählt. Es emittiert eine Grünfluoreszenz der Wellenlänge 525 nm und wird vom Durchflusszytometer als Fluoreszenz 1 (FL1) gemessen. Grundsätzlich ist außerdem auch die Verwendung von weiteren Fluorochromen mit unterschiedlichem Abstand zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge (z.B. Rotfluoreszenz mit 620 nm bei Propidiumjodid) zur Mehrfarbenfluoreszenzanalyse möglich, was eine Erweiterung des durchflusszytometrischen Anwendungsspektrums bedeutet. Diese können dann gesondert gemessen werden (z.B. FL2)

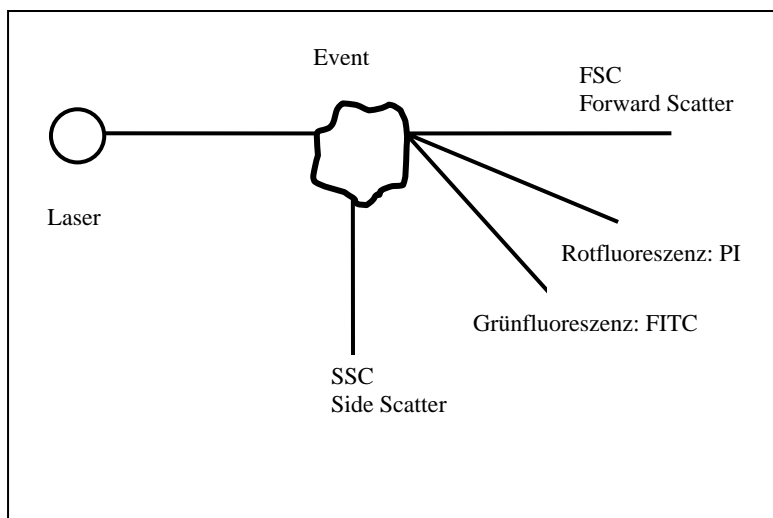


Abbildung 3: Prinzip der Funktionsweise eines Flow-Zytometers. Der Laserstrahl wird durch eine Zelle oder einen allgemeinen „Event“ abgelenkt. Schema modifiziert nach Perschel ¹³⁸

2.5.2 Flüssigkeitssystem

Ein Durchflusszytometer besitzt zwei Leitungen. Über die erste wird kontinuierlich eine Trägerflüssigkeit (*FACS-Flow*[®], Fa. Becton Dickinson) in die Messzelle und weiter in den Abfalltank gepumpt. Die zweite Leitung transportiert die Zellsuspension entweder per Überdruck oder über ein Ansaugsystem vom Probenröhrchen zur Messzelle, in der beide Flüssigkeiten aufeinander treffen. Diese sollten den gleichen Brechungsindex haben. Durch

den höheren Druck des Hüllstroms aus Trägerflüssigkeit (sheath flow) wird der innere Probenstrom zu einer dünnen Linie ausgezogen und in der Weise verengt, dass die einzelnen Zellen perlschnurartig hintereinander zum Messpunkt geleitet werden. Durch die Verengung kommt es zu einer Beschleunigung des Zellstroms von anfänglich einigen Zentimetern/Sekunde auf ca. sieben Meter/Sekunde. Dieser Prozess wird als „hydrodynamische Fokussierung“ bezeichnet und gewährleistet, dass die Zellen einzeln hintereinander am Messpunkt des Detektionssystems vom Laserstrahl erfasst werden können.

2.5.3 Signalverarbeitung

Die Höhe des elektrischen Signals hängt von der Intensität des Streulichtsignals ab. Da das Seitwärtsstreulicht (SSC) und die Fluoreszenz relativ schwache Lichtsignale darstellen, müssen sie besonders verstärkt werden. Hierzu dient eine Photoröhre, in der nach Auftreffen von Photonen Elektronen emittiert werden, die an benachbarten Elektroden wiederum Elektronen freisetzen und so zu einer Kettenreaktion führen, die das ursprüngliche Signal um ein Vielfaches verstärkt. Bei Fluoreszenzmessungen reicht der Spielraum der Messbereiche von einer geringen Autofluoreszenz bis hin zu mehreren tausend Fluoreszenzäquivalenten. Um das weite Spektrum der unterschiedlichen Messbereiche abdecken zu können, stehen eine logarithmische und eine lineare Signalverstärkung zur Auswahl. Echte Signale werden von Störsignalen durch eine elektronische Schwelle (Threshold) unterschieden, die in diesem Fall vom Vorwärtsstreulicht (FSC) ausgelöst wird. Die registrierten elektrischen Signale werden dann von einem Analog-/Digitalwandler von Volt in eine Klassenzahl umgerechnet, deren Werte zwischen 0 und 1024 (1024-Klassenauflösung) liegen können, und auf einem Speichermedium abgelegt.

2.6 Darstellung der Messergebnisse

Die spezifische Fluoreszenzintensität eines Messparameters wird in einem Histogramm- oder Häufigkeitsdiagramm dargestellt. Hierbei werden die Zellen entsprechend ihrer Fluoreszenzintensität verschiedenen Intensitätskanälen bzw. „Klassen“ zugeordnet und dabei im Histogramm gegen die absolute Zellzahl aufgetragen. In Abhängigkeit von der zuvor gewählten Signalverarbeitung und der elektrischen Spannung des Zytometers werden die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten innerhalb einer Zellpopulation in 256 oder 1024 Klassen verteilt. Bei der Histogrammanalyse können die verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch das Setzen geeigneter Gates in negative (nichtfluoreszierende)

und positive (fluoreszierende) Zellen eingeteilt werden. Durch die Verwendung einer geeigneten, unmarkierten, nichtfluoreszierenden „Negativkontrolle“ kann ein Wert definiert werden, bis zu dem die Fluoreszenz einer Zelle noch als negativ zu gelten hat. Diese Abgrenzung der negativen Zellen wird bei der anschließenden Messung der relevanten Proben beibehalten und ermöglicht den Ausschluss unspezifischer Fluoreszenz durch Spontanfluoreszenz der Zellen bzw. unspezifischer Bindung FITC-konjugierter Antikörper. Die graphische Darstellung der Messparameter erfolgt als Punktehistogramm (Dot Plot). Zellgröße (FSC), Zellstruktur (SSC) sowie die jeweiligen Fluoreszenzen einer Zelle können miteinander korrelierend dargestellt, und als Parameter auf den beiden Intensitätsachsen eines Koordinatensystems aufgetragen werden. In der Zweiparameterdarstellung stellt sich dabei jeder Punkt als Schnittpunkt zweier Messparameter (FSC, SSC) in der so entstandenen Matrix dar, und charakterisiert jeweils eine bestimmte Zelle mit ihren spezifischen Merkmalen. Die im FSC/SSC-Diagramm dargestellten charakteristischen Verteilungsmuster der einzelnen Zellpopulationen können nun durch das Setzen eines Auswertefensters (Gate) gesondert betrachtet und untereinander sowie von Zelltrümmern abgegrenzt werden. In dieser Studie konzentrierten wir uns auf die Granulozyten.

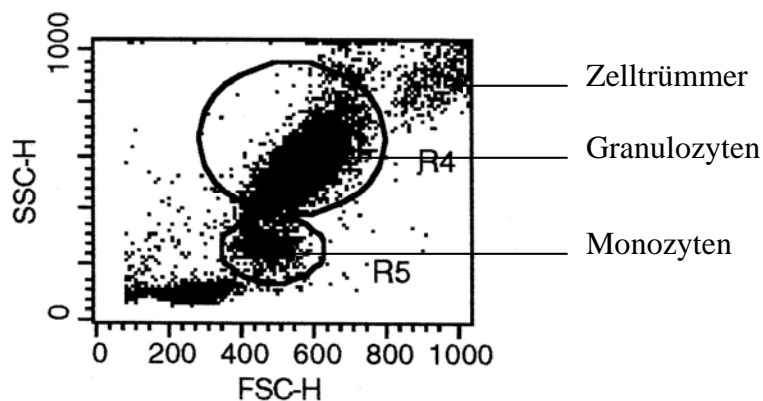


Abbildung 4: FSC/SSC-Diagramm (Originalregistrierung). Durch Setzen eines Gates können die einzelnen Leukozytenpopulationen voneinander abgegrenzt und selektiv ausgewertet werden.

Eine differenzierte Aussage über neutrophile Granulozyten kann jedoch nur aufgrund der quantitativen Überlegenheit dieser Subpopulation im Vollblut erfolgen, da basophile und eosinophile Granulozyten ebenfalls im Auswertefenster miterfasst werden. Nach Setzen eines Gates auf die Granulozyten kann die Fluoreszenzintensitätsverteilung dieser Zellen als Histogramm (Einfachfluoreszenz) oder als Punktwolke (Mehrfarbenfluoreszenz) dargestellt werden. Die negativen Zellen erscheinen dann in einem Bereich, in dem bis zu einer

bestimmten Klasse auch Autofluoreszenz und unspezifische Bindungen abgebildet werden. Dieser Bereich wird durch Setzen eines Gates (M1) von den positiven Zellen abgegrenzt, deren Fluoreszenzintensitäten oberhalb des vorher definierten Grenzwertes liegen. Die positiven Zellen werden nun ebenfalls „gegatet“ (M2), so dass 100% der gemessenen Zellen innerhalb dieser beiden Auswertefenster liegen. Um einen objektiven Vergleich zwischen verschiedenen Proben anstellen zu können, muss bei jeder Messung sichergestellt werden, dass der Peak der Negativkontrolle vor einer definierten, festgelegten Marke liegt (z.B. 10^1). Das von uns verwendete Histogramm trägt die gemessene Grünfluoreszenz (FL1) gegen die Häufigkeit auf. Granulozyten, die kein Antigen exprimieren, erscheinen wegen der damit verbundenen niedrigen Fluoreszenzintensität im Auswertefenster M1 am linken Bildrand.

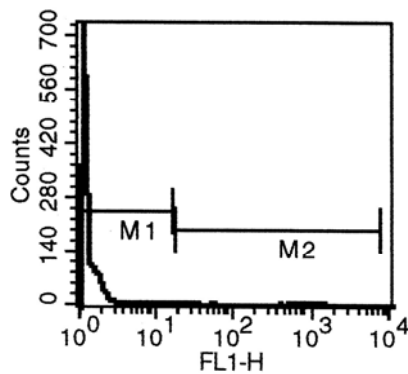


Abbildung 5: Die Negativkontrolle durch nicht-fluoreszierende Antikörper entspricht der granulozytären Autofluoreszenz

Antigenpositive Zellen stellen sich hingegen wegen der höheren Fluoreszenzintensität weiter rechts im Auswertefenster M2 dar.

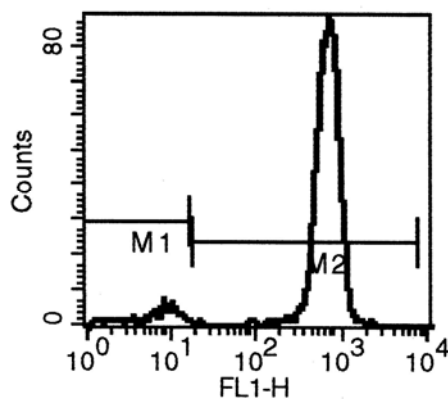


Abbildung 6: Durch Markieren der PMN mit FITC-konjugiertem Antikörper gegen das zu untersuchende Oberflächenantigen ergibt sich eine starke Zunahme der Grünfluoreszenz.

2.7 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten diente die Software *CellQuest*[®] (Fa. Becton Dickinson), welche auf der Auswertung der Histogramm und Zweiparameter-Darstellungen basiert. Die Zählrate betrug bei jeder Messung exakt 10000 Zellen. Angezeigt werden verschiedene Parameter, wie die Anzahl der Ereignisse, die relativen Prozentanteile der Zellen in den jeweiligen Auswertefenstern, Mittelwert, Median und der Modus der Signalintensität. Zur Auswertung der Ergebnisse diente hier der Median der Signalintensitäten (MFI = Median der Fluoreszenzintensität). Der Median entspricht dem Wert, bei dem 50% der Messergebnisse oberhalb dieses Wertes liegen und 50% unterhalb. Er wird von „Ausreißern“ wie Zelltrümmern oder Artefakten nur wenig beeinflusst und hat deshalb eine gute Aussagekraft hinsichtlich des Signalwertes. Im Vergleich zum Mittelwert ist der Median etwas resistenter gegenüber Veränderungen der Fluoreszenzintensität. Lediglich zur Auswertung des Oberflächenrezeptors NB-1 diente der Mittelwert der Signalintensitäten als Referenzwert. Dieser wurde anschließend mittels eines Excel-Programms mit den standardisierten Antigendichten der Cal-Beads verrechnet und so zu einem Wert mit quantitativer Aussagekraft umgeformt.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Messergebnisse wurde mit Hilfe der Statistiksoftware BIAS durchgeführt.

Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung überprüft. Da in der Regel die Hypothese der Normalverteilung verworfen werden musste, wurden für die statistische Analyse nichtparametrische Verfahren verwandt.

Bei Vergleichen von mehreren abhängigen Parametern wurde eine Rangvarianzanalyse für verbundene Stichproben mit dem Friedman-Test durchgeführt. Dieses Verfahren prüft die Null-Hypothese: Die verschiedenen abhängigen Parameter sind hinsichtlich der Messergebnisse vergleichbar. Wurde diese Null-Hypothese verworfen, so wurde als multipler Anschlussstest der Wilcoxon-Wilcox-Test durchgeführt, um die paarweisen Unterschiede zwischen den Parametern zu untersuchen.

Für Vergleiche zwischen zwei unabhängigen Gruppen wurde der Mann-Whitney U-Test angewandt. Das Signifikanzniveau dieser Arbeit beträgt $p < 0,05$ ¹³⁹ ¹⁴⁰.

3 Ergebnisse

3.1 Vitalitätsprüfung

Um eine medikamenteninduzierte Nekrose der Granulozyten als Ursache für eine Immunmodulation auszuschließen, führten wir nach Inkubation (Kapitel 2.1.5) und Isolierung (Kapitel 2.1.4) eine Vitalitätsprüfung durch. Es zeigte sich nach Färbung der isolierten Granulozyten mit Tryptanblau ein Anteil von 95-98% vitaler Zellen. Dies entsprach den Ergebnissen einer Vorinkubation mit NaCl 0,9%. Nach Färbung mit Propidiumiodid fanden wir in der durchflusszytometrischen Untersuchung einen Anteil nekrotischer Zellen von 3-6%. Dieses Ergebnis zeigt, dass immunmodulierende Effekte der getesteten Medikamente nicht auf eine Vitalitätsminderung der Granulozyten zurückzuführen sind.

3.2 LPS-induzierte und medikamentenunabhängige Effekte auf die Expression von Oberflächenrezeptoren und der IL-8-Synthese

Es zeigte sich, dass die Spontanexpression des Komplementrezeptors CR3 in der unstimulierten Kontrolle im zeitlichen Verlauf von 3 Std. um ca. 30% abnahm, wohingegen die LPS-stimulierte Kontrolle um ca. 15% zunahm. Der dargestellte zeitlich signifikante Effekt der unstimulierten, medikamenteninkubierten Proben ist daher wohl durch die abnehmende Spontanexpression auch der Kontrollen bedingt und somit nicht als medikamentös induziert zu bewerten.

Durch LPS wird eine proteolytische Spaltung mit anschließendem Abwerfen (Shedding) des CD62L-Rezeptors auf neutrophilen Granulozyten induziert, was in unserer Untersuchung zu einer drastischen Reduktion der Rezeptordichte um ca. 85% führte. Hierdurch ergaben sich in den LPS-stimulierten Medikamentenproben numerisch nur geringe Effekte (siehe Abbildung 32, 38, 44, 50). Durch die geringe Standardabweichung wurde jedoch zum Teil das Signifikanzniveau erreicht. Ähnlich, wie beim CR3-Rezeptor fand sich auch beim CD62L-Rezeptor im zeitlichen Verlauf von 3 Stunden eine weitere Spontansuppression von ca. 20% im LPS-stimulierten Vollblut. Die gemessenen signifikant zeitlichen Effekte bei 3-stündig inkubierter supraklinischer Konzentration aller untersuchten Testsubstanzen war annähernd proportional zu der ebenfalls um 20% abnehmenden Rezeptorendichte der LPS-stimulierten Vergleichskontrolle. Ein medikamentöser Effekt scheint hier deshalb ebenfalls unwahrscheinlich.

Der CD16-Rezeptor zeigte eine hohe Spontanexpression. Diese konnte durch LPS-Stimulation nur um etwa 30% gesteigert werden.

Die Ergebnisse der Interleukin-8-Synthese zeichneten sich in dieser Untersuchung durch eine hohe Standardabweichung nach Medikamenteninkubation aus. Im unstimulierten Vollblut fanden wir in den Messreihen beider Inkubationszeiten eine durchschnittliche IL-8 Konzentration von 29 pg/ml. Die Stimulierung mit LPS führte in Abhängigkeit von der gewählten Inkubationszeit zu unterschiedlichen Ergebnissen: Während die Zytokinsynthese in der 15 Minuten-Reihe auf 548 pg/ml gesteigert wurde, verstärkte sich die Synthese nach 3 Stunden auf 663 pg/ml.

3.3 Ketamin

3.3.1 CR3 (CD11b/CD 18-Expression)

Es wurde der Einfluss zweier verschiedener Ketaminkonzentrationen auf die CR3 (CD11b/CD18)-Expression neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von Inkubationszeit und LPS-Stimulation untersucht (dargestellt sind hierbei Median \pm Standardabweichung bei $n = 12$). Nach 15 Minuten zeigte sich in der unstimulierten Probe mit supraklinischer Ketaminkonzentration von 1 mM keine Veränderung. Nach LPS-Stimulation jedoch konnte eine signifikante Suppression der Komplementrezeptorexpression um ca. 10% ($p: 0,009$) bei einer klinisch relevanten Ketaminkonzentration von 100 μ M beobachtet werden. Bei der supraklinischen Konzentration wurde die Expression sogar um ca. 30% vermindert ($p: 0,009$). Nach 180 minütiger Inkubation zeigten sich ähnliche Effekte. Zusammenfassend ließ sich eine konzentrationsabhängige Suppression der CR3-Expression durch Ketamin auf neutrophilen Granulozyten nachweisen.

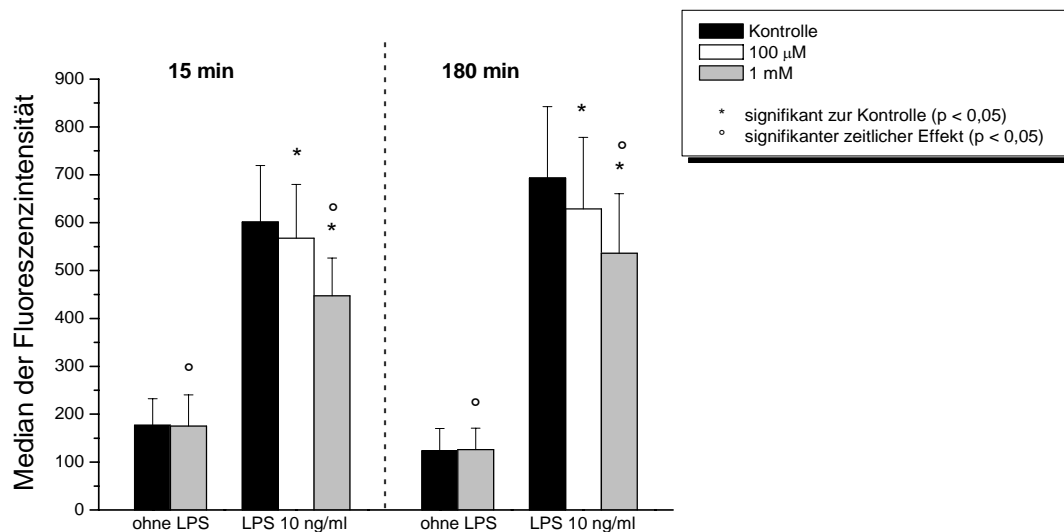


Abbildung 7: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD11b/CD18) auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Ketamin in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.3.2 CD 16-Expression

Die Expression des Fc γ -Rezeptors CD16 wurde durch die Inkubation mit Ketamin ebenfalls in stimulations- und konzentrationsabhängiger Weise verringert, wenn auch weniger stark als der CR3-Rezeptor (n = 12, dargestellt sind Median \pm Standardabweichung). Die Spontanexpression wurde durch die supraklinische Ketaminkonzentration nicht beeinflusst. Nach LPS-Stimulation zeigte sich in supraklinischer Konzentration jedoch sowohl nach 15 Minuten (p: 0,018) als auch nach 180 Minuten (p: 0,018) eine signifikante Suppression von 10%. In klinisch relevanter Konzentration zeigte sich hierbei kein signifikanter Effekt.

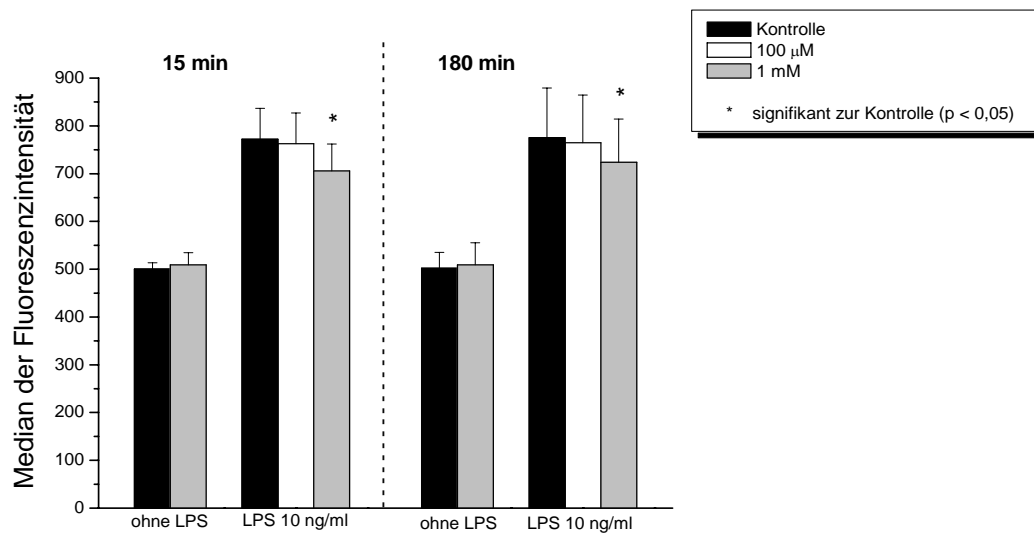


Abbildung 8: Expression des Oberflächenrezeptors CD16 auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Ketamin in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.3.3 CR1 (CD35)-Expression

Ketamin supprimierte in dieser Studie die Expression des CR1 (CD35)-Rezeptors stimulations- und konzentrationsabhängig ($n = 12$, dargestellt sind Median \pm Standardabweichung). In unstimuliertem Vollblut zeigte sich kein signifikanter Effekt. Nach LPS-Stimulation kam es jedoch in supraklinischer Konzentration von 1 mM zu einer frühzeitig einsetzenden signifikanten Suppression. Nach 15 Minuten zeigte sich eine Suppression von ca. 25% ($p: 0,018$), nach 3 Stunden war noch eine 20% Suppression nachzuweisen ($p: 0,018$). Die klinisch relevante Konzentration von 100 μM erbrachte keinen eindeutigen Effekt. Diese Beobachtung sprach für eine frühzeitig ketamininduzierte Abnahme der CR1 (CD35)-Rezeptordichte in supraklinischer Konzentration auf neutrophilen Granulozyten.

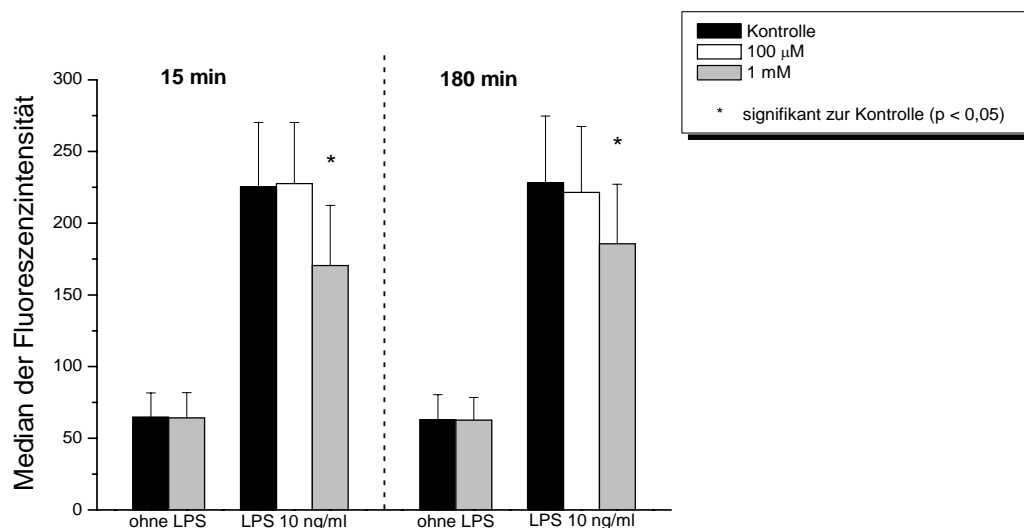


Abbildung 9: Expression des Oberflächenrezeptors CD35 auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Ketamin in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.3.4 CD62L-Expression

Nach LPS-Inkubation supprimierte Ketamin die Expression des CD62L-Rezeptors zeit-, stimulations- und konzentrationsabhängig ($n = 12$, dargestellt sind Median \pm Standardabweichung). Nach LPS-Stimulation wurde bereits nach 15 Minuten sowohl in klinisch relevanter Konzentration von $100 \mu\text{M}$ ($p: 0,017$), als auch in supraklinischer Konzentration von 1 mM ($p: 0,026$) das Signifikanzniveau erreicht und eine Suppression von ca. 20% gezeigt. Nach 3 stündiger Inkubation stellten sich ähnliche Effekte dar, wobei hier auch ein signifikant zeitlicher Effekt in supraklinischer Konzentration gezeigt werden konnte ($p: 0,017$). Zudem zeigte sich nach drei Stunden auch eine signifikante Suppression der CD62L-Rezeptorendichte im unstimulierten Vollblut von ca. 10%, die nach 15 Minuten noch nicht nachzuweisen war ($p: 0,048$).

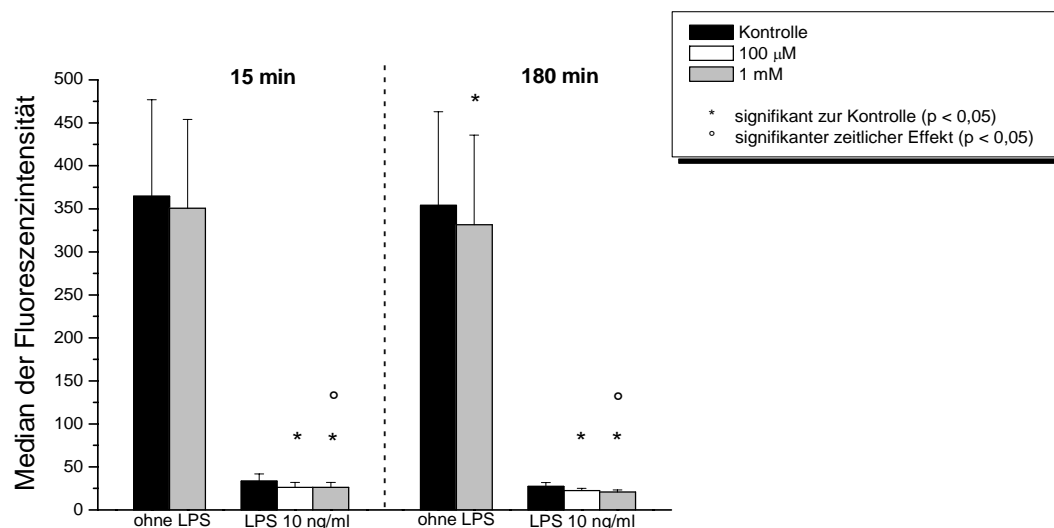


Abbildung 10: Expression des Oberflächenrezeptors CD62L auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Ketamin in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.3.5 Interleukin-8-Expression

Ketamin stimulierte zeit-, stimulations- und konzentrationsabhängig die Interleukin-8-Synthese im Vollblut (n = 12, dargestellt sind Median ± Standardabweichung). Bereits nach 15 Minuten kam es in einer supraklinischen Ketaminkonzentration von 1 mM in der unstimulierten Probe zu einer Synthesesteigerung von ca. 600% von 29 pg/ml auf 187 pg/ml (p: 0,020). Dieser Effekt steigerte sich nach 3 Stunden sogar auf 255 pg/ml bzw. ca. 770% (p: 0,020). In den LPS-stimulierten Proben führte nach 15-minütiger Inkubation weder die klinisch relevante noch die supraklinische Ketaminkonzentration zu signifikanten Effekten. Nach 3 stündiger Inkubation jedoch kam es in der supraklinischen Konzentration zu einer Synthesesteigerung von 663 pg/ml auf 1204 pg/ml (p: 0,033). Im zeitlichen Vergleich resultierte daraus eine signifikante Erhöhung um ca. 70% (p: 0,01). Relativierend zu diesen eindeutigen Ergebnissen musste hier jedoch die erhebliche Standardabweichung nach LPS-Stimulation berücksichtigt werden.

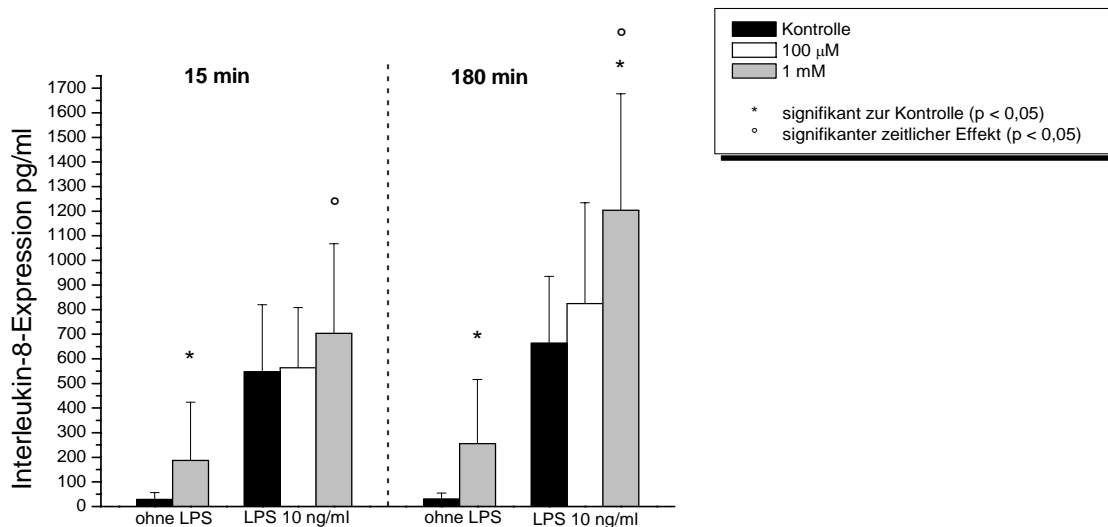


Abbildung 11: Synthese des Zytokin Interleukin-8 nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Ketamin in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.4 Thiopental

3.4.1 CR3 (CD11b/CD18-Expression)

Thiopental beeinflusste die Expression des Oberflächenrezeptors CR3 (CD11b/CD18) in ähnlicher Weise, wie es sich für Ketamin nachweisen ließ ($n = 12$, dargestellt sind Median \pm Standardabweichung). In einer supraklinischen Konzentration von 400 $\mu\text{g/ml}$ wurde bei den unstimulierten Proben weder nach 15 Minuten noch nach 180 Minuten ein nennenswerter Effekt beobachtet. Nach LPS-Stimulation jedoch ließ sich sowohl nach 15 Minuten als auch nach 180 Minuten eine signifikante ($p: 0,009$) Suppression der Rezeptordichte auf PMN von ca. 30% nachweisen. Auch in der klinisch relevanten Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ kam es nach LPS-Stimulation sowohl nach 15 Minuten ($p: 0,048$) als auch nach 180 Minuten ($p: 0,009$) zu einer signifikanten Verminderung des Fluoreszenzsignals um ca. 10%. Zusammenfassend konnte eine schnell einsetzende und lang anhaltende signifikante konzentrationsabhängige Hemmung des CR3-Rezeptors durch Thiopental im LPS-stimulierten Blut in klinischer und supraklinischer Konzentration gezeigt werden.

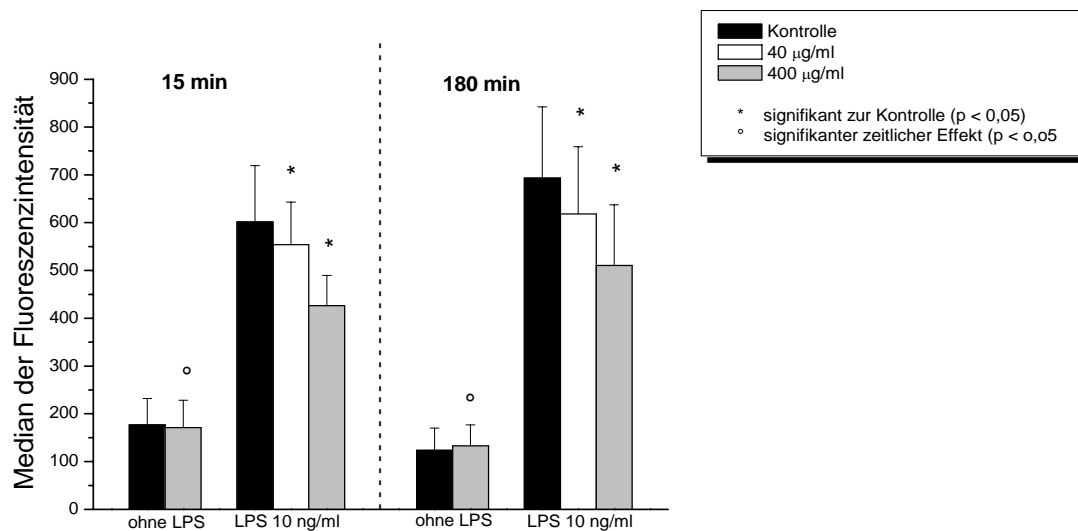


Abbildung 12: Expression des Oberflächenrezeptors CR3 (CD11b/CD18) auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Thiopental in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.4.2 CD16-Expression

Die Inkubation mit Thiopental zeigte ähnlich den ketamininduzierten Veränderungen stimulations- und konzentrationsabhängige Effekte auf die Expression des Oberflächenrezeptors CD16 ($n = 12$, dargestellt sind Median \pm Standardabweichung). In unstimuliertem Vollblut zeigten sich in supraklinischer Thiopentalkonzentration keine signifikanten Effekte. Nach LPS-Stimulation konnte jedoch in supraklinischer Thiopentalkonzentration sowohl nach 15 Minuten ($p: 0,018$) als auch nach 180 Minuten ($p: 0,018$) eine signifikante Suppression von ca. 10% nachgewiesen werden. Die klinisch relevante Konzentration von $40 \mu\text{g/ml}$ zeigte hierbei keinen Effekt.

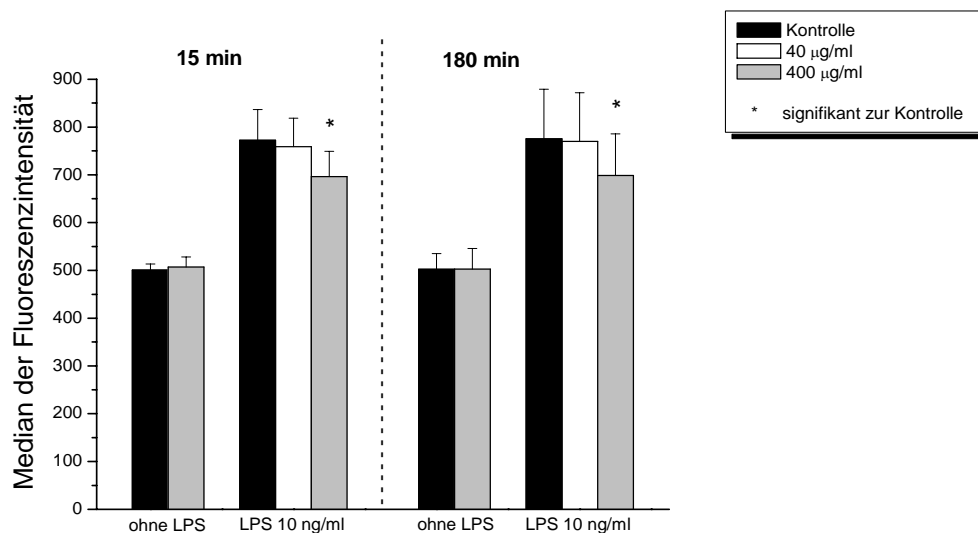


Abbildung 13: Expression des Oberflächenrezeptors CD16 auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Thiopental in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.4.3 CR1 (CD35)-Expression

Thiopental suppressierte die CR1 (CD35)-Expression konzentrationsabhängig in ähnlicher Weise wie Ketamin ($n = 12$, dargestellt sind Median \pm Standardabweichung). Bei einer supraklinischen Thiopentalkonzentration von $400 \mu\text{g/ml}$ kam es hier im LPS-stimulierten Vollblut nach 15 Minuten zu einer Suppression der Rezeptordichte um ca. 30% ($p: 0,018$). Dieser Effekt war nach 180 Minuten annähernd gleich bleibend. Die klinisch relevante Thiopentalkonzentration von $40 \mu\text{g/ml}$ hatte auf das LPS-stimulierte Vollblut keine signifikanten Auswirkungen. Ebenso wurde die Spontanexpression durch die supraklinische Thiopentalkonzentration nicht beeinflusst.

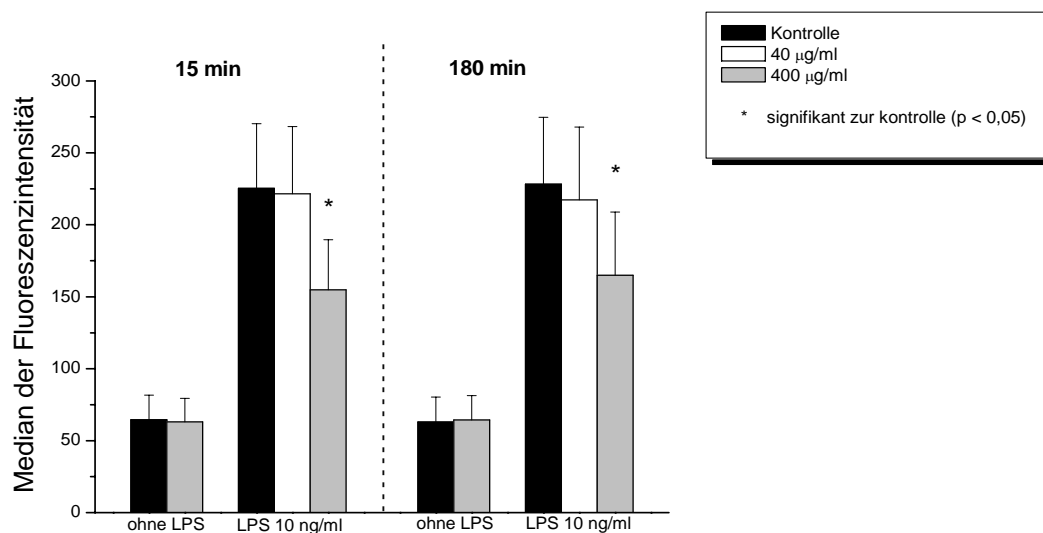


Abbildung 14: Expression des Oberflächenrezeptors CD35 auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Thiopental in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.4.4 CD62L-Expression

Thiopental suppressierte die Expression des CD62L-Rezeptors auf PMN in ähnlicher Weise wie es sich für Ketamin darstellen ließ in zeit-, stimulations- und konzentrationsabhängiger Weise ($n = 12$, dargestellt sind Median \pm Standardabweichung). Nach LPS-Stimulation kam es nach 15-minütiger Inkubation mit Thiopental in einer supraklinischen Konzentration von $400 \mu\text{g/ml}$ zu einem weiteren Abwerfen des CD62L-Rezeptors um ca. 20% im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrolle ($p: 0,028$). Dieser Effekt war nach drei Stunden unverändert. In klinisch relevanter Thiopentalkonzentration von $40 \mu\text{g/ml}$ zeigte sich nach 15 Minuten eine Reduktion von ca. 10% ($p: 0,017$), welche nach drei Stunden nicht mehr signifikant nachzuweisen war. In der unstimulierten supraklinischen Probe hingegen konnte erst nach drei Stunden ein signifikant suppressierender Effekt von 10% ($p: 0,019$) nachgewiesen werden. Dieser war nach 15 Minuten noch nicht nachzuweisen. Nach LPS-Stimulation hingegen trat in niedriger Konzentration ein frühzeitiger Effekt auf, der im zeitlichen Verlauf abnahm.

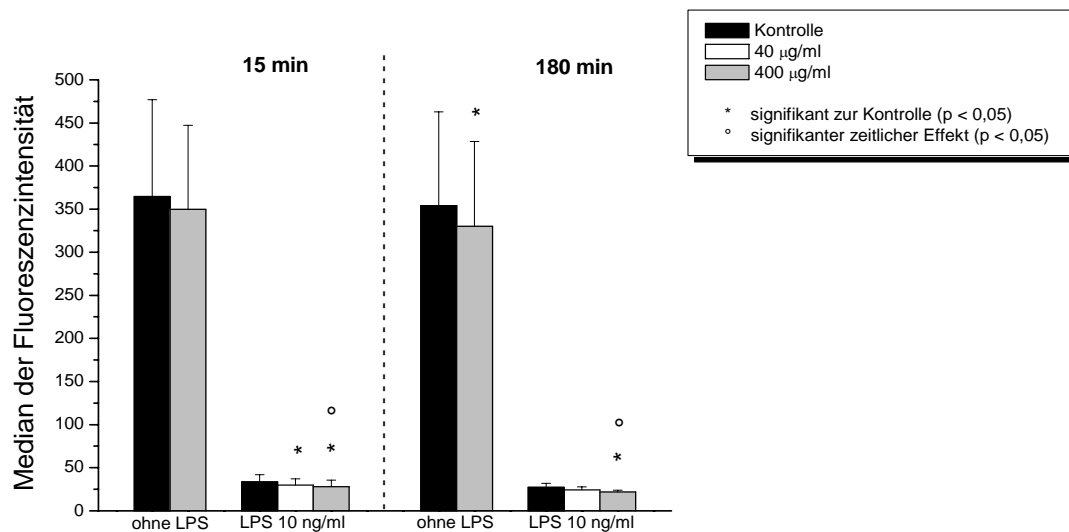


Abbildung 15: Expression des Oberflächenrezeptors CD62L auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Thiopental in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.4.5 Interleukin-8-Expression

Thiopental steigerte die Synthese des Zytokins Interleukin-8 stimulations- und konzentrationsabhängig (n = 12, dargestellt sind Median ± Standardabweichung). Bei einer supraklinischen Thiopentalkonzentration von 400 µg/ml konnte nach 15 Minuten im unstimuliertem Vollblut eine signifikante Synthesesteigerung von 29 pg/ml auf 97 pg/ml nachgewiesen werden (p: 0,013). Nach 180 Minuten steigerte sich dieser Effekt sogar auf 165 pg/ml (p: 0,009). Im LPS-stimulierten Plasma konnten aufgrund hoher Standardabweichungen keine Signifikanzen ermittelt werden. Auch nach mehrmaligen Wiederholungen der Messreihen ließ sich die Standardabweichung nicht eingrenzen. Tendenziell muss aber nach unseren Messungen zumindest in einer supraklinischen Konzentration von 400 µg/ml auch im LPS-stimulierten Plasma von einer weiteren Stimulation der Interleukin-8-Synthese durch Thiopental ausgegangen werden. Dieses Ergebnis ähnelte somit den Werten, die wir für Ketamin darstellen konnten.

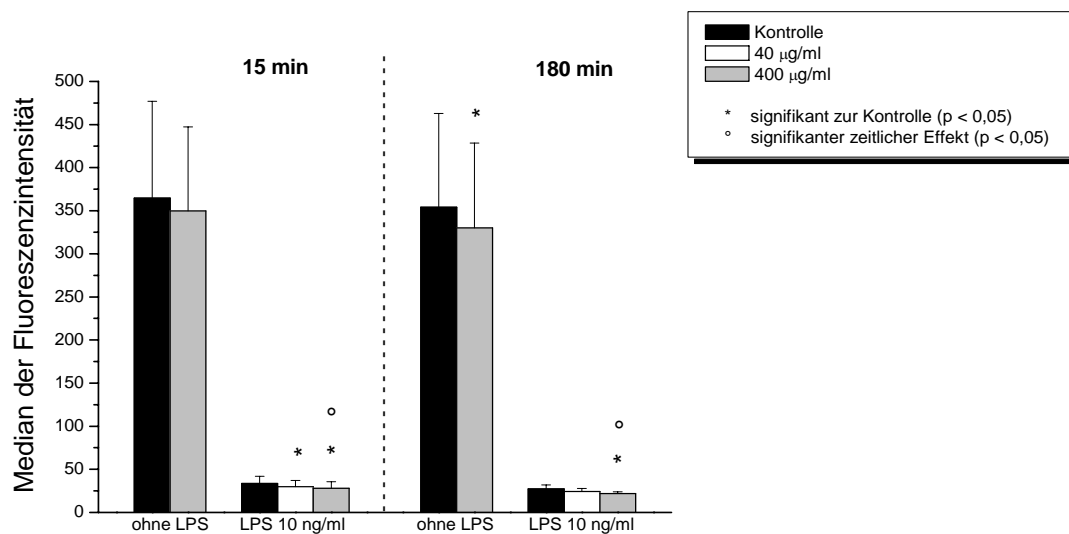


Abbildung 16: Synthese des Zytokin Interleukin-8 nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Thiopental in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.5 Propofol

3.5.1 CR3 (CD11b/CD18-Expression)

Die Inkubation mit Propofol wirkte sich zeit-, stimulations- und konzentrationsabhängig auf die Regulation der CR3 (CD11b/CD18)-Rezeptorexpression auf PMN aus ($n = 12$, dargestellt sind Median \pm Standardabweichung). Auffällig war, dass bei einer klinisch relevanten Propofolkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ sowohl nach 15 Minuten mit ca. 10% ($p: 0,027$) als auch nach 180 Minuten mit ca. 5% ($p: 0,048$) zwar zahlenmäßig geringe, aber doch signifikante Suppressionseffekte der Oberflächenrezeptorexpression im LPS-stimulierten Vollblut zu beobachten waren. Bei einer supraklinischen Propofolkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ hingegen kehrte sich dieser Effekt in beiden Inkubationszeiten tendenziell um in einen diskreten Stimulationseffekt der Rezeptorexpression. Diese Effekte erreichten zwar nicht das Signifikanzniveau in Vergleich zur Kontrolle, jedoch ließ sich ein signifikant zeitlicher Effekt von ca. 20% darstellen, der tendenziell auch bei LPS-Stimulation und niedriger Propofolkonzentration nachweisbar ist. Zusammenfassend stehen die diskret stimulierenden Effekte auf den CR3 (CD11b/CD18)-Rezeptor bei PMN durch Propofol in supraklinischer Konzentration im Gegensatz zu den Effekten, die wir für Ketamin und Thiopental nachweisen konnten. Auffällig war dabei die Diskrepanz zu den signifikant supprimierenden Effekten der klinisch relevanten Propofolkonzentration.

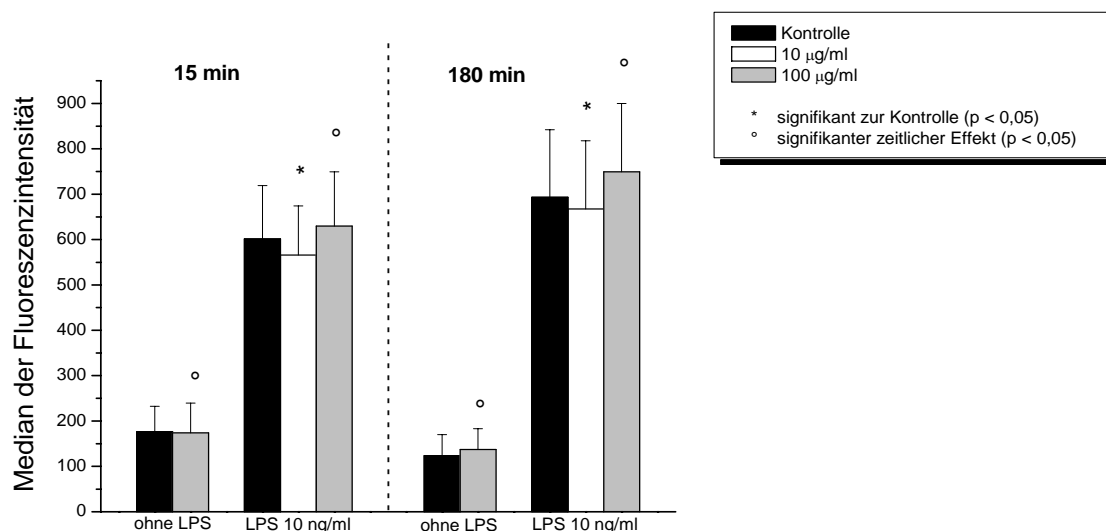


Abbildung 17: Expression des Oberflächenrezeptors CR3 (CD11b/CD18) auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Propofol in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation

3.5.2 CD16-Expression

Die Expression des Oberflächenrezeptors CD16 wurde durch Propofol in supraklinischer Konzentration von 100 µg/ml in stimulationsabhängiger Weise gesteigert (n = 12, dargestellt sind Median ± Standardabweichung). Im Gegensatz zu Ketamin und Thiopental kam es hier in den unstimulierten Proben bei supraklinischer Propofolkonzentration sowohl nach 15-minütiger Inkubation (p: 0,009), als auch nach 180-minütiger Inkubation (p: 0.019) zu einer signifikant erhöhten Rezeptorexpression. Hierbei zeigte sich bereits nach 15 Minuten eine Expressionssteigerung um 17%, die nach 180 Minuten noch 12% ausmachte. In LPS-stimuliertem Vollblut ließen sich hingegen weder in klinisch relevanter Konzentration von 10 µg/ml noch in der supraklinischen Konzentration von 100 µg/ml signifikante Effekte auf die CD16-Expression von PMN nachweisen. Zusammenfassend fiel der stimulierende Effekt von Propofol auf den CD16-Rezeptor in den unstimulierten Blutproben auf, während nach LPS-Stimulation kein Effekt mehr nachzuweisen war. Dieser Effekt stand im Gegensatz zu den hemmenden Effekten, die wir für Ketamin und Thiopental im LPS-stimulierten Vollblut nachweisen konnten.

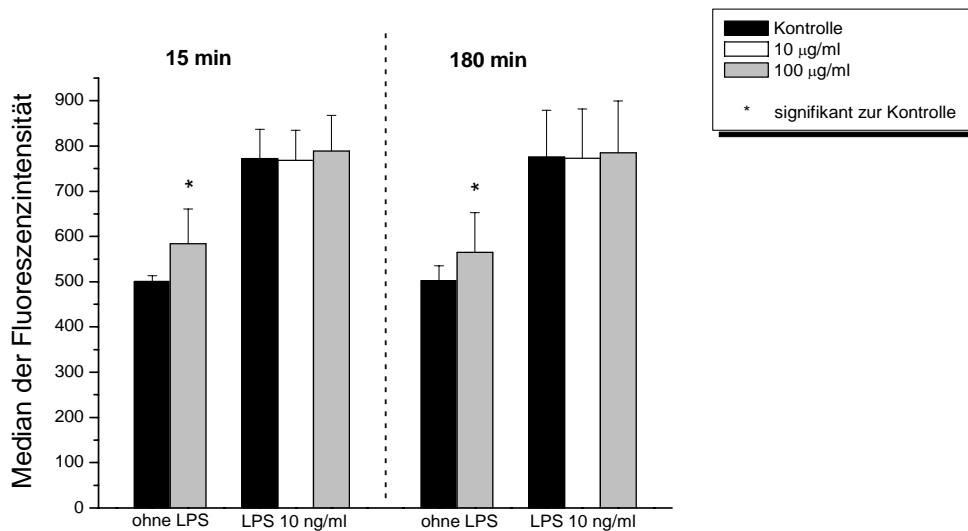


Abbildung 18: Expression des Oberflächenrezeptors CD16 auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Propofol in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.5.3 CR1 (CD35)-Expression

Die Expression des Oberflächenrezeptors CR1 (CD35) wurde durch Propofol in zeit-, stimulations- und konzentrationsabhängiger Weise gesteigert (n = 12, dargestellt sind Median \pm Standardabweichung). Bereits nach 15 Minuten ließ sich in der unstimulierten, mit 100 $\mu\text{g/ml}$ propofolinkubierten Vollblutprobe eine signifikante Steigerung der CR1-Rezeptorexpression von ca. 25% darstellen (p: 0,017). Nach 180 Minuten betrug diese Steigerung noch etwa 20% (p: 0,014). In den LPS-stimulierten Proben konnte nach 15 Minuten in supraklinischer Konzentration ebenfalls eine signifikant stimulierte Rezeptorexpression von ca. 20% festgestellt werden (p: 0,018). Nach 180 Minuten jedoch kam es zu einem zeitlich signifikanten Rückgang dieser propofolinduziert gesteigerten Rezeptorexpression um mehr als 10% (p: 0,03). Hier konnte zwar eine angedeutet gesteigerte Rezeptorexpression, jedoch kein Signifikanzniveau zur Kontrolle mehr nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen standen in deutlichem Gegensatz zu den Effekten, die wir für Ketamin und Thiopental auf den CR1 (CD35)-Rezeptor von PMN nachweisen konnten. In der klinisch relevanten Propofolkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ ließen sich diese stimulierenden Effekte jedoch nicht darstellen.

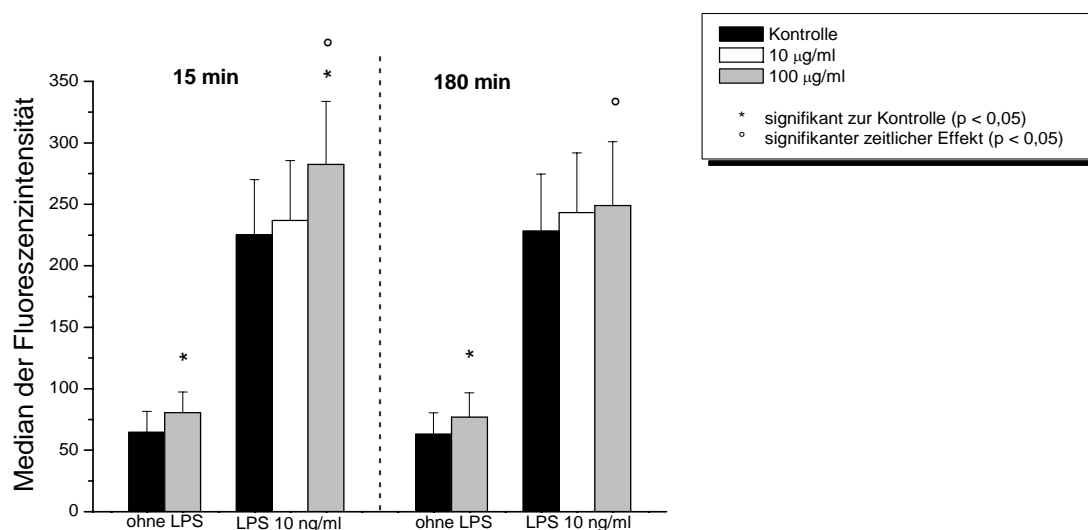


Abbildung 19: Expression des Oberflächenrezeptors CD35 auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Propofol in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.5.4 CD62L-Expression

Die Inkubation mit Propofol suppressierte die Expression des CD62L-Rezeptors auf PMN in stimulationsabhängiger Weise ($n = 12$, dargestellt sind Median \pm Standardabweichung). Nach 15 ($p: 0,018$) sowie nach 180 Minuten ($p: 0,009$) ließ sich mit der supraklinischen Propofolkonzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ in der unstimulierten Probe eine signifikant suppressierte Expression des CD62L-Rezeptors von ca. 10 % nachweisen. Nach LPS-Stimulation zeigte sich in der supraklinischen Propofolkonzentration gleichfalls nach 15 Minuten sogar eine signifikante Suppression von ca. 20% ($p: 0,029$). Diese war nach 3 Stunden unverändert nachzuweisen ($p: 0,035$). Auch für die klinisch relevante Propofolkonzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ konnte eine signifikante Rezeptorsuppression von ca. 20% sowohl nach 15 Minuten ($p: 0,017$) als auch nach 180 Minuten ($p: 0,025$) nachgewiesen werden.

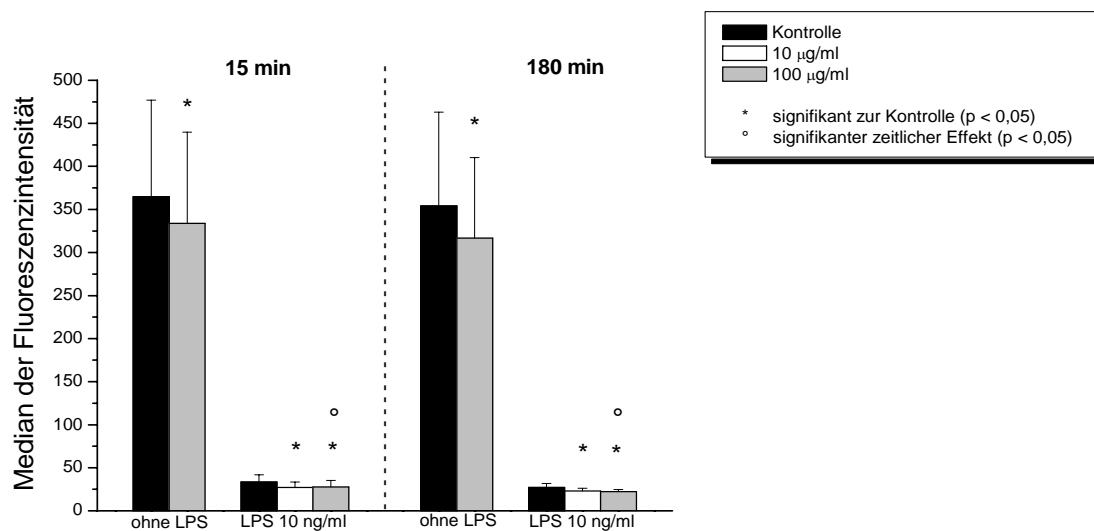


Abbildung 20: Expression des Oberflächenrezeptors CD62L auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Propofol in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.5.5 Interleukin-8-Expression

Die Inkubation mit Propofol steigerte die Synthese des Zytokin Interleukin-8 zeit-, stimulations- und konzentrationsabhängig (n = 12, dargestellt sind Median ± Standardabweichung). Diese Effekte fielen deutlich, aber in geringerem Ausmaß aus, als bei Ketamin und Thiopental. Im unstimulierten Vollblut konnte nach 15 Minuten durch die supraklinische Propofolkonzentration von 100 µg/ml eine signifikante Synthesesteigerung des Zytokins Interleukin-8 um ca. 150% von 29 pg/ml auf 72 pg/ml gezeigt werden (p: 0,023). Dieser Effekt steigerte sich nach 180-minütiger Inkubation auf 92 pg/ml (p: 0,027). Nach LPS-Stimulation kam es in der supraklinischen Propofolkonzentration erst nach 180 Minuten zu einer signifikanten Synthesesteigerung von 663 pg/ml auf 1425 pg/ml (p: 0,026). Auffällig war die hohe Standardabweichung nach LPS-Stimulation.

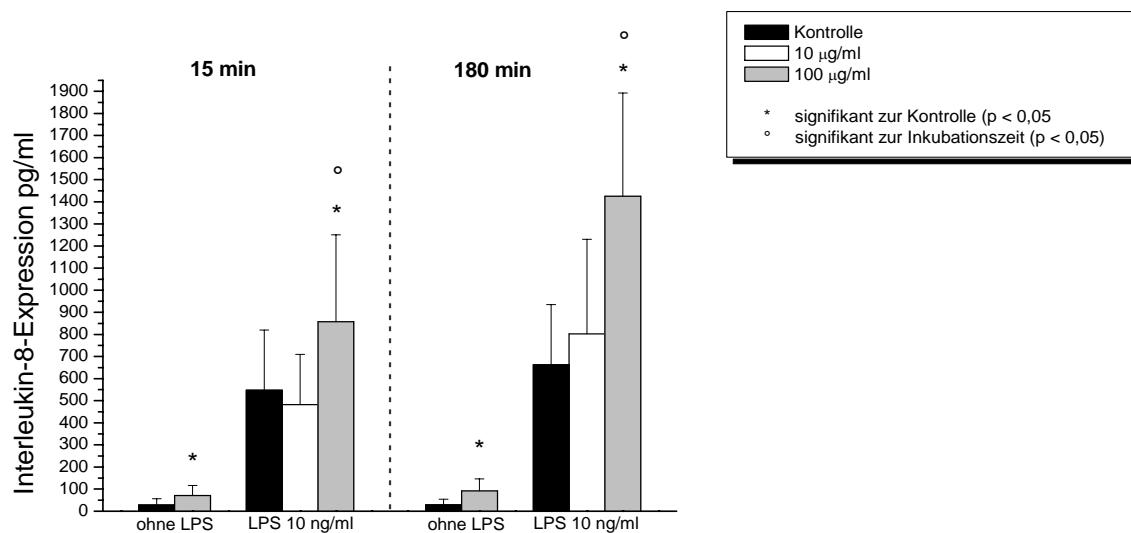


Abbildung 21: Synthese des Zytokin Interleukin-8 nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Propofol in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.6 Etomidat

3.6.1 CR3 (CD11b/CD18-Expression)

Die Inkubation mit Etomidat wirkte sich zeit-, stimulations- und konzentrationsabhängig auf die Regulation der CR3 (CD11b/CD18)- Rezeptorexpression auf PMN aus (n = 12, dargestellt sind Median \pm Standardabweichung). Im unstimulierten Vollblut kam es bereits nach 15 minütiger Inkubation mit supraklinischer Etomidatkonzentration zu einem signifikanten Suppressionseffekt (p: 0,018) von ca. 10%, der nach 180 minütiger Inkubation nicht mehr nachzuweisen war. Nach LPS-Stimulation kam es in der klinisch relevanten Etomidatkonzentration von 0,5 μ g/ml sowohl nach 15-minütiger Inkubation (p: 0,015), als auch nach 180-minütiger Inkubation (p: 0,009) zu signifikanten Suppressionseffekten der Rezeptorexpression von ca. 10%. In supraklinischer Konzentration von 5 μ g/ml zeigte sich jedoch lediglich nach 180 minütiger Inkubation eine signifikante Suppression von ca. 5% (p: 0,041).

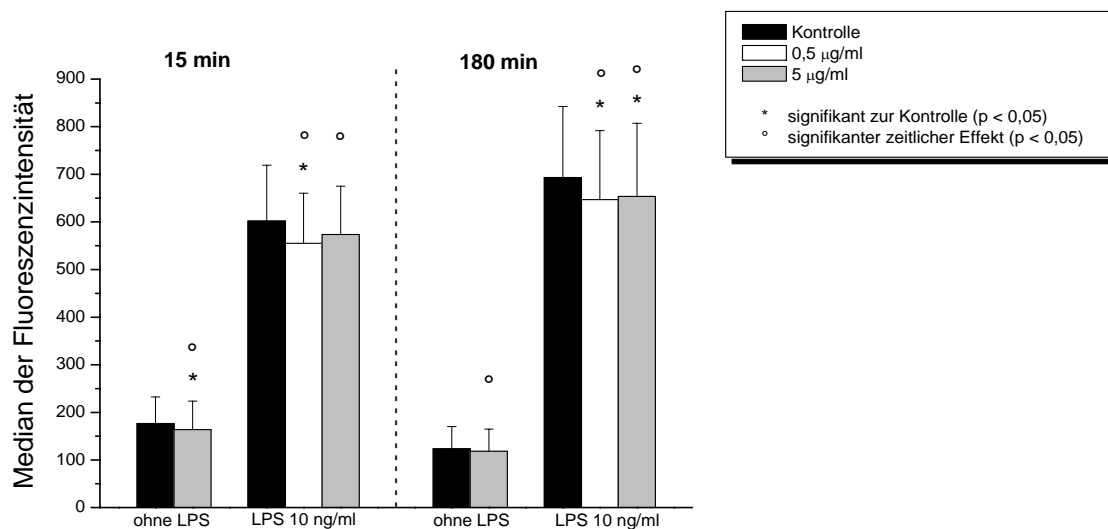


Abbildung 22: Expression des Oberflächenrezeptors CR3 (CD11b/CD18) auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Etomidat in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.6.2 CD16-Expression

Die Expression des Oberflächenrezeptors CD16 auf PMN wurde durch Etomidat nicht signifikant beeinflusst ($n = 12$, dargestellt sind Median \pm Standardabweichung). Die Ergebnisse für LPS-stimuliertes Vollblut gleichen somit jenen, die wir für Propofol ermitteln konnten. Jedoch ergab sich im unstimulierten Vollblut für Etomidat kein signifikanter Effekt im Gegensatz zu Propofol.

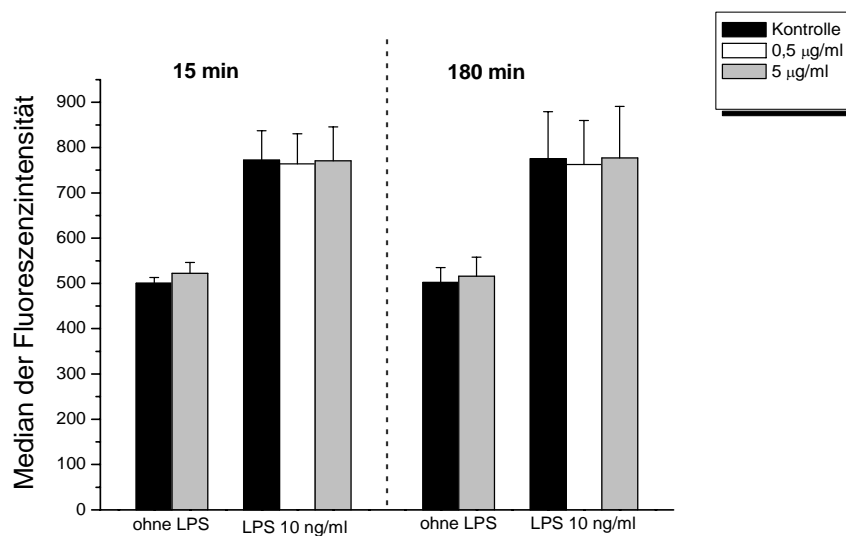


Abbildung 23: Expression des Oberflächenrezeptors CD16 auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Etomidat in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.6.3 CR1 (CD35)-Expression

Die Expression des Oberflächenrezeptors CR1 (CD35) wurde durch Etomidat nicht signifikant beeinflusst ($n = 12$, dargestellt sind Median \pm Standardabweichung). Angedeutet stimulierende Effekte auf die Oberflächenexpression des CR1-Rezeptors von Etomidat in supraklinischer Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ erwiesen sich als nicht signifikant. Somit konnte für Etomidat als einzige der getesteten Substanzen kein Effekt auf diesen Rezeptor nachgewiesen werden. Lediglich andeutungsweise konnte ein ähnlich stimulierender Effekt in supraklinischer Konzentration dargestellt werden, wie wir ihn für Propofol nachweisen konnten.

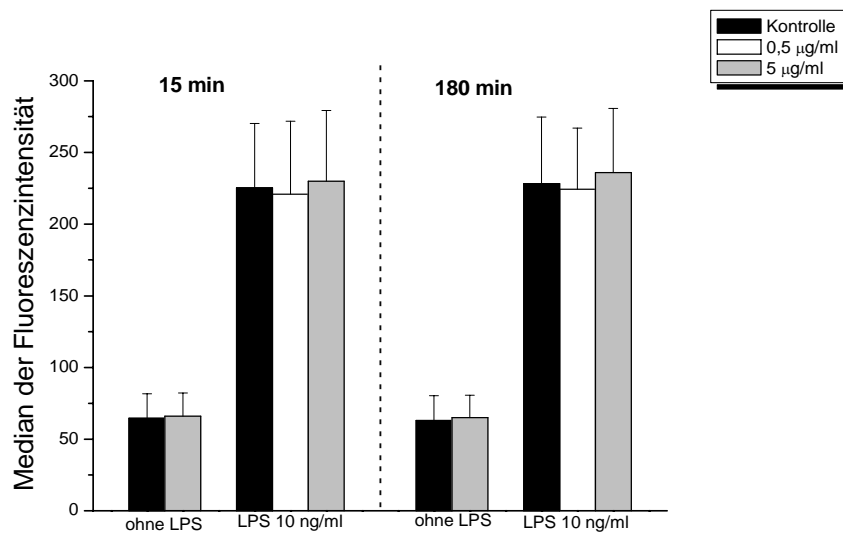


Abbildung 24: Expression des Oberflächenrezeptors CD35 auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Etomidat in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.6.4 CD62L-Expression

Die Inkubation mit Etomidat supprimierte die Expression des CD62L-Rezeptors auf PMN in konzentrations- und stimulationsabhängiger Weise ($n = 12$, dargestellt sind Median \pm Standardabweichung). In den unstimulierten Proben kam es bei einer supraklinischen Etomidatkonzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ zu einer signifikanten Expressionsminderung sowohl nach 15 Minuten ($p: 0,019$) als auch nach 180 Minuten ($p: 0,039$) von jeweils ca. 10%. In den LPS stimulierten Proben konnte lediglich nach 180 Minuten Inkubation mit der klinisch relevanten Etomidatkonzentration von $0,5 \mu\text{g/ml}$ ein signifikanter Suppressionseffekt von ca. 15% gezeigt werden ($p: 0,026$). Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass es im unstimulierten Vollblut zu einer frühzeitigen und lang anhaltenden Suppression des CD62L-Rezeptors kam. Im LPS-stimulierten Vollblut konnte nur die klinisch relevante Konzentration nach langer Inkubationszeit einen signifikant supprimierenden Effekt hervorrufen. Somit stand der verzögert auftretende Effekt durch Etomidat im LPS-stimulierten Vollblut im Gegensatz zu den schon frühzeitig einsetzenden Effekten der übrigen untersuchten Substanzen. Im unstimulierten Vollblut ähnelte die frühzeitig einsetzende und lang anhaltende Supprimierung dem Effekt von Propofol, wohingegen es bei Ketamin und Thiopental zu einer verzögerten Supprimierung kam. Die medikamentösen Effekte waren hierbei im Vergleich zur LPS-induzierten Suppression jedoch eher gering.

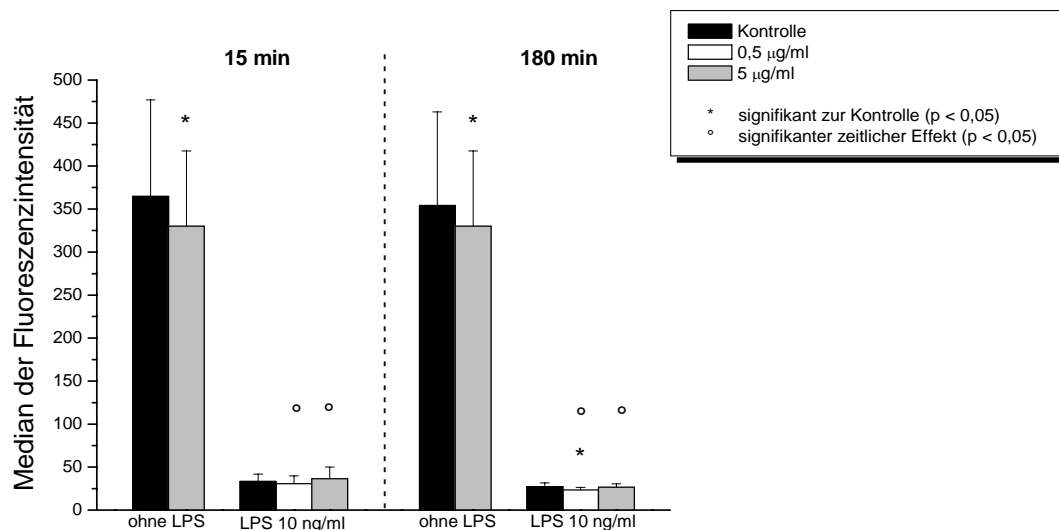


Abbildung 25: Expression des Oberflächenrezeptors CD62L auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Etomidat in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.6.5 Interleukin-8-Expression

Etomidat hatte als einziges der untersuchten Präparate keinen signifikanten Einfluss auf die spontane und LPS-induzierte Synthese des Zytokins Interleukin-8 ($n = 12$, dargestellt sind Median \pm Standardabweichung). Im Gegensatz zu den drei anderen getesteten Substanzen konnte in den unstimulierten Proben in supraklinischer Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ weder nach 15 Minuten noch nach 3 Stunden ein medikamentös induzierter Effekt auf die Synthese des Zytokin Interleukin-8 nachgewiesen werden. Nach LPS-Stimulation zeichnete sich in der klinisch relevanten Konzentration von $0,5 \mu\text{g/ml}$ in beiden Inkubationszeiten ein supprimierender Effekt ab. In der 10-fach höheren Dosis deutete sich hingegen eine Synthesesteigerung an. Diese Effekte erreichten jedoch kein Signifikanzniveau. Somit war Etomidat das einzige in dieser Studie getestete Medikament, für das wir keine signifikante Steigerung auf die IL-8-Synthese zeigen konnten. Auch hier muss die hohe Standardabweichung nach LPS-Stimulation beachtet werden.

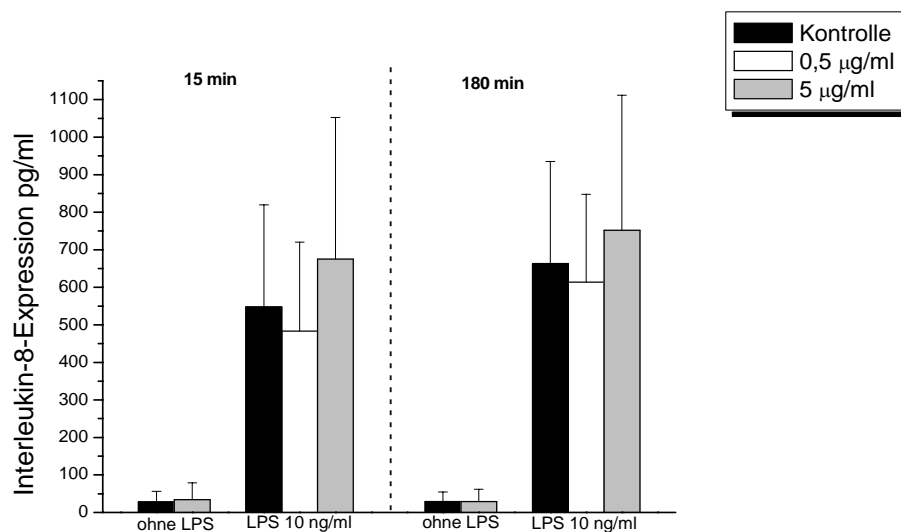


Abbildung 26: Synthese des Zytokin Interleukin-8 nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Etomidat in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.

3.7 NB1 (HNA-2a, CD177)

Ketamin, Thiopental, Propofol und Etomidat hatten in klinisch relevanter Konzentration keinerlei Auswirkung auf die LPS-induzierte Expression des CD177-Rezeptors (n = 6, Ergebnisse siehe Tab.). Die Stimulation mit LPS führte zu einer signifikanten Expressionssteigerung des Rezeptors um ca. 100%. Dabei lag die durchschnittliche, spontane Fluoreszenzintensität bei 58, nach LPS-Stimulation hingegen bei 108. Es fielen hohe interindividuelle Unterschiede in der Rezeptorexpression auf, was sich in einer hohen Standardabweichung widerspiegelte.

Proband	Kontrolle	Kontrolle + LPS	Thiopental + LPS	Ketamin + LPS	Propofol + LPS	Etomidat + LPS
1	80	135	124	127	128	126
2	28	63	51	61	58	59
3	34	43	38	45	46	48
4	65	136	133	153	154	143
5	91	130	129	138	134	134
6	50	86	79	81	81	81
Stabw.	25	41	42	45	45	41
Mittelwert	58	108	102	104	105	104

Abbildung 27: Expression des Oberflächenrezeptors NB1 (HNA-2a, CD177) auf PMN nach 15 minütiger Inkubation mit klinisch relevanten Konzentrationen von Ketamin, Thiopental, Propofol und Etomidat nach LPS-Stimulation (numerische Darstellung).

Proband	Kontrolle	Kontrolle + LPS	Thiopental + LPS	Ketamin + LPS	Propofol + LPS	Etomidat + LPS
1	58	138	142	142	144	144
2	27	58	56	58	55	58
3	44	54	55	45	60	63
4	58	140	131	148	144	143
5	77	147	145	150	149	146
6	26	63	65	65	66	66
Stabw.	20	46	45	48	47	45
Mittelwert	51	101	98	104	105	105

Abbildung 28 Expression des Oberflächenrezeptors NB1 (HNA-2a, CD177) auf PMN nach 180 minütiger Inkubation mit klinisch relevanten Konzentrationen von Ketamin, Thiopental, Propofol und Etomidat nach LPS-Stimulation (numerische Darstellung).

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Probenaufbereitung

Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien, in denen nach Anwendung unterschiedlicher Separationsverfahren Veränderungen der Antigenexpression auf der Zellmembran sowie morphologische Veränderungen neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden konnten¹⁴¹^{142 35 143 144 145 146 147 148}, wurde in der vorliegenden Studie für die durchflusszytometrische Darstellung der Messergebnisse von Oberflächenrezeptoren auf PMN sowie für die Messung des Interleukin-8 mittels ELISA eine Vollblutmethode angewandt^{149 150 31 151 144 152 153 154 155}¹⁵⁶. Diese Methode erlaubt es, PMN in ihrem physiologischen Milieu zu belassen und sie unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen auszusetzen, ohne die bei physikalischer Zellisolation beschriebenen „Up-Regulations-Mechanismen“ im Sinne einer vermehrten Oberflächenrezeptorexpression zu induzieren. Eine bis zu 400% höhere Expression, insbesondere des CR3-Rezeptors¹⁴¹, und ein erhöhter Oxidativer Burst als Zeichen der Zellaktivierung und Zellstoffwechselstimulation^{157 158} bei unveränderter Phagozytoseaktivität der Granulozyten wurde beobachtet^{159 141 156}. In standardisierten Verfahren zur Isolierung und Fixierung von neutrophilen Granulozyten wird die Separation häufig über Zentrifugation in Percoll- oder Ficollgradienten durchgeführt, wodurch Störfaktoren durch andere Zellpopulationen in der durchflusszytometrischen Funktionsanalyse auf ein Minimum reduziert werden^{84 146}. Während bei Zellseparation über den sucrosehaltigen Dichtegradienten Ficoll morphologische und funktionelle Veränderungen bei PMN beobachtet wurden¹⁵⁸, konnte dieser Effekt bei dem sucrosefreien Gradienten Percoll nicht nachgewiesen werden^{146 158}. Neben der mechanischen Manipulation bei der Aufarbeitung stellt die Umgebungstemperatur einen weiteren wichtigen Einflussfaktor auf die Aktivität und somit die Expression von Oberflächenrezeptoren auf PMN dar. Während wechselnde Temperaturen von 0°C bis 37°C eine verstärkte Expression insbesondere der CD11b- und CD35-Rezeptoren auf der Granulozytenoberfläche sowie einen Anstieg der Adhäsionsmoleküle als Zeichen der Zellaktivierung induzieren können, sistiert die Expression der Komplementrezeptoren bei der Aufarbeitung in vitro bei 4°C^{160 161 159 141 162}. Forsyth et al. fanden im Vergleich zu 4°C eine vermehrte Expression des Oberflächenrezeptors CD35 auf PMN bei 22°C Aufarbeitungstemperatur¹⁶⁰. Um diesem Effekt Rechnung zu tragen, wurden in der vorliegenden Arbeit Medikamenteneffekte bei

37°C untersucht und das Vollblut anschließend bei Raumtemperatur aufgearbeitet. Um die Zeitspannen der Stimulation bzw. Inkubation möglichst genau definieren zu können, wurden die Ansätze im Anschluss an jede Inkubation jeweils bei 4°C zentrifugiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen^{160 85 5}. Uns interessierten in dieser Arbeit die immunmodulatorischen Auswirkungen von Anästhetika auf PMN im präinflammatorischen bzw. septischen Milieu, weshalb wir die Ansätze nach Inkubation der Testsubstanzen mit LPS stimulierten und eine zusätzliche unstimulierte Kontrollreihe untersuchten. Die Stimulation von Leukozyten in Vollblut mit Entzündungsmediatoren wie LPS stellt heute zunehmend ein anerkanntes Verfahren zur Darstellung eines in-vitro-Modells für septische Krankheitsbilder dar^{163 164 165 166}. LPS wird im Plasma an LPS-bindendes Protein (LBP) gebunden¹⁶⁷ und zu dem auf myeloischen Zellreihen exprimierten Oberflächenrezeptor CD14 transportiert^{168 169}. Anschließend wird LPS an den transmembranären Signalrezeptor toll-like receptor 4 (TLR4) und das mit diesem assoziierte Protein MD2 übertragen^{28 29}. Über mehrere intrazelluläre Signalwege werden schließlich verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert. Hierzu zählen NF-kappaB (p50/p65) und AP-1 (c-Fos/c-Jun), welche die genetische Codierung für die Induktion verschiedener Entzündungsmediatoren koordinieren^{170 171 168}. Unterschiede in der LPS-induzierten Immunantwort werden u.a. auf Mutationen der genetischen Codierung für TLR4 zurückgeführt^{172 173 174}. Lynn et al. konnten zeigen, dass bei LPS-Konzentrationen von bereits 1 ng/ml und 5-minütiger Inkubation eine vermehrte Expression des CR3 (CD11b/CD18)-Rezeptors auf PMN induziert wird. Ein 200 bis 300%iger Anstieg zum Kontrollwert wurde nach 30 Minuten bei einer LPS-Konzentration von 30 ng/ml bis 100 ng/ml erreicht⁵. Diese für den CR3- und CR1-Rezeptor auch von O'Shea und Jones beobachteten frühen Stimulationseffekte deuten auf eine Mobilisierung bereits präformierter Rezeptoren aus getrennten intrazellulären Pools hin^{175 26 7}. Mit zunehmender Stimulationsdauer nahm auch in unserer Studie die Expression der Oberflächenrezeptoren zu. Dieser langfristige Effekt wurde schon in vorherigen Studien gezeigt und lässt sich als de-novo Synthese der Rezeptoren nach längerfristiger Stimulation interpretieren^{162 176 177}. Jedoch muss hier auch die verlängerte Kontaktzeit der Granulozyten mit der Fremdoberfläche des Probenröhrchens als möglicher Trigger einer Expressionssteigerung gesehen werden. Wir inkubierten Vollblut bei 37°C für 30 Minuten mit 10 ng/ml LPS und erzielten für den CR3-Rezeptor im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine Expressionssteigerung von ca. 400%. Die intrazellulären Mechanismen, die durch eine solche Stimulation induziert werden, sind an leukozytären Zelllinien oder isolierten Blutzellen bereits ausführlich untersucht und dargestellt worden^{178 179 36 180}. Um

die von Repo et al. beschriebene erhöhte Hintergrundfluoreszenz im Durchflusszytometer zu vermeiden, welche durch unspezifische Antikörper-Bindung im Blut bei der Lyse ausgelöst wird¹⁸¹, wurde das Vollblut in dieser Arbeit erst nach erfolgter Inkubation und Stimulation lysiert. Für diesen Zweck verwendeten wir *FACS-Lysing-Solution*[®] (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg), für welche in vorhergehenden Studien kein signifikanter Verlust an neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden konnte¹⁸². Es resultierte eine genaue durchflusszytometrische Darstellung der Leukozytenpopulationen bei verminderten Störfaktoren durch andere Zellpopulationen. Während das Streulichtsignal (FSC/SSC) durch die Lyse verändert wird, bleibt das Fluoreszenzsignal hierbei konstant¹⁸². Die Fluoreszenz resultiert dabei aus der Bindung der verwendeten Fluorochrome an entsprechend spezifische Bindungsstellen auf der Zellmembranoberfläche sowie der Eigenfluoreszenz der Zelle¹⁸³. Jedoch können auch unspezifische Bindungen von Antikörpern an andere Zellen zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal führen. Um dieses Problem auszuschließen, wurde in dieser Studie jeweils ein FITC-markierter anti-IgG-Antikörper als ein zusätzlicher Kontrollansatz mitgemessen. Der eigentliche Kontrollwert wurde festgelegt, indem ein weiterer Kontrollansatz mit unmarkiertem Antikörper inkubiert und das resultierende Fluoreszenzsignal als entsprechende Eigenfluoreszenz einer Zelle gesetzt wurde. Die Differenz zu den Proben ergab den jeweiligen Stimulationseffekt. Diese Autofluoreszenz erklärt sich durch Flavoproteine im Zellstoffwechsel¹⁸⁴.

Für die Bestimmung des Zytokins Interleukin-8 im Plasma wurde ebenfalls eine Vollblutmethode angewandt^{164 34}. Die Aufarbeitung mittels ELISA erfolgte wie zuvor beschrieben¹⁸⁵. Nach in vitro Aktivierung mit LPS³⁴ und während Entzündungsreaktionen werden Zytokine massiv freigesetzt^{186 185}. Dabei sind nach LPS-Aktivierung hohe interindividuelle Unterschiede in ihrer Produktion sowohl für Vollblut als auch für isolierte Monozyten beschrieben¹⁸⁷. Auch wir fanden nach Aktivierung von Vollblut interindividuelle Unterschiede in der Synthese von IL-8, was sich in hohen Standardabweichungen ausdrückte. In einer Studie wurde nach erneuter Aktivierung mit 100 ng/ml LPS bei isolierten PMN septischer Patienten eine im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe verminderte Produktion des proinflammatorischen Interleukin-8 gefunden. Eine höhere LPS-Konzentration von 1 µg/ml glich diesen Unterschied wieder aus³⁴. Im Vollblutmodell konnte die antiinflammatorische Wirkung von IL-10 als wesentliche Ursache dieses Phänomens postuliert werden¹⁶⁵. Die von uns ermittelte Zytokinproduktion nach 8-stündiger LPS-Stimulation mit 10 ng/ml lag bei durchschnittlich 548 pg/ml und somit deutlich unter dem Kontrollwert von 16 ng/ml, den Marie et al. nach 24-stündiger Stimulation mit 100 ng/ml

LPS fanden. IL-8 wird nicht nur von PMN synthetisiert sondern auch von anderen Zellreihen, wie z.B. Monozyten oder Fibroblasten^{38 39 188 189}. Diese Zellen können im Vollblut-Assay anders reagieren^{190 191} und eventuelle granulozytenspezifische Medikamenteneffekte überlagern. Dadurch stellt IL-8 im Vergleich zu den Oberflächenrezeptoren einen wesentlich indirekteren, unspezifischeren Marker dar. Auch der Einfluss von Plasmaproteinen oder die Interaktion der Leukozyten untereinander sind denkbare Störfaktoren, die eine Verstärkung spezifischer und unspezifischer Effekte hervorrufen können. Dies würde ebenfalls größere individuelle Schwankungen hervorrufen und eine hohe Standardabweichung erklären. Auch der Kontakt mit der Fremdoberfläche eines Aufarbeitungsröhrchens muss als möglicher Einflussfaktor auf die Aktivität der Zellen und somit auch auf die Zytokinsynthese beachtet werden¹⁹².

4.1.2 Fluoreszenzfärbung

Bei der durchflusszytometrischen Bestimmung der Oberflächenantigene resultiert die gemessene Fluoreszenz aus der Bindung der verwendeten Fluorochrome an spezifische und unspezifische Bindungsstellen der Zellmembranoberfläche sowie der Eigenfluoreszenz einer Zelle^{193 184}. Diese Autofluoreszenz wird von Flavoproteinen im Zellstoffwechsel emittiert^{184 193}. Um einen Kontrollwert zu etablieren, wurden in einem separaten Ansatz Zellen mit einem unmarkierten Antikörper inkubiert und die so ermittelte Fluoreszenz als Eigenfluoreszenz von den ermittelten Werten der FITC-markierten Proben abgezogen. Die in dieser Studie verwendeten monoklonalen Antikörper reagieren nach Angabe der Hersteller spezifisch mit dem jeweiligen Rezeptor, so dass unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden können. Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung von Vollblutproben ist die präanalytische Lyse der Erythrozyten Voraussetzung^{151 182}. Durch Färbung mit Propidiumjodid lassen sich kernhaltige Zellen durch Anfärben ihrer intrazellulären DNA von Zelltrümmern oder Aggregationsartefakten unterscheiden^{194 2 138}. Dabei werden Kernfragmente durch das rotfluoreszierende Propidiumjodid gebunden. Durch die Mehrfarbenfluoreszenzanalyse, die sich aus der Kombination der grünfluoreszierenden FITC-markierten Antikörper sowie des rotfluoreszierenden Propidiumjodids zusammensetzt, wird eine Differenzierung von kernhaltigen Zellen und Zellfragmenten ermöglicht. Die zuvor erforderliche Permeabilisierung der Plasmamembran wurde in dieser Studie durch die lysierenden Substanzen Formaldehyd und Diglycol der *FACS-Lysing-Solution*[®] hervorgerufen. Die durchflusszytometrische Messung wird hierbei nicht durch eine

signifikante Reduktion der Anzahl neutrophiler Granulozyten bzw. ein Übermaß an Zellfragmenten verfälscht^{151 144}. Ein eventuell verändertes Streulichtsignal beeinflusst dabei nicht das Fluoreszenzsignal der Zelle¹⁵¹. Lediglich zur Bestimmung des NB1-Rezeptors wurde für die Lyse Aqua dest. verwendet, wobei in Vorversuchen kein Unterschied zur Lyse mit *FACS-Lysing-Solution*[®] gefunden wurde. Die hierbei verwendete, wie unter 2.3.1 und 2.3.2 beschriebene, Methode zur quantitativen Bestimmung der Rezeptordichte auf Leukozyten im Vollblut wurde in vorherigen Studien standardisiert^{195 196 197}.

4.1.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie weist in Bezug auf die quantitative Auswertung der verschiedenen Zellpopulationen eine hohe Korrelation mit der Fluoreszenzmikroskopie auf^{184 138}. Jedoch ließen sich im Vergleich zwischen Durchflusszytometrie, Fluoreszenzmikroskopie und automatischer Zellzählung signifikante Veränderungen der Ergebnisse zeigen. Dies wurde mit der schlechten Abgrenzbarkeit der verschiedenen Leukozytenpopulationen in der graphischen Histogrammdarstellung der Durchflusszytometrie erklärt¹⁹⁸. Das in der Durchflusszytometrie gemessene Streulicht wird durch die Form, die Oberflächenbeschaffenheit sowie die intrazelluläre Granularität der Zellen beeinflusst¹⁹⁹. Zwar führt die Aktivierung von Granulozyten zu morphologischen und strukturellen Veränderungen, die Korrelation zwischen Vorwärtsstreulicht und der zellulären Größe ist jedoch nur eingeschränkt möglich²⁰⁰. Somit stellt die Messung des Streulichtes keinen validen Parameter zur Analyse von Zellgröße oder Zellform aktivierter PMN dar²⁰¹. Neutrophile Granulozyten und Monozyten ähneln sich in Größe und Granularität, was ihre Differenzierung im FSC/SSC-Diagramm erschwert^{202 35}. Auch in dieser Studie war es trotz entsprechender Eingrenzung nicht immer möglich, eine sichere Trennung der beiden Leukozytenpopulationen zu gewährleisten. Bei einer im Auswertefenster analysierten Zellzahl von 10000 Granulozyten ergibt sich jedoch für falsch mitanalysierte Monozyten ein aufgrund ihrer geringen Quantität zu vernachlässigender Messfehler¹⁹⁸. Die gemessenen Fluoreszenzsignale sind innerhalb eines Häufigkeitsdiagramms um einen Mittelwert gestreut¹³⁸. In dieser Studie verwendeten wir den Median um die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Zellpopulation zu ermitteln. Im Vergleich zum arithmetischen Mittelwert einer Normalverteilung zeigt der Median bei der statistischen Auswertung bei Messwerten mit einer starken Streuung eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Ausreißern²⁰³. Man erhält so bei der Auswertung des Medians eine bessere Reproduzierbarkeit der

Ergebnisse und eine höhere Präzision der Probenanalyse ²⁰³. Dieser Auswertemodus erwies sich insbesondere dort als vorteilhaft, wo interindividuelle Schwankungen der spontanen und/oder LPS-induzierten Expression zu Tage traten. Ansonsten wurde bei der Messung der Rezeptorenexpression aufgrund geringer Standardabweichungen trotz einer Differenz von nur circa 10% gegenüber den Kontrollwerten das Signifikanzniveau erreicht.

4.1.4 Auswahl der Messparameter

Die Wanderung von Leukozyten durch endotheliale Zellen der Blutgefäße zum Ort einer Entzündung wird durch Adhäsionsmoleküle eingeleitet. PMN exprimieren auf ihrer Oberfläche mindestens drei Klassen von Adhäsionsmolekülen, die für das Entlangwandern an Gefäßwänden (Rolling), das Anhaften an der Gefäßwand (Adhärenz) und das Auswandern in das Gewebe (Diapedese) erforderlich erscheinen ⁸³. Hierzu zählen die Selektine, die Integrine und die Immunglobulin-Superfamilie. In vorhergehenden Studien konnten für die vier in dieser Studie getesteten Substanzen bereits signifikant supprimierende Effekte auf die Bakterieneliminierung ¹²² bzw. Phagozytose ^{117 120 122 118 123} und den Oxidativen Burst ^{122 120} sowie auf die Leukozytenadhärenz und -aggregation ^{127 119 204} sowohl an isolierten Granulozytenpopulationen als auch z.T. in Vollblut-Assays gezeigt werden. Um weitergehende Informationen über die zellulären Mechanismen dieser medikamentös induzierten Effekte zu erhalten, waren in dieser Studie die Auswirkungen auf die spontane und LPS-induzierte Expression der Rezeptoren CD62L, CD11b, CD35 und CD16 als adhäsion- bzw. phagozytoseinduzierende Oberflächenmoleküle auf PMN, sowie das Zytokin Interleukin-8 in Vollblut von Interesse. Weiterhin wurde der NB1 Rezeptor untersucht, über dessen Funktion im Entzündungsgeschehen bisher relativ wenig bekannt ist.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Anästhetika- induzierte Veränderungen des Adhäsionsrezeptors CD62L (L-Selektin)

Basierend auf den bereits bekannten immunmodulativen Effekten von Ketamin, Thiopental, Propofol und Etomidat auf die granulozytäre Aktivität insbesondere der Phagozytose und der Adhäsion, wurde in dieser Studie zunächst der Einfluss auf die spontane und LPS-induzierte Expression des zugrunde liegenden Adhäsionsrezeptors CD62L (L-Selektin) im Vollblut-Assay untersucht. Die spontane Expression des CD62L-Rezeptors auf PMN war in dieser

Untersuchung individuell sehr verschieden, was sich in einer hohen Standardabweichung der unstimulierten Ansätze widerspiegelte. Nach Stimulation mit LPS kam es jedoch stets zu einem Aktivierungsprozess im Sinne des proteolytischen Sheddings mit numerisch sehr geringer Standardabweichung. Auffällig war hier, dass die Negativ-Kontrollen der LPS-stimulierten Proben in der drei Stundeninkubation niedriger lagen als nach 15 Minuten. Hierbei könnte es sich um eine zeitabhängig verminderte Affinität des Rezeptors für den von uns verwendeten Antikörper handeln. Solche Effekte sind für verschiedene Substanzen beschrieben worden ⁷. Aktivierung während der Aufarbeitung oder der längeren Inkubationszeit bei 37°C sind weitere mögliche Erklärungen ¹⁴¹. Zur Beurteilung der zeitlichen Effekte wurde der Unterschied in der Expression der beiden korrespondierenden Medikamentenproben der 15 Minuten- und 3-Stunden Inkubation ermittelt. Im Vergleich der jeweiligen LPS-Kontrollen ergaben sich jedoch keine Differenzen in den zeitlichen pharmakologischen Auswirkungen. Die dargestellten signifikanten zeitlichen Unterschiede sind deshalb nicht als medikamentös induziert zu werten, sondern auf den veränderten Stimulationseffekt durch LPS in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zurückzuführen. Wir konnten für jedes der getesteten Präparate bereits in klinisch relevanten Konzentrationen eine Steigerung des LPS-induzierten Sheddings in vitro nachweisen. Während dieser Effekt bei Ketamin und Propofol schnell und lang anhaltend nachzuweisen war, wurde er bei Etomidat erst nach 3 Stunden beobachtet. Thiopental hingegen steigerte die Aktivität des LPS induzierten Sheddings nur kurzfristig. In der 10-fach höheren Konzentration waren diese Effekte bei Ketamin und Propofol unverändert nachweisbar. Bei Thiopental war die Steigerung hingegen nun auch langfristig ausgeprägt. Überraschenderweise konnte für Etomidat in supraklinischer Konzentration kein Effekt auf das LPS-induzierte Shedding nachgewiesen werden. Im Unterschied zu der massiv aktivierenden Wirkung durch LPS, ergab das zusätzliche medikamentös induzierte Shedding numerisch nur geringe Steigerungen, so dass signifikante Unterschiede graphisch nur schwer darzustellen sind. Es ist möglich, dass es sich hierbei um ein rein statistisches Phänomen ohne jegliche klinische Relevanz handelt. Jedoch finden sich in der Literatur ähnlich aktivierende Ergebnisse, die eine genauere Analyse rechtfertigen.

Auch auf die Spontanexpression von L-Selektin wirkte sich die Inkubation in jeweils supraklinischer Dosierung aus. So kam es bei Propofol und Etomidat zu einer schnell einsetzenden und lang anhaltenden Verminderung der Spontanfluoreszenz. Bei Ketamin und Thiopental war dieser Effekt nach 15 Minuten angedeutet, erreichte aber erst nach 3 Stunden das Signifikanzniveau und war mit ca. 10% jedoch viel geringer ausgeprägt, als nach

Aktivierung mit LPS, bei der es zu einer um ca. 90%igen Rezeptorenverminderung kam. Dies kann entweder mit einer PMN-Aktivierung durch Ketamin oder aber durch Kontakt mit künstlichen Oberflächen während der in-vitro-Aufarbeitung erklärt werden^{205 206}. Jedoch widerspricht dies den Ergebnissen anderer Studien, die eine Beeinflussung der Spontanexpression des L-Selektins auf PMN in Vollblut durch Ketamin weder in vitro²⁰⁷ noch in vivo²⁰⁸ fanden. Weigand et al. arbeiteten mit heparinisiertem Vollblut, von dem bekannt ist, dass es leukozytäre Aktivierungsprozesse durch künstliche Oberflächen vermindert^{192 209 210}. Außerdem inkubierten sie lediglich über 20 Minuten, während wir für Ketamin erst nach 3 Stunden einen signifikanten Effekt erzielten, so dass langfristige Effekte von Weigand et al. nicht erfasst wurden. In einer anderen Studie konnte nach Inkubation mit 50 µM Thiopental eine frühzeitige Hemmung der Adhärenz von PMN unter basalen, nicht ischämischen Bedingungen am isolierten, perfundierten Meerschweinchenherzen festgestellt werden¹¹⁶, was ebenfalls für einen medikamentös induzierten Effekt spricht. Nach LPS-Stimulation zeigte sich in unserer Studie erwartungsgemäß ein frühzeitig auftretendes und lang anhaltendes Shedding von der granulozytären Oberfläche, das die Rezeptordichte um ca. 90% verringerte. Die physiologische Bedeutung des Sheddings von L-Selektin ist hierbei noch nicht vollständig geklärt. In klinisch relevanter Konzentration konnte für jedes der vier getesteten Medikamente eine Verstärkung des LPS-induzierten Sheddings gezeigt werden, in supraklinischer Dosis hingegen nur für Ketamin, Thiopental und Propofol. Thiopental steigerte diesen Effekt in supraklinischer Konzentration, während der Effekt bei Ketamin, Propofol und Etomidat unverändert war. Ob dieser aktivierende Effekt jedoch als adhäsionssteigernd oder aber inhibierend zu werten ist, bleibt strittig. In einer Studie war die Hemmung des TNF- α -induzierten Sheddings von L-Selektin Ursache für eine signifikant gesteigerte leukozytäre Adhärenz und Transmigration⁶⁸. Dies wurde mit einem LFA-1 und ICAM-1-abhängigen Mechanismus erklärt, der zu einer verlängerten Kontaktzeit der Leukozyten mit dem aktivierten Endothel und einer daraus resultierenden, verstärkten leukozytären Aktivierung führt. Aktivierung des Rezeptors resultiert hingegen in der proteolytischen Spaltung mit entsprechender Zunahme der Leukozytenmobilität und -geschwindigkeit im Sinne eines ungerichteteren Rollingprozesses^{74 67}. Der Zusammenhang zwischen Ligandenbindung und Crosslinking von L-Selektin und einer β 2-Integrinabhängigen Adhäsionssteigerung wurde mehrfach belegt^{68 76 75 77}. Die Beobachtung, dass sowohl CD11b als auch CD62L in unserer Studie als einzige der untersuchten Parameter auf eine klinisch relevante Konzentration aller vier getesteten Medikamente reagierten, weist auf eine Beeinflussung der granulozytären Adhäsion bereits in klinisch relevanter

Konzentration hin. Über die spezifische Wirkung adhäsionshemmender Substanzen auf die adhäsionsrelevanten Oberflächenrezeptoren von PMN wird kontrovers diskutiert. Der von uns gezeigte, aktivierende Effekt von Ketamin auf das CD62L-Shedding steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Weigand et al., die nach Stimulierung von heparinisiertem Vollblut mit FMLP oder PMA sowohl eine ketamininduzierte Reduktion der CD11b-Expression als auch ein vermindertes Shedding des L-Selektin und eine verminderte Superoxidanionenproduktion in Konzentrationen ab 200 μ M bei PMN beobachteten²⁰⁷. Wie oben erwähnt, bleibt die Bedeutung dieses zwar signifikanten, numerisch jedoch geringen Effektes unklar. Hingegen steht die supprimierende Wirkung der getesteten i.v.-Anästhetika auf die LPS-induzierte CD11b-Expression im Einklang mit den von Weigand et al. beschriebenen Veränderungen für Ketamin. Bislang existieren keine konkreten Daten über den Einfluss von Thiopental, Propofol und Etomidat auf das Shedding von L-Selektin. Szekely et al. zeigten jedoch auch eine frühzeitige Hemmung der ischämiebedingten Adhäsion von PMN am isolierten, perfundierten Meerschweinchenherzen nach Inkubation mit 25 μ Mol Thiopental¹¹⁶ im Sinne eines wahrscheinlich myokardprotektiven Effektes²¹¹. Eine weitere Studie untersuchte den Einfluss von Xenon auf die Spontanexpression und das FMLP-induzierte Abwerfen des CD62L-Rezeptors auf isolierten Granulozyten²¹² ebenfalls vor dem Hintergrund einer reduzierten Infarktgröße nach lokaler Ischämie im Kaninchenherz in vivo²¹³. Sie erhielten ähnlich aktivierende Resultate für das Shedding von L-Selektin wie wir sie zeigen konnten. Während dort eine Steigerung des Sheddings von ca. 30% zur FMLP-stimulierten Kontrolle gezeigt wurde, verstärkten die in unserer Studie untersuchten Pharmaka das LPS-induzierte Shedding um durchschnittlich 20%. Jedoch stellten de Rossi et al. keine Beeinflussung der β_2 -Integrinexpression fest. Während das Rolling, als erster Schritt im Adhäsionsprozess, durch klinisch relevante Dosen aller vier getesteten Medikamente signifikant verstärkt wurde, kam es in unserer Studie zu einer gleichzeitigen Hemmung der β_2 -Integrinexpression. Die frühe interzelluläre Adhäsion mit ihren nachgeschalteten Verfestigungsschritten wird dadurch gestört.

Über den Einfluss von Propofol auf die Adhärenz von PMN existieren bislang nur wenige und uneindeutige Ergebnisse^{126 116}. Hierbei scheint die Verwendung verschiedener Fettsäureemulsionen eine Rolle zu spielen. In unserer Untersuchung wurden gemischt mittel- und langkettige Triglyceride als Trägersubstanz sowohl für Propofol (*Propofol*-[®]*Lipuro*; B. Braun, Melsungen, Germany), als auch für Etomidat (*Etomidat*-[®]*Lipuro*; B. Braun, Melsungen, Germany) verwendet, für die insgesamt stimulierende Effekte auf die leukozytäre Aktivität beschrieben sind³. Während das LPS-induzierte Shedding des CD62L-Rezeptors

durch Propofol konzentrationsunabhängig gesteigert wurde, war in supraklinischer Konzentration überraschender Weise kein Effekt mehr auf die β 2-Integrinexpression nachzuweisen. In Anlehnung daran zeigten Szekely et al. für klinisch relevante, nicht aber für supraklinische LCT-Propofolkonzentrationen eine Minderung der postischämischen Adhärenz am isolierten, perfundierten Meerschweinchenherzen ¹¹⁶. Sie vermuteten einen wirkstoffspezifischen, immunsupprimierenden Effekt in klinisch relevanter Konzentration, der durch einen aktivierenden Effekt des Trägerstoffs Intralipid, einer langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäureemulsion, in hohen Dosen überlagert wird. Andere Autoren konnten keinen Effekt auf die Adhärenz durch Intralipid nachweisen ¹²⁶. Die supraklinische Etomidatkonzentration vermochte in dieser Studie keine signifikante Steigerung des LPS-induzierten Sheddings von L-Selektin mehr hervorzurufen. Auch die β 2-Integrinexpression wurde erst langfristig signifikant gehemmt, so dass im Vergleich zur klinisch relevanten Dosis ein angedeutet adhäsionssteigernder Effekt zu verzeichnen war.

Auch über den Einfluss von Etomidat auf die leukozytäre Adhärenz existieren in der Literatur uneinheitliche Aussagen. So unterstützen unsere Ergebnisse die Aussagen von Krumholz et al., die für klinisch relevante LCT-Etomidatkonzentrationen eine verminderte Adhärenz von isolierten PMN fanden ¹²⁷. Szekely et al. konnten weder mit 25 μ M noch 50 μ M einen Effekt für MCT/LCT-Etomidat am postischämischen, perfundierten Meerschweinchenherzen nachweisen ¹¹⁶, und auch Kress et al. fanden keine Effekte von Propylen-Glykol gelöstem Etomidat auf das spontane und FMLP-induzierte Migrationverhalten von isolierten PMN ²¹⁴. Diese Studien untersuchten jedoch nur kurzfristige Effekte. Wir aber konnten erst nach drei Stunden eine signifikante Verstärkung des LPS-induzierten Sheddings von L-Selektin in klinisch relevanter Etomidatkonzentration zeigen, was auf einen langfristigen Effekt hindeutet. Da wir jedoch in dieser Studie ein Vollblutverfahren anwendeten, sind direkte Vergleiche mit Ergebnissen an isolierten Granulozyten oder in vivo Studien schwierig. Die Adhäsion von Granulozyten im physiologischen Medium Blut ist weiterhin in entscheidendem Maße von den korrespondierenden Liganden auf den Gefäßwänden abhängig. Durch das Fehlen einer solchen endothelialen Oberfläche ist deswegen die Aussagekraft eines Vollblut-Assays eingeschränkt. Wir untersuchten handelsübliche Präparate, ohne den Einfluss ihrer Lösungsvermittler separat zu analysieren. In wieweit die von uns gezeigten konzentrationsabhängigen Effekte deshalb wirkstoffspezifisch oder aber vom Trägerstoff abhängig waren, konnte im Rahmen dieser Untersuchung nicht eindeutig geklärt werden. Dies scheint jedoch, besonders in Bezug auf die fettlöslichen Emulsionsbestandteile, aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zu den

wasserlöslichen Präparaten, ein nicht unerheblicher Einflussfaktor zu sein. In Anlehnung an die vorgenannten Untersuchungen sprechen unsere Ergebnisse jedoch insgesamt für hemmende Effekte auf die LPS-induzierte Expression adhäsionsrelevanter Oberflächenrezeptoren bereits in klinisch relevanter Konzentration und unterstützen somit die Aussagen anderer Studien, welche für Ketamin, Thiopental, Propofol und Etomidat in klinisch relevanter Konzentration inhibierende Effekte auf die Adhärenz^{116 126 127 119} fanden. In supraklinischer Konzentration zeichnete sich im Unterschied zu Ketamin und Thiopental ein eher neutraler bis aktivierender Effekt durch Propofol und Etomidat ab.

4.2.2 Anästhetika-induzierte Veränderungen der Komplementrezeptoren CR3 (CD11b/CD18), CR1 (CD35) und FcγRIII (CD16)

Für die in dieser Studie untersuchten Präparate sind immunmodulative Effekte, insbesondere auf die Phagozytose bekannt. Uns interessierte deshalb die Wirkung auf spezifische Oberflächenrezeptoren, die mit der Phagozytose in Verbindung gebracht werden. Im Speziellen wurde der Einfluss auf die spontane und LPS-induzierte Expression der Komplementrezeptoren CR3 (CD11b/CD18), CR1 (CD35) und FcγRIII (CD16) untersucht. Auch hierbei unterschieden sich die Effekte der wasserlöslichen Präparate Ketamin (*Ketamin Inresa*[®]; Solupharm, Melsungen) und Thiopental (*Trapanal*[®]; Altana Pharma, Konstanz) von den fettlöslichen Substanzen Propofol (*Propofol-[®]Lipuro*; B. Braun, Melsungen, Germany) und Etomidat (*Etomidat-[®]Lipuro*; B. Braun, Melsungen, Germany). Die Spontanexpression der Komplementrezeptoren wurde durch Ketamin und Thiopental nicht beeinflusst. Etomidat bewirkte hingegen eine kurzfristige Abnahme der spontanen CD11b-Expression. Erstaunlicherweise zeigte sich nach Inkubation mit Propofol eine rasch einsetzende und lang anhaltende Steigerung der spontanen CD16- und CD35-Expression, die bei LPS-Aktivierung nicht mehr nachzuweisen war. Um eine möglichst realistische Situation einer gram-negativen bakteriellen Sepsis zu imitieren^{32 34}, stimulierten wir PMN in Vollblut über 30 Minuten mit 10 ng LPS (Fa. Sigma, Serotyp 026:B6). Lynn et al. ermittelten 1 ng/ml R595 LPS als minimale Konzentration, um eine vermehrte Expression des CD11b/CD18 Rezeptors hervorzurufen. Eine maximale Stimulationsantwort erfolgte in einer Dosis zwischen 30 ng/ml und 100 ng/ml. Es fand sich eine schnelle Up-Regulation, die bereits nach 5 Minuten nachzuweisen war und ihr Maximum bei zwei bis dreifachem Ausgangswert nach 30 Minuten erreichte⁵. Wir erhielten ähnliche Stimulationswerte. Bei der Auswertung der Ergebnisse fiel auf, dass die Spontanexpression des Komplementrezeptors CD11b in der unstimulierten

Kontrolle im zeitlichen Verlauf um ca. 30% abnahm, wohingegen die LPS-stimulierte Kontrolle um ca. 15% zunahm, wodurch sich in Relation, ähnlich wie bei L-Selektin, ein scheinbar zeitlich signifikanter Effekt der medikamenteninkubierten Proben ergab. Die Bindung fluoreszierender Antikörper hängt nicht nur von der Expression der Komplementrezeptoren ab. Sie kann auch durch verschiedene Aktivitätsgrade des Rezeptors im Sinne einer verminderten oder erhöhten Affinität für den Liganden beeinflusst werden, was die beobachtete Diskrepanz zwischen stimulierten und unstimulierten Effekten erklären könnte. Ein Einfluss auf die Bindungsaffinität ist für verschiedene Substanzen beschrieben worden ⁷. Eine weitere Erklärung könnte in einer besonders guten Stimulierbarkeit des CD11b-Rezeptors durch LPS nach der 3-stündigen Vorinkubation bei 37°C liegen. Es ist bekannt, dass unterschiedliche Einflussfaktoren wie Inkubationstemperatur, -zeit, verwendetes Stimulanz und Antikoagulanzen die Expression des CD11b-Rezeptors auf PMN beeinflussen ^{215 216 141}. Shalekoff et al. zeigten, dass eine 18-stündige Inkubation bei 37°C im Vergleich zur Inkubation bei Raumtemperatur nach Antikoagulation mit EDTA sowohl in unstimuliertem als auch zytokinstimuliertem Vollblut zu einer dramatischen Down-Regulierung der CD11b-Rezeptorexpression auf PMN führte. Dieser Effekt war auf Lymphozyten ähnlich stark ausgeprägt aber nach Antikoagulation mit Heparin fast nicht nachweisbar ²¹⁵. Die von uns beobachtete zeitabhängige Down-Regulierung der unstimulierten CD11b-Rezeptor-Expression auf PMN stimmt mit dieser Beobachtung überein. Die Analyse des Blutes HIV- und pneumonieinfizierter Patienten ergab in o.g. Studie ähnliche Ergebnisse, ohne jedoch eine Spezifizierung in Hinblick auf die bakterielle oder virale Komponente zu geben. Youssef et al. zeigten eine signifikante Hochregulierung der CD11b-Rezeptorexpression nach Stimulierung von Vollblut mit PMA und Inkubation bei 37°C ¹⁴¹. Unterschiedliche Virulenzen könnten deshalb die von uns gezeigte Expressionssteigerung nach Stimulation mit LPS erklären.

Die von uns gezeigte, im Vergleich zu den anderen Parametern auffällig hohe Spontanfluoreszenz des CD16-Rezeptors von 500 ± 12 , wurde auch von anderen Autoren gefunden ^{217 218}. Nach Stimulierung mit LPS zeigte sich erwartungsgemäß eine lang anhaltende Expressionssteigerung aller untersuchten Komplementrezeptoren. In klinisch relevanter Konzentration konnte für jedes der getesteten Medikamente eine schnelle und lang anhaltende Suppression der LPS-induzierten CD11b-Expression von durchschnittlich 10% gezeigt werden. Die Inkubation mit der jeweils 10-fachen Dosis erbrachte für Ketamin und Thiopental eine Suppressionssteigerung auf ca. 30%. Die Rezeptorsuppression durch Etomidat erreichte in der hohen Dosis interessanterweise erst nach 3 Stunden das

Signifikanzniveau, und für Propofol konnte kein Einfluss mehr nachgewiesen werden, was auf einen stimulativen Einfluss in höheren Konzentrationen hindeutet. Der CD11b-Rezeptor nimmt eine Brückenfunktion zwischen Phagozytose und Adhäsion ein. Die von uns gefundenen Auswirkungen der Medikamente auf die Expression des Adhäsionsmoleküls CD62L lassen eine Beeinflussung der Funktion des β 2-Integrins im Rahmen der Adhäsion als relevant erscheinen. Ob die von uns gezeigte alleinige Expressionshemmung dieses Rezeptors in klinisch relevanter Konzentration auch die Phagozytose beeinflusst, ist fraglich. Die LPS-induzierte Expression der Rezeptoren CD16 und CD35 wurde durch Ketamin und Thiopental erst in supraklinischer Konzentration signifikant vermindert. Propofol bewirkte hier eine kurzfristige Steigerung der CD35-Expression. Die LPS-induzierte Expression des CD16-Rezeptors wurde nicht beeinflusst. Etomidat zeigte auch in supraklinischer Konzentration keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Expression von CD16 und CD35. Unsere Ergebnisse dokumentieren einen supprimierenden Effekt der LPS-induzierten Expression phagozytoserelevanter Oberflächenrezeptoren durch Ketamin und Thiopental erst in supraklinischen Konzentrationen. Etomidat zeigte hier eher neutrale, Propofol sogar stimulierende Effekte. Andere Vollblutstudien zeigten korrespondierend supprimierte Phagozytoseleistungen für Ketamin und Thiopental in vergleichbaren Dosen ¹²². Die durch Ketamin und Thiopental verminderte Rezeptorenexpression kann also einen entscheidenden Pathomechanismus für die Phagozytosehemmung durch die genannten Substanzen darstellen ¹²⁰. Untersuchungen an isolierten Granulozyten fanden für Ketamin und Thiopental hingegen schon in klinisch relevanter Konzentration hemmende Effekte auf die Phagozytose ^{117 125} und eine Hemmung der FMLP-induzierten intrazellulären Kalziumerhöhung für Thiopental ¹²⁵. Die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium als Reaktion auf die PMN-Aktivierung ist hierbei u.a. nötige Voraussetzung für die Expression phagozytose- und adhäsionsinduzierender Komplementfaktoren ⁹². Auf die LPS-induzierte Expression des phagozytoserelevanten Oberflächenrezeptors CD16 konnten wir weder durch Propofol noch durch Etomidat einen Einfluss nachweisen. Angedeutet aktivierende Effekte in supraklinischer Konzentration durch Propofol erreichten kein Signifikanzniveau. Übereinstimmend hiermit fanden Davidson et al. nach 24-stündiger Stimulation von Vollblut mit Hitze-deaktivierten Staphylokokkus aureus und einstündiger Propofolinkubation weder in klinisch relevanter noch in supraklinischer Konzentration Effekte auf die Phagozytose ¹²⁰. Auch Krumholz et al. konnten für die Produktion von bakteriziden Substanzen im Rahmen des oxidativen Burst keine Immunmodulation durch Etomidat bei isolierten PMN nachweisen ²¹⁹. Hingegen wurde in unserer Studie überraschenderweise die Spontanexpression der

Rezeptoren CD16 und CD35 im Gegensatz zu den übrigen getesteten Substanzen durch 100 µg/ml Propofol frühzeitig signifikant gesteigert. Nach LPS-Stimulation zeigte sich für den CD35-Rezeptor in supraklinischer Konzentration ebenfalls ein kurzfristig signifikanter Stimulationseffekt, der nach 3 Stunden nicht mehr nachzuweisen war. Propofol und Etomidat zeichnen sich in ihren handelsüblichen Darreichungsformen entweder durch gemischt mittel-langkettige (MCT/LCT) oder langkettige (LCT) Fettsäureemulsionen als Trägerstoffe aus, deren immunmodulativer Einfluss in mehreren Studien belegt wurde. Wir untersuchten in dieser Studie MCT/LCT-gelöste Präparate. Analog zu unseren Ergebnissen zeigten vorherige Studien inhibierende Effekte der langkettigen Fett-Emulsion und aktivierende Effekte der mittelkettigen Fettemulsion auf die E.coli- induzierte Phagozytose und den Oxidativen Burst in Vollblut ³. Auch andere in-vitro-Untersuchungen belegen eine frühzeitig und lang anhaltend inhibierende Wirkung des LCT-gelösten Propofol *Disoprivan*[®] und dessen Trägerstoff *Intralipid*[®] sowie LCT-Etomidat auf die Phagozytose und den Oxidativen Burst in klinisch relevanter und supraklinischer Konzentration ^{2 131 122 137}. Das wasserlösliche Etomidatpräparat *Hypnomidate*[®] und dessen alkoholischer Trägerstoff Propylenglycol wirkten sich ebenfalls negativ auf die E.coli-induzierte Phagozytose isolierter PMN aus ²²⁰. In einer in-vivo-Studie mit einer kontinuierlichen Infusion von 6-8 ml/kg/h LCT-Propofol fand sich ein inhibierender Effekt sowohl nach zwei Stunden, als auch nach vier Stunden. Allerdings ergab sich im Vergleich zu Isofluran in vivo eine geringere Diskrepanz in der Hemmung der Phagozytose als in vitro ²²¹. Die genannten in-vitro Untersuchungen verwendeten heparinisiertes Blut, von dem u.a. aus kardiopulmonalen Bypass-Modellen bekannt ist, dass es die Degranulierung von PMN und die Komplementaktivierung insbesondere des Faktors C3 mindert ^{222 223}. In früheren Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe konnte kein Unterschied in der Expression des CD11b und CD35-Rezeptors bei Verwendung von Heparin oder EDTA als Antikoagulation festgestellt werden. Allerdings gibt es auch Belege darüber, dass das von uns in dieser Untersuchung zur Antikoagulation benutzte EDTA die Phagozytose von bovinen PMN stärker inhibierte als Heparin ²²⁴. Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass die von uns in vitro gezeigten, hauptsächlich neutralen Effekte von MCT/LCT-gelöstem Propofol und Etomidat auf die Expression phagozytoserelevanter Oberflächenrezeptoren auf PMN durch diesen Effekt beeinflusst wurden. Insbesondere die gesteigerte Spontanexpression der Rezeptoren CD16 und CD35 durch Propofol lässt einen eventuell stärker ausgeprägten, stimulierenden Effekt in vivo möglich erscheinen. In wie weit die von uns gezeigten konzentrationsabhängigen Effekte wirkstoffspezifisch oder aber vom Trägerstoff abhängig waren, konnte im Rahmen dieser Untersuchung nicht geklärt werden.

Unsere Ergebnisse implizieren sowohl lösungsmittelinduzierte Unterschiede der medikamentösen Effekte als auch differente Auswirkungen in vitro und in vivo. Dies muss in weiteren Studien näher untersucht werden.

4.2.3 Fehlende Veränderungen des NB1-Rezeptors (HNA-2a, CD177) durch i.v. Anästhetika

Um die Rolle des NB1-Rezeptors (HNA-2a, CD177) und eventuelle medikamentöse Einflussfaktoren im Entzündungsprozess weiter aufzuklären, wurde in dieser Studie der Effekt von drei i.v. Anästhetika sowie eines Barbiturats in klinisch relevanter Dosis auf seine LPS-induzierte Expression auf PMN in Vollblut untersucht. Hierzu liegen bislang keine Ergebnisse vor. In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass NB1 u.a. durch bakterielle Entzündungsgeschehen und verschiedene Leukozytenaktivatoren vermehrt exprimiert wird^{107 102}. In dieser Studie konnten wir nun auch nach Stimulation mit LPS eine signifikante Expressionssteigerung von durchschnittlich 100% nachweisen. Sowohl die spontane, als auch die stimulierte Expression zeichnete sich durch interindividuelle Unterschiede aus. Dies spiegelte sich in einer hohen interindividuellen Standardabweichung wieder. Der Grund für das Auftreten so genannter Low-Responder wird auf molekulargenetischer Ebene im Sinne eines Transkriptionsdefektes vermutet^{225 226}. Diese Expressionsdefekte scheinen für Mitglieder der Ly-6 Superfamilie nicht ungewöhnlich zu sein²²⁷. Da die Stimulation von Granulozyten in Vollblut mit LPS als ex-vivo-Modell für die Untersuchung von Entzündungsvorgängen und septischen Krankheitsbildern anerkannt ist^{32 34}, unterstreicht die von uns beobachtete LPS-induzierte Expressionssteigerung die Vermutung, dass der Rezeptor im akuten, septischen Entzündungsgeschehen eine Rolle spielt. Auch ein vermehrter Oxidativer Burst wurde nach Antikörperbindung an den NB1-Rezeptor beschrieben²²⁸. Vor dem Hintergrund der bekannten immunmodulativen Effekte von Ketamin, Thiopental, Propofol und Etomidat wäre eine Beeinflussung der LPS-induzierten Expression des NB1-Rezeptors daher durchaus denkbar. Da sich jedoch in den Vorversuchen unserer Studie keinerlei Effekte der untersuchten Präparate auf dessen Expression darstellen ließen, beschränkten wir die Probandenzahl auf n = 6. Die Beobachtung eines neutralen Effektes ist erstaunlich, da ein Einfluss der Anästhetika in klinisch relevanter Konzentration z.B. auf den Oxidativen Burst belegt ist^{2 122}. Die Expression des CD11b-Rezeptors, welcher u.a. eine Rolle für den Oxidativen Burst spielt^{229 230}, wurde in unserer Studie bereits in klinisch relevanten Konzentrationen signifikant beeinflusst. Ausserdem ist bekannt, dass der

NB1-Rezeptor durch Bindung an das endotheliale Zelladhäsionsmolekül PECAM-1 an der Transmigration von Granulozyten beteiligt ist ¹⁰⁸. Unsere Ergebnisse zeigten jedoch, dass die Expression der adhäsionsrelevanten Rezeptoren CD62L und CD11b durch klinisch relevante Konzentrationen aller vier getesteten Medikamente signifikant beeinflusst wurde. Somit scheint der NB1-Rezeptor durch Inkubation mit i.v. Anästhetika und Barbituraten in klinisch relevanten Dosierungen unbeeinflusst zu bleiben. Dies entspricht den Ergebnissen, die wir für die Komplementrezeptoren CD16 und CD35 zeigen konnten. Diese Beobachtung impliziert einen anderen Induktionsweg für NB1, als wir ihn für die übrigen untersuchten Oberflächenrezeptoren darstellen konnten. Die Tatsache, dass Frauen einen höheren Prozentsatz an CD177-positiven Subpopulationen aufweisen ¹⁰³, und sich während der Schwangerschaft die Expression des HNA-2a-Antigens erhöht ¹⁰⁹, lässt u.a. einen hormonellen Einfluss vermuten. Unsere Studie untersuchte jedoch ein rein männliches Probandenkollektiv. Inwieweit differente Ergebnisse bei einem vergleichbaren weiblichen Kollektiv auftreten können und die Frage, ob supraklinische Anästhetikakonzentrationen Auswirkungen auf die NB1-Expression auf PMN besitzen, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

4.2.4 Anästhetika-induzierte Effekte auf die Synthese von Interleukin-8 (IL-8)

Wir wählten Interleukin-8, weil es eines der wenigen von PMN synthetisierten Zytokine darstellt. Im unstimulierten Vollblut zeigte sich in dieser Studie überraschenderweise eine signifikante medikamentös induzierte Synthesesteigerung des Zytokins IL-8 in jeweils supraklinischer Konzentration durch Inkubation mit Ketamin (1 mM), Thiopental (400 µg/ml) und Propofol (100 µg/ml). Etomidat (5 µg/ml) zeigte keinen signifikanten Effekt. Nach LPS Stimulation konnte in klinisch relevanter Konzentration für keine der getesteten Substanzen ein signifikanter Effekt dargestellt werden (Ketamin 100 µM, Thiopental 40 µg/ml, Propofol 10 µg/ml, Etomidat 0,5 µg/ml). In supraklinischer Dosierung zeigte Propofol eine schnell einsetzende und lang anhaltende signifikante Synthesesteigerung. Ketamin zeigte frühzeitig einen angedeuteten stimulativen Effekt, welcher nach drei Stunden das Signifikanzniveau erreichte. Lediglich für Etomidat und kurzfristig auch für Propofol konnten in klinisch relevanter Dosis angedeutete, nicht signifikante Suppressionseffekte dargestellt werden.

Im Hinblick auf die in dieser Studie gezeigten suppressiven Wirkungen auf funktionsrelevante Oberflächenrezeptoren stehen unsere Ergebnisse hierbei in deutlichem

Gegensatz zu den von uns erwarteten und den bisher publizierten Studien. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen hemmten Ketamin und Thiopental die IL-8-Synthese in vorherigen Vollblutstudien in vitro konzentrationsabhängig^{52 164}. Auch Propofol zeigte in vorherigen Studien signifikant supprimierende Effekte auf die IL-8-Sekretion in vivo wie auch bei isolierten LPS-stimulierten Granulozyten^{231 232}. Die Auswirkungen von Etomidat auf die IL-8-Sekretion sind bislang nicht dokumentiert.

Welters et al. stimulierten Vollblut mit 100 ng/ml LPS und konnten eine konzentrationsabhängige Minderung der IL-8 Sekretion von ca. 25% bereits durch 100 µM Ketamin verzeichnen. Bei einer supraklinischen Ketaminkonzentration von 1 mM wurde die IL-8 Sekretion sogar um fast 90% gesenkt. Hierzu korrelierend konnte mittels RT-PCR in der supraklinischen Ketamin Konzentration nach LPS Stimulation ein abgeschwächter Gehalt an IL-8-mRNA in den Granulozyten dargestellt werden. Im Zusammenhang mit einer ebenfalls durch Ketamin hervorgerufenen Suppression der intrazellulären Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB, konnte hier auf eine zumindest teilweise, in hohen Ketaminkonzentrationen stattfindende transkriptionelle Hemmung der IL-8 Synthese in Vollblut geschlossen werden¹²³. Loop et al. fanden einen kausalen Mechanismus zwischen der thiopentalinduzierten Hemmung von NFκB und der Immunsuppression an Lymphozyten²³³. Hierbei konnten sie eine Beeinflussung der NFκB-Aktivität für Thiopental, nicht aber für Ketamin und Propofol nachweisen. Sun et al. führten hingegen eine ketamininduzierte Suppression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF-α auf eine Hemmung durch NFκB zurück²³⁴. Kawasaki et al. fanden für Ketamin > 20 µg/ml eine signifikante Suppression der LPS induzierten TNF-α Produktion. In einer supraklinischen Ketaminkonzentration von 100 µg/ml bis 500 µg/ml konnten sie sowohl eine signifikante Suppression der LPS induzierten TNF-α- als auch der IL-6- und IL-8- Produktion zeigen. Gleichzeitig supprimierte Ketamin > 100 µg/ml die IL-6- und IL-8-Konzentration in Vollblut, welches mit rekombinantem humanem TNF-α stimuliert worden war. Die Ergebnisse von Kawasaki et al. deuten somit auf eine direkte Inhibierung der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α, IL-6 und IL-8 durch Ketamin hin. Als Testsubstanz benutzten wir das handelsübliche Ketanest (*Ketamin Inresa*; Solupharm, Melsungen) sowie in einer zweiten Versuchsreihe (\pm)-*Ketamine Hydrochlorid* als Trockensubstanz der Firma Sigma-Aldrich gelöst in Wasser für Injektionszwecke (*Aqua ad iniectabilia*; Baxter S.A.; Ergebnisse nicht dargestellt), um eventuell wirkstoffunabhängige, lösungsmittelinduzierte Effekte auszuschließen. Die Ergebnisse unterschieden sich hierbei jedoch nicht. Vorherige Untersuchungen zeigten keinen

Unterschied in der Wirkung der zwei Ketamin Isomere S(+) und S(-) ²³⁵. Galley et al. fanden im Unterschied zu uns keinen signifikanten Effekt von supraklinischer Propofolkonzentration auf unstimulierte Granulozyten. Allerdings konnten sie signifikante Abnahmen der extrazellulären IL-8-Konzentration an isolierten, propofolinkubierten Granulozyten nach LPS-Stimulation feststellen. Bereits nach vierstündiger LPS-Stimulation beobachteten sie erhöhte mRNA-Konzentrationen für IL-8, welche durch Inkubation mit Propofol weiter gesteigert werden konnten. Alleinige Exposition mit Propofol hatte jedoch keinen Effekt auf die IL-8-mRNA. Die intrazelluläre IL-8-Konzentration in LPS-stimulierten Granulozyten war in Anwesenheit von Propofol erhöht und stieg in Abhängigkeit einer steigenden Propofolkonzentration weiter an. Diese Beobachtungen ließen auf einen posttranslationalen Wirkmechanismus im Sinne eines gehemmten intrazellulären Transports oder einer gehemmten Sekretion durch Propofol schließen ²³². Galley et al. stimulierten isolierte humane Granulozyten mit 2 µg/ml LPS über 20 Stunden und erhielten so wesentlich höhere Stimulationswerte, als wir in dieser Arbeit zeigen konnten. Sie untersuchten isolierte Zellen, wohingegen wir ein Vollblut-Assay verwendeten. Die Verwendung eines Northern blots zur Untersuchung der propofolabhängigen Synthese von IL-8-mRNA in Granulozyten im physiologischen Medium Blut muss in weiteren Arbeiten erfolgen.

Inwieweit unterschiedliche Stimulationswerte durch LPS differente medikamentöse Effekte auf die IL-8-Synthese bedingen, ist fraglich. Die von uns erzielten Kontrollwerte nach 8-stündiger Inkubation mit 10 ng/ml LPS lagen mit 557 pg/ml bzw. 663 pg/ml jedoch deutlich unter den Stimulationseffekten anderer Studien. Kawasaki et al. fanden nach 6 Stunden Inkubation mit gleicher LPS-Konzentration eines anderen Serotyps eine Synthesesteigerung auf 900 pg/ml bzw. nach 12 Stunden auf 1500 pg/ml ⁵². Welters erreichte durch Inkubation mit 10 ng/ml LPS Stimulationswerte um 2160 pg/ml ¹²³.

Unsere Ergebnisse lassen aufgrund der hohen Standardabweichung keine eindeutige Interpretation zu. Eine klinische Relevanz ist somit fraglich. Weshalb es in dieser Studie trotz wiederholter Versuche zu einer solch hohen Standardabweichung kam, bleibt ungeklärt. Veränderungen des pH-Werts konnten mittels Teststäbchen ausgeschlossen werden. Grobe Fehler in der Aufarbeitung konnten durch die realistischen Basalwerte in den Negativkontrollen ebenfalls ausgeschlossen werden. Die von uns getesteten Medikamentenkonzentrationen waren vergleichbar mit denen anderer Studien ^{125 164}. Allerdings sind hohe interindividuelle Unterschiede in der Zytokinproduktion nach LPS-Aktivierung sowohl für Vollblut als auch für isolierte Monozyten beschrieben ¹⁸⁷.

Unterschiede in der LPS-induzierten Immunantwort werden u.a. auf Mutationen der genetischen Codierung für TLR4 zurückgeführt^{172 173 174}.

In weitergehenden Untersuchungen sollte geklärt werden, inwieweit die untersuchten Pharmaka die transkriptionelle Aktivierung des IL-8 als wichtigen Mediator der Chemotaxis und Aktivator der granulozytären Entzündungsreaktion beeinflussen. Die bisher vorhandenen Daten sind diesbezüglich uneindeutig. Auch sollte ein möglicher Einfluss unterschiedlicher Emulsionslösungen, insbesondere der gemischt mittel- langkettigen Triglyceride, näher beleuchtet werden.

4.3 Mögliche klinische Relevanz

Bei septischen Krankheitsbildern kann es infolge einer überschießenden Immunantwort zum schockhaften Zustandsbild mit hämodynamischer Instabilität kommen²³⁶. In der Frühphase der Behandlung septischer Krankheitsbilder können immunsuppressive Therapieverfahren deshalb eine wirkungsvolle und präventive Massnahme darstellen. In vorhergehenden Studien konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein Zusammenhang zwischen *i.v.* anästhetikainduzierter Immunsuppression und einem positiven klinischen Outcome bei SIRS, Sepsis und septischem Schock dargestellt werden. Hierbei wurde vor allem die Hemmung auf Ebene der proinflammatorischen Zytokinsynthese durch klinische Konzentrationen von Ketamin^{237 238 239 240} und Propofol²⁴¹ sowie antioxidative Wirkungen durch Propofol beschrieben²⁴². Auch im Anschluss an kardiovaskuläre Bypassoperationen konnte durch die Gabe von niedrig dosiertem Ketamin eine verminderte Vasodilatation sowie eine signifikante Reduktion des postoperativen Anstiegs von CRP, IL-6 und Il-10, nicht aber von Il-8 verzeichnet werden²⁴³. Diese Ergebnisse verdeutlichen die klinische Relevanz immunmodulativer Effekte von *i.v.* Anästhetika. Es stellt sich jedoch die Frage, welche weiteren Stufen der physiologischen Entzündungskaskade mit einem positiven klinischen Outcome korrelieren bzw. welche Oberflächenrezeptoren hierdurch beeinflusst werden. In unserer Untersuchung zeigten nach LPS-Stimulation alle vier Medikamente in jeweils klinisch relevanter Dosierung frühzeitig und mit Ausnahme des Barbiturats Thiopental (CD62L) auch langfristig hemmende Effekte auf die Expression der adäsionsrelevanten Oberflächenrezeptoren CD62-L und des β 2-Integrins CD11b. Dies korreliert mit den Ergebnissen der vorgenannten Untersuchungen auf Rezeptorebene. Das fehlende Ansprechen der phagozytoserelevanten Oberflächenrezeptoren CD16 und CD35 auf klinisch relevante Konzentrationen aller vier Medikamente steht dem entgegen. Im standardisierten klinischen

Setting bei bakterieller Sepsis oder systemischen Entzündungsreaktionen könnte deshalb auch die verminderte Expression adhäsionsrelevanter Oberflächenrezeptoren mit einem verbesserten Outcome in vivo einhergehen. Für phagozytoserelevante Rezeptoren können wir dies jedoch nicht postulieren. Dies muss in folgenden klinischen Studien näher untersucht werden.

Supraklinische Konzentrationen von Anästhetika finden sich im klinischen Alltag u.a. durch Akkumulation bei Langzeitsedationen in Kombination mit Störungen des Metabolismus (z.B. Nieren-/Leberinsuffizienz) oder im entzündeten Gewebe. Wir konnten konzentrationsabhängige Unterschiede auf Rezeptorebene bei allen vier untersuchten Substanzen nachweisen. Die zusätzliche Reduktion phagozytoserelevanter Rezeptoren durch Ketamin und Thiopental in hohen Konzentrationen könnte eine effektivere Hemmung autolytischer Prozesse im Rahmen septisch bedingter Gewebeschäden bedingen. So konnte bei Ratten in vivo nur durch supraklinische Ketaminkonzentrationen die endotoxininduzierte Schädigung des Lungenparenchyms reduziert werden²⁴⁴. In der genannten Studie wurde die Aktivität von NFκB zwar bereits durch klinisch relevante Ketaminkonzentrationen (5 mg/kgKG) gehemmt, eine Reduktion der Myelo-Peroxidase sowie der TNF-α und IL-6-Synthese liess sich hingegen erst in supraklinischer Konzentration (50 mg/kgKG) nachweisen. Eine gehemmte Adhäsion scheint in vivo also nur durch die gleichzeitige Hemmung der phagozytoseinduzierenden Rezeptoren mit einem konsekutiv verminderten Oxidativen Burst einen protektiven Effekt auf das entzündete Lungengewebe zu haben. Gleichzeitig muss jedoch auch eine potentielle Verschlechterung der mikrovaskulären Blutversorgung durch Hemmung der endothelialen Stickoxid-Synthase durch Ketamin²⁴⁵ bedacht werden.

Propofol und Etomidat zeigten in hoher Dosierung eine eher rückläufige Hemmung der adhäsionsrelevanten Rezeptoren. Die phagozytoserelevanten Rezeptoren wurden durch Etomidat nicht beeinflusst. Für Propofol liessen sich hingegen sogar stimulative Effekte auf die Expression von CD35 zeigen. Wir konnten somit zeigen, dass die immunsuppressiven Effekte von Propofol und Etomidat in supraklinischen Konzentrationen auf Rezeptorebene nachlassen. Diese auf Rezeptorebene gegensätzlichen Effekte im Vergleich zu Ketamin und Thiopental könnten durch die gemischt mittel- langkettige Fettsäureemulsion bedingt sein. Trotzdem gibt es in vivo am Rattenmodell auch Hinweise auf einen protektiven Effekt von Propofol lediglich in hohen Dosen auf die LPS-induzierte Schädigung des Lungenparenchyms²⁴⁶. Den hierbei zugrunde gelegten Kriterien einer verminderten Leukosequestration, Lungenödem und der pulmonalen Hyperpermeabilität wurden

leukozytäre Aktivitätsgrade jedoch nicht zugeordnet, was einen Vergleich mit unserer Studie schwierig macht. Obwohl Propofol im klinischen Alltag gerne zur Sedation kritisch Kranker Patienten verwendet wird, gibt es auch Hinweise auf propofolinduzierte Komplikationen. So ist bekannt, dass es sowohl bei Langzeitsedierung, als auch bei einer Propofolanästhesie ab fünf Stunden unter bestimmten Voraussetzungen zum Propofol-Infusionssyndrom mit konsekutiver Lactatazidose kommen kann ²⁴⁷. Die genauen Mechanismen sind hierbei noch nicht geklärt. Als auslösende Ursachen gelten geringe Sauerstoffsättigung, cerebrale Traumata, hohe Propofolkonzentrationen und Sepsis ²⁴⁸. So wurde kürzlich von einem septischen Patienten ohne neurologische Störung mit Propofol-Infusionssyndrom berichtet ²⁴⁹. Ob auch immunmodulative Wirkungen durch Propofol hierbei eine Rolle spielen, ist spekulativ. Wir konnten jedoch auch im unstimulierten Vollblut eine Steigerung der phagozytoserelevanten Rezeptoren CD16 und CD35 durch supraklinische Propofolkonzentrationen nachweisen. Ob diese Beobachtung klinisch relevant im Sinne einer gesteigerten autoimmunen Reaktion sein kann, muss in weiteren Studien geklärt werden. Unsere Ergebnisse auf Rezeptorebene sprechen jedoch für einen kritischen Umgang mit Etomidat und vor allem Propofol bei der Langzeitsedierung septischer Patienten.

Im Rahmen lokaler Ischämien, wie zum Beispiel beim akuten Koronarsyndrom, kommt es beim Menschen im Vollblut-Assay zur systemischen Aktivierung von PMN ²⁵⁰, sowie zu postischämischen Reperfusionsschäden am Myokard. Hierbei spielen die durch PMN produzierten freien Sauerstoffradikale eine entscheidende Rolle ^{251 252 253}. Die Hemmung der interzellulären Adhäsion führt daher zu geringeren Zellschädigungen am Myokard ^{252 211 254 255}. Szekely et al. konnten am isolierten Meerschweinchenherzen eine Hemmung der postischämischen Adhäsion durch klinisch relevante Konzentrationen von Ketamin und Thiopental zeigen, wohingegen Propofol und Etomidat in klinisch relevanter Konzentration keinen Effekt hatten ¹¹⁶. Unsere Ergebnisse auf Rezeptorebene unterstützen diese Ergebnisse für Ketamin und Thiopental im Sinne einer reduzierten Expression adhäsionsrelevanter Oberflächenrezeptoren und des β 2-Integrins. Die nur kurzfristig vorhandene Wirkung durch Thiopental auf L-Selektin scheint deshalb klinisch nicht relevant zu sein. Jedoch konnten wir auch für Propofol und Etomidat in klinisch relevanten Konzentrationen eine Abnahme der Expression adhäsionsrelevanter Oberflächenrezeptoren und des β 2-Integrins zeigen. Im Hinblick auf die antioxidative und hemmende Wirkung auf freie Sauerstoffradikale, welche einen protektiven Effekt gegen Reperfusionsschäden bedingen, wird Propofol klinisch gerne zur Anästhesie kardiochirurgischer Patienten eingesetzt ¹²⁹. Nach LPS-Stimulation konnten wir in klinisch relevanter Konzentration für keines der getesteten Medikamente einen Effekt

auf die Rezeptoren CD35 und CD16 nachweisen. Die PMN-Aktivierung durch ischämische Prozesse ist jedoch nicht unbedingt gleichzusetzen mit einer septisch induzierten Aktivierung. Unsere Beobachtung eines stimulativen Effekts auf die Spontanexpression von CD16 und CD35 von Propofol in hoher Konzentration gibt ebenso wie die hämodynamischen Effekte Anlass zur kritischen Indikationsstellung bei langfristiger Anwendung von Propofol bei kardialen Risikopatienten. Entsprechende Studien an einem geeigneten Probandenkollektiv sollten deshalb folgen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde in einem Vollblut-Assay der Einfluss der in der Anästhesie gebräuchlichen i.v. Anästhetika Ketamin, Propofol und Etomidat sowie des Barbiturats Thiopental auf die spontane und LPS-induzierte Aktivität von PMN bestimmt. Hierbei wurden das Adhäsionsmolekül CD62L (L-Selektin), die Komplementrezeptoren CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) und CD16 (Fc γ RIII) sowie der NB1-Rezeptor (HNA-2a, CD177) als entzündungsrelevante, granulozytäre Oberflächenmoleküle mittels Durchflusszytometrie genauer untersucht. Die Bestimmung des u.a. von PMN synthetisierten, proinflammatorischen Zytokins Interleukin-8 erfolgte mittels Sandwich-ELISA.

Unsere Ergebnisse bestätigen immunmodulierende Wirkungen aller vier getesteten Medikamente auf Rezeptorebene. Es konnten differente Effekte der einzelnen Pharmaka auf die spontane und LPS-induzierte granulozytäre Aktivität in konzentrations- und zeitabhängiger Weise dargestellt werden.

Die Spontanexpression des CD62L-Rezeptors wurde von Propofol und Etomidat schnell und lang anhaltend, durch Ketamin und Thiopental erst langfristig im Sinne eines aktivierten Sheddings vermindert. Propofol steigerte gleichzeitig die Spontanexpression der Rezeptoren CD35 und CD16 im Sinne eines phagozytosestimulierenden Effekts. Die spontane Sekretion des IL-8 wurde von Ketamin, Thiopental und Propofol signifikant gesteigert. Für Etomidat konnte dieser Effekt nicht dargestellt werden.

Nach LPS-Stimulation zeigte sich ein anderes Bild. Klinisch relevante Konzentrationen aller vier getesteten Medikamente führten zu einem vermehrten Shedding von L-Selektin. Dies konnte für Thiopental nur kurzfristig, für Etomidat erst langfristig dargestellt werden. Gleichzeitig wurde die Expression des β 2-Integrin CD11b in klinisch relevanten Dosen vermindert, was auf einen adhäsionshemmenden Effekt aller vier Medikamente in klinisch relevanten Konzentrationen hindeutet. IL-8, als konformationsänderndes Zytokin wurde im Gegensatz zu anderen Studien nicht signifikant beeinflusst. Auch auf die Expression der Rezeptoren CD16 und CD35 konnte in klinisch relevanten Konzentrationen für keines der Medikamente ein Effekt nachgewiesen werden.

In 10-fach höherer Konzentration unterschieden sich die Wirkungen durch Ketamin und Thiopental von Propofol und Etomidat. Das Shedding von CD62L wurde durch Ketamin, Thiopental und Propofol schnell und lang anhaltend, durch Etomidat jedoch nicht vermehrt aktiviert. Ketamin und Thiopental zeigten in supraklinischer Konzentration eine weitere Suppression der CD11b-Expression. Für Etomidat konnte hingegen erst langfristig und für

Propofol gar kein Effekt mehr nachgewiesen werden. Hier zeigte sich eine, im Vergleich zur klinisch relevanten Konzentration, schwächere Hemmung adhäsionsrelevanter Rezeptoren durch Propofol und Etomidat. Dies könnte durch die gemischt mittel- langkettige Fettemulsionslösung verursacht sein. Interleukin-8 wurde durch Ketamin, Thiopental und Propofol in hohen Dosen signifikant gesteigert. Für Etomidat konnte aufgrund hoher Standardabweichungen kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden. Die Expression der Komplementfaktoren CD16 und CD35 wurde durch Ketamin und Thiopental in supraklinischer Konzentration signifikant vermindert. Etomidat und Propofol zeigten hierbei keine Wirkung. Lediglich die Expression des CD35-Rezeptors wurde durch Propofol kurzfristig gesteigert im Sinne eines aktivierenden Effekts.

Der NB1-Rezeptor wurde durch keines der untersuchten Medikamente beeinflusst, was auf einen anderen Induktionsweg hindeutet. Seine Rolle im Entzündungsgeschehen muss in weiteren Studien genauer untersucht werden.

6 Summary

In this study we examined the influence of the commonly used i.v. anaesthetics Ketamine, Propofol and Etomidate as well as the barbiturate Thiopentone on spontaneous and LPS-induced activity of PMN in a whole blood assay. We studied the complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) and CD16 (Fc γ RIII), the adhesion molecule CD62L and the NB1-receptor (HNA-2a, CD177) as infection-relevant granulocytic surface-molecules via flow cytometry. One of the players involved in the production of IL-8 as a pro-inflammatory cytokine are known to be PMN. The quantification of IL-8 production was evaluated by Sandwich-ELISA.

Our Results confirm immune-modulating effects on a cellular level by all four tested drugs on the level of receptor-expression. We could show different specific effects induced by all drugs in terms of spontaneous and LPS-induced activity in a concentration- and time-dependant matter.

Both short and long term spontaneous expression of CD62L-receptor was reduced by Propofol and Etomidate. Ketamine and Thiopentone showed delayed reduction of the CD62L-expression in terms of an activated shedding. Propofol also enhanced the spontaneous expression of CD35 and CD16 in terms of a phagocytosis-stimulating effect. Furthermore the spontaneous production of IL-8 was significantly enhanced by Ketamine, Thiopentone and Propofol but not by Etomidate.

After stimulation with LPS the effects changed. Clinical relevant concentrations of all tested drugs caused an increased shedding of L-Selectin. This effect was induced by Thiopentone only after short time exposure. Etomidate showed an effect only after long time exposure. Simultaneously the expression of β 2-integrin CD11b was lowered by clinical relevant concentrations of all tested drugs. These findings indicate that all tested drugs used in a clinically relevant concentration have an inhibiting effect on the cellular expression of receptors associated with cell-adhesion. In contrast to previous studies we could not show that the tested drugs used in clinically relevant concentrations influence the production of IL-8. In addition none of the tested drugs showed an effect on the expression of CD16 and CD35 in clinically relevant concentrations.

When we used these drugs in 10-fold higher concentration we found different effects. Ketamine and Thiopentone on one hand and Propofol and Etomidate on the other hand. The shedding of CD62L was quickly and prolonged enhanced by Ketamine, Thiopentone and Propofol whereas Etomidate showed no effect. The expression of CD11b was further

suppressed by high concentrations of Ketamine and Thiopentone. Etomidate exhibited this effect only after three hours, whereas Propofol had no effect. Compared with clinically relevant concentrations of Etomidate and Propofol we found a less depressive effect on the expression of receptors associated with cell-adhesion when higher concentrations were used. This could be explained by side-effects produced by the MCT/LCT lipid containing solution. The production of IL-8 was significantly enhanced by high concentrations of Ketamine, Thiopentone and Propofol. Etomidate failed to show statistically significant effects. The expression of surface receptors CD16 and CD35 was significantly inhibited by high concentrations of Ketamine and Thiopentone but there was no such effect by Etomidate and Propofol. During short-term incubation, only the expression of CD35 was enhanced by Propofol, indicating an activating effect.

The NB1-Receptor was not influenced by any of the tested drugs. Its role during infection must be further investigated in upcoming studies.

7 Literaturverzeichnis

1. Stevenson GW, Hall SC, Rudnick S, Seleny FL, Stevenson HC: The effect of anesthetic agents on the human immune response. *Anesthesiology* 1990; 72: 542-52
2. Heine J, Leuwer M, Scheinichen D, Arseniev L, Jaeger K, Piepenbrock S: Flow cytometry evaluation of the in vitro influence of four i.v. anaesthetics on respiratory burst of neutrophils. *Br J Anaesth* 1996; 77: 387-92
3. 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; 45: 213-20
4. Eberhardt KE, Thimm BM, Spring A, Maskos WR: Dose-dependent rate of nosocomial pulmonary infection in mechanically ventilated patients with brain oedema receiving barbiturates: a prospective case study. *Infection* 1992; 20: 12-8
5. Lynn WA, Raetz CR, Qureshi N, Golenbock DT: Lipopolysaccharide-induced stimulation of CD11b/CD18 expression on neutrophils. Evidence of specific receptor-based response and inhibition by lipid A-based antagonists. *J Immunol* 1991; 147: 3072-9
6. Edwards SW: Biochemistry and physiology of the neutrophil. *Neutrophils and host defense* 1994: 1 - 32
7. Edwards SW: Biochemistry and physiology of the neutrophil. The generation and recognition of neutrophil-activating factors: Structure and funktion of neutrophil receptors 1994: 77 - 125
8. Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S: Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 155-77
9. Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346: 425-34
10. Butcher EC: Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991; 67: 1033-6
11. Jung U, Ley K: Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *J Immunol* 1999; 162: 6755-62
12. Forrester JV, Lackie JM: Adhesion of neutrophil leucocytes under conditions of flow. *J Cell Sci* 1984; 70: 93-110
13. Ley K, Bullard DC, Arbones ML, Bosse R, Vestweber D, Tedder TF, Beaudet AL: Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med* 1995; 181: 669-75
14. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC: Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 1989; 245: 1238-41
15. Dunne JL, Ballantyne CM, Beaudet AL, Ley K: Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood* 2002; 99: 336-41
16. Dunne JL, Collins RG, Beaudet AL, Ballantyne CM, Ley K: Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation. *J Immunol* 2003; 171: 6105-11
17. Zimmerman GA, McIntyre TM, Mehra M, Prescott SM: Endothelial cell-associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion. *J Cell Biol* 1990; 110: 529-40

18. Rainger GE, Fisher AC, Nash GB: Endothelial-borne platelet-activating factor and interleukin-8 rapidly immobilize rolling neutrophils. *Am J Physiol* 1997; 272: H114-22
19. Nash S, Stafford J, Madara JL: Effects of polymorphonuclear leukocyte transmigration on the barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1987; 80: 1104-13
20. Janeway C. A., P. T: *Immunologie*, 2. Auflage. Berlin Oxford, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1997
21. Frank JHM: Wanderverhalten neutrophiler Granulozyten in einem Transmigrationsverfahren, Dissertation. Hannover, Tierärztliche Hochschule, 2000
22. Dustin ML, Springer TA: Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 27-66
23. Hynes RO: Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48: 549-54
24. Edwards SW, Watson F: The cell biology of phagocytes. *Immunol Today* 1995; 16: 508-10
25. Madara JL: Migration of neutrophils through epithelial monolayers. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 4-7
26. O'Shea JJ, Brown EJ, Seligmann BE, Metcalf JA, Frank MM, Gallin JI: Evidence for distinct intracellular pools of receptors for C3b and C3bi in human neutrophils. *J Immunol* 1985; 134: 2580-7
27. Detmers PA, Zhou D, Powell D, Lichenstein H, Kelley M, Pironkova R: Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase. *J Immunol* 1995; 155: 2085-95
28. da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ: Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 2001; 276: 21129-35
29. Dobrovolskaia MA, Vogel SN: Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect* 2002; 4: 903-14
30. Ohlsson K, Linder C, Lundberg E, Axelsson L: Release of cytokines and proteases from human peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells following phagocytosis and LPS stimulation. *Scand J Clin Lab Invest* 1996; 56: 461-70
31. Blix IJ, Helgeland K, Kahler H, Lyberg T: LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the expression of beta2 integrins and L-selectin in an ex vivo human whole blood system. *Eur J Oral Sci* 1999; 107: 14-20
32. Lee JD, Kato K, Tobias PS, Kirkland TN, Ulevitch RJ: Transfection of CD14 into 70Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *J Exp Med* 1992; 175: 1697-705
33. Yasui K, Becker EL, Sha'afi RI: Lipopolysaccharide and serum cause the translocation of G-protein to the membrane and prime neutrophils via CD14. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183: 1280-6
34. Marie C, Muret J, Fitting C, Losser MR, Payen D, Cavaillon JM: Reduced ex vivo interleukin-8 production by neutrophils in septic and nonseptic systemic inflammatory response syndrome. *Blood* 1998; 91: 3439-46
35. Repo H, Jansson SE, Leirisalo-Repo M: Flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo. *J Immunol Methods* 1993; 164: 193-202
36. Limb GA, Hamblin AS, Wolstencroft RA, Dumonde DC: Selective up-regulation of human granulocyte integrins and complement receptor 1 by cytokines. *Immunology* 1991; 74: 696-702

37. Zhou MJ, Brown EJ: CR3 (Mac-1, alpha M beta 2, CD11b/CD18) and Fc gamma RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc gamma RIII and tyrosine phosphorylation. *J Cell Biol* 1994; 125: 1407-16
38. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K: Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 617-48
39. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL: Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84: 1045-9
40. Strieter RM, Kasahara K, Allen RM, Standiford TJ, Rolfe MW, Becker FS, Chensue SW, Kunkel SL: Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8. *Am J Pathol* 1992; 141: 397-407
41. Cassatella MA, Bazzoni F, Ceska M, Ferro I, Baggiolini M, Berton G: IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a pertussis toxin-sensitive pathway. *J Immunol* 1992; 148: 3216-20
42. Altstaedt J, Kirchner H, Rink L: Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology* 1996; 89: 563-8
43. Katanaev VL: Signal transduction in neutrophil chemotaxis. *Biochemistry (Mosc)* 2001; 66: 351-68
44. Roberts PJ, Pizzey AR, Khwaja A, Carver JE, Mire-Sluis AR, Linch DC: The effects of interleukin-8 on neutrophil fMetLeuPhe receptors, CD11b expression and metabolic activity, in comparison and combination with other cytokines. *Br J Haematol* 1993; 84: 586-94
45. Marshall WG, Jr., Dimick AR: The natural history of major burns with multiple subsystem failure. *J Trauma* 1983; 23: 102-5
46. Goris RJ, Boekholtz WK, van Bebber IP, Nuytinck JK, Schillings PH: Multiple-organ failure and sepsis without bacteria. An experimental model. *Arch Surg* 1986; 121: 897-901
47. Marano MA, Fong Y, Moldawer LL, Wei H, Calvano SE, Tracey KJ, Barie PS, Manogue K, Cerami A, Shires GT, et al.: Serum cachectin/tumor necrosis factor in critically ill patients with burns correlates with infection and mortality. *Surg Gynecol Obstet* 1990; 170: 32-8
48. Meade P, Shoemaker WC, Donnelly TJ, Abraham E, Jagels MA, Cryer HG, Hugli TE, Bishop MH, Wo CC: Temporal patterns of hemodynamics, oxygen transport, cytokine activity, and complement activity in the development of adult respiratory distress syndrome after severe injury. *J Trauma* 1994; 36: 651-7
49. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T: The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med* 1989; 169: 333-8
50. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ, 3rd, Zentella A, Albert JD, et al.: Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986; 234: 470-4
51. DeForge LE, Remick DG: Kinetics of TNF, IL-6, and IL-8 gene expression in LPS-stimulated human whole blood. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174: 18-24
52. Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Ogata J, Inoue Y, Shigematsu A: Ketamine suppresses proinflammatory cytokine production in human whole blood in vitro. *Anesth Analg* 1999; 89: 665-9
53. Kunsch C, Lang RK, Rosen CA, Shannon MF: Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J Immunol* 1994; 153: 153-64
54. Hog N: Adhesion molecules in cell interactions. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 383 - 90
55. Picker LJ: Control of lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 394-406

56. Johnston GI, Bliss GA, Newman PJ, McEver RP: Structure of the human gene encoding granule membrane protein-140, a member of the selectin family of adhesion receptors for leukocytes. *J Biol Chem* 1990; 265: 21381-5
57. Rojas AI, Ahmed AR: Adhesion receptors in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10: 337-58
58. Etzioni A, Doerschuk CM, Harlan JM: Of man and mouse: leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies. *Blood* 1999; 94: 3281-8
59. Fukuda M, Tsuboi S: Mucin-type O-glycans and leukosialin. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455: 205-17
60. Tumova S, Woods A, Couchman JR: Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 269-88
61. Seekamp A, Till GO, Mulligan MS, Paulson JC, Anderson DC, Miyasaka M, Ward PA: Role of selectins in local and remote tissue injury following ischemia and reperfusion. *Am J Pathol* 1994; 144: 592-8
62. Dore M, Korthuis RJ, Granger DN, Entman ML, Smith CW: P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood* 1993; 82: 1308-16
63. Lawrence MB, Springer TA: Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol* 1993; 151: 6338-46
64. Tedder TF, Penta AC, Levine HB, Freedman AS: Expression of the human leukocyte adhesion molecule, LAM1. Identity with the TQ1 and Leu-8 differentiation antigens. *J Immunol* 1990; 144: 532-40
65. Jutila MA, Rott L, Berg EL, Butcher EC: Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and MAC-1. *J Immunol* 1989; 143: 3318-24
66. Jung TM, Dailey MO: Rapid modulation of homing receptors (gp90MEL-14) induced by activators of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. *J Immunol* 1990; 144: 3130-6
67. Walcheck B, Kahn J, Fisher JM, Wang BB, Fisk RS, Payan DG, Feehan C, Betageri R, Darlak K, Spatola AF, Kishimoto TK: Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. *Nature* 1996; 380: 720-3
68. Hafezi-Moghadam A, Thomas KL, Prorock AJ, Huo Y, Ley K: L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *J Exp Med* 2001; 193: 863-72
69. Borland G, Murphy G, Ager A: Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits shedding of L-selectin from leukocytes. *J Biol Chem* 1999; 274: 2810-5
70. Wang TL, Chang H, Hung CR, Tseng YZ: Attenuation of neutrophil and endothelial activation by intravenous morphine in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1997; 80: 1532-5
71. Feehan C, Darlak K, Kahn J, Walcheck B, Spatola AF, Kishimoto TK: Shedding of the lymphocyte L-selectin adhesion molecule is inhibited by a hydroxamic acid-based protease inhibitor. Identification with an L-selectin-alkaline phosphatase reporter. *J Biol Chem* 1996; 271: 7019-24
72. Palecanda A, Walcheck B, Bishop DK, Jutila MA: Rapid activation-independent shedding of leukocyte L-selectin induced by cross-linking of the surface antigen. *Eur J Immunol* 1992; 22: 1279-86
73. Diaz-Gonzalez F, Gonzalez-Alvaro I, Campanero MR, Mollinedo F, del Pozo MA, Munoz C, Pivel JP, Sanchez-Madrid F: Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Invest* 1995; 95: 1756-65

74. Hafezi-Moghadam A, Ley K: Relevance of L-selectin shedding for leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med* 1999; 189: 939-48
75. Simon SI, Burns AR, Taylor AD, Gopalan PK, Lynam EB, Sklar LA, Smith CW: L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18) beta 2-integrin. *J Immunol* 1995; 155: 1502-14
76. Crockett-Torabi E, Sulenbarger B, Smith CW, Fantone JC: Activation of human neutrophils through L-selectin and Mac-1 molecules. *J Immunol* 1995; 154: 2291-302
77. Gopalan PK, Smith CW, Lu H, Berg EL, McIntire LV, Simon SI: Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin. *J Immunol* 1997; 158: 367-75
78. Steeber DA, Engel P, Miller AS, Sheetz MP, Tedder TF: Ligation of L-selectin through conserved regions within the lectin domain activates signal transduction pathways and integrin function in human, mouse, and rat leukocytes. *J Immunol* 1997; 159: 952-63
79. Laudanna C, Constantin G, Baron P, Scarpini E, Scarlato G, Cabrini G, Dehecchi C, Rossi F, Cassatella MA, Berton G: Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule. *J Biol Chem* 1994; 269: 4021-6
80. Waddell TK, Fialkow L, Chan CK, Kishimoto TK, Downey GP: Potentiation of the oxidative burst of human neutrophils. A signaling role for L-selectin. *J Biol Chem* 1994; 269: 18485-91
81. White-Owen C, Alexander JW, Babcock GF: Reduced expression of neutrophil CD11b and CD16 after severe traumatic injury. *J Surg Res* 1992; 52: 22-6
82. von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC: Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7538-42
83. Edwards SW: Cell signalling by integrins and immunoglobulin receptors in primed neutrophils. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 362-7
84. Berger M, O'Shea J, Cross AS, Folks TM, Chused TM, Brown EJ, Frank MM: Human neutrophils increase expression of C3bi as well as C3b receptors upon activation. *J Clin Invest* 1984; 74: 1566-71
85. Fearon DT, Collins LA: Increased expression of C3b receptors on polymorphonuclear leukocytes induced by chemotactic factors and by purification procedures. *J Immunol* 1983; 130: 370-5
86. Philips MR, Buyon JP, Winchester R, Weissmann G, Abramson SB: Up-regulation of the iC3b receptor (CR3) is neither necessary nor sufficient to promote neutrophil aggregation. *J Clin Invest* 1988; 82: 495-501
87. Todd RF, 3rd, Arnaout MA, Rosin RE, Crowley CA, Peters WA, Babior BM: Subcellular localization of the large subunit of Mo1 (Mo1 alpha; formerly gp 110), a surface glycoprotein associated with neutrophil adhesion. *J Clin Invest* 1984; 74: 1280-90
88. Larson RS, Springer TA: Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* 1990; 114: 181-217
89. Nathan C, Srimal S, Farber C, Sanchez E, Kabbash L, Asch A, Gailit J, Wright SD: Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. *J Cell Biol* 1989; 109: 1341-9
90. Werfel T, Witter W, Gotze O: CD11b and CD11c antigens are rapidly increased on human natural killer cells upon activation. *J Immunol* 1991; 147: 2423-7

91. Zhang J, Kaupke CJ, Yousefi S, Cesario TC, Vaziri ND: Flow cytometric investigation of neutrophil activation pathways by n-formyl-Met-Leu-Phe and phorbol myristate acetate. *Biol Cell* 1995; 84: 147-53
92. Berger M, Birx DL, Wetzler EM, O'Shea JJ, Brown EJ, Cross AS: Calcium requirements for increased complement receptor expression during neutrophil activation. *J Immunol* 1985; 135: 1342-8
93. Smolen JE, Korchak HM, Weissmann G: The roles of extracellular and intracellular calcium in lysosomal enzyme release and superoxide anion generation by human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1981; 677: 512-20
94. Kay AB, Duncan AJ, Glass EJ, Stewart J: Leukocyte chemotactic factors and the C3b receptor. *Kroc Found Ser* 1981; 14: 197-211
95. Galon J, Gauchat JF, Mazieres N, Spagnoli R, Storkus W, Lotze M, Bonnefoy JY, Fridman WH, Sautes C: Soluble Fc γ receptor type III (Fc γ RIII, CD16) triggers cell activation through interaction with complement receptors. *J Immunol* 1996; 157: 1184-92
96. Richard S, Shaw AS, Showell HJ, Connelly PA: The role of individual Fc γ receptors in aggregated IgG-stimulated protein tyrosine phosphorylation in the human neutrophil. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 653-61
97. Masuda K, Kinoshita Y, Hasui M, Kobayashi Y: Polymorphonuclear leukocyte heterogeneity of Fc receptor expression and membrane potential in human neonates. *Biol Neonate* 1991; 60: 168-75
98. Cassatella MA, Anegon I, Cuturi MC, Griskey P, Trinchieri G, Perussia B: Fc γ R(CD16) interaction with ligand induces Ca²⁺ mobilization and phosphoinositide turnover in human natural killer cells. Role of Ca²⁺ in Fc γ R(CD16)-induced transcription and expression of lymphokine genes. *J Exp Med* 1989; 169: 549-67
99. Lalezari P, Murphy GB, Allen FH, Jr.: NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia. *J Clin Invest* 1971; 50: 1108-15
100. Clement LT, Lehmeier JE, Gartland GL: Identification of neutrophil subpopulations with monoclonal antibodies. *Blood* 1983; 61: 326-32
101. Stroncek DF, Shankar R, Litz C, Clement L: The expression of the NB1 antigen on myeloid precursors and neutrophils from children and umbilical cords. *Transfus Med* 1998; 8: 119-23
102. Goldschmeding R, van Dalen CM, Faber N, Calafat J, Huizinga TW, van der Schoot CE, Clement LT, von dem Borne AE: Further characterization of the NB 1 antigen as a variably expressed 56-62 kD GPI-linked glycoprotein of plasma membranes and specific granules of neutrophils. *Br J Haematol* 1992; 81: 336-45
103. Matsuo K, Lin A, Procter JL, Clement L, Stroncek D: Variations in the expression of granulocyte antigen NB1. *Transfusion* 2000; 40: 654-62
104. Skubitz KM, Stroncek DF, Sun B: Neutrophil-specific antigen NB1 is anchored via a glycosylphosphatidylinositol linkage. *J Leukoc Biol* 1991; 49: 163-71
105. Kissel K, Santoso S, Hofmann C, Stroncek D, Bux J: Molecular basis of the neutrophil glycoprotein NB1 (CD177) involved in the pathogenesis of immune neutropenias and transfusion reactions. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1301-9
106. Stroncek DF, Skubitz KM, McCullough JJ: Biochemical characterization of the neutrophil-specific antigen NB1. *Blood* 1990; 75: 744-55
107. Gohring K, Wolff J, Doppl W, Schmidt KL, Fenchel K, Pralle H, Sibelius U, Bux J: Neutrophil CD177 (NB1 gp, HNA-2a) expression is increased in severe bacterial infections and polycythaemia vera. *Br J Haematol* 2004; 126: 252-4

108. Sachs UJ, Andrei-Selmer CL, Maniar A, Weiss T, Paddock C, Orlova VV, Choi EY, Newman PJ, Preissner KT, Chavakis T, Santoso S: The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *J Biol Chem* 2007; 282: 23603-12
109. Caruccio L, Bettinotti M, Matsuo K, Sharon V, Stroncek D: Expression of human neutrophil antigen-2a (NB1) is increased in pregnancy. *Transfusion* 2003; 43: 357-63
110. Bux J, Becker F, Seeger W, Kilpatrick D, Chapman J, Waters A: Transfusion-related acute lung injury due to HLA-A2-specific antibodies in recipient and NB1-specific antibodies in donor blood. *Br J Haematol* 1996; 93: 707-13
111. Stroncek DF, Herr GP, Plachta LB: Neutrophil-specific antigen NB1 inhibits neutrophil-endothelial cell interactions. *J Lab Clin Med* 1994; 123: 247-55
112. Stroncek DF, Shankar RA, Noren PA, Herr GP, Clement LT: Analysis of the expression of NB1 antigen using two monoclonal antibodies. *Transfusion* 1996; 36: 168-74
113. Lüllmann Heinz, Mohr Klaus: *Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart, Thieme Verlag Stuttgart New York, 1999
114. Lippmann M, Appel PL, Mok MS, Shoemaker WC: Sequential cardiorespiratory patterns of anesthetic induction with ketamine in critically ill patients. *Crit Care Med* 1983; 11: 730-4
115. Yli-Hankala A, Kirvela M, Randell T, Lindgren L: Ketamine anaesthesia in a patient with septic shock. *Acta Anaesthesiol Scand* 1992; 36: 483-5
116. Szekely A, Heindl B, Zahler S, Conzen PF, Becker BF: Nonuniform behavior of intravenous anesthetics on postischemic adhesion of neutrophils in the guinea pig heart. *Anesth Analg* 2000; 90: 1293-300
117. Krumholz W, Endrass J, Hempelmann G: Inhibition of phagocytosis and killing of bacteria by anaesthetic agents in vitro. *Br J Anaesth* 1995; 75: 66-70
118. Moudgil GC: Effect of premedicants, intravenous anaesthetic agents and local anaesthetics on phagocytosis in vitro. *Can Anaesth Soc J* 1981; 28: 597-602
119. Krumholz W, Kabisch S, Biscopig J, Hempelman G: [Change in the adhesiveness of polymorphonuclear neutrophilic granulocytes by the intravenous anesthetics midazolam and ketamine]. *Anasth Intensivther Notfallmed* 1987; 22: 211-3
120. Davidson JA, Boom SJ, Pearsall FJ, Zhang P, Ramsay G: Comparison of the effects of four i.v. anaesthetic agents on polymorphonuclear leucocyte function. *Br J Anaesth* 1995; 74: 315-8
121. Zahler S, Heindl B, Becker BF: Ketamine does not inhibit inflammatory responses of cultured human endothelial cells but reduces chemotactic activation of neutrophils. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999; 43: 1011-6
122. 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; 42: 518-26
123. Welters ID: *Effekte von Morphin, Fentanyl und Ketamin auf leukozytäre Funktion, Transkriptionsfaktoren und Interleukin-8-Synthese*, Habilitationsschrift. Giessen, 2000
124. Loop T, Humar M, Pischke S, Hoetzel A, Schmidt R, Pahl HL, Geiger KK, Pannen BH: Thiopental inhibits tumor necrosis factor alpha-induced activation of nuclear factor kappaB through suppression of kappaB kinase activity. *Anesthesiology* 2003; 99: 360-7
125. Nishina K, Akamatsu H, Mikawa K, Shiga M, Maekawa N, Obara H, Niwa Y: The inhibitory effects of thiopental, midazolam, and ketamine on human neutrophil functions. *Anesth Analg* 1998; 86: 159-65

126. Skoutelis A, Lianou P, Papageorgiou E, Kokkinis K, Alexopoulos K, Bassaris H: Effects of propofol and thiopentone on polymorphonuclear leukocyte functions in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* 1994; 38: 858-62
127. Krumholz W, Jorgall H, Kabisch S, Hempelmann G: [Anesthesia induction agents and granulocyte adherence]. *Anasth Intensivther Notfallmed* 1988; 23: 69-72
128. Frenkel C, Urban BW: [The molecular action profile of intravenous anesthetics]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1992; 27: 101-8
129. Bovill JG: Intravenous anesthesia for the patient with left ventricular dysfunction. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2006; 10: 43-8
130. de Rossi L, Wessiepe M, Buhre W, Kuhlen R, Hutschenreuter G, Rossaint R: Effect of propofol on adhesion of activated platelets to leukocytes in human whole blood. *Intensive Care Med* 2003; 29: 1157-63
131. 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; 15: 540-5
132. Evans RH, Hill RG: GABA-mimetic action of etomidate. *Experientia* 1978; 34: 1325-7
133. Doenicke Alfred OP: *Textbook of Intravenous Anaesthetics*, 1 Edition. Baltimore, Williams and Wilkins, 1997
134. Kenyon CJ, McNeil LM, Fraser R: Comparison of the effects of etomidate, thiopentone and propofol on cortisol synthesis. *Br J Anaesth* 1985; 57: 509-11
135. Wagner RL, White PF, Kan PB, Rosenthal MH, Feldman D: Inhibition of adrenal steroidogenesis by the anesthetic etomidate. *N Engl J Med* 1984; 310: 1415-21
136. Weiss M, Birkhahn A, Krone M, Schneider EM: Do etomidate and propofol influence oxygen radical production of neutrophils? *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1996; 18: 291-307
137. Gelb AW, Lok P: Etomidate reversibly depresses human neutrophil chemiluminescence. *Anesthesiology* 1987; 66: 60-3
138. Perschel W, Langefeld, T., and Yildiz, M.: Beschreibung einer Methode zur Quantifizierung der granulozytären Phagozytose von *Staphylococcus aureus* K 807 mittels Flow-Zytometrie. *Med Welt* 1994; 45: 100 - 105
139. Friedmann M: The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. *J. Amer. Stat. Assoc.* 1937; 32: 675-701
140. Wilcoxon F. WRA: *Some rapid approximate statistical procedure*. New York, Lederle Laboratories, Pearl River, 1964
141. Youssef PP, Mantzioris BX, Roberts-Thomson PJ, Ahern MJ, Smith MD: Effects of ex vivo manipulation on the expression of cell adhesion molecules on neutrophils. *J Immunol Methods* 1995; 186: 217-24
142. Macey MG, McCarthy DA, Newland AC: The ex vivo function and expression of function-associated antigens of peripheral blood neutrophils and monocytes. *Exp Hematol* 1994; 22: 967-72
143. Watson F, Robinson JJ, Edwards SW: Neutrophil function in whole blood and after purification: changes in receptor expression, oxidase activity and responsiveness to cytokines. *Biosci Rep* 1992; 12: 123-33
144. Carter PH, Resto-Ruiz S, Washington GC, Ethridge S, Palini A, Vogt R, Waxdal M, Fleisher T, Noguchi PD, Marti GE: Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants, and five cell preparations. *Cytometry* 1992; 13: 68-74

145. Chen WY, Lei HY, Wang JY, Lu CC: Direct measurement of neutrophil F-actin content in microvolume whole blood samples. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 110: 325-31
146. Dooley DC, Simpson JF, Meryman HT: Isolation of large numbers of fully viable human neutrophils: a preparative technique using percoll density gradient centrifugation. *Exp Hematol* 1982; 10: 591-9
147. Simon SI, Chambers JD, Butcher E, Sklar LA: Neutrophil aggregation is beta 2-integrin- and L-selectin-dependent in blood and isolated cells. *J Immunol* 1992; 149: 2765-71
148. Zahler S, Kowalski C, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, Gerlach E: The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J Immunol Methods* 1997; 200: 173-9
149. Antal P, Sipka S, Suranyi P, Csipo I, Seres T, Marodi L, Szegedi G: Flow cytometric assay of phagocytic activity of human neutrophils and monocytes in whole blood by neutral red uptake. *Ann Hematol* 1995; 70: 259-65
150. Bednar MM, Balazy M, Murphy M, Booth C, Fuller SP, Barton A, Bingham J, Golding L, Gross CE: Peroxynitrite augments fMLP-stimulated chemiluminescence by neutrophils in human whole blood. *J Leukoc Biol* 1996; 60: 619-24
151. Bossuyt X, Marti GE, Fleisher TA: Comparative analysis of whole blood lysis methods for flow cytometry. *Cytometry* 1997; 30: 124-33
152. Francis C, Connelly MC: Rapid single-step method for flow cytometric detection of surface and intracellular antigens using whole blood. *Cytometry* 1996; 25: 58-70
153. Hasui M, Hirabayashi Y, Kobayashi Y: Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. *J Immunol Methods* 1989; 117: 53-8
154. Himmelfarb J, Hakim RM, Holbrook DG, Leeber DA, Ault KA: Detection of granulocyte reactive oxygen species formation in whole blood using flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13: 83-9
155. Perticarari S, Presani G, Banfi E: A new flow cytometric assay for the evaluation of phagocytosis and the oxidative burst in whole blood. *J Immunol Methods* 1994; 170: 117-24
156. Trinkle LS, Wellhausen SR, McLeish KR: A simultaneous flow cytometric measurement of neutrophil phagocytosis and oxidative burst in whole blood. *Diagn Clin Immunol* 1987; 5: 62-8
157. White-Owen C, Alexander JW, Sramkoski RM, Babcock GF: Rapid whole-blood microassay using flow cytometry for measuring neutrophil phagocytosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2071-6
158. Haslett C, Guthrie LA, Kopaniak MM, Johnston RB, Jr., Henson PM: Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol* 1985; 119: 101-10
159. Wehlin L, Gustavsson K, Hallden G, Emilson A, Svensson A, Hild M, Lundahl J: Complement activation during blood sampling procedures alters the expression of CD11b/CD18 on human neutrophils. *Vox Sang* 1998; 74: 21-6
160. Forsyth KD, Levinsky RJ: Preparative procedures of cooling and re-warming increase leukocyte integrin expression and function on neutrophils. *J Immunol Methods* 1990; 128: 159-63
161. Hamblin A, Taylor M, Bernhagen J, Shakoor Z, Mayall S, Noble G, McCarthy D: A method of preparing blood leucocytes for flow cytometry which prevents upregulation of leucocyte integrins. *J Immunol Methods* 1992; 146: 219-28
162. Bikoue A, George F, Poncelet P, Mutin M, Janossy G, Sampol J: Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression: normal adult values. *Cytometry* 1996; 26: 137-47

163. Bergmann M, Gornikiewicz A, Sautner T, Waldmann E, Weber T, Mittlbock M, Roth E, Fugger R: Attenuation of catecholamine-induced immunosuppression in whole blood from patients with sepsis. *Shock* 1999; 12: 421-7
164. Larsen B, Hoff G, Wilhelm W, Buchinger H, Wanner GA, Bauer M: Effect of intravenous anesthetics on spontaneous and endotoxin-stimulated cytokine response in cultured human whole blood. *Anesthesiology* 1998; 89: 1218-27
165. Marie C, Fitting C, Muret J, Payen D, Cavaillon JM: Interleukin 8 production in whole blood assays: Is interleukin 10 responsible for the downregulation observed in sepsis? *Cytokine* 2000; 12: 55-61
166. Wilson BM, Severn A, Rapson NT, Chana J, Hopkins P: A convenient human whole blood culture system for studying the regulation of tumour necrosis factor release by bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol Methods* 1991; 139: 233-40
167. Raetz CR, Whitfield C: Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 2002; 71: 635-700
168. Ulevitch RJ, Tobias PS: Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 437-57
169. Fenton MJ, Golenbock DT: LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol* 1998; 64: 25-32
170. Guha M, Mackman N: LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001; 13: 85-94
171. Heumann D, Roger T: Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta* 2002; 323: 59-72
172. Bihl F, Lariviere L, Qureshi ST, Flaherty L, Malo D: LPS-hyporesponsiveness of mnd mice is associated with a mutation in Toll-like receptor 4. *Genes Immun* 2001; 2: 56-9
173. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-8
174. Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D: Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 1999; 189: 615-25
175. Jones DH, Anderson DC, Burr BL, Rudloff HE, Smith CW, Krater SS, Schmalstieg FC: Quantitation of intracellular Mac-1 (CD11b/CD18) pools in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 1988; 44: 535-44
176. Muirhead KA, Schmitt TC, Muirhead AR: Determination of linear fluorescence intensities from flow cytometric data accumulated with logarithmic amplifiers. *Cytometry* 1983; 3: 251-6
177. Menzebach A, Hirsch J, Hempelmann G, Welters ID: Effects of endogenous and synthetic opioid peptides on neutrophil function in vitro. *Br J Anaesth* 2003; 91: 546-50
178. Bayon Y, Alonso A, Sanchez Crespo M: Immunoglobulin-E/dinitrophenyl complexes induce nitric oxide synthesis in rat peritoneal macrophages by a mechanism involving CD23 and NF-kappa B activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 242: 570-4
179. Ikewaki N, Tamauchi H, Inoko H: Modulation of cell surface antigens and regulation of phagocytic activity mediated by CD11b in the monocyte-like cell line U937 in response to lipopolysaccharide. *Tissue Antigens* 1993; 42: 125-32
180. McDonald PP, Bovolenta C, Cassatella MA: Activation of distinct transcription factors in neutrophils by bacterial LPS, interferon-gamma, and GM-CSF and the necessity to overcome the action of endogenous proteases. *Biochemistry* 1998; 37: 13165-73
181. Repo H, Jansson SE, Leirisalo-Repo M: Anticoagulant selection influences flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo and ex vivo. *J Immunol Methods* 1995; 185: 65-79

182. Romeu MA, Mestre M, Gonzalez L, Valls A, Verdaguer J, Corominas M, Bas J, Massip E, Buendia E: Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults. Comparison of fresh whole blood lysis technique, Ficoll-Paque separation and cryopreservation. *J Immunol Methods* 1992; 154: 7-10
183. Cheung K, Archibald AC, Robinson MF: The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. *J Immunol* 1983; 130: 2324-9
184. Nebe CT: [Flow cytometry and data analysis]. *Infusionsther Transfusionsmed* 1996; 23: 111-3
185. Marty C, Misset B, Tamion F, Fitting C, Carlet J, Cavaillon JM: Circulating interleukin-8 concentrations in patients with multiple organ failure of septic and nonseptic origin. *Crit Care Med* 1994; 22: 673-9
186. Cavaillon JM, Munoz C, Fitting C, Misset B, Carlet J: Circulating cytokines: the tip of the iceberg? *Circ Shock* 1992; 38: 145-52
187. Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC: Comparison of cytokine production in cultures of whole human blood and purified mononuclear cells. *Cytokine* 1999; 11: 600-5
188. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM: Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1747-54
189. Levin J. AC, Munford RS., Stütz PL.: Bacterial Endotoxin: Recognition and Effector Mechanisms, *Microbiology Today: Book Reviews* Endotoxin Research Series, Vol. 2. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1993
190. Kamp DW, Bauer KD, Knap A, Dunn MM: Contrasting effects of inflammatory stimuli on neutrophil and monocyte adherence to endothelial cells. *J Appl Physiol* 1989; 67: 556-62
191. Barth E, Fischer G, Schneider EM, Wollmeyer J, Georgieff M, Weiss M: Differences in the expression of CD64 and mCD14 on polymorphonuclear cells and on monocytes in patients with septic shock. *Cytokine* 2001; 14: 299-302
192. Lappegard KT, Fung M, Bergseth G, Riesenfeld J, Mollnes TE: Artificial surface-induced cytokine synthesis: effect of heparin coating and complement inhibition. *Ann Thorac Surg* 2004; 78: 38-44; discussion 44-5
193. Cheung K, Archibald AC, Robinson MF: Luminol-dependent chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by immune complexes. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1984; 62 (Pt 4): 403-19
194. Sasaki DT, Dumas SE, Engleman EG: Discrimination of viable and non-viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence. *Cytometry* 1987; 8: 413-20
195. Lenkei R, Gratama JW, Rothe G, Schmitz G, D'Hautcourt J L, Arekrans A, Mandy F, Marti G: Performance of calibration standards for antigen quantitation with flow cytometry. *Cytometry* 1998; 33: 188-96
196. Serke S, van Lessen A, Huhn D: Quantitative fluorescence flow cytometry: a comparison of the three techniques for direct and indirect immunofluorescence. *Cytometry* 1998; 33: 179-87
197. Poncelet P, Carayon P: Cytofluorometric quantification of cell-surface antigens by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1985; 85: 65-74
198. Sucic M, Kolevska T, Kopjar B, Kosanovic M, Drobnjak M, Zalud I, Marusic M: Accuracy of routine flow-cytometric bitmap selection for three leukocyte populations. *Cytometry* 1989; 10: 442-7
199. Donabedian H, Sawyer T, Senitzer D: Inhibition of neutrophil shape change by an inhibitor of chemotaxis. *J Leukoc Biol* 1987; 42: 510-8

200. Keller HU, Fedier A, Rohner R: Relationship between light scattering in flow cytometry and changes in shape, volume, and actin polymerization in human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* 1995; 58: 519-25
201. Lieberman MM, Sachanandani DM, Pinney CA: Comparative study of neutrophil activation by chemiluminescence and flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 3: 654-62
202. Radtke H: [Quantitative flow cytometry: absolute cell count determination in whole blood and blood components]. *Infusionsther Transfusionsmed* 1996; 23: 114
203. Sachs L: Verteilungsunabhängige Verfahren. *Angewandte Statistik*. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag, 1997
204. Ruud B, Benestad HB, Opdahl H: Dual effect of thiopentone on human granulocyte activation. Non-intervention by ketamine and morphine. *Acta Anaesthesiol Scand* 1988; 32: 316-22
205. Peltroche-Llacsahuanga H, Schmidt S, Schnitzler N, Lutticken R, Haase G: Simultaneous measurement of biopolymer-mediated Mac-1 up-regulation and adherence of neutrophils: a novel flow cytometric approach for predicting initial inflammatory interaction with foreign materials. *J Immunol Methods* 2001; 258: 13-25
206. Gorbet MB, Yeo EL, Sefton MV: Flow cytometric study of in vitro neutrophil activation by biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1999; 44: 289-97
207. Weigand MA, Schmidt H, Zhao Q, Plaschke K, Martin E, Bardenheuer HJ: Ketamine modulates the stimulated adhesion molecule expression on human neutrophils in vitro. *Anesth Analg* 2000; 90: 206-12
208. Ramamoorthy C, Kovarik WD, Winn RK, Harlan JM, Sharar SR: Neutrophil adhesion molecule expression is comparable in perinatal rabbits and humans. *Anesthesiology* 1997; 86: 420-7
209. Schmid FX CY, Zhou X, Hilker M, Habermehl P, Zepp F, Oelert H: Regulation of platelet-leukocyte interaction in simulated ECC: attenuation with heparin surface modification. *Critical Care* 1999; 3: P09
210. Keldenich S, Kopp R, Klein B, Henseler A, Oedekoven B, Mottaghy K: Leukocyte interactions with surface modified biomaterials on in vitro flow conditions, *BioMed Central Ltd. L2*, 1999
211. Raschke P, Becker BF, Leipert B, Schwartz LM, Zahler S, Gerlach E: Postischemic dysfunction of the heart induced by small numbers of neutrophils via formation of hypochlorous acid. *Basic Res Cardiol* 1993; 88: 321-39
212. de Rossi LW, Horn NA, Stevanovic A, Buhre W, Hutschenreuter G, Rossaint R: Xenon modulates neutrophil adhesion molecule expression in vitro. *Eur J Anaesthesiol* 2004; 21: 139-43
213. Preckel B, Mullenheim J, Moloschavij A, Thamer V, Schlack W: Xenon administration during early reperfusion reduces infarct size after regional ischemia in the rabbit heart in vivo. *Anesth Analg* 2000; 91: 1327-32
214. Kress HG, Segmuller R: [Intravenous anesthetics and human neutrophil granulocyte motility in vitro]. *Anaesthesist* 1987; 36: 356-61
215. Shalekoff S, Page-Shipp L, Tiemessen CT: Effects of anticoagulants and temperature on expression of activation markers CD11b and HLA-DR on human leukocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5: 695-702
216. Engstad CS, Gutteberg TJ, Osterud B: Modulation of blood cell activation by four commonly used anticoagulants. *Thromb Haemost* 1997; 77: 690-6
217. Bikoue A, D'Ercole C, George F, Dameche L, Mutin M, Sampol J: Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression on human fetal and cord blood: normal values and changes during development. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84: 56-64

218. Durand V, Renaudineau Y, Pers JO, Youinou P, Jamin C: Cross-linking of human Fcγ₃RIIIb induces the production of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* 2001; 167: 3996-4007
219. Krumholz W, Demel C, Jung S, Meuthen G, Knecht J, Hempelmann G: The effects of thiopentone, etomidate, ketamine and midazolam on several bactericidal functions of polymorphonuclear leucocytes in vitro. *Eur J Anaesthesiol* 1995; 12: 141-6
220. Krumholz W, Endrass J, Hempelmann G: Propofol inhibits phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Can J Anaesth* 1994; 41: 446-9
221. 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; 85: 424-30
222. Jensen E, Andreasson S, Bengtsson A, Berggren H, Ekroth R, Lindholm L, Ouchterlony J: Influence of two different perfusion systems on inflammatory response in pediatric heart surgery. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 919-25
223. Weber N, Wendel HP, Ziemer G: Quality assessment of heparin coatings by their binding capacities of coagulation and complement enzymes. *J Biomater Appl* 2000; 15: 8-22
224. Ducusin RJ, Sarashina T, Uzuka Y, Tanabe S, Ohtani M: Phagocytic response of bovine polymorphonuclear leukocytes to different incubation conditions and following exposure to some effectors of phagocytosis and different anticoagulants in vitro. *Can J Vet Res* 2001; 65: 38-44
225. Kissel K, Scheffler S, Kerowgan M, Bux J: Molecular basis of NB1 (HNA-2a, CD177) deficiency. *Blood* 2002; 99: 4231-3
226. Wolff J, Brendel C, Fink L, Bohle RM, Kissel K, Bux J: Lack of NB1 GP (CD177/HNA-2a) gene transcription in NB1 GP- neutrophils from NB1 GP-expressing individuals and association of low expression with NB1 gene polymorphisms. *Blood* 2003; 102: 731-3
227. Mallya M, Campbell RD, Aguado B: Transcriptional analysis of a novel cluster of LY-6 family members in the human and mouse major histocompatibility complex: five genes with many splice forms. *Genomics* 2002; 80: 113-23
228. Bux J, Dickmann JO, Stockert U, Mueller-Eckhardt C: Influence of granulocyte antibodies on granulocyte function. *Vox Sang* 1993; 64: 220-5
229. Dri P, Cramer R, Romano M, Spessotto P, Patriarca P: Effect of biological surfaces on neutrophil O₂-production and its relationship to the CD11b/CD18 integrin-dependent adherence. *Int J Tissue React* 1991; 13: 193-201
230. Rest RF: Measurement of human neutrophil respiratory burst activity during phagocytosis of bacteria. *Methods Enzymol* 1994; 236: 119-36
231. Helmy SA, Al-Attayah RJ: The immunomodulatory effects of prolonged intravenous infusion of propofol versus midazolam in critically ill surgical patients. *Anaesthesia* 2001; 56: 4-8
232. Galley HF, Dubbels AM, Webster NR: The effect of midazolam and propofol on interleukin-8 from human polymorphonuclear leukocytes. *Anesth Analg* 1998; 86: 1289-93
233. Loop T, Liu Z, Humar M, Hoetzel A, Benzing A, Pahl HL, Geiger KK, BH JP: Thiopental inhibits the activation of nuclear factor kappaB. *Anesthesiology* 2002; 96: 1202-13
234. Sun J, Wang XD, Liu H, Xu JG: Ketamine suppresses intestinal NF-kappa B activation and proinflammatory cytokine in endotoxic rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1028-31

235. Kawasaki C, Kawasaki T, Ogata M, Nandate K, Shigematsu A: Ketamine isomers suppress superantigen-induced proinflammatory cytokine production in human whole blood. *Can J Anaesth* 2001; 48: 819-23
236. Bone RC: The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991; 115: 457-69
237. Gurfinkel R, Czeiger D, Douvdevani A, Shapira Y, Artru AA, Sufaro Y, Mazar J, Shaked G: Ketamine improves survival in burn injury followed by sepsis in rats. *Anesth Analg* 2006; 103: 396-402, table of contents
238. Shaked G, Czeiger D, Dukhno O, Levy I, Artru AA, Shapira Y, Douvdevani A: Ketamine improves survival and suppresses IL-6 and TNFalpha production in a model of Gram-negative bacterial sepsis in rats. *Resuscitation* 2004; 62: 237-42
239. Song XM, Li JG, Wang YL, Zhou Q, Du ZH, Jia BH, Hu ZF, Li P: [Protective effect of ketamine against septic shock in rats]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2004; 16: 348-51
240. Song XM, Li JG, Wang YL, Zhou Q, Du ZH, Jia BH, Ke JJ: Effects of ketamine on proinflammatory cytokines and nuclear factor kappaB in polymicrobial sepsis rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7350-4
241. Hsu BG, Yang FL, Lee RP, Peng TC, Chen HI: Effects of post-treatment with low-dose propofol on inflammatory responses to lipopolysaccharide-induced shock in conscious rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32: 24-9
242. Marik PE: Propofol: an immunomodulating agent. *Pharmacotherapy* 2005; 25: 28S-33S
243. Bartoc C, Frumento RJ, Jalbout M, Bennett-Guerrero E, Du E, Nishanian E: A randomized, double-blind, placebo-controlled study assessing the anti-inflammatory effects of ketamine in cardiac surgical patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2006; 20: 217-22
244. Yang J, Li W, Duan M, Zhou Z, Lin N, Wang Z, Sun J, Xu J: Large dose ketamine inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Inflamm Res* 2005; 54: 133-7
245. Lange M, Broking K, van Aken H, Hucklenbruch C, Bone HG, Westphal M: [Role of ketamine in sepsis and systemic inflammatory response syndrome]. *Anaesthesist* 2006; 55: 883-91
246. Takao Y, Mikawa K, Nishina K, Obara H: Attenuation of acute lung injury with propofol in endotoxemia. *Anesth Analg* 2005; 100: 810-6, table of contents
247. Motsch J, Roggenbach J: [Propofol infusion syndrome]. *Anaesthesist* 2004; 53: 1009-22; quiz 1023-4
248. Ahlen K, Buckley CJ, Goodale DB, Pulsford AH: The 'propofol infusion syndrome': the facts, their interpretation and implications for patient care. *Eur J Anaesthesiol* 2006; 23: 990-8
249. De Waele JJ, Hoste E: Propofol infusion syndrome in a patient with sepsis. *Anaesth Intensive Care* 2006; 34: 676-7
250. Takeshita S, Isshiki T, Ochiai M, Ishikawa T, Nishiyama Y, Fusano T, Toyozumi H, Kondo K, Ono Y, Sato T: Systemic inflammatory responses in acute coronary syndrome: increased activity observed in polymorphonuclear leukocytes but not T lymphocytes. *Atherosclerosis* 1997; 135: 187-92
251. Hansen PR: Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995; 91: 1872-85
252. Raschke P, Becker BF: Adenosine and PAF dependent mechanisms lead to myocardial reperfusion injury by neutrophils after brief ischaemia. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 569-76
253. Kamada T, Shiga T, McCuskey R: Tissue perfusion and organ function. Amsterdam, Elsevier Science BV, 1996

254. Szekely A, Heindl B, Zahler S, Conzen PF, Becker BF: S(+)-ketamine, but not R(-)-ketamine, reduces postischemic adherence of neutrophils in the coronary system of isolated guinea pig hearts. *Anesth Analg* 1999; 88: 1017-24
255. Kupatt C, Zahler S, Seligmann C, Massoudy P, Becker BF, Gerlach E: Nitric oxide mitigates leukocyte adhesion and vascular leak after myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 643-54

8 Anhang

8.1 Ergebnistabellen

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	177	56	124	47
Ketamin 1 mM	175	65	126	45
Kontrolle + LPS	602	118	693	149
Ketamin 100 μ M + LPS	568	112	629	150
Ketamin 1 mM + LPS	447	79	536	124
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 29: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD11b-Expression nach Inkubation mit Ketamin

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	500	13	502	33
Ketamin 1 mM	509	25	509	46
Kontrolle + LPS	772	65	775	104
Ketamin 100 μ M + LPS	763	64	765	100
Ketamin 1 mM + LPS	706	57	724	90
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 30: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD16-Expression nach Inkubation mit Ketamin

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	65	17	63	17
Ketamin 1 mM	64	18	63	16
Kontrolle + LPS	225	45	228	47
Ketamin 100 µM + LPS	228	43	221	46
Ketamin 1 mM + LPS	171	42	186	42
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 31: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD35-Expression nach Inkubation mit Ketamin

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	365	112	354	109
Ketamin 1 mM	351	103	332	104
Kontrolle + LPS	33	8	27	5
Ketamin 100 µM + LPS	26	6	22	3
Ketamin 1 mM + LPS	26	6	21	2
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 32: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD62L-Expression nach Inkubation mit Ketamin

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	58	25	51	20
Kontrolle + LPS	108	41	101	46
Ketamin 100 µM + LPS	104	45	104	48
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 33: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte NB1-Expression nach Inkubation mit Ketamin

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	28	28	29	26
Ketamin 1 mM	187	237	255	261
Kontrolle + LPS	548	272	663	272
Ketamin 100 µM + LPS	563	245	825	409
Ketamin 1 mM + LPS	703	364	1204	473
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 34: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte II-8-Synthese nach Inkubation mit Ketamin

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	177	56	124	47
Thiopental 400 µg/ml	171	57	133	44
Kontrolle + LPS	602	118	693	149
Thiopental 40 µg/ml + LPS	554	89	618	140
Thiopental 400 µg/ml + LPS	427	63	510	127
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 35: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD11b-Expression nach Inkubation mit Thiopental

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	500	13	502	33
Thiopental 400 µg/ml	507	21	503	43
Kontrolle + LPS	772	65	775	104
Thiopental 40 µg/ml + LPS	759	60	770	102
Thiopental 400 µg/ml + LPS	697	53	698	87
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 36: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD16-Expression nach Inkubation mit Thiopental

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	65	17	63	17
Thiopental 400 µg/ml	63	16	64	17
Kontrolle + LPS	225	45	228	47
Thiopental 40 µg/ml + LPS	222	47	217	51
Thiopental 400 µg/ml + LPS	155	35	165	44
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 37: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD35-Expression nach Inkubation mit Thiopental

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	365	112	354	109
Thiopental 400 µg/ml	350	98	330	98
Kontrolle + LPS	33	8	27	5
Thiopental 40 µg/ml + LPS	30	7	24	3
Thiopental 400 µg/ml + LPS	30	8	22	2
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 38: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD62L-Expression nach Inkubation mit Thiopental

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	58	25	51	20
Kontrolle + LPS	108	41	101	46
Thiopental 40 µg/ml + LPS	102	42	98	45
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 39: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte NB1-Expression nach Inkubation mit Thiopental

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	28	28	29	26
Thiopental 400 µg/ml	97	78	165	150
Kontrolle + LPS	548	272	663	272
Thiopental 40 µg/ml + LPS	574	253	776	386
Thiopental 400 µg/ml + LPS	840	639	1103	686
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 40: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte II-8-Synthese nach Inkubation mit Thiopental

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	177	56	124	47
Propofol 100 µg/ml	174	66	137	46
Kontrolle + LPS	602	118	693	149
Propofol 10 µg/ml + LPS	566	108	667	150
Propofol 100 µg/ml + LPS	630	120	749	151
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 41: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD11b-Expression nach Inkubation mit Propofol

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	500	13	502	33
Propofol 100 µg/ml	584	77	565	88
Kontrolle + LPS	772	65	775	104
Propofol 10 µg/ml + LPS	768	67	773	109
Propofol 100 µg/ml + LPS	789	79	785	115
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 42: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD16-Expression nach Inkubation mit Propofol

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	65	17	63	17
Propofol 100 µg/ml	81	17	77	20
Kontrolle + LPS	225	45	228	47
Propofol 10 µg/ml + LPS	237	49	243	49
Propofol 100 µg/ml + LPS	283	51	249	52
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 43: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD35-Expression nach Inkubation mit Propofol

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	365	112	354	109
Propofol 100 µg/ml	334	106	317	93
Kontrolle + LPS	33	8	27	5
Propofol 10 µg/ml + LPS	27	6	23	3
Propofol 100 µg/ml + LPS	28	8	23	2
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 44: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD62L-Expression nach Inkubation mit Propofol

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	58	25	51	20
Kontrolle + LPS	108	41	101	46
Propofol 10 µg/ml + LPS	105	45	105	47
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 45: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte NB1-Expression nach Inkubation mit Propofol

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	28	28	29	26
Propofol 100 µg/ml	72	45	92	55
Kontrolle + LPS	548	272	663	272
Propofol 10 µg/ml + LPS	483	228	803	429
Propofol 100 µg/ml + LPS	858	393	1425	468
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 46: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte II-8-Synthese nach Inkubation mit Propofol

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	177	56	124	47
Etomidat 5 µg/ml	164	60	118	46
Kontrolle + LPS	602	118	693	149
Etomidat 0,5 µg/ml + LPS	555	105	647	145
Etomidat 5 µg/ml + LPS	574	102	654	154
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 47: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD11b-Expression nach Inkubation mit Etomidat

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	500	13	502	33
Etomidat 5 µg/ml	522	24	516	42
Kontrolle + LPS	272	65	775	104
Etomidat 0,5 µg/ml + LPS	764	67	763	97
Etomidat 5 µg/ml + LPS	771	75	777	114
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 48: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD16-Expression nach Inkubation mit Etomidat

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	65	17	63	17
Etomidat 5 µg/ml	66	16	65	16
Kontrolle + LPS	225	45	228	47
Etomidat 0,5 µg/ml + LPS	221	51	224	43
Etomidat 5 µg/ml + LPS	230	49	236	45
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 49: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD35-Expression nach Inkubation mit Etomidat

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	365	112	354	109
Etomidat 5 µg/ml	330	87	330	87
Kontrolle + LPS	33	8	27	5
Etomidat 0,5 µg/ml + LPS	31	9	24	3
Etomidat 5 µg/ml + LPS	37	13	27	4
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 50: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD62L-Expression nach Inkubation mit Etomidat

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	58	25	51	20
Kontrolle + LPS	108	41	101	46
Etomidat 0,5 µg/ml + LPS	104	41	105	45
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 51: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte NB1-Expression nach Inkubation mit Etomidat

	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Kontrolle	28	28	29	26
Etomidat 5 µg/ml	34	45	29	33
Kontrolle + LPS	548	272	663	272
Etomidat 0,5 µg/ml + LPS	483	237	613	234
Etomidat 5 µg/ml + LPS	675	377	752	360
	15 Minuten		3 Stunden	

Abbildung 52: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte II-8-Synthese nach Inkubation mit Etomidat

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Calibration-Beads (Originalregistrierung) zur Darstellung der definierten Antigendichte.....	17
Abbildung 2: Set-Beads (Originalregistrierung) zur Festlegung des Negativbereichs (M1) und des Positivbereichs (M2)	17
Abbildung 3: Prinzip der Funktionsweise eines Flow-Zytometers. Der Laserstrahl wird durch eine Zelle oder einen allgemeinen „Event“ abgelenkt. Schema modifiziert nach Perschel ¹³⁸	22
Abbildung 4: FSC/SSC-Diagramm (Originalregistrierung). Durch Setzen eines Gates können die einzelnen Leukozytenpopulationen voneinander abgegrenzt und selektiv ausgewertet werden.	24
Abbildung 5: Die Negativkontrolle durch nicht-fluoreszierende Antikörper entspricht der granulozytären Autofluoreszenz	25
Abbildung 6: Durch Markieren der PMN mit FITC-konjugiertem Antikörper gegen das zu untersuchende Oberflächenantigen ergibt sich eine starke Zunahme der Grünfluoreszenz.	25
Abbildung 7: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD11b/CD18) auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Ketamin in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.	29
Abbildung 8: Expression des Oberflächenrezeptors CD16 auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Ketamin in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.....	30
Abbildung 9: Expression des Oberflächenrezeptors CD35 auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Ketamin in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.....	31
Abbildung 10: Expression des Oberflächenrezeptors CD62L auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Ketamin in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.	32
Abbildung 11: Synthese des Zytokin Interleukin-8 nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Ketamin in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.	33
Abbildung 12: Expression des Oberflächenrezeptors CR3 (CD11b/CD18) auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Thiopental in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.	34
Abbildung 13: Expression des Oberflächenrezeptors CD16 auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Thiopental in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation. .	35
Abbildung 14: Expression des Oberflächenrezeptors CD35 auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Thiopental in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation. .	36
Abbildung 15: Expression des Oberflächenrezeptors CD62L auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Thiopental in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.	37
Abbildung 16: Synthese des Zytokin Interleukin-8 nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Thiopental in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.....	38
Abbildung 17: Expression des Oberflächenrezeptors CR3 (CD11b/CD18) auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Propofol in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.....	39

Abbildung 18: Expression des Oberflächenrezeptors CD16 auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Propofol in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.	40
Abbildung 19: Expression des Oberflächenrezeptors CD35 auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Propofol in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.	41
Abbildung 20: Expression des Oberflächenrezeptors CD62L auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Propofol in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.	42
Abbildung 21: Synthese des Zytokin Interleukin-8 nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Propofol in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.	43
Abbildung 22: Expression des Oberflächenrezeptors CR3 (CD11b/CD18) auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Etomidat in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.	44
Abbildung 23: Expression des Oberflächenrezeptors CD16 auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Etomidat in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.	45
Abbildung 24: Expression des Oberflächenrezeptors CD35 auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Etomidat in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.	46
Abbildung 25: Expression des Oberflächenrezeptors CD62L auf PMN nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Etomidat in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.	47
Abbildung 26: Synthese des Zytokin Interleukin-8 nach 15 und 180 minütiger Inkubation mit klinischer und supraklinischer Konzentration an Etomidat in Vollblut mit und ohne LPS-Stimulation.	48
Abbildung 27: Expression des Oberflächenrezeptors NB1 (HNA-2a, CD177) auf PMN nach 15 minütiger Inkubation mit klinisch relevanten Konzentrationen von Ketamin, Thiopental, Propofol und Etomidat nach LPS-Stimulation (numerische Darstellung).	49
Abbildung 28 Expression des Oberflächenrezeptors NB1 (HNA-2a, CD177) auf PMN nach 180 minütiger Inkubation mit klinisch relevanten Konzentrationen von Ketamin, Thiopental, Propofol und Etomidat nach LPS-Stimulation (numerische Darstellung).	49
Abbildung 29: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD11b-Expression nach Inkubation mit Ketamin	91
Abbildung 30: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD16-Expression nach Inkubation mit Ketamin	91
Abbildung 31: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD35-Expression nach Inkubation mit Ketamin	92
Abbildung 32: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD62L-Expression nach Inkubation mit Ketamin	92
Abbildung 33: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte NB1-Expression nach Inkubation mit Ketamin	92
Abbildung 34: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte Il-8-Synthese nach Inkubation mit Ketamin	93

Abbildung 35: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD11b-Expression nach Inkubation mit Thiopental	93
Abbildung 36: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD16-Expression nach Inkubation mit Thiopental	93
Abbildung 37: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD35-Expression nach Inkubation mit Thiopental	94
Abbildung 38: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD62L-Expression nach Inkubation mit Thiopental	94
Abbildung 39: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte NB1-Expression nach Inkubation mit Thiopental	94
Abbildung 40: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte Il-8-Synthese nach Inkubation mit Thiopental.....	95
Abbildung 41: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD11b-Expression nach Inkubation mit Propofol.....	95
Abbildung 42: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD16-Expression nach Inkubation mit Propofol.....	95
Abbildung 43: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD35-Expression nach Inkubation mit Propofol.....	96
Abbildung 44: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD62L-Expression nach Inkubation mit Propofol.....	96
Abbildung 45: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte NB1-Expression nach Inkubation mit Propofol.....	96
Abbildung 46: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte Il-8-Synthese nach Inkubation mit Propofol.....	97
Abbildung 47: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD11b-Expression nach Inkubation mit Etomidat.....	97
Abbildung 48: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD16-Expression nach Inkubation mit Etomidat.....	97
Abbildung 49: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD35-Expression nach Inkubation mit Etomidat.....	98
Abbildung 50: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte CD62L-Expression nach Inkubation mit Etomidat.....	98
Abbildung 51: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte NB1-Expression nach Inkubation mit Etomidat.....	98
Abbildung 52: Darstellung der numerischen Ergebnisse für die spontane und LPS-induzierte Il-8-Synthese nach Inkubation mit Etomidat	99

8.3 Abkürzungen

α :	alpha
Aqua dest:	Aqua destillatum
AP-1:	Aktivator-Protein 1
Arg:	Arginin
Asp:	Aspartat
β :	beta
bzw.:	beziehungsweise
ca.:	zirka
CD:	Cluster of Differentiation
CR :	Komplementrezeptor
C- :	Komplementfaktor
Ca^{2+}	Kalzium-Ion
CRP:	C-reaktives Protein
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
E.coli:	Escherichia coli
EDTA:	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA:	enzyme-linked immuno sorbent assay
et al:	et alii (und andere)
FACS:	Fluorescens Activated Cell Sorter
Fa.:	Firma
FITC:	Fluoresceinisothiocyanat
Fc-:	Fragment crystalline
FMLP:	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC:	Forward Angle Light Scatter
GABA:	gamma-aminobutyric-acid (Gamma-Aminobuttersäure)
GlyCam.....	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule
$^{\circ}\text{C}$:	Grad Celsius
g:	Gramm
G-CSF:	granulocyte-colony stimulating factor
HNA:	Humanes Neutrophiles Alloantigen
HRP:	horseradish peroxidase
H_2O_2 :	Wasserstoff-Peroxid

ICAM:	Intercellular adhesion molecule
Ig:	Immunglobulin
IL:	Interleukin
i.v.:	intravenös
K ⁺ :	Kalium-Ion
kDa:	kiloDalton
Kg:	Kilogramm
kgKG:	Kilogramm Körpergewicht
LASER:	Light Amplification by stimulated emission of radiation
LBP :	LPS-bindendes Protein
LCT:	long-chain triglyceride
LFA:	lymphozytenfunktionsassoziiertes Antigen
LPS:	Lipopolysaccharid
LTB ₄ :	Leukotrien B4
MAdCAM:	mucosal adressin cell adhesion molecule
MAP:	mittlerer arterieller Druck (pressure)
MCT:	middle-chain triglyceride
mg:	Milligramm
Min:	Minute
Mio.:	Millionen
ml:	Milliliter
mM:	millimol
μM:	mykromol
mRNA:	messenger-Ribonucleic-acid
mW:	milliWatt
μg:	Mykrogramm
μl:	Mykroliter
μm:	Mykrometer
μM:	Mykromol
Na ⁺ :	Natrium-Ion
NaCl:	Natrium Chlorid
nm:	Nanometer
ng:	Nanogramm
NFκB:	Nuclear Factor kappa B

NMDA: n-Methyl-D-Aspartat
 o.g.: oben genannt
 O₂·: Superoxid-Anionen
 PBS: Phosphat buffered saline
 pH: potentia hydrogenii (Stärke des Wasserstoffs)
 pg: Pikogramm
 PMA: Phorbol myristate acetate
 PMN: Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
 /: pro
 % : Prozent
 RPMI: Rockwell park memorial institut
 RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction
 SSC: Side Scatter
 TLR: toll-like receptor
 TNF: Tumornecrosefaktor
 TRALI: transfusion-related acute lung injury
 T-Zellen: Thymus-Zellen (Lymphozyten)
 t_{1/2}: Halbwertszeit
 u.a. : unter anderem
 U/min: Umdrehungen pro Minute
 w/o: without
 z.B. : zum Beispiel
 ZNS: Zentrales Nervensystem
 2NH₂SO₄: Ammoniumsulfat
 z.T. : zum Teil

8.4 Verwendete Materialien und Reagenzien

Substanz bzw. Material	Hersteller
LPS (Serotyp 026:B6)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
PBS	BAG, Lich, Deutschland
FACS- [®] Brand-Lysing-Solution	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS [®] Flow [™]	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Cycle Test [™] Plus DNA Reagent KIT	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Anti CD11b/CD18 Antikörper Klon 44	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anti CD11b/CD18 Antikörper Klon 44 / FITC	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anti human CD16 Antikörper Klon BL-LGL/1	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anti human CD16 Antikörper Klon 3G8 / FITC	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anti CD35 Antikörper Klon E-11 / FITC	Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA
Anti CD35 Antikörper Klon E-11	Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA
Anti CD62L Antikörper Klon FMC46 / FITC	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anti CD62L Antikörper Klon FMC46	Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA
Anti-human IgG Antikörper / FITC	PharMingen, San Diego, Ca, USA
Anti Rabbit IgG / FITC Antikörper FITC	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anti 7D8 Antikörper	Klinische Immunologie JLU Giessen
DAKO [®] Quifikit calibration beads	Dako, Glostrup, Denmark
PBS (w/o Ca + Mg)	Life Technologies, GIBCO BRL, New York, USA
OptEIA [™] Set: Anti-human IL-8	PharMingen, San Diego, Ca, USA
Aqua ad iniectabilia	Baxter, Deerfield, Il, USA
RPMI-1640 Medium	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ketamin [®] Inresa	Solupharm GmbH, Melsungen, Deutschland
Trapanal [®] (Thiopental Natrium)	Altana Pharma GmbH Konstanz, Deutschland
Propofol-Lipuro [®] 2%	B. Braun, Melsungen AG, Deutschland
Etomidat-Lipuro [®]	B. Braun, Melsungen AG, Deutschland

9 Schriftliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.“

Zürich, 09.08.2007

.....

Georg Hafer

10 Veröffentlichung

Welters I, Hafer G, Mühling J, Engel J, Hempelmann G. (2006). Thiopentone reduces neutrophil receptor expression. Eur J Anaesth vol Suppl. 37 pp 150-1

(Abstract)

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Gunter Hempelmann danke ich für das Bereitstellen der umfangreichen Laboreinrichtungen und Mittel, welche mir zum Erstellen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt wurden.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Ingeborg Welters für die Überlassung des Themas, sowie die ausserordentlich engagierte Betreuung während der laborpraktischen Arbeit, wie auch hinterher bei der Erstellung der Zusammenschrift. Sie war zu jedem Zeitpunkt eine äusserst zuverlässige Ansprechpartnerin und stand mir stets mit konstruktiven Vorschlägen inhaltlicher und methodischer Art zur Seite.

Weiterhin danke ich in besonderem Masse Herrn Christian Reyher für die intensive und tolle Zusammenarbeit im Labor. Er hat durch seine freundschaftliche sowie kollegiale Hilfe und Unterstützung in ganz erheblichem Ausmass zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ohne ihn hätten die langen Laborabende nur halb so viel Spass gemacht.

Herrn Dr. med. Axel Menzebach danke ich für die theoretische und praktische Unterstützung im Labor in der Frühphase dieser Arbeit.

Dem Büro für Statistik Mogk und Reitze GbR möchte ich für die Auswertung der Daten danken.

Bei Frau Birgit Weber (†) bedanke ich mich für Ihre Unterstützung im Labor der Abteilung Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin in Giessen.

Dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der JLU-Giessen möchte ich für die gute Zusammenarbeit und Kooperation bei der Aufarbeitung der Daten zum NB1-Rezeptor danken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Freundin Lenka für ihre Präsenz und die geduldige und liebevolle Unterstützung.

12 Lebenslauf

Zur Person

Name: Hafer
Vorname: Georg
Geburtsdatum: 22.08.1976
Geburtsort: Paderborn
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1983 bis 1985 Grundschole Albanischule, Göttingen
1985 bis 1987 Grundschole Heinrichstrasse, Braunschweig
1987 bis 1989 Orientierungsstufe Franz`ches Feld, Braunschweig
1989 bis 1996 Gymnasium Neue Oberschole, Braunschweig
Abitur am 23.05.1996
1993 bis 1994 Studienjahr an der Hinkley High-School, Aurora, Colorado, USA

Zivildienst

1996 bis 1997 Zivildienst beim Rettungsdienst des Arbeiter- Samariter-Bundes,
Prüfung zum Rettungssanitäter am 31.05.1997

Studium

1997 bis 2004 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen
Ärztliche Vorprüfung am 03.04.2000
1. Staatsexamen am 12.04.2001
2. Staatsexamen am 19.09.2003
3. Staatsexamen am 09.11.2004

Approbation als Arzt am 22.11.2004

Beruflicher Werdegang

1.3.05 bis 28.2.07 Assistenzarzt Abteilung Innere Medizin,
Kreisspital für das Freiamt Muri, AG, Schweiz
unter CA Dr. med. F. Kocher

seit 1.3.07 Assistenzarzt Abteilung Alterspsychiatrie
Psychiatrische Universitätsklinik Zürich, Schweiz
unter Prof. Dr. med. C. Hock