

Einfluss von
Opioidalkaloiden und Opioidpeptiden
auf die freien intrazellulären Aminosäuren
und die Immunfunktion humaner neutrophiler
Granulozyten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Stefan Weiß

aus Giessen

Giessen im Jahr 2003

Aus dem Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie
Abteilung Anaesthesiologie, Intensivmedizin, Schmerztherapie
des Universitätsklinikums Giessen

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Hempelmann

Gutachter: PD Dr. J. Mühling

Gutachter: Prof. Dr. G. Bein

Tag der Disputation: 30.08.2004

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Übersicht über das Thema	1
1.1.1	Morphin.....	6
1.1.2	Fentanyl.....	7
1.1.3	β-Endorphin.....	7
1.1.4	Naloxon	9
1.2	Fragestellungen.....	9
2	MATERIAL UND METHODEN.....	10
2.1	Studienkonzeption	10
2.2	Blutentnahme	11
2.3	Inkubation.....	11
2.3.1	Konzentrationsreihen	11
2.3.2	Zeitreihen.....	11
2.4	Granulozytenseparation	12
2.5	Quantitative Aminosäurenanalyse	14
2.5.1	Externe Aminosäurestandards	14
2.5.2	Standardextraktionspuffer	15
2.5.3	Weitere Puffer und Materialien zur HPLC-Analyse	15
2.5.4	Ablauf der Analyse	16
2.5.5	Gradienten.....	17
2.6	Bestimmung der Granulozytenaktivität	18
2.6.1	Superoxidationbildung	18
2.6.2	Wasserstoffperoxidbildung	19
2.6.3	Aktivität der Myeloperoxidase	20
2.7	Auswertung	20
3	ERGEBNISSE	21
3.1	Kontrollen	23
3.2	Morphin	25
3.3	Fentanyl.....	28
3.4	β-Endorphin.....	31
3.5	Naloxon	33
4	DISKUSSION	35
4.1	Diskussion der Methoden	35
4.1.1	PMN-Isolation	35
4.1.2	PMN-Lyse und Probenkonservierung	36
4.1.3	HPLC-Analytik	37
4.1.4	Immunfunktionsbestimmungen	37

4.2	Diskussion der Ergebnisse	39
4.2.1	Morphin.....	39
4.2.2	Fentanyl.....	45
4.2.3	β -Endorphin.....	46
4.2.4	Naloxon	47
5	ZUSAMMENFASSUNG	49
6	ANHANG	50
6.1	Ergebnistabellen.....	50
6.1.1	Kontrollen	50
6.1.2	Morphin.....	51
6.1.3	Fentanyl.....	53
6.1.4	β -Endorphin.....	55
6.1.5	Naloxon	56
6.2	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	59
6.3	Materialverzeichnis.....	61
6.4	Literaturverzeichnis	62
6.5	Kurzfassung (deutsch).....	76
6.6	Kurzfassung (englisch).....	77
6.7	Erklärung zur Durchführung der Dissertation	78
6.8	Lebenslauf.....	79
6.9	Danksagung	80

1 EINLEITUNG

1.1 Übersicht über das Thema

Polymorphkernige Granulozyten (PMN) nehmen eine Schlüsselfunktion bei der Abwehr mikrobieller Infektionen ein. Ihre Hauptfunktion liegt darin, eingedrungene Bakterien und Pilze möglichst schnell unschädlich zu machen, bevor sie sich vermehren und im ganzen Organismus ausbreiten. Dabei gehören die PMN zu einem Netzwerk aus verschiedenen Komponenten zu denen unter anderem Lymphozyten und Monozyten, Komplementfaktoren, Antikörper, Akute-Phase-Proteine und Zytokine zählen. Ziel dieses Netzwerks ist es, durch die Verknüpfung der einzelnen Elemente ein möglichst schlagkräftiges System im Kampf gegen die Invasion pathogener Keime aufzubauen [33]. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die PMN als zentrale Zellen des Immunsystems.

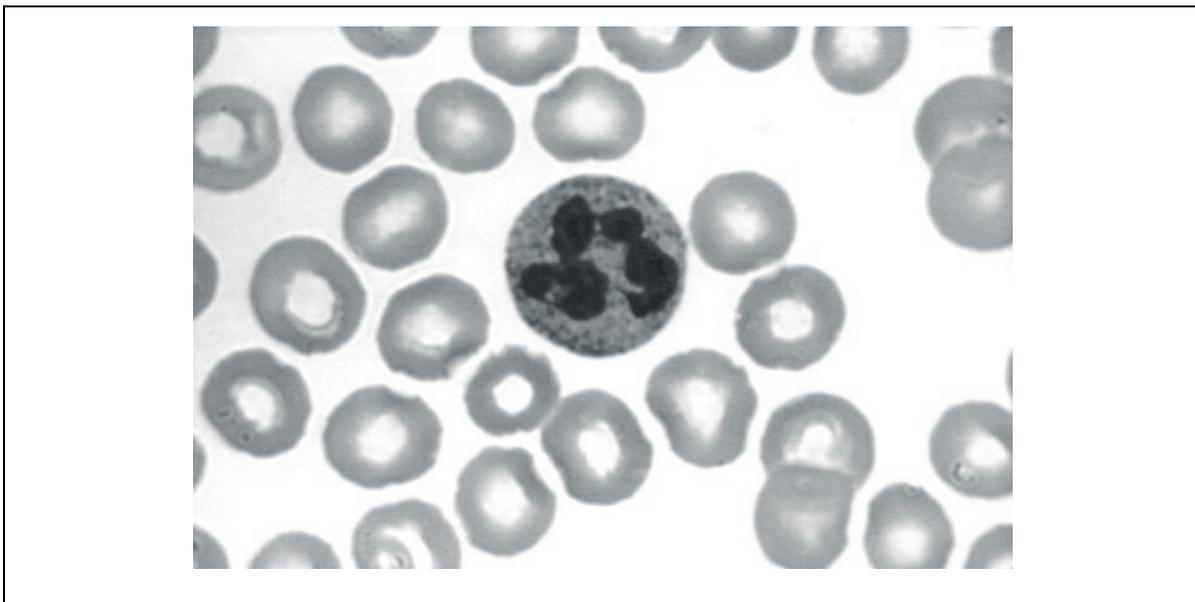


Abbildung 1: Blutastrich mit PMN. Deutlich zu sehen ist der charakteristische gelappte Kern der PMN, der sie von anderen Blutzellen unterscheidet. Umgeben ist der PMN von Erythrozyten.

Mit 40-65% stellen sie die größte Untergruppe der Leukozyten dar. Im normalen erwachsenen Organismus zirkulieren permanent ca. 2×10^{10} PMN, die pro Tag 2-3 mal ausgetauscht werden. Innerhalb der Blutzirkulation haben PMN nur eine Überlebenszeit von 8-20 Stunden. Im Rahmen akuter Infektionen können sich diese Zellzahlen schnell verzehnfachen [33]. PMN sind kernhaltige Zellen, die unter anderem einen Zitratzyklus und einen Harnstoffzyklus besitzen, und sie haben die Fähigkeit, Glykolyse zu betreiben [46]. Außerdem sind sie im Besitz der für eine oxidative

Phosphorylierung erforderlichen Enzymkomplexe und zeigen eine eigene Protein-, Enzym- sowie Lipidbiosynthese [24, 38]. Bisher vorliegende grundlegende Untersuchungen zeigen, dass PMN hinsichtlich der Vielfalt und Komplexität ihrer intrazellulären Stoffwechselwege anderen differenzierten kernhaltigen Gewebezellen (z.B. Muskel-, Nieren-, aber auch Leberzellen) hierbei durchaus gleichen [33].

Diese Stoffwechseleigenschaften sind Grundlage für die immunologischen Fähigkeiten der PMN. Hierbei können PMN opsonisierte pathogene Keime im Rahmen der Phagozytose in das Zellinnere aufnehmen und durch die Produktion zytotoxischer Sauerstoffmetabolite während des „oxidative burst“ zerstören. Dabei sind PMN anderen Zellen der unspezifischen Abwehr wegen ihrer Funktionalität, ihrer hohen Zellumsatzrate und ihrer guten Verfügbarkeit überlegen [33].

Eine besondere Bedeutung für Funktion und Integrität von PMN besitzt nach neueren Untersuchungen der hochaktive intragranulozytäre Aminosäurestoffwechsel [16, 17]. Dies erscheint logisch, da in schnell proliferierenden Geweben, zu denen auch Immunzellen zählen, neben Zuckermolekülen überwiegend Aminosäuren eine essentielle Bedeutung für die vielfältigsten zellulären Stoffwechsel- und Regulationsfunktionen besitzen [45, 126]. Für stoffwechselaktive, immunkompetente Zellen sind freie Aminosäuren wichtige Substrate für die Synthese von Proteinen (z. B. im Rahmen des „oxidative burst“) und anderer wichtiger zellulärer Makromoleküle (Enzyme, Nucleotide). Außerdem wirken sie als Stickstoff- bzw. Aminogruppendonatoren bei der Biosynthese wichtiger Verbindungen wie Purinen, Pyrimidinen oder auch Stickstoffmonoxid (NO) [60]. Darüber hinaus besitzen sie essentielle Funktionen bei der zellulären Glukosehomöostase, dem zellulären Energiestoffwechsel sowie auch bedeutende osmoregulatorische, antioxidative und immunmodulatorische bzw. –regulatorische Funktionen. Interessanterweise werden hierbei auch von PMN ganz spezielle Aminosäuren in großem Maße aus dem Extrazellulärraum aufgenommen, kompartimentiert und zu hochaktiven zellulären Substraten umgeformt. Bei der Beobachtung der intrazellulären Aminosäurekonzentrationen bzw. möglicher pathophysiologisch bedeutsamer Einflussfaktoren auf den intragranulozytären Aminosäurestoffwechsel ist besonders bemerkenswert, dass einige der untersuchten Aminosäuren in PMN, verglichen mit menschlichen Plasmaproben, auch in nicht stimulierten PMN-Zellen bis zu 100-fach höher konzentriert sind. Speziell Taurin, Glutamin, Glutamat, Asparagin und Ornithin liegen in PMN in sehr großen Mengen vor.

Die stoffwechselphysiologische Bedeutung dieser Befunde ist bislang jedoch nahezu unerforscht.

Insbesondere Glutamin spielt im leukozytären Stoffwechsel eine herausragende Rolle. Neueste Untersuchungen haben ergeben, dass Glutamin den schnell proliferierenden Zellen des Immunsystems als Energie-, Kohlenstoff- und Stickstoffquelle und als Bausteinlieferant für die Biosynthese von Nukleotiden und Zytokinen dient. Untersuchungen an Makrophagen und Lymphozyten zeigten, dass hierbei nur 25% des intrazellulär angereicherten Glutamins vollständig oxidiert wird, während der weitaus größere Anteil als Glutamat, Aspartat und Alanin „zwischengelagert“ wird. Dies wird damit erklärt, dass diese Zellen, analog zu PMN, jederzeit in der Lage sein müssen, auf einen Stimulus zu reagieren, um im Bedarfsfall sehr schnell Vorstufen für die Synthese von DNA, RNA und immunologisch aktiven Proteinen- bzw. Enzymen zur Verfügung stellen zu können. Gleichzeitig fördert Glutamin bei diesen Zellen die Proliferation, die Phagozytosefähigkeit sowie die Fähigkeit, Antigene zu präsentieren und die Zytokinproduktion. Sowohl für den Metabolismus wie auch für fundamentale Immunfunktionen von PMN scheint Glutamin unentbehrlich zu sein [127]. Einige Untersucher gehen sogar noch weiter und postulieren für Glutamin eine sogenannte „konditionelle Essentialität“ für Immunzellen. Insbesondere unter katabolen Bedingungen wie Operationen, Trauma, schwere Infektions- und Tumorerkrankungen übersteigt, trotz erhöhter endogener Produktion, der Bedarf an Glutamin auch bei hoher Ausgangskonzentration die zelluläre Neusyntheserate, sodass Glutamin zu einer essentiellen Aminosäure konvertiert [18, 127].

Neben Glutamin besitzen auch Arginin und Ornithin für Immunzellen bedeutendes stoffwechselregulatorisches und immunomodulatorisches Potential. Ähnlich wie für Glutamin wurde in Lymphozyten, Makrophagen, aber auch in „natural killer“ (NK) und „lymphokine activated killer“ (LAK) Zellen nach Argininsupplementation ein Anstieg essentieller zellulär vermittelter Immunfunktionen wie unter anderem der lymphozytären Mitogenese, der Interferon-induzierten NK-Aktivität, der makrophagozytären Zytotoxizität und der LAK-Zahl beobachtet. An der immunomodulatorischen Wirkung von Arginin ist hauptsächlich das aus der „Arginasereaktion“ entstehende Ornithin beteiligt, da Ornithin das einzige Substrat der zur Mitogenese zwingend erforderlichen intrazellulären Polyamine ist [122]. Analog zu Glutamin sind jedoch viele stoffwechselphysiologische Aspekte der Arginin- bzw. Ornithinwirkung auf den intrazellu-

lären Aminosäurestoffwechsel in PMN noch ungeklärt. Dies betrifft die zelluläre Aufnahme, Speicherung und insbesondere die intragranulozytäre Konversion dieser Aminosäuren zu Aminosäuresubstraten. Auch direkte Korrelationen von intragranulozytären Aminosäurebefunden unter Arginin- bzw. Ornithinsupplementation mit essentiellen Immunfunktionen liegen ebenso wie für Glutamin bisher nicht vor.

Gleiches gilt für die Aminosäure Taurin. Obwohl Taurin die höchstkonzentrierte Aminosäure in menschlichen PMN repräsentiert ($\approx 60\%$ des freien intragranulozytären Aminosäurebestandes) [79], wurde sie jahrzehntelang als stoffwechselneutrales „Zellabfallprodukt“ ohne besondere Funktionen angesehen. Erst in den letzten Jahren zeigte sich, dass speziell PMN-Zellen diese hohen Taurinkonzentrationen aktiv gegen einen hohen extra-intrazellulär-Gradienten (1:50-100) erzeugen und stabil aufrechterhalten. Es konnte gezeigt werden, dass Taurin in vielfältigster Weise an zellulären Regulationsmechanismen und Immunfunktionen beteiligt ist [121]. So wurden mit Taurin speziell in immunkompetenten Zellen antioxidative, membranstabilisierende und sogar antidotartige Eigenschaften in Verbindung gebracht. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Hypothese, dass Taurin für PMN eine Schutzfunktion ausübt, indem es die Zelle vor den deletären Folgen der zur Bakterienvernichtung produzierten reaktiven Sauerstoffradikale schützt. In welcher Form jedoch eine Taurinsupplementation Einfluss auf den intragranulozytären Aminosäurestoffwechsel nimmt und ob eine Korrelationen mit granulozytären Immunfunktionen besteht, ist auch für Taurin noch gänzlich ungeklärt.

Nach den Erkenntnissen der modernen Zellbiologie können Ungleichgewichte essentieller zellulärer Stoffwechselfunktionen, die Malfunktion eines Schlüsselenzyms oder signifikante Veränderungen des intrazellulären Substrathaushaltes zu einer Modulation der Zellaktivität, zum Verlust der Zellintegrität, aber auch zu einem hochgradigen Funktionsverlust führen. Einen bedeutenden Einflussfaktor auf die intrazelluläre Homöostase der PMN stellen nach den bisher vorliegenden Erkenntnissen hierbei auch Medikamente dar.

Dies betrifft Pharmaka, die häufig im Rahmen einer Sedierung und Analgesie bei kritisch kranken Patienten längerfristig und kontinuierlich appliziert werden müssen [28, 30, 46, 48, 49, 52, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75]. Oft führen nicht nur diese Medikamente, sondern auch die mit ihnen verabreichten Lösungsvermittler und Additiva, trotz unterschiedlicher Wirkmechanismen, zu analogen Einflüssen auf die Funktionen von

Immunzellen [98]. Diese Veränderungen bei der Immunfunktion spiegeln sich auch im intrazellulären Aminosäurestoffwechsel wider, wie durch unsere Arbeitsgruppe bereits für Flunitrazepam [154] und Diazepam [103] sowie Etomidate [104], Thiopental [102], Methohexital [101] und Propofol [99] gezeigt werden konnte. Für Diazepam konnten al-Sawaf et. al. [2] zeigen, dass die Kombination einer medikamentös bedingten Hemmung bzw. Blockierung wichtiger zellulärer Aminosäurestoffwechselprozesse, in Kombination mit einem Verlust der für die ungestörte Zellfunktion so wichtigen „Aminosäuresubstrathomöostase“, mitverantwortlich für bedeutende Veränderungen der lympho- bzw. granulozytären Integrität und Funktion zu sein scheint. Ferner postulierten die Autoren, dass Veränderungen des intrazellulären Aminosäurestoffwechsels nicht nur eine wichtige Indikatorfunktion für beginnende Funktionsänderungen von Granulozyten besitzen, sondern auch möglicherweise ein stoffwechselphysiologisches „Frühwarnsystem“ für beginnende pathologische Zellstoffwechselprozesse als Folge von Medikamenteneinwirkungen darstellen könnten.

Bislang liegen keinerlei Untersuchungen zum Einfluss von Opioiden auf die freien intrazellulären Aminosäuren von PMN vor, obwohl im Bereich der modernen Anästhesie der Einsatz von Opioiden heute nicht mehr wegzudenken ist. Die Spanne reicht von kurzen Eingriffen in der ambulanten Chirurgie bis zu Langzeitsedierungen in der Intensivmedizin. Neben der sedierenden Wirkung ist hier vor allem die analgetische Wirkung der Opiate von klinischer Bedeutung. Außer diesen gewünschten Effekten haben Opiate weitere, zum Teil unerwünschte Wirkungen wie Atemdepression, Miosis, Übelkeit und Erbrechen, Obstipation sowie psychische und physische Abhängigkeit. Eine weitere, in jüngerer Zeit vermehrt untersuchte Eigenschaft, stellt die Wirkung auf das Immunsystem und die Immunfunktionen des menschlichen Körpers dar [115, 129, 141, 145].

Opioide vermitteln ihre Wirkung über spezielle Bindungsstellen, die als Opioidrezeptoren bezeichnet werden. Opioidrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte, unverzweigte Proteine in der Zellwand, die hemmend auf die Adenylatcyclase und damit auf die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) wirken. Über eine Veränderung des Kalzium-Einstroms und eine Öffnung von Kalium-Kanälen wird die Zellmembran stabilisiert und damit die Transmitterfreisetzung aus Schmerz vermittelnden Neuronen reduziert. Die Opioide haben bei Kontakt mit den Opioidrezeptoren unterschiedliche Wechselwirkungen mit dem Rezeptor. Reine Agonisten (z. B. Mor-

phin und Fentanyl) besitzen intrinsische Aktivität, das bedeutet, dass sie nach Bindung an den Rezeptor zu einer Konformationsänderung im Rezeptormolekül führen. Daneben gibt es die reinen Antagonisten (z. B. Naloxon), die mit den Agonisten um die Rezeptorbindung konkurrieren, jedoch keine intrinsische Aktivität besitzen. Ihre Wirkung besteht in der Rezeptorblockade und ist zum einen von der Konzentration des Antagonisten und zum anderen von der Rezeptoraffinität abhängig. Bislang wurden die Opioidrezeptoren in drei Klassen (μ , δ , κ) mit weiteren Unterklassen eingeteilt, die sich in Lokalisation und Wirkprofil unterscheiden [129].

1.1.1 Morphin

Ursubstanz aller Opioide ist das Opium, der aus unreifen Fruchtkapseln gewonnene und getrocknete Milchsaft des Schlafmohns (*Papaver somniferum*). Opium enthält ca. 25 Alkaloide, von denen Morphin mit 12% Trockenmassenanteil das bedeutendsten ist. Die Isolierung des Morphins aus Opium gelang Anfang des 19. Jahrhunderts erstmals dem deutschen Apotheker Adam Sertürner [43].

In der Literatur wird die Wirkung von Morphin auf PMN sehr uneinheitlich bewertet. Während einige wenige Arbeitsgruppen bei der Morphininkubation keine Veränderungen bei der Chemolumineszenz [158] bzw. bei der granulozytären Adhärenz [74] feststellen konnten, so zeichnen sich jedoch bei der überwiegenden Zahl der Autoren vielfältige Effekte von Morphin auf PMN ab. Morphin hat sowohl einen hemmenden Einfluss auf die Chemotaxis und Bakterizidie [29], als auch auf die Aggregation der PMN [94]. In einer Studie konnten die Autoren zeigen, dass Morphin in Konzentrationsbereichen von 10^{-14} M bis 10^{-8} M die Superoxidanionenbildung erhöht [133], wohingegen in höherer Konzentration (10^{-5} M) andere Autoren schon keine Auswirkungen mehr beobachten konnten [131]. Welters et al. konnten eine Hemmung der Expression granulozytärer Oberflächenrezeptoren nach Morphinexposition nachweisen. Außerdem wurde die Phagozytose von opsonisierten Bakterien und deren Zersetzung im Rahmen des „oxidative burst“ supprimiert, allerdings waren diese Effekte nur geringgradig ausgeprägt und traten meist in supraklinischen Stimuluskonzentrationen bei langen Inkubationszeiten auf [97]. Die Antagonisierbarkeit der morphininduzierten Hemmung der Granulozytenfunktion durch NO-Synthaseinhibitoren lässt auf eine Schlüsselfunktion des second-messenger NO schließen [97, 157].

1.1.2 Fentanyl

Als erste vollsynthetische Opioide konnten Pethidin (1939) und Methadon (1945) hergestellt werden. Zu den vollsynthetischen Opioiden zählt auch das Fentanyl, dem eine 100-fach höhere analgetische Potenz zugeschrieben wird als Morphin [74].

Mit Fentanyl scheint nach heutigem Kenntnisstand ein immunologisch inertes Pharmakon entwickelt worden zu sein [160]. Fentanyl hat keinen Einfluss auf die granulozytäre Adhärenz [74], die Superoxidanionproduktion, die Peroxid-Produktion oder die Aktivität der Myeloperoxidase [66]. Fentanyl hat selbst im Hochdosisbereich keinen Einfluss auf den „oxidative burst“ der PMN [59, 97], ebenso bleiben Phagozytose und die Expression der Komplementrezeptoren 1 und 3 (CD35 und CD11b) unbeeinflusst [97]. Lediglich eine Arbeitsgruppe konnte für Fentanyl (30 ng/ml) eine Inhibition der Transmigration nachweisen [56].

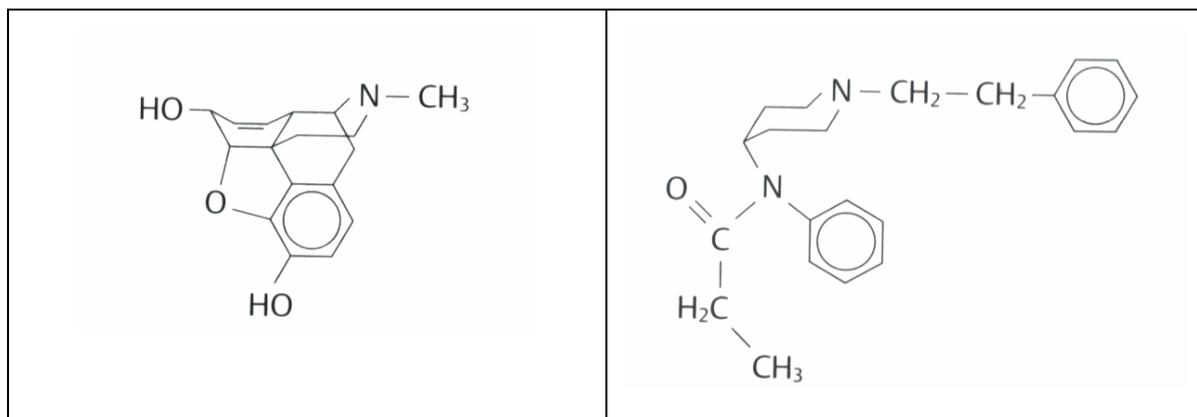


Abbildung 2: Strukturformel der Opioidalkaloide Morphin (links) und Fentanyl (rechts) [129]

1.1.3 β -Endorphin

Neben den synthetischen, im Rahmen der Anästhesie verabreichten Opioiden, spielen endogene Opioide eine oft noch verkannte Rolle. Endogene Opioide sind Peptide aus 5 bis 39 Aminosäuren, deren erste Vertreter 1975 durch John Hughes und Hans Kosterlitz identifiziert wurden [43]. Wenig später wurde auch das Opioidpeptid β -Endorphin nachgewiesen, das durch graduelle Proteolyse aus der Vorstufe Prä-Pro-Opiomelanocortin (POMC) neben dem adrenocorticotropen Hormon (ACTH) und dem melanozytenstimulierenden Hormon (MSH) entsteht. Alle wirksamen endogenen Opioide besitzen die amino-terminale Sequenz Tyr-Gly-Gly-Phe-X, wobei X entweder Methionin oder Leucin ist.

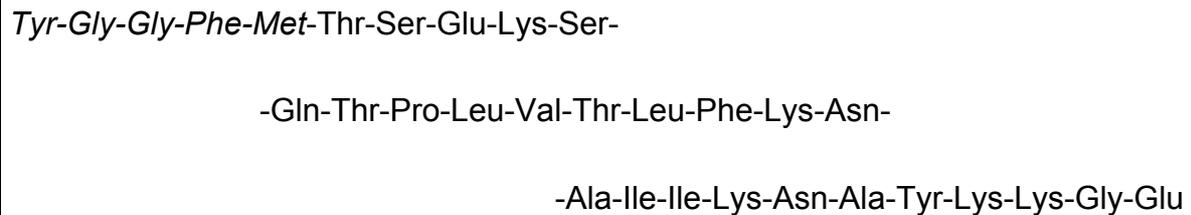


Abbildung 3: Aminosäuresequenz des humanen β -Endorphins

Freigesetzte Opioidpeptide werden hauptsächlich durch enzymatische Spaltung durch Enkephalinasen inaktiviert [44]. Endorphine werden vom Körper bei Stress ausgeschüttet, mit ihnen werden Schmerz, Bewusstsein und Emotionen beeinflusst [43, 97].

β -Endorphin liegt im Plasma normalerweise in Konzentrationen von 10^{-12} bis 10^{-10} M vor [41]. In Stimulationsversuchen konnten bei der Einwirkung von β -Endorphin auf PMN im allgemeinen nach 2-12 min. in einem Konzentrationsbereich ab 10^{-9} M Effekte beobachtet werden [41]. β -Endorphin veranlasst PMN, ihre Zellform zu verändern [37]. Dies stellt die Vorstufe zur Migration und damit den Beginn einer chemotaktischen Antwort gegenüber β -Endorphin dar [95, 132, 133, 159]. In höheren Konzentrationsbereichen kommt es jedoch vermutlich zu einer Hemmung der Reaktion der PMN auf β -Endorphin [114]. β -Endorphin erhöht die Adhärenz von PMN [150] und steigert in Konzentrationen von 10^{-7} M die Expression von Komplementrezeptor 3 (CD11b) und Komplementrezeptor 1 (CD35) auf PMN [97, 114]. Andere Arbeitsgruppen konnten eine Hemmung der Aktivität membranständiger Kalziumkanäle in PMN zeigen [93]. Bei der Wirkung von β -Endorphin auf den „oxidative burst“ steigern niedrige Stimuluskonzentrationen die Superoxidanionbildung und die H_2O_2 -Produktion, während sich dieser Effekt in höheren Konzentrationsbereichen abschwächt [131, 132, 133]. Welters et al. konnten bei Stimulation mit β -Endorphin zeigen, dass sowohl die Phagozytose opsonisierter Bakterien als auch der „oxidative burst“ gehemmt wurde [97], wobei allerdings auch hier die Effekte, ähnlich wie bei Morphin, nicht sehr stark ausgeprägt waren. Tatsache ist jedoch, dass PMN die für den Abbau der Opioidpeptide erforderliche Enkephalinase Neutrale Endopeptidase 24.11 (NEP 24.11) enthalten [5, 25, 35], die in der Lage ist, β -Endorphin zu inaktivieren [5, 86].

1.1.4 Naloxon

Naloxon ist ein Opioidantagonist und wurde deshalb in den meisten Studien zur Demonstration der Reversibilität opioidinduzierter Effekte verwendet [31, 43, 76, 94, 129, 133, 150, 156, 157]. Lediglich eine Arbeitsgruppe fand für Naloxon gemischte agonistisch-antagonistische Effekte [83]. Bei der Superoxidanionfreisetzung gibt es differente Ergebnisse. Während Seifert et al. keinen Effekt von Naloxon auf die Superoxidanionbildung in PMN nachweisen konnten [131], wurde in anderen Arbeiten eine Hemmung der Superoxidanionfreisetzung beschrieben [136]. Naloxon inhibiert die zelluläre Antikörperproduktion [61] und übt proliferative Effekte auf humane Lymphozyten aus [13].

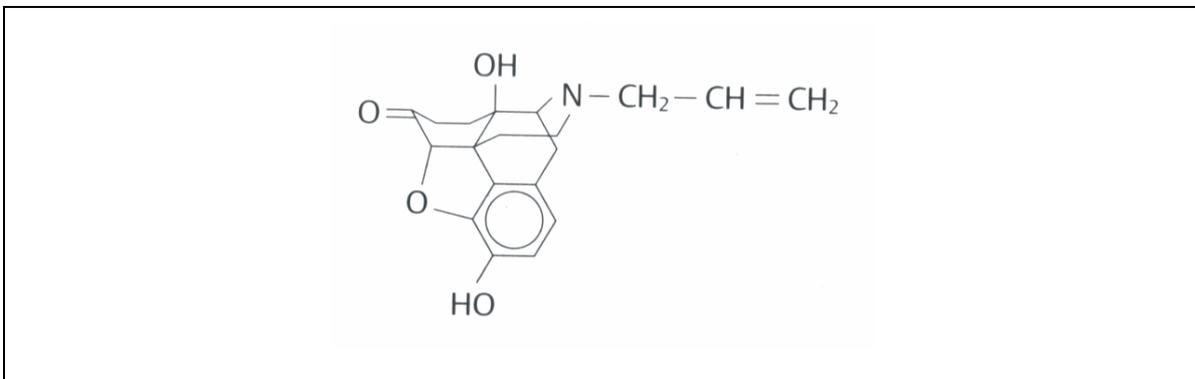


Abbildung 4: Strukturformel des Opiatantagonisten Naloxon [129]

1.2 Fragestellungen

1. Beeinflussen die Opiode Morphin, Fentanyl, β -Endorphin und Naloxon konzentrations- bzw. expositionszeitabhängig den Gehalt an freien intrazellulären Aminosäuren in PMN?
2. Kommt es parallel dazu zu Veränderungen der Funktion der PMN bei der Superoxidanion- und Wasserstoffperoxidbildung sowie bei der Aktivität der sezernierten Myeloperoxidase im Rahmen des „oxidative burst“?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studienkonzeption

Zur Klärung der oben aufgeführten Fragestellungen wurden zwei unterschiedliche Studienansätze gewählt. Zum einen wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Opioidkonzentrationen auf den intrazellulären Aminosäurestoffwechsel in einer Konzentrationsreihe untersucht, zum anderen wurden die Veränderungen der freien intrazellulären Aminosäuren bei Opioidinkubation im Zeitverlauf in einer Zeitreihe untersucht. In beiden Studien wurden parallel dazu zelluläre Immunfunktionsparameter der Zellen analysiert. Dazu wurden von insgesamt 26 freiwilligen, gesunden Probanden Granulozyten gewonnen, wobei sowohl männliche als auch weibliche Probanden in die Studie aufgenommen wurden. Für alle Versuchsreihen galten die gleichen Ein- und Ausschlusskriterien.

Einschlusskriterien:

- Volljährigkeit
- Einwilligung in die Blutentnahme
- Blutentnahme zwischen 17:00 und 18:00 Uhr

Ausschlusskriterien:

- Kalorienzufuhr in den letzten 6 Stunden
- akute Erkrankungen oder Infektionen
- Nikotinkonsum
- Erkrankungen des Blutes und des blutbildenden Systems
- Allergien in der Anamnese

Eine Kalorienzufuhr vor der Blutentnahme stellte ein Ausschlusskriterium dar, da abhängig von der Art der zugeführten Nährstoffe sich die intrazellulären Aminosäuren in neutrophilen Granulozyten verändern [11] und daher keine standardisierten Ausgangswerte erzielt werden können. Ähnliches gilt für pathologische Veränderungen ausgelöst durch Nikotinkonsum, akute Erkrankungen und allergische Disposition, da es hierdurch zu einer unkontrollierten Aktivierung der neutrophilen Granulozyten kommt.

2.2 Blutentnahme

Den Probanden wurden einmalig 90 ml Blut abgenommen, mit EDTA antikoaguliert und mit Proteaseinhibitoren versetzt (handelsübliche 10 ml EDTA-Monovetten mit jeweils 1 mg PMSF, 100 µg Leupeptin, 100 µg Pepstatin A, 100 µg Antipain) [17].

2.3 Inkubation

Zur Inkubation wurden je 4 ml Blut in ein Polystyrol-Röhrchen gegeben. Als Inkubationsreagenzien wurden Morphin, Fentanyl, β -Endorphin oder Naloxon mit einem Volumen von jeweils 200 µl zugegeben, wobei der dadurch entstehende Verdünnungseffekt bei den Konzentrationen der Medikamente berücksichtigt wurde.

2.3.1 Konzentrationsreihen

Für die Konzentrationsreihen wurden zwei unterschiedliche Medikamentenkonzentrationen gegen einen Leerwert (PBS-Puffer) getestet. Parallel zu diesen Konzentrationen wurde eine Naloxon-Konzentrationsreihe mit zwei verschiedenen Konzentrationen gemessen.

	Konzentration 1	Konzentration 2
Morphin	(0,1 µg/ml) = $2,7 \times 10^{-7}$ M	(5,0 µg/ml) = $1,3 \times 10^{-5}$ M
Fentanyl	(0,01 µg/ml) = $3,0 \times 10^{-8}$ M	(0,1 µg/ml) = $3,0 \times 10^{-7}$ M
β -Endorphin	$1,0 \times 10^{-12}$ M	$1,0 \times 10^{-9}$ M
Naloxon	$1,0 \times 10^{-6}$ M	$1,0 \times 10^{-4}$ M

Tabelle 1: Medikamentenkonzentrationen in den Konzentrationsreihen

Bei den Konzentrationsreihen wurden die Proben und die Kontrollen nach Zugabe des Medikaments bei 37°C für 10 Minuten unter leichtem Schütteln im Schüttelwasserbad (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die PMN aus dem Vollblut isoliert, lyophilisiert und anschließend die intrazellulären Aminosäuren quantitativ bestimmt (siehe unten).

2.3.2 Zeitreihen

Für die Zeitreihen wurde die jeweils höhere Medikamentenkonzentration nach drei verschiedenen Inkubationszeiten (10, 60 und 120 Minuten) gegen den Leerwert getestet. Außerdem wurde eine Leerwert-Zeitreihe angelegt, um eventuell auftretende natürliche Veränderungen zu erfassen. Als Medikamente wurden Morphin, Fentanyl und Naloxon verwendet. β -Endorphin wurde in den Zeitreihen nicht getestet, da be-

reits nach 10 Minuten das Wirkungsmaximum zu erwarten ist [132] und β -Endorphin danach unter anderem durch Enkephalinasen enzymatisch inaktiviert wird [5, 25, 35, 86]. Zur Inkubation wurden je 4 ml EDTA-Blut mit 200 μ l Medikamentenlösung bei 37°C im Schüttelwasserbad für die jeweilige Zeit inkubiert.

	10 Minuten	60 Minuten	120 Minuten
Morphin	$1,3 \times 10^{-5}$ M	$1,3 \times 10^{-5}$ M	$1,3 \times 10^{-5}$ M
Fentanyl	$3,0 \times 10^{-7}$ M	$3,0 \times 10^{-7}$ M	$3,0 \times 10^{-7}$ M
Naloxon	$1,0 \times 10^{-6}$ M	$1,0 \times 10^{-6}$ M	$1,0 \times 10^{-6}$ M

Tabelle 2: Medikamentenkonzentrationen in den Zeitreihen

2.4 Granulozytenseparation

Die Separation der neutrophilen Granulozyten aus Vollblut erfolgte durch diskontinuierliche Dichtezentrifugation in Percoll. Hierzu wurden an jedem Versuchstag aus käuflichem Percoll zwei verschiedene Lösungen erstellt, die Temperatur der Lösungen betrug 4°C.

	Lösung 1	Lösung 2
Percoll (Dichte 1,131 g/ml)	55 ml	70 ml
NaCl (1,5 M)	10 ml	10 ml
Aqua dest.	35 ml	20 ml

Tabelle 3: Percolllösungen

In einem Polystyrolröhrchen wurden 4 ml der Lösung 1 vorgelegt und mit 4 ml der Lösung 2 unterschichtet. Auf die beiden Lösungen wurden vorsichtig 4 ml Vollblut pipettiert, sodass eine saubere Abgrenzung von drei verschiedenen Phasen möglich war. Direkt im Anschluss daran wurde das Vollblut über den entstehenden Percoll-Gradienten zentrifugiert (20 min, 350 x g, 4°C; Biofuge[®] 17RS, Fa. Heraeus Instruments, Hanau). Nach Ablauf der Zentrifugation stellten sich folgende Banden dar:

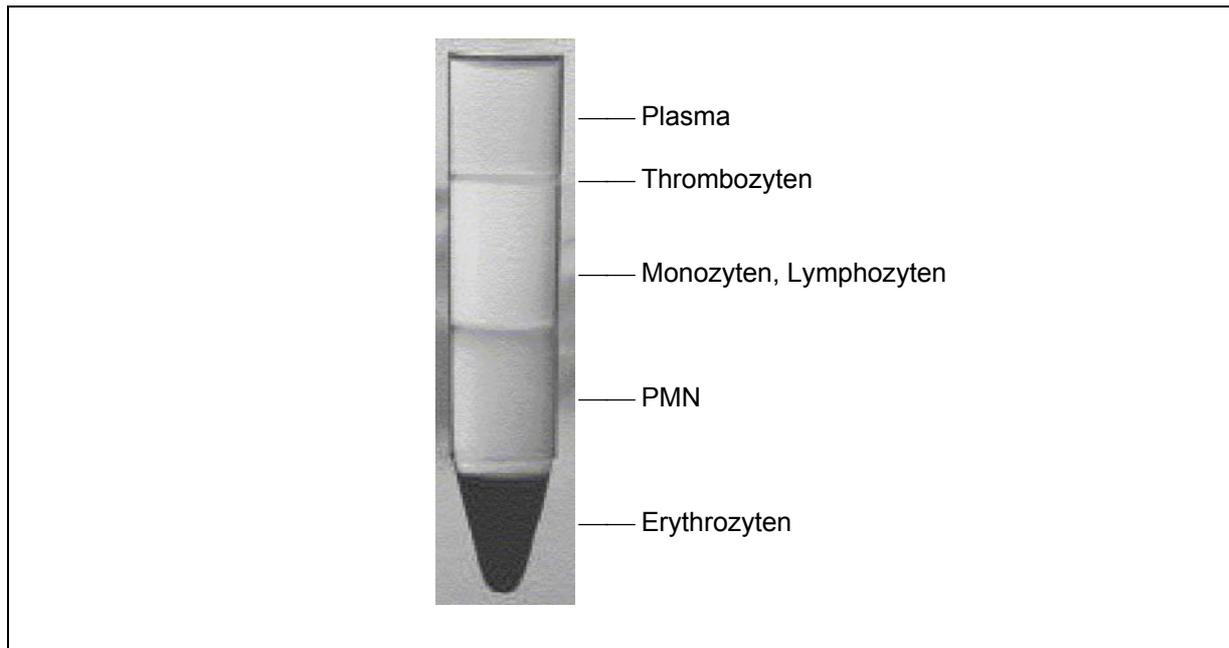


Abbildung 5: Einzelne Fraktionen des entstandenen Gradienten nach diskontinuierlicher Dichtezentrifugation von Vollblut in Percoll.

Der Überstand wurde verworfen und die PMN-Bande in PBS-Puffer (4°C vorgekühlt) überführt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 200×g, 4°C, Biofuge[®] 17RS) und der Überstand verworfen. In dem am Röhrchenboden befindlichen Zellpellet befanden sich noch Resterythrozyten, die mittels hypotoner Lyse entfernt wurden. Hierzu wurde das Zellpellet in 4 ml Aqua dest. resuspendiert und die Lyse nach 40 s durch Zugabe von 2 ml NaCl 2,7 % durch Reosotonisierung abgestoppt. Die Probe wurde mit vorgekühltem PBS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt und die im Lysevorgang nicht zerstörten Granulozyten wurden abzentrifugiert (5 min, 200×g, 4°C, Biofuge[®] 17RS). Nach Verwerfen des Überstands stellte sich am Röhrchenboden ein weißes Granulozytenpellet dar. Dieses Granulozytenpellet wurde in 250 µl vorgekühltem PBS-Puffer sorgfältig resuspendiert. Mit Hilfe von Leukopipetten wurden zwei Proben entnommen und mit Türks-Lösung bzw. Trypanblau angefärbt. Die mit Türks-Lösung angefärbte Probe diente zur lichtmikroskopischen Handauszählung (Mikroskop, Fa. Eschenbach Optik GmbH, Nürnberg) der Granulozyten in einer Neubauer-Zählkammer, um die Zellkonzentration zu bestimmen und zur Kontrolle der Reinheit der Zellproben. Proben mit einem Anteil von mehr als 4 % Fehlerzellen wurden verworfen. Mit der Anfärbung durch Trypanblau wurde, ebenfalls lichtmikroskopisch, die Vitalität der Zellen überprüft und Proben mit mehr als 4 % avitaler Zellen wurden verworfen [100].

Von der restlichen Zellsuspension wurden 200 μ l in ein Eppendorfhütchen pipettiert und bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurde die Probe innerhalb von vier Wochen lyophilisiert. Bei diesem Verfahren werden die Zellmembranen der Granulozyten bei -80 °C unter Hochvakuum zerstört (CIT-2[®], Fa. Heraeus Instruments, Hanau), sodass im Anschluss die intrazellulären Aminosäuren frei vorliegen. Zusätzlich wurde durch dieses Verfahren die Haltbarkeit der Proben auf 6 Monate verlängert [45, 100].

2.5 Quantitative Aminosäurenanalyse

Die hier angewendete Methode nach Mühling [100] stellt eine Weiterentwicklung der von Fuchs [45] vorgestellten Methoden dar. Die Methode ermöglicht mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) eine präzise quantitative Analyse freier intrazellulärer Aminosäuren. Umfangreiche Untersuchungen von Mühling und Mitarbeitern zeigten die hohe Validität und Präzision der Methodik [100].

2.5.1 Externe Aminosäurestandards

Zur Standardisierung und Kalibrierung der HPLC wurden selbst hergestellte externe Aminosäurestandardproben verwendet. Um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten und um eine Qualitätskontrolle für die Analytik zu haben, wurde nach jeweils neun HPLC-Proben ein externer Standard verwendet. Hierdurch wurde die „Tag-zu-Tag-Vergleichbarkeit“ der Proben über einen langen Zeitraum gewährleistet und der natürlich auftretende Materialverschleiß wurde rechtzeitig bemerkt, sodass beispielsweise die Chromatographiesäule ausgetauscht werden konnte, bevor es zu einem Probenverlust kam.

Für die externen Aminosäurestandards wurden zunächst fünf Lösungen hergestellt:

Lösung 1	Lösung 2	Lösung 3	Lösung 4	Lösung 5
2 mg Tyrosin	20 mg α -Aminoadipinsr.	20 mg Alanin	20 mg α -Aminobuttersr.	50 mg Arginin
	20 mg Glutamin	20 mg γ -Aminobuttersr.	20 mg Asparagin	20 mg Asparaginsr.
	50 mg Ornithin	20 mg Glutaminsr.	20 mg Citrullin	20 mg Glycin
	20 mg Threonin	50 mg Histidin	10 mg Isoleucin	10 mg Leucin
	10 mg Valin	50 mg Lysin	20 mg Taurin	20 mg Methionin
		20 mg Phenylalanin	40 mg Tryptophan	20 mg Serin

Tabelle 4: Startlösungen für die Herstellung des externen Aminosäurestandards. Jede Lösung wurde mit 20 ml NaCl 0,9% angesetzt.

Jeweils 400 μ l der Lösungen 2-5 wurden zu 4 ml der Lösung 1 gegeben und 800 mg humanes Serumalbumin hinzugefügt. Je 200 μ l dieser Stammlösung wurden an-

schließlich in Eppendorfggefäße (1,5 ml) gegeben und nach Tiefgefrierung bei -80 °C lyophilisiert (CIT-2[®]).

2.5.2 Standardextraktionspuffer

Die lyophilisierten Proben (sowohl Zell- als auch Standardproben) wurden jeweils in 280 μl Standardextraktionspuffer resuspendiert. Der Standardextraktionspuffer besteht aus 80% Methanol und 20% Aqua dest. Zusätzlich enthält der Standardextraktionspuffer als internen Standard die Aminosäure Homoserin, die in neutrophilen Granulozyten nicht enthalten ist, in einer Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$.

2.5.3 Weitere Puffer und Materialien zur HPLC-Analyse

Die bei der HPLC-Analyse erforderliche Bildung von Isoindolderivaten aus primären Aminosäuren verlangt ein alkalisches Medium (pH 9,5). Hierzu wurde ein Boratpuffer verwendet, für den 5,03 g Tetraborat in 200 ml Aqua dest. für 5 min bei 100 °C erhitzt und gelöst wurde. Der so entstandene Boratpuffer ist bei 20 °C unter Lichtabschluss drei Monate haltbar.

Zur Fluoreszenzmarkierung der Aminosäuren wurde o-Phtaldialdehyd-Mercaptoethanol (OPA) verwendet. Zur Herstellung von OPA wurden 100 mg o-Phtaldialdehyd in 9 ml Methanol gelöst und mit 1 ml Boratpuffer (s. o.) und 100 μl 2-Mercaptoethanol versetzt. Das OPA wurde für jeden Analysenlauf frisch angesetzt und bis zum Beginn der Analyse bei 4 °C zwischengelagert. Bei Raumtemperatur beträgt die Haltbarkeit des OPA-Reagenz drei Tage.

Um die Stabilität der fluoreszenzmarkierten Aminosäuren zu gewährleisten, ist ein pH-Wert von 7,2-7,4 erforderlich. Hierzu wurde 1-N HCl mit Aqua dest. zu einer 0,75-N HCl verdünnt und damit der pH-Wert im automatisierten Analyseverfahren auf reproduzierbare Werte von $7,3 \pm 0,15$ eingestellt.

2.5.3.1 Methanol-Natriumazetatpuffer

Zur optimalen Auftrennung der fluoreszenzmarkierten Aminosäuren in der Chromatographiesäule wurde ein binäres Eluentensystem verwendet. Die verwendete 0,5-M Natriumazetatlösung wurde mit 6-M HCl auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt und anschließend mit Aqua dest. 1:10 verdünnt. Durch Zugabe von Methanol wurden

dann die beiden Elutionspuffer hergestellt. Puffer A enthielt 19% Methanol und 81% 0,05-M Natriumazetatpuffer, wohingegen Puffer B aus 75% Methanol und 25% 0,05-M Natriumazetatpuffer bestand.

2.5.3.2 HPLC-Spüllösung

Zum Reinigen und Spülen der HPLC-Anlage wurde eine Spüllösung aus 50% Methanol und 50% Aqua dest. verwendet, die im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 103®, Fa. Bandelin, Berlin) über 15 min entgast wurde.

2.5.3.3 Geräteanforderungen

Die HPLC-Anlage bestand aus folgenden Bausteinen:

- programmierbare hydrostatische Gradientenpumpe (600 E[®], Fa. Waters, USA)
- 3-Kanal-Degaser (Fa. Knauer, Berlin)
- programmierbare Autosampler-Pipettiereinheit (Triathlon[®], Fa. Spark, Holland)
- 100 µl Probenschleife (AS 300[®], Fa. Sunchrom, Friedrichsdorf)
- Reversed-Phase-F-HPLC-Trennsäule (Nova Pak[®], RP-C-18, 300 x 3,9 mm, I.D. 60 Å, 4 µm, Fa. Waters, USA)
- Säulenofen (Fa. Knauer, Berlin)
- Fluoreszenzspektrometer (RF-530[®], Fa. Shimadzu, Kyoto, Japan)
- Analog-Digitalwandler Interfacebox (Fa. Knauer, Berlin)
- PC (Fa. Compaq, USA) zur Messdatenerfassung
- Integrationssoftware Eurochrom 2000 for Windows[®] Version 1.6 (Fa. Knauer, Berlin)

2.5.4 Ablauf der Analyse

Die lyophilisierten Zellproben sowie die Standards wurden in Standardextraktionspuffer resuspendiert und so ein methanolischer Extrakt der Probe hergestellt. Nach Inkubation und Zentrifugation (5 min, 350×g, RT, Rotixa/KS[®], Fa. Hettich, Tuttlingen) wurden 200 µl des Überstands der Probe in ein spezielles Probengefäß (siehe Materialverzeichnis im Anhang) überführt und nachfolgend automatisiert mit 80 µl 0,5-M Boratpuffer basisch gepuffert (pH ≈ 9,5), 40 µl OPA-2-Mercaptoethanol-Reagenz zugesetzt und die Derivatisierung nach exakt 120 s durch Neutralisierung mit 20 µl

0,75-N HCl gestoppt (pH \approx 7,2). Dieser Ansatz wurde weiterhin mit dem Puffer A 1:4 verdünnt und 50 μ l dieser Lösung in die Chromatographiesäule injiziert.

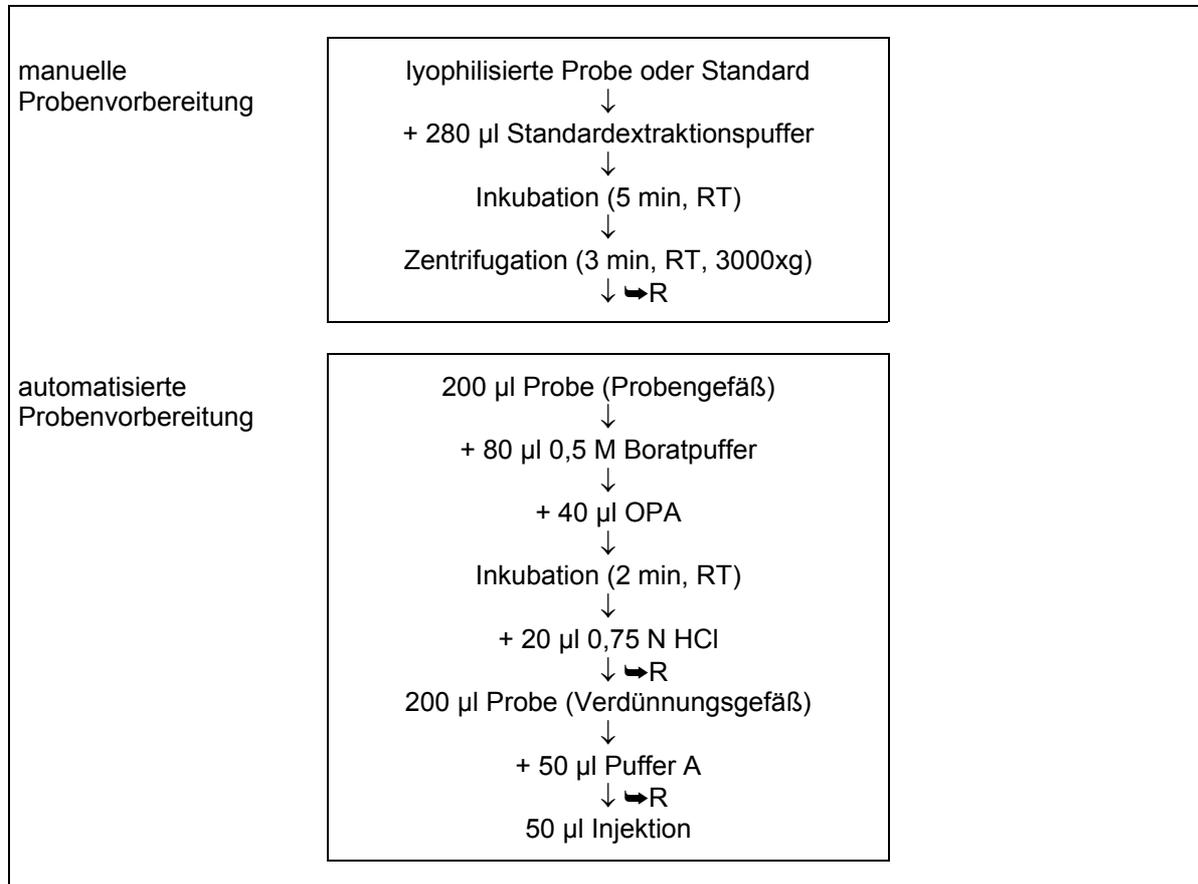


Abbildung 6: Pipettierschema der automatisierten OPA-2-Mercaptoethanol-Fluoreszenz-Vorsäulen-derivatisierung (R= Rest verwerfen)

2.5.5 Gradienten

Nach sorgfältiger Äquilibration der Analytik (\geq 4 h) erfolgte die Gradientenelution. Die Elutionspuffer wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min nach dem in der Tabelle beschriebenen Mischungsverhältnis in das Fluoreszenz-HPLC-System eingespeist. Der aufgrund dieser Flussrate im System entstehende Arbeitsdruck betrug, je nach Puffer-Mischungsverhältnis, zwischen 2900 und 3500 P.S.I. (1 P.S.I. = 6894,76 Pa). Die zur Fluoreszenzdetektion primärer Aminosäuren verwendete Anregungswellenlänge betrug 330 nm, die Emissionswellenlänge 450 nm.

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]
0,0	97	3
3,0	97	3
3,1	100	0
37,0	70	30
63,0	0	100
67,0	97	3

Tabelle 5: Puffermischverhältnis im angewendeten binären Eluentensystem

Die erhaltenen Messwerte wurden digitalisiert und die entstandenen Chromatogramme computerunterstützt mit einer speziell entwickelten Integrationssoftware (EuroChrome™ 2000 for Windows, Version 1.6, Fa. Knauer, Berlin, Deutschland) ausgewertet. Danach wurden mit den Standardchromatogrammen die in den Proben enthaltenen Aminosäuremassen ermittelt und anhand der ermittelten Zellzahlen der einzelnen Proben der Bezug zum Einzelzellniveau erstellt.

2.6 Bestimmung der Granulozytenaktivität

Die verwendeten Methodiken zur Bestimmung der granulozytären Superoxidanion- und Wasserstoffperoxidbildung sowie die Quantifizierung der granulozytären Myeloperoxidaseaktivität sind Weiterentwicklungen der von Krumholz et al. [65, 66, 68, 75] beschriebenen Analytikverfahren.

2.6.1 Superoxidanionbildung

Diese Methodik beruht im wesentlichen auf der Reduktion von Cytochrom C durch Superoxidanion. Zu diesem Zweck wurden vorbereitend 100 mg Cytochrom C in 30 ml PBS-Puffer gelöst, aliquotiert und bei einer Temperatur von -20 °C eingefroren. Zur Stimulation der Granulozyten diente voropsoniertes Zymosan, welches durch Inkubation (37 °C, 30 min, Schüttelwasserbad) von 100 mg Zymosan mit 6 ml gepooltem AB-Serum gewonnen wurde. Nach zweimaligem Waschen in 0,9%-iger NaCl-Lösung und anschließender Zentrifugation (10 min, 350 × g, RT, Rotixa/KS®) wurde das opsonierte Zymosan in 10 ml PBS-Puffer resuspendiert, portioniert (500 µl) und bei -20 °C eingefroren. Nach Inkubation der Vollblutproben mit den zu untersuchenden Testsubstanzen wurden die PMN mit dem oben beschriebenen Se-

parationsverfahren isoliert. Nach Entnahme von Aliquots zur Kontrolle von Zellzahl, Reinheit und Vitalität sowie zur Aminosäurenanalyse erfolgte die Einstellung der PMN-Konzentration ($0,8 \times 10^6$ PMN/ml) mittels eines Glukose-PBS-Puffers (9,9 g/l Glukose). 500 μ l dieser PMN-Probe ($0,4 \times 10^6$ PMN) wurden nun mit 500 μ l voropsoniertem Zymosan, 150 μ l AB-Serum und 250 μ l Cytochrom C 15 min bei 37 °C inkubiert (Schüttelwasserbad). Als Nullwert diente ein Ansatz, der statt Zymosan 500 μ l Glukose-PBS-Puffer enthielt. Direkt im Anschluss an das Inkubationsverfahren wurde die Reaktion durch Einbringen der Probe in Eiswasser abgestoppt. Nach der Zentrifugation (3 min, 350 \times g, 4 °C, Rotixa/KS[®]) wurde der Probenüberstand gewonnen und die Extinktion bei 546 nm gegen den Nullwert in einem Digitalphotometer (Digitalphotometer 6114 S[®], Fa. Eppendorf, Hamburg) ermittelt. Die gebildete Superoxid-anionmenge berechnete sich aus der Extinktion, der Schichtdicke und dem Extinktionskoeffizienten des Cytochrom C [(21/(mMol \times cm))] unter Berücksichtigung des Probenvolumens nach dem Gesetz von Lambert & Beer [10]. Simultan zu den Messproben wurden stets auch testsubstanzfreie Ansätze mituntersucht.

2.6.2 Wasserstoffperoxidbildung

Auch die in der vorliegenden Untersuchung angewendeten Methodiken zur Bestimmung der Wasserstoffperoxidproduktion von PMN basieren auf Weiterentwicklungen der von Krumholz und Mitarbeitern beschriebenen Analytikverfahren [65]. Das hierbei angewendete Messprinzip beruht auf der durch Meerrettich-Peroxidase vermittelten Oxidation von Phenolrot durch Wasserstoffperoxid. Versuchsvorbereitend wurde Phenolrot in Aqua dest. und Meerrettich-Peroxidase in Glukose-PBS-Puffer gelöst. Nach Inkubation des Vollblutes mit der zu untersuchenden Testsubstanz sowie nach erfolgter PMN-Isolation wurden die PMN mittels voropsoniertem Zymosan stimuliert. Der endgültige Testansatz bestand aus 500 μ l PMN-Suspension (2×10^6 PMN), 500 μ l voropsoniertem Zymosan, 125 μ l AB-Serum, 12,5 μ l Meerrettich-Peroxidase-Lösung, 12,5 μ l Phenolrotlösung und 12,5 μ l Natriumazidlösung. Dieser Testansatz wurde nun über einen Zeitraum von 15 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert und im direkten Anschluss daran zentrifugiert (3 min, 350 \times g, RT, Rotixa/KS[®]). Nach Zusatz von 25 μ l 1-N-NaOH-Lösung erfolgte die photometrische Extinktionsbestimmung des Überstandes bei 623 nm gegen einen unstimulierten Nullwert (Digitalphotometer 6114 S[®]). Die Wasserstoffperoxidkonzentrationen wurde an Hand von in regelmäßigen Intervallen durchgeführten Eichungsmessungen ermittelt.

2.6.3 Aktivität der Myeloperoxidase

Zur Quantifizierung der Aktivität der von PMN freigesetzten Myeloperoxidase wurde eine Weiterentwicklung der von Krumholz und Mitarbeitern beschriebenen Analytikverfahren angewendet [65]. Vorbereitend wurde zunächst 1 mmol 2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazoline)-Sulfonsäure (ABTS) in 0,1 M-Citratpuffer gelöst. Das Vollblutinkubationsverfahren wie auch die nachfolgende PMN-Isolation erfolgte wie oben bereits beschrieben. 100 µl PMN-Suspension (2×10^6 PMN) wurden nun mit 0,5 µg Cytochalasin B 5 min im Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Nach Hinzufügen von 100 µl voropsoniertem Zymosan wurde erneut inkubiert (10 min, 37 °C) und anschließend 1 ml ABTS-Lösung beigefügt. Nach der Zentrifugation (3 min, 700×g, 20 °C, Rotixa/KS[®]) wurde 1 ml des Überstandes abpipettiert und mit 30%-iger Wasserstoffperoxidlösung versetzt. Im Anschluss an die Homogenisierung auf dem Rüttelmixer (REAX 1[®], Fa. Heidolph, Deutschland) wurde die Extinktion bei 405 nm photometrisch bestimmt (Digitalphotometer 6114 S[®]). Anhand in regelmäßigen Intervallen mittels Meerrettich-Peroxidase erstellten Eichkurven wurde die Aktivität der freigesetzten Myeloperoxidase ermittelt.

2.7 Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch das Institut für medizinische Informatik der Universität Giessen. Die erhobenen Daten wurden durch Varianzanalyse mit Messwiederholungen und paarweisen Kontrasten nach Sidak, unterstützt durch das Computerprogramm SPSS für Windows Version 10.07, ausgewertet. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ festgelegt [64, 92].

3 ERGEBNISSE

An den beiden Studienreihen nahmen insgesamt 26 Probanden teil, wobei der Anteil männlicher und weiblicher Probanden jeweils gleich groß war. Alle teilnehmenden Probanden erfüllten die geforderten Einschlusskriterien. Beide Gruppen waren hinsichtlich der physischen Kenndaten Alter, Größe und Gewicht in sich homogen und miteinander vergleichbar (siehe Tabelle 6).

	n	Geschlecht		Alter [a]		Größe [cm]		Gewicht [kg]	
		männl.	weibl.	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Konzentrationsreihe	16	8	8	28,6	9,9	175,4	8,2	72,4	10,2
Zeitreihe	10	5	5	26,8	3,5	175,1	10,6	65,9	13,5

Tabelle 6: Übersicht über physische Kenndaten der teilnehmenden Probanden. Angegeben ist die Anzahl der Probanden (n), sowie für Alter, Größe und Gewicht jeweils die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) in den beiden Studienreihen.

Die Probenentnahme bei den nüchternen Probanden (keine Nahrungsaufnahmen oder Zufuhr hochkalorischer Getränke innerhalb der letzten sechs Stunden) erfolgte grundsätzlich zwischen 17:00 und 18:00 Uhr. Pro 4 ml entnommener Vollblutprobe konnten durchschnittlich $3,67 \times 10^6 \pm 1,19 \times 10^6$ PMN-Zellen separiert werden. Um eine ausreichende Sensitivität zu gewährleisten sind bei der hier angewendeten Methode $>10^5$ PMN/Probe erforderlich [100]. Die prozentuale Abweichung der Zellzahl bei zweimaliger Zellzählung betrug $3,9 \pm 1,6$ %. Die Reinheit der separierten PMN betrug durchschnittlich $98,6\% \pm 0,8\%$, die Vitalität $99,1\% \pm 0,7\%$ (Zellproben mit $< 96\%$ vitalen PMN-Zellen sowie einer PMN-Zellreinheit $< 96\%$ wurden verworfen). Die PMN-Zellseparation erforderte durchschnittlich 34 ± 4 min.

Von jeder Zell- bzw. Standardprobe wurde ein Chromatogramm erstellt (s. Abb. 7 und 8). Die Flächen unter der Chromatogrammkurve für die einzelnen Aminosäuren wurden mittels Planimetrie unter Zuhilfenahme der Software EuroChrome™ 2000 for Windows (Version 1.6, Fa. Knauer, Berlin) integriert. Anschließend wurden unter Einbeziehung des externen (Standardaminosäurenlösung) und internen Standards (Hos) die in der jeweiligen Probe enthaltenen Aminosäuremassen errechnet. Abschließend wurde der Bezug zum Einzelzellniveau anhand der bei der Aufarbeitung lichtmikroskopisch ermittelten PMN-Zellzahlen der einzelnen Proben hergestellt.

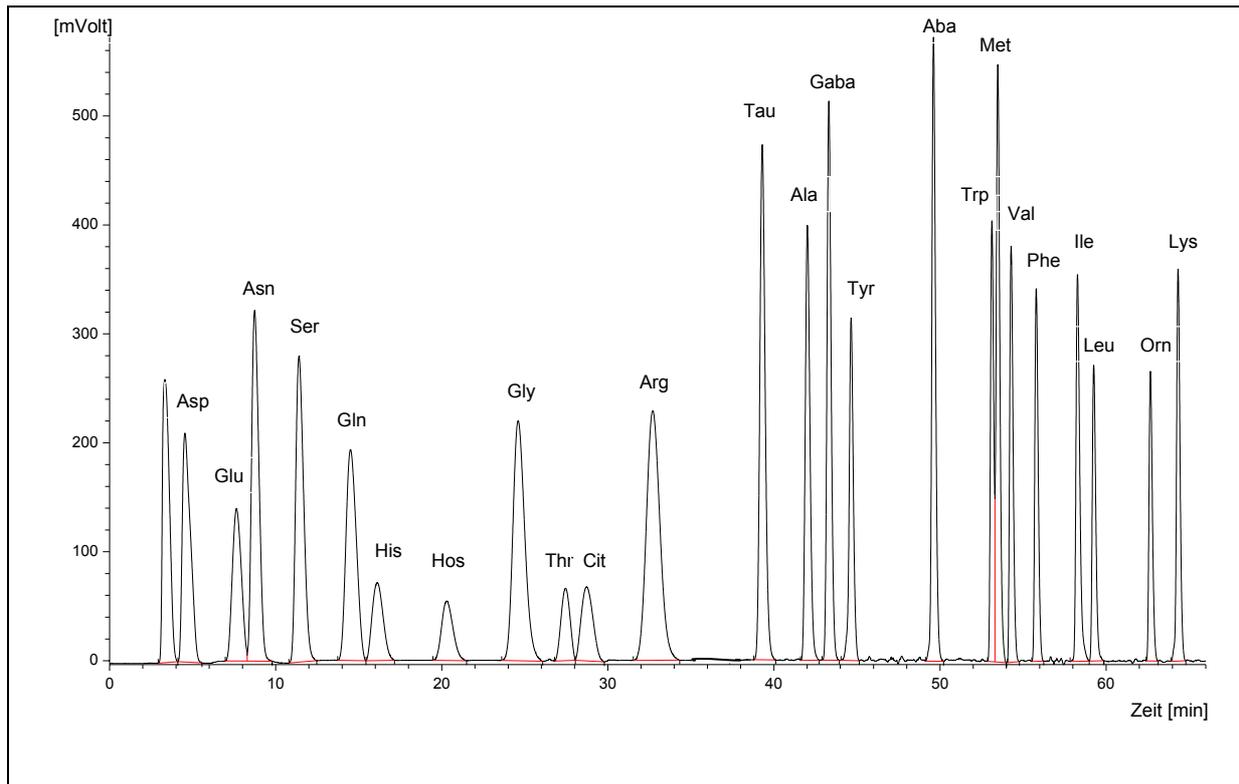


Abbildung 7: Chromatogramm einer Standardaminosäurenlösung

Um die Reproduzierbarkeit und die Qualität der Messergebnisse im Rahmen der HPLC-Quantifizierung von primären Aminosäuren konstant gewährleisten zu können, wurde die Analytik kontinuierlich mittels externer sowie interner Standards überwacht. Bei jeder HPLC-Analyse wurden deshalb routinemäßig mehrere Standards mitgemessen, was eine Qualitätssicherung durch Reihenanalysen und „Tag-zu-Tag-Vergleiche“ möglich machte. Die Variationskoeffizienten der gemessenen Standardaminosäuremassen lagen bei Reihenanalysen im Durchschnitt zwischen 0,86% (Methionin) und 2,34% (Leucin) sowie bei „Tag-zu-Tag-Vergleichen“ zwischen 1,88% (Glycin) und 4,69% (Lysin). Neben den Variationskoeffizienten für die Standardaminosäuremassen liefern auch die Variationskoeffizienten der einzelnen Retentionszeiten einen Beweis für die Reproduzierbarkeit der Methodik. Diese lagen bei den Reihenanalysen im Mittel zwischen 0,02% (Lysin) und 0,23% (Citrullin) und bei den „Tag-zu-Tag-Vergleichen“ zwischen 0,04% (Lysin) und 0,72% (Threonin). Wie die Ergebnisse der Reihenanalysen aber auch der „Tag-zu-Tag-Vergleiche“ zeigen, gewährleistete der verwendete Standardextraktionspuffer (Methanol-H₂O-Gemisch 0,8/0,2) wie auch die nachfolgenden Analytikschritte im Rahmen der automatisierten Vorsäulenderivatisierung die kurzfristige Lagerfähigkeit (< 60 h), sodass es auch

nach Resuspendierung der lyophilisierten Standardaminosäureproben zu keiner weiteren chemischen Umwandlung bzw. zum Verlust an Fluoreszenzaktivität kam.

Die Wiederfindungsrate betrug sowohl bei den Aminosäurestandardproben als auch bei den PMN- und Plasmaproben für alle untersuchten Aminosäuren 100%.

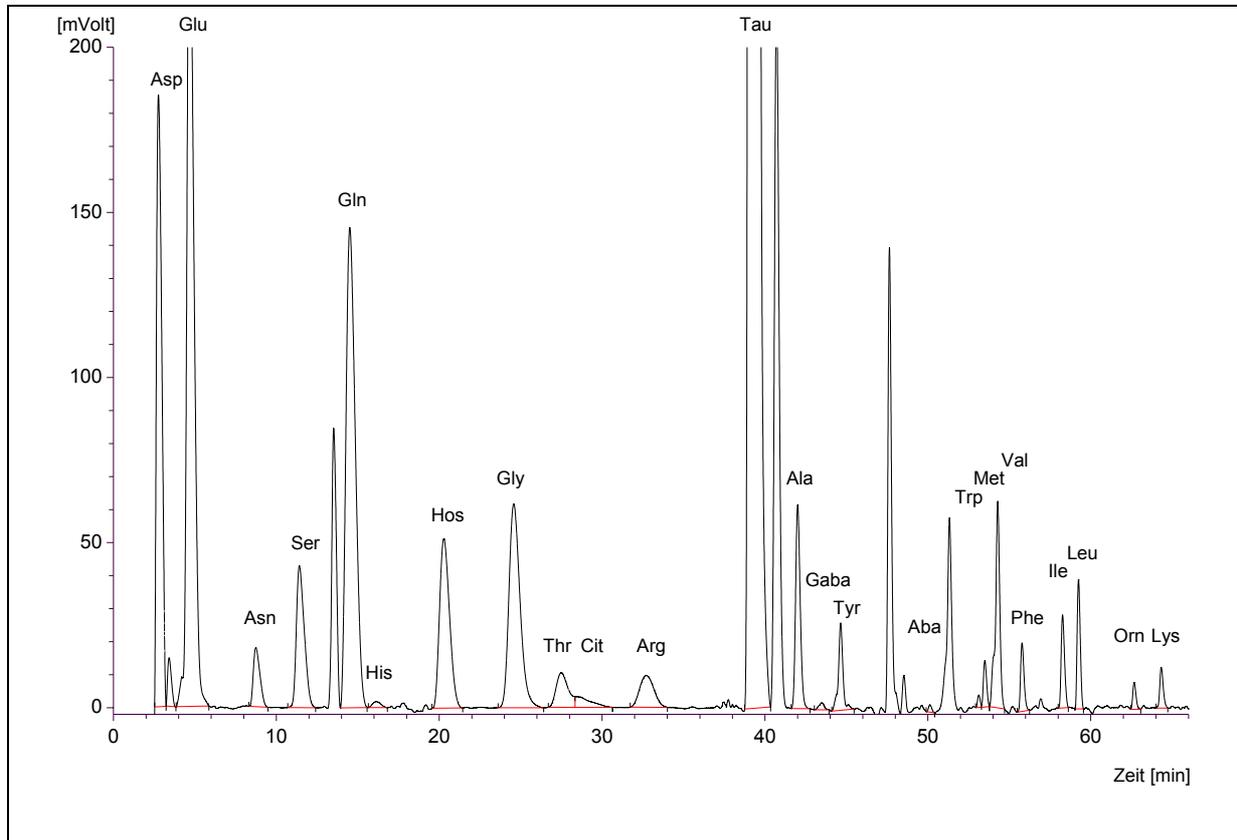


Abbildung 8: Chromatogramm einer PMN-Probe

Wie methodische Voruntersuchungen zeigten, fand sich für jede hier untersuchte Einzelaminosäure in den vorgegebenen Messbereichen darüber hinaus eine lineare Detektionsempfindlichkeit ($r^2 \geq 0.996$). Weiterhin betrug die minimale Empfindlichkeit der Methodik ≥ 75 nmol/l und lag damit weit unterhalb der physiologischerweise vorkommenden Aminosäurekonzentrationen.

3.1 Kontrollen

In jeder der durchgeführten Versuchsreihen wurden Kontrollen mitgemessen. Hierzu wurden Zellproben verwendet, bei denen anstelle eines Stimulans PBS-Puffer (zur Erzielung der Volumengleichheit zwischen Kontrollzell- und Probenzellsuspensionen)

zugesetzt wurde. Zwei wesentliche Ergebnisse lassen sich an diesen Kontrollreihen zeigen: Zum einen entsprechen die gemessenen Massen freier intrazellulärer Aminosäuren in PMN denen anderer Studien [3, 46, 58, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 126], zum anderen bleiben die freien intrazellulären Aminosäuren über den in der Zeitreihe verwendeten Zeitraum von 120 min stabil (siehe Tabelle 7 im Anhang).

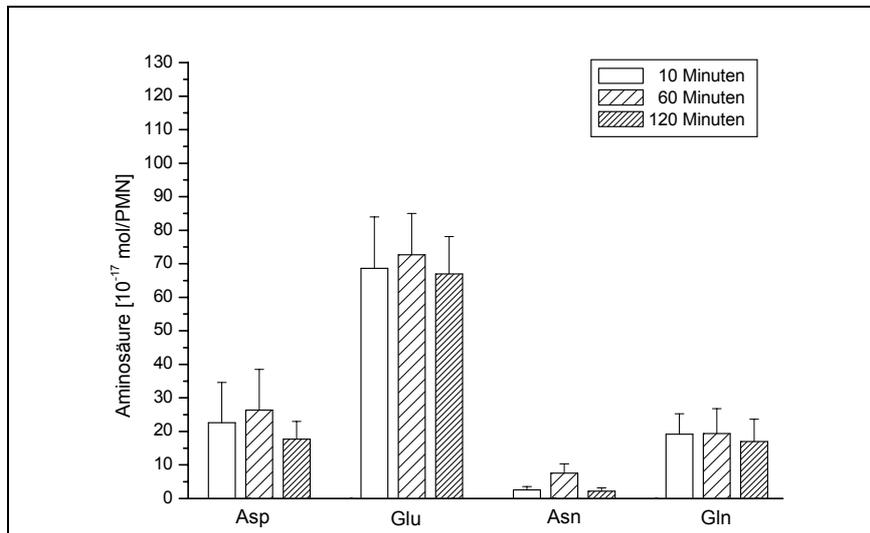


Abbildung 9: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN. Dargestellt sind die Kontrollwerte bei verschiedenen Inkubationszeiten für die sauren Aminosäuren (Asp, Glu) und für die Säureamide (Asn, Gln). Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl $n=10$.

Die Abbildungen 9 und 10 zeigen die quantitative Darstellung der schon angesprochenen Markeramino­säuren. Besonders hervorzuheben ist hier nochmals die Aminosäure Taurin, die mit ihrer 200-fach höheren Konzentration gegenüber den anderen intragranulozytären Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der stoffwechselphysiologischen Integrität von PMN spielt [58, 79, 89, 90, 96].

Auch bei den Inkubationen für die Bestimmung der Immunparameter Wasserstoffperoxid- und Superoxidanionproduktion sowie bei der Aktivität der sezernierten Myeloperoxidase zeigten sich im Zeitverlauf über 120 min keine signifikanten Veränderungen bei den Kontrollwerten (siehe Tabelle 8).

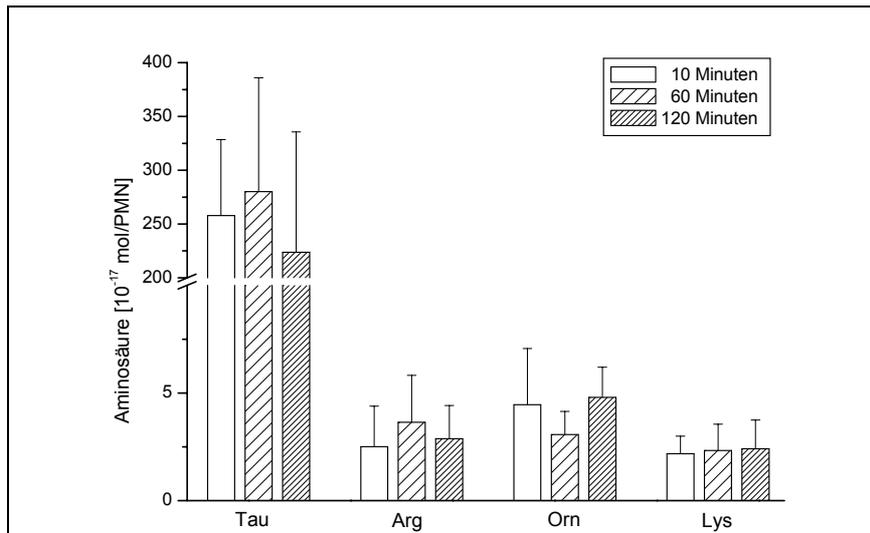


Abbildung 10: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN. Dargestellt sind die Kontrollwerte bei verschiedenen Inkubationszeiten für Taurin (Tau) und für die basischen Aminosäuren (Arg, Orn, Lys). Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl $n=10$.

3.2 Morphin

Bei der Inkubation von Vollblut mit Morphin in der therapeutischen Konzentration von $0,1 \mu\text{g/ml}$ ($= 2,7 \times 10^{-7}$ M) und mit $5 \mu\text{g/ml}$ ($= 1,3 \times 10^{-5}$ M) zeigten sich nach einer Inkubationszeit von 10 min keine signifikanten Veränderungen der gemessenen intrazellulären Aminosäuren gegenüber den Leerwerten in der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 9 und Abbildungen 11 und 12).

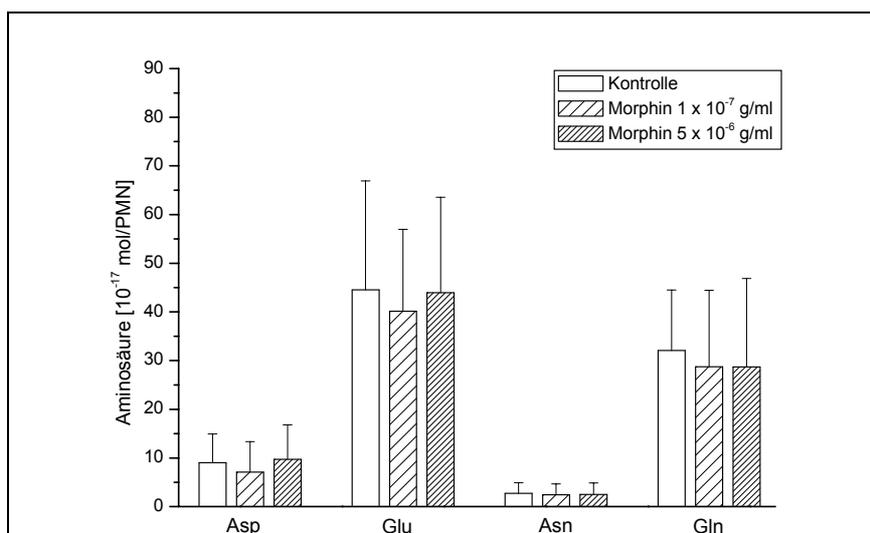


Abbildung 11: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Inkubation mit Morphin. Dargestellt sind die zwei unterschiedlichen Morphinkonzentrationen gegenüber den Kontrollwerten für saure Aminosäuren (Asp, Glu) und Säureamide (Asn, Gln). Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl $n=16$.

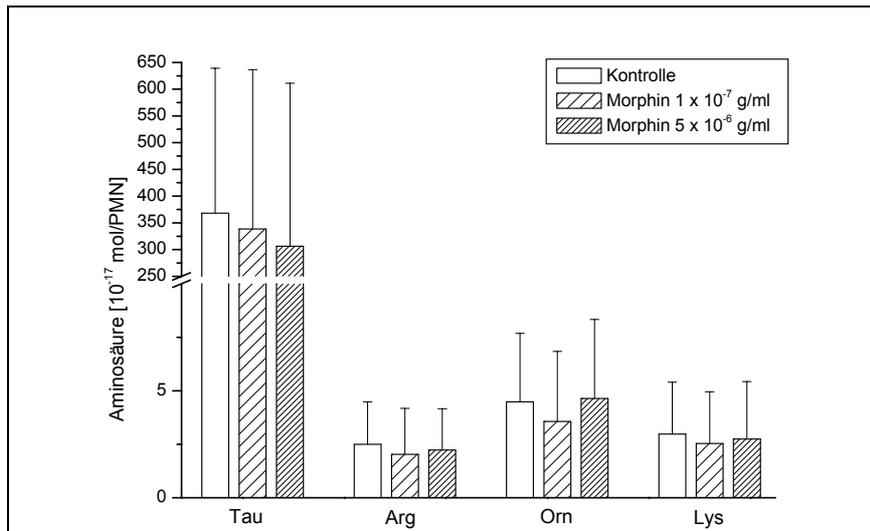


Abbildung 12: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Inkubation mit Morphin. Dargestellt sind die zwei unterschiedlichen Morphinkonzentrationen gegenüber den Kontrollwerten für Taurin (Tau) und basischen Aminosäuren (Arg, Orn, Lys). Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl n=16.

Auch im Zeitverlauf über 120 min zeigten sich weder bei den „Markeramino-säuren“ Taurin, Asparagin und Aspartat, Glutamin und Glutamat sowie Arginin noch bei allen anderen gemessenen Aminosäuren quantitative Veränderungen der intrazellulären Aminosäuremassen (siehe Tabelle 10 und Abbildungen 13 und 14).

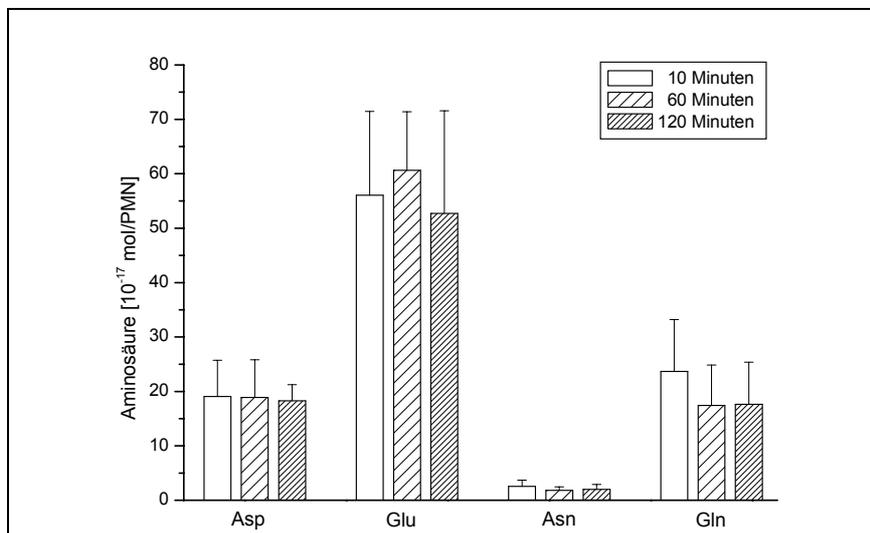


Abbildung 13: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Morphininkubation. Dargestellt sind die mit $5,0 \mu\text{g/ml}$ Morphin inkubierten Proben zu verschiedenen Inkubationszeiten für saure Aminosäuren (Asp, Glu) und Säureamide (Asn, Gln). Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl n=10.

Bei der Zeitreihe mit Morphin wurde die höhere der beiden Konzentrationen aus der Konzentrationsreihe ($5 \mu\text{g/ml}$) verwendet.

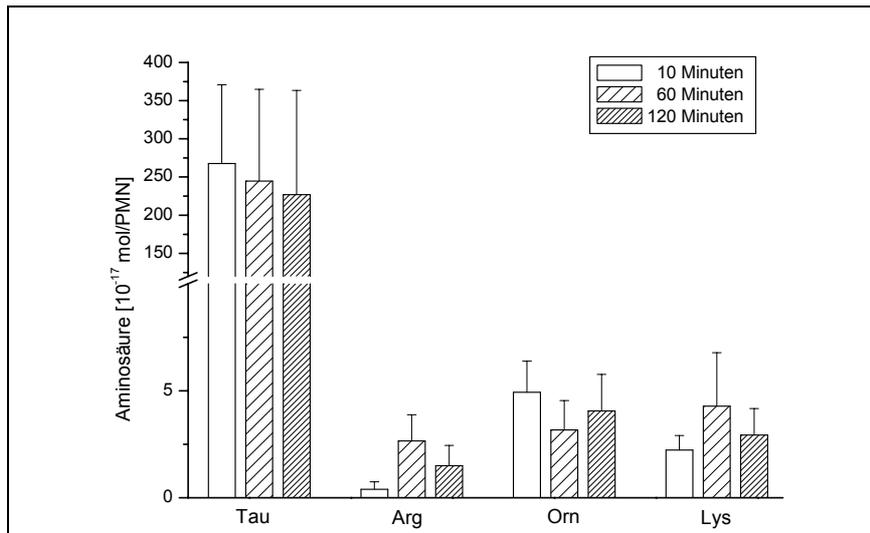


Abbildung 14: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Morphininkubation. Dargestellt sind die mit $5,0 \mu\text{g/ml}$ Morphin inkubierten Proben zu verschiedenen Inkubationszeiten für Taurin (Tau) und basische Aminosäuren (Arg, Orn, Lys). Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl $n=10$.

In der Zeitreihe bei den Immunparametern (siehe Tabelle 11 und 12) wurden einzelne signifikante Veränderungen beobachtet. So war ab einer Inkubationszeit von 60 min die gemessene Superoxidanionmenge bei Morphininkubation ($5 \mu\text{g/ml}$) signifikant erniedrigt (Signifikanzniveau $p<0,05$; siehe Abbildung 15).

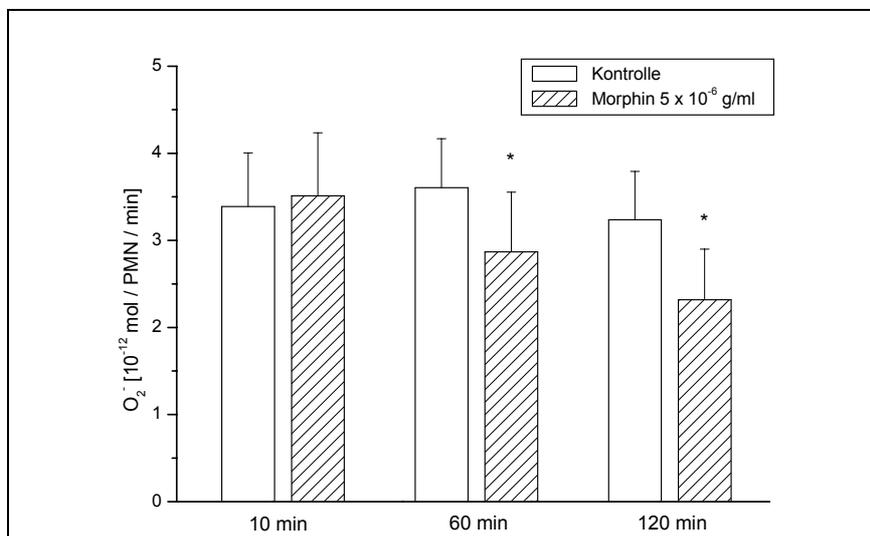


Abbildung 15: PMN-Immunparameter bei Inkubation mit Morphin. Dargestellt ist die Superoxidanionproduktion (O_2^-) für die mit $5,0 \mu\text{g/ml}$ Morphin stimulierten Proben gegenüber den unstimulierten Kontrollen zu verschiedenen Inkubationszeiten. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) in 10^{-12} mol/PMN/min bei einer Probenanzahl von $n=10$. Signifikante Veränderungen (Signifikanzniveau $p<0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Neben der Superoxidanionmenge war auch die Wasserstoffperoxidmenge in der Zeitreihe gegenüber den Kontrollen signifikant reduziert, hier allerdings erst bei einer Inkubationszeit von 120 min (siehe Tabelle 12 und Abbildung 16).

Bei allen gemessenen Immunparametern ergaben sich jedoch keine konzentrations-abhängigen Effekte (siehe Tabelle 11).

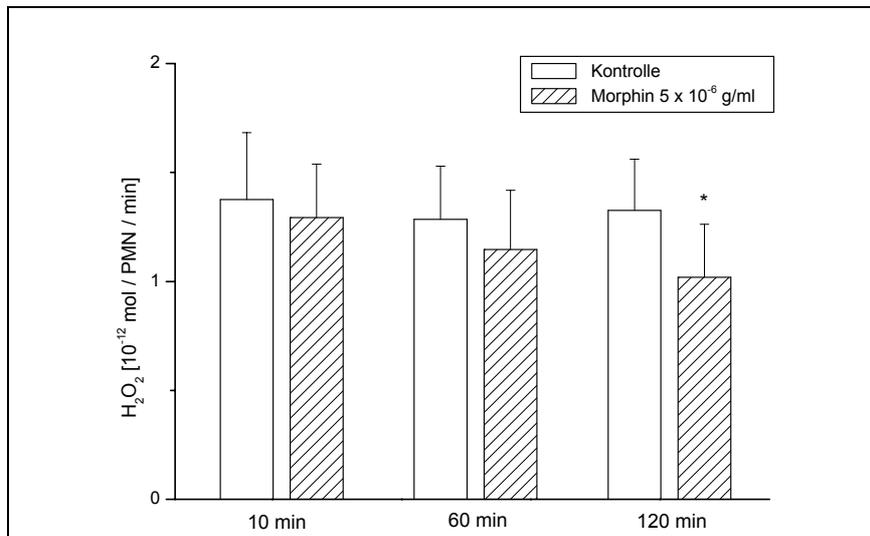


Abbildung 16: PMN-Immunparameter bei Inkubation mit Morphin. Dargestellt ist die Wasserstoffperoxidproduktion (H₂O₂) für die mit 5,0 µg/ml Morphin inkubierten Proben gegenüber den Kontrollen zu verschiedenen Inkubationszeiten. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) in 10⁻¹² mol/PMN/min bei einer Probenanzahl von n=10. Signifikante Veränderungen (Signifikanzniveau p<0,05) sind mit * gekennzeichnet.

3.3 Fentanyl

Bei der Inkubation von Vollblut mit Fentanyl in der therapeutischen Konzentration von 0,01 µg/ml (= 3,0×10⁻⁸ M) und mit 0,1 µg/ml (= 3,0×10⁻⁷ M) zeigten sich nach einer Inkubationszeit von 10 min keine signifikanten Veränderungen der gemessenen intrazellulären Aminosäuren gegenüber den Leerwerten in der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 13 und Abbildungen 17 und 18).

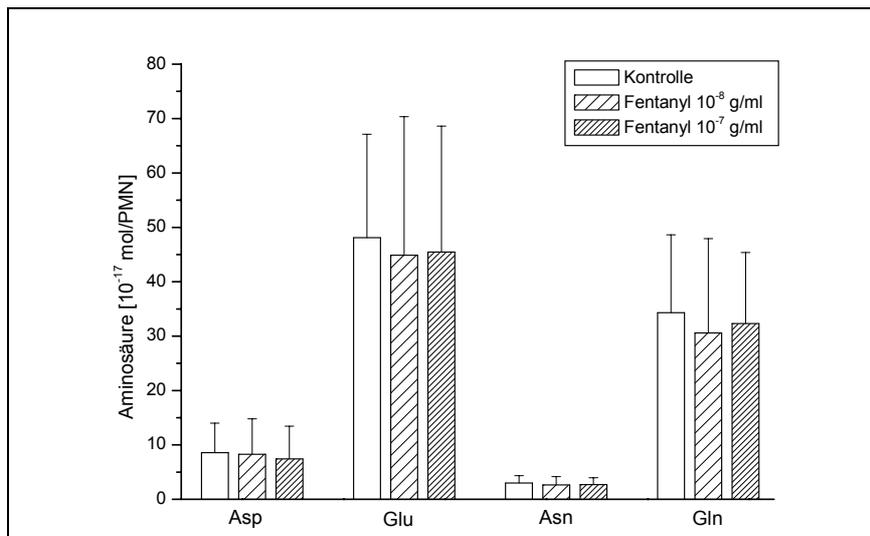


Abbildung 17: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Inkubation mit Fentanyl. Dargestellt sind die zwei unterschiedlichen Fentanylkonzentrationen gegenüber den Kontrollwerten für saure Aminosäuren (Asp, Glu) und Säureamide (Asn, Gln). Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl n=16.

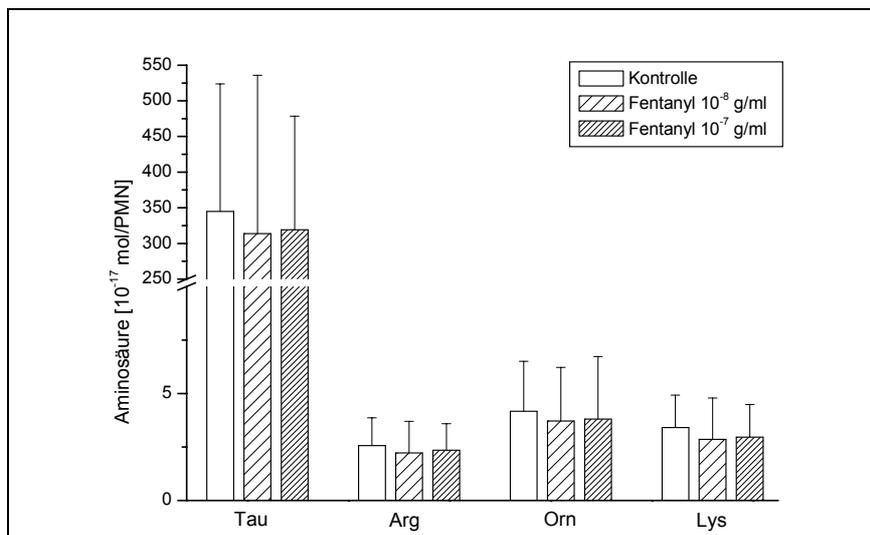


Abbildung 18: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Inkubation mit Fentanyl. Dargestellt sind die zwei unterschiedlichen Fentanylkonzentrationen gegenüber den Kontrollwerten für Taurin (Tau) und für die basischen Aminosäuren (Arg, Orn, Lys). Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl n=16.

Auch im Zeitverlauf über 120 min zeigten sich weder bei den „Markeramino-säuren“ Taurin, Asparagin und Aspartat, Glutamin und Glutamat sowie Arginin noch bei allen anderen gemessenen Aminosäuren Veränderungen der intrazellulären Aminosäuremassen (siehe Tabelle 14 und Abbildungen 19 und 20).

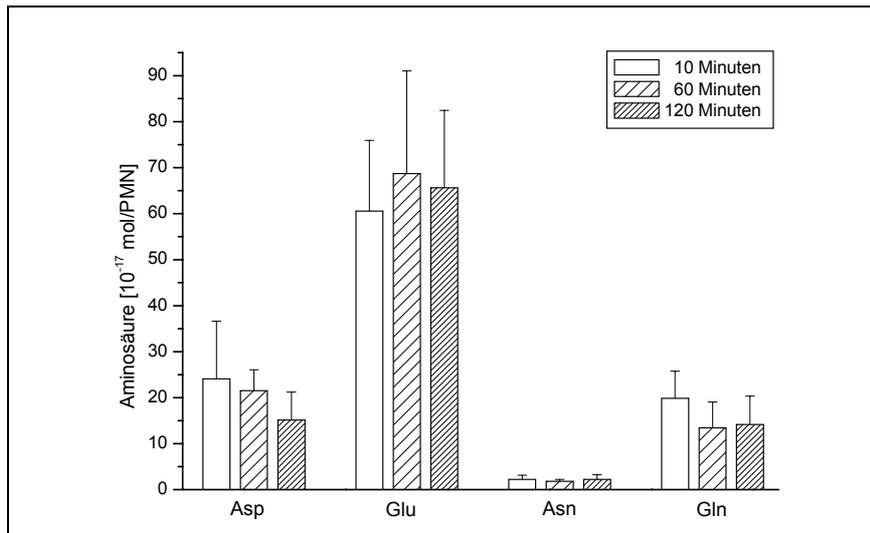


Abbildung 19: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Fentanylinkubation. Dargestellt sind die mit $0,1 \mu\text{g/ml}$ Fentanyl inkubierten Proben zu verschiedenen Inkubationszeiten für saure Aminosäuren (Asp, Glu) und Säureamide (Asn, Gln). Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl $n=10$.

Bei den gemessenen Immunparametern (Superoxidation- und Wasserstoffperoxidproduktion und Aktivität der sezernierten Myeloperoxidase) zeigten sich sowohl in der Konzentrations- als auch in der Zeitreihe gegenüber den Kontrollen keine signifikanten Veränderungen (siehe Tabellen 15 und 16).

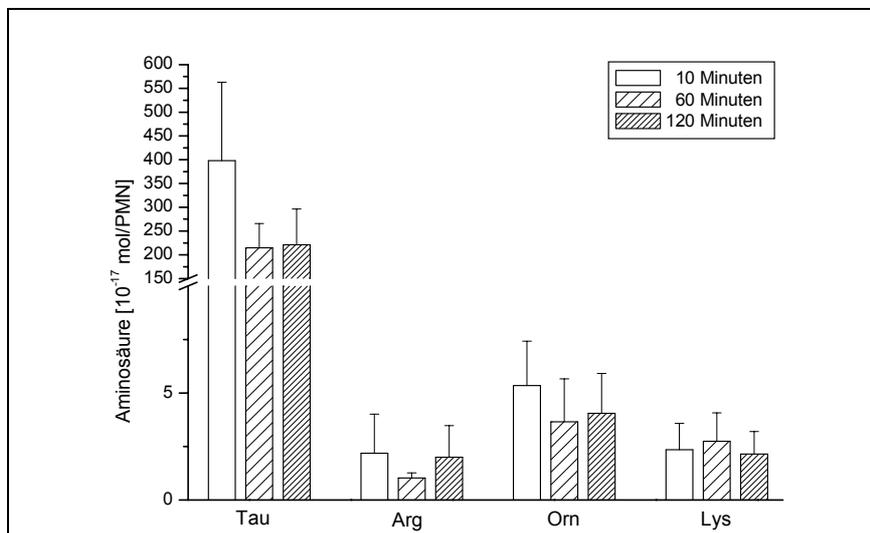


Abbildung 20: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Fentanylinkubation. Dargestellt sind die mit $0,1 \mu\text{g/ml}$ Fentanyl inkubierten Proben zu verschiedenen Inkubationszeiten für Taurin (Tau) und für die basischen Aminosäuren (Arg, Orn, Lys). Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl $n=10$.

3.4 β -Endorphin

Bei der Inkubation von Vollblut mit β -Endorphin in den Konzentrationen von 1×10^{-12} M und 1×10^{-9} M zeigten sich nach einer Inkubationszeit von 10 min keine signifikanten Veränderungen der gemessenen intrazellulären Aminosäuren gegenüber den Leerwerten in der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 17 und Abbildungen 21 und 22).

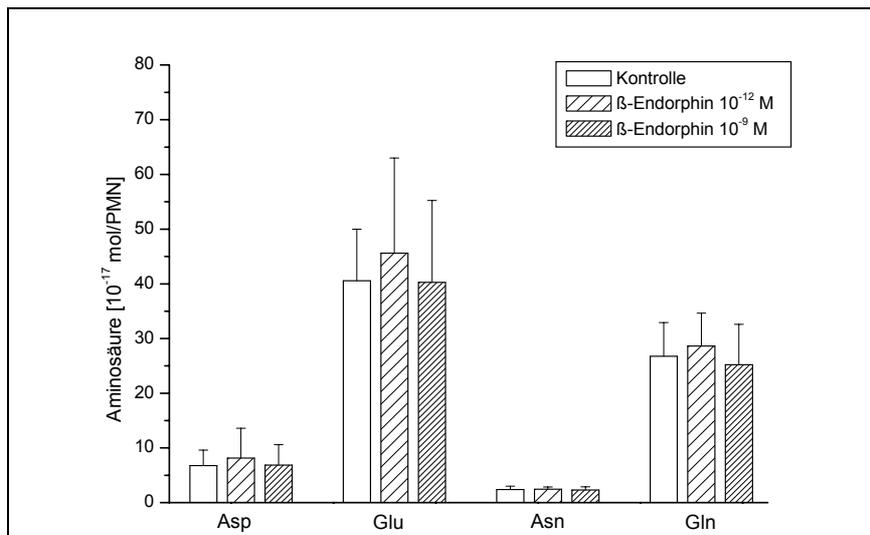


Abbildung 21: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Inkubation mit β -Endorphin. Dargestellt sind die zwei unterschiedlichen β -Endorphinkonzentrationen gegenüber den Kontrollwerten für saure Aminosäuren (Asp, Glu) und Säureamide (Asn, Gln). Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl n=16.

Auf die Durchführung einer Zeitreihe wurde bei β -Endorphin aufgrund des Vorhandenseins von Enkephalinasen und des damit verbundenen schnellen Abbaus von β -Endorphin in vivo verzichtet.

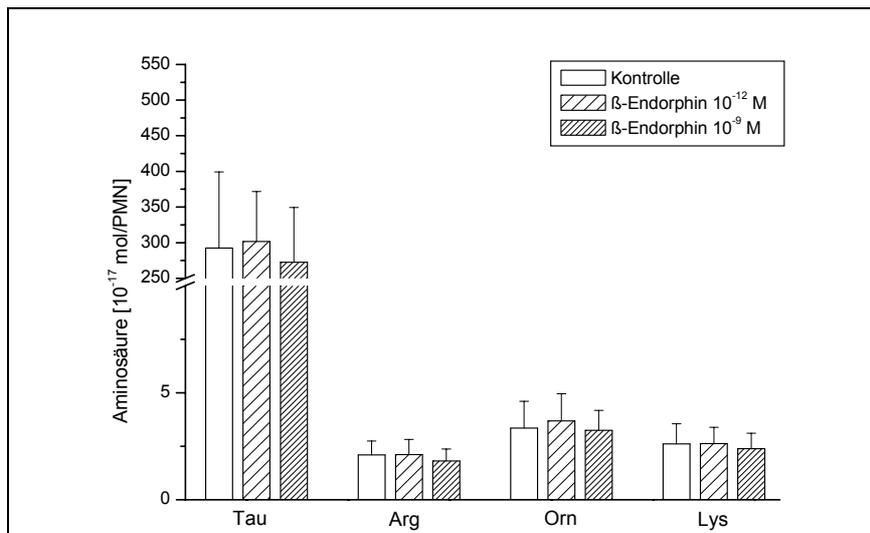


Abbildung 22: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Inkubation mit β -Endorphin. Dargestellt sind die zwei unterschiedlichen β -Endorphinkonzentrationen gegenüber den Kontrollwerten für Taurin (Tau) und für die basischen Aminosäuren (Arg, Orn, Lys). Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl $n=16$.

Bei den Immunparametern Superoxidanion- und Wasserstoffperoxidbildung zeigte sich bei der Inkubation mit β -Endorphin die Tendenz einer Reduktion dieser Sauerstoffmetabolite. Diese Ergebnisse liegen jedoch außerhalb des Signifikanzbereichs mit $p < 0,05$ (siehe Tabelle 18 und Abbildung 23).

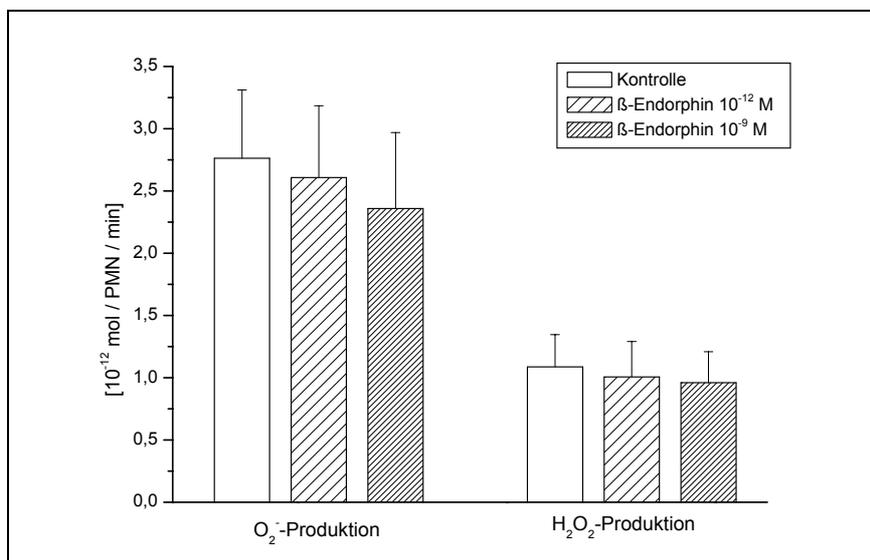


Abbildung 23: PMN-Immunparameter bei Inkubation mit β -Endorphin. Dargestellt ist die Superoxidanion- (O_2^-) und die Wasserstoffperoxidproduktion (H_2O_2) für die mit verschiedenen β -Endorphinkonzentrationen inkubierten Proben gegenüber den Kontrollen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) in 10^{-12} mol/PMN/min bei einer Probenanzahl von $n=16$.

3.5 Naloxon

Bei der Inkubation von Vollblut mit Naloxon in den Konzentrationen 1×10^{-6} M und mit 1×10^{-4} M zeigten sich nach einer Inkubationszeit von 10 min keine signifikanten Veränderungen der gemessenen intrazellulären Aminosäuren gegenüber den Leerwerten in der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 19 und Abbildungen 24 und 25).

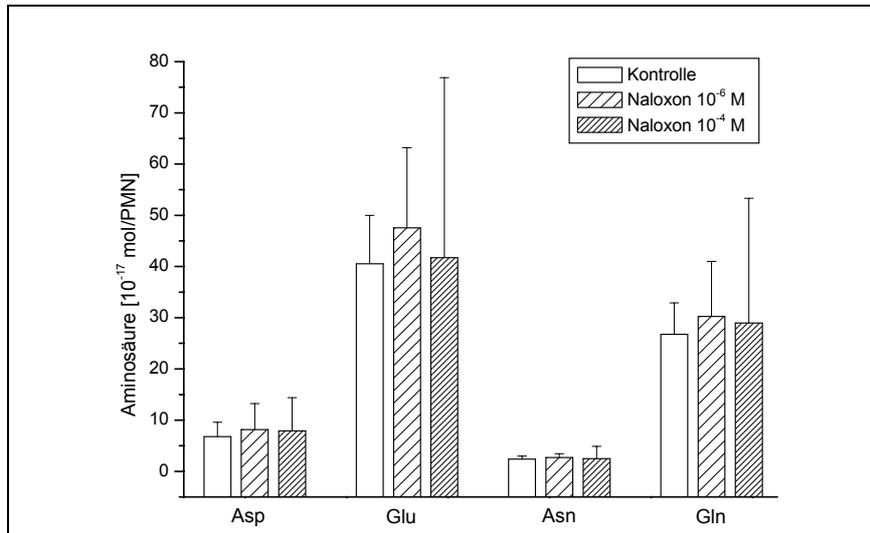


Abbildung 24: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Inkubation mit Naloxon. Dargestellt sind die zwei unterschiedlichen Naloxonkonzentrationen gegenüber den Kontrollwerten für saure Aminosäuren (Asp, Glu) und Säureamide (Asn, Gln). Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl n=16.

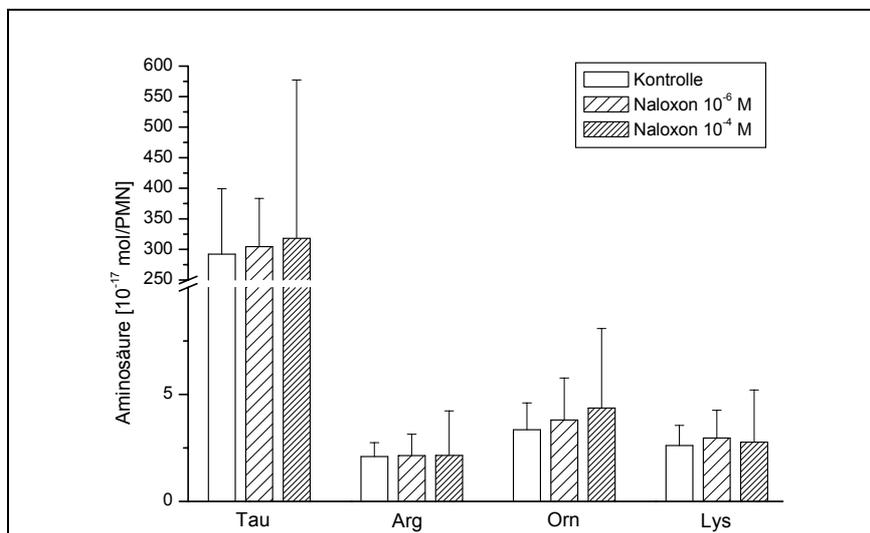


Abbildung 25: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Inkubation mit Naloxon. Dargestellt sind die zwei unterschiedlichen Naloxonkonzentrationen gegenüber den Kontrollwerten für Taurin (Tau) und für die basischen Aminosäuren (Arg, Orn, Lys). Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl n=16.

Auch im Zeitverlauf über 120 min zeigten sich weder bei den „Markeramino­säuren“ Taurin, Asparagin und Aspartat, Glutamin und Glutamat sowie Arginin noch bei allen

anderen gemessenen Aminosäuren Veränderungen der intrazellulären Aminosäuremassen (siehe Tabelle 20 und Abbildungen 26 und 27).

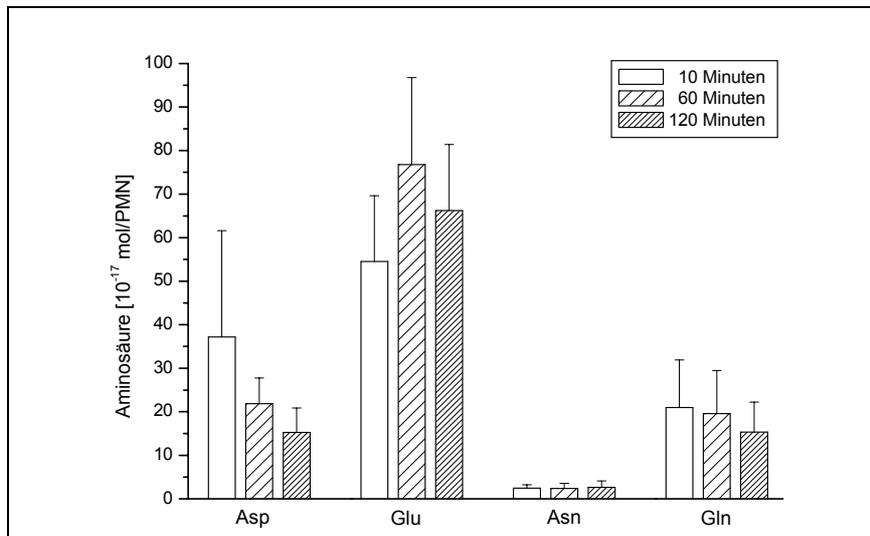


Abbildung 26: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Naloxoninkubation. Dargestellt sind die mit $100 \mu\text{M}$ Naloxon inkubierten Proben zu verschiedenen Inkubationszeiten für saure Aminosäuren (Asp, Glu) und Säureamide (Asn, Gln). Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl $n=10$.

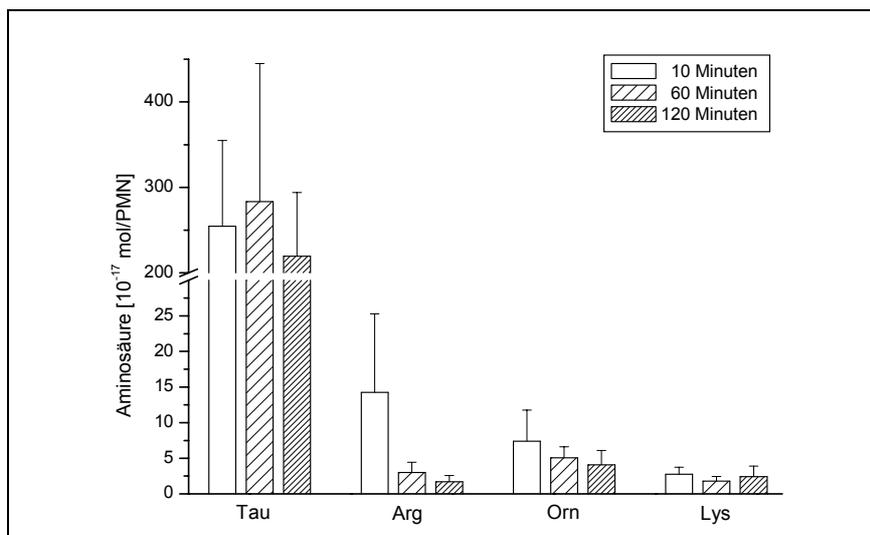


Abbildung 27: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Naloxoninkubation. Dargestellt sind die mit $100 \mu\text{M}$ Naloxon inkubierten Proben zu verschiedenen Inkubationszeiten für Taurin (Tau) und für die basischen Aminosäuren (Arg, Orn, Lys). Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl $n=10$.

Bei den gemessenen Immunparametern (Superoxidation- und Wasserstoffperoxidproduktion und der Aktivität der sezernierten Myeloperoxidase) zeigten sich sowohl in der Konzentrations- als auch in der Zeitreihe gegenüber den Kontrollen keine signifikanten Veränderungen (siehe Tabellen 21 und 22).

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 PMN-Isolation

Für die hier verwendete hochsensitive Aminosäureanalytik ist die Zellaufbereitung von entscheidender Bedeutung. Zum einen ist es entscheidend, möglichst hochreine Zellproben zu gewinnen, in denen möglichst wenig Fehlerzellen enthalten sind. Zum anderen ist es von essentieller Wichtigkeit, die Zellen so stoffwechselneutral wie möglich aus dem Vollblut zu isolieren. Für diese Arbeit wurde eine modifizierte Percoll-Methode verwendet. Da in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass sucrosehaltige Dichtegradienten (z.B. Ficoll) adverse Effekte, wie zum Beispiel spontane Formänderungen von PMN, eine erhöhte PMN-Zelladhäsion an Glasoberflächen, eine verminderte Chemotaxis, aber auch eine vermehrte Expression von Komplementrezeptoren im Sinne einer PMN-Aktivierung induzieren können, wurde zur PMN-Separation mit Percoll ein sucrosefreier Gradient gewählt [51, 120, 156], denn bei Anwendung eines Percoll-Gradienten wurden diese Effekte bislang nicht beobachtet [9, 32]. Percoll gilt heute allgemein als die schonendste Methode zur PMN-Isolation [32, 34, 54, 81, 120]. Da aber auch fortgesetzte mechanische Manipulationen sowie wechselnde Temperaturen eine PMN-Aktivierung oder auch eine Modulation der PMN-Funktion induzieren können, wurde die Percoll-Methode weiterentwickelt und bringt jetzt einige entscheidene Vorteile mit sich. So wurde in dieser Arbeit großer Wert auf eine niedrige Arbeitstemperatur gelegt. Nach dem Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen bereits während der ersten Gradientenzentrifugation auf 4°C heruntergekühlt, um ihre Stoffwechselaktivität möglichst weit einzuschränken. Sofort im Anschluss an die Isolation wurden die Zellen bis zur Lyophilisierung bei -80°C eingefroren. Ein weiterer entscheidender Faktor ist die Zeit. Nach Ende der Inkubationszeit war es im Durchschnitt schon nach 34 Minuten möglich, die isolierten Zellen tiefzugefrieren.

Die hier verwendete lichtmikroskopische Handauszählung der PMN stellt ein weiteres Instrument zur Qualitätssteigerung dar. So war es möglich, die Reinheit der Zellproben und die morphologische Integrität der Zellen kontinuierlich während der Studie für jede einzelne Probe zu überwachen. Trotz der weiterentwickelten Percoll-Methode ließ sich eine Aktivierung der Granulozyten bei der Zellseparation, erkenn-

bar an einer mikro- und makroskopisch sichtbaren PMN-Aggregation, nicht immer vermeiden und führte zum Ausschluss solcher Proben aus dem weiteren Analyseverfahren. Zudem ist die Methode der Handauszählung sehr genau. Bei wiederholten Vergleichszählungen lag der Zählfehler bei <2%.

4.1.2 PMN-Lyse und Probenkonservierung

Eine besondere Problematik der HPLC-Analytik muss in den früher verwendeten PMN-Lyse-Techniken gesehen werden. Die bisher beschriebenen Methoden sind teilweise ausgesprochen kompliziert, zeitaufwendig und gewährleisteten nicht die notwendige Stoffwechselneutralität, da die Zellen hier aufwendigen und sehr langwierigen Gefrier- und Auftauprozessen unterzogen bzw. die Proben teilweise bis auf 100°C erwärmt oder sehr aggressive chemische Lyseverfahren verwendet wurden [2, 16, 17, 46, 79]. Weder temperaturabhängige noch chemische Lyseverfahren garantieren jedoch die zu fordernde Stabilität vor stoffwechselaktiver bzw. auch chemischer Umwandlung. Ziel war daher die PMN-Lyse der gefrorenen Probe, um weitere Aminosäureveränderungen während der Probenvorbereitung nahezu auszuschließen. Dies wurde durch die sich an die PMN-Separation anschließende Tiefgefrier-trocknung (Lyophilisierung) erreicht. Sie ermöglicht eine rasche und vollständige Lyse der PMN ohne weitere Zusätze oder gar Wiedererwärmung der Probe mit der Gefahr einer erneuten Zellaktivierung. Wie die methodischen Voruntersuchungen zeigten, führt die Lyophilisierung verglichen mit einem herkömmlichen PMN-Lysepuffer bei den Aminosäuren zu analogen Ergebnissen und dies ohne Gefahr einer nicht kontrollierbaren chemischen Umwandlung oder auch Bindung [100].

Ein weiterer wesentlicher Punkt, auf den bei einer hochsensitiven Aminosäure-Analytik Wert gelegt werden muss, ist die stabile Lagerung der Zellen, um eine Verfälschung der Messergebnisse zu verhindern. Neben einer unverzüglichen Aufarbeitung der PMN-Proben ist, wegen der raschen Hydrolyse wichtiger Aminosäuren, insbesondere der Säureamide Glutamin und Asparagin, aber auch der Gefahr einer bakteriellen Kontamination, eine sichere Lagerung aller Proben und Standards unerlässlich. Nach den Ergebnissen von Fuchs et al. gewährleistet die in dieser Studie vorgenommene Lyophilisierung der Proben auch nach mehrmonatiger Lagerung (bei -80°C bis zu sechs Monate), verglichen mit frischen biologischen Proben, exakte Konzentrationsbestimmungen [45]. Darüber hinaus bietet die Lyophilisierung eine außerordentlich effektive Extraktion der Aminosäuren aus ihrer Probenmatrix [100]

und das für die HPLC verwendete Methanol/Wasser-Gemisch gewährleistet die während der Chromatographie erforderliche Stabilität der Proben bis zu 80 Stunden [45, 100].

4.1.3 HPLC-Analytik

Für eine geeignete Analyse des intrazellulären Aminosäurestoffwechsels muss gefordert werden, dass der gemessene intrazelluläre Aminosäuregehalt auf das Einzelzellniveau bezogen wird. Andere Bezugsgrundlagen, beispielsweise auf das Intrazellulärwasser, verbieten sich aus heutiger Sicht, da hier zu viele, bei Probanden und Patienten nicht standardisierbare Faktoren, wie zum Beispiel Osmolalität oder Serumnatriumgehalt, unberechenbare Einflüsse ausüben [60, 100].

Im Rahmen der HPLC-Analyse wurde nach den Ergebnissen von Fuchs et al. OPA als Fluorphor-Derivatisierungsreagenz verwendet. Die Bildung der Isoindol-Derivate (pH 9,5-10 in 0,5 M Borat) erfolgt bei Raumtemperatur innerhalb kürzester Zeit vollständig und reproduzierbar. Hauptvorteil der OPA-Vorsäulen-Derivatisierung freier Aminosäuren ist neben den geringen Kosten die günstige Größenrelation zwischen Fluorphorteil und Aminosäurerest, wodurch höchste Selektivität und Sensitivität gewährleistet wird [45].

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die hier verwendete HPLC-Methodik eine quantitative, hochexakte und reproduzierbare Aminosäureanalytik freier Aminosäuren in PMN auf Einzelzellniveau gestattet. Sowohl hinsichtlich der erforderlichen Probenmenge, der schonenden PMN-Separation, der Probenvorbereitung und -haltbarkeit als auch hinsichtlich der gewählten HPLC-Analytik, sind die beschriebenen Verfahren anderen veröffentlichten Methodiken deutlich überlegen. Die beschriebenen Verfahren genügen somit vollkommen den hohen Anforderungen einer ultrasensitiven intrazellulären Aminosäureanalytik.

4.1.4 Immunfunktionsbestimmungen

In der vorliegenden Arbeit wurden zu allen vorgegebenen und beschriebenen Untersuchungsbedingungen, parallel zu den Quantifizierungen der freien intrazellulären Aminosäurepools, auch essentielle granulozytäre Immunfunktionsparameter untersucht. Um eine direkte Vergleichbarkeit mit Befunden früherer sowie aktueller Forschungstätigkeit gewährleisten zu können, wurden als Grundlage der Unter-

suchungen etablierte und gängige Analytikverfahren verwendet. Die hier verwendeten Methoden zur Bestimmung der granulozytären Superoxidanion- und Wasserstoffperoxidbildung sowie die Quantifizierung der von PMN freigesetzten Myeloperoxidaseaktivität vitaler PMN waren Weiterentwicklungen der von Weening et al. [153], Stangel et al. [138], Pick und Keisari [116], Schmitt et al. [128] sowie Krumholz und Mitarbeitern [65, 66, 67, 68] entwickelten und beschriebenen Analytikverfahren.

Die Bestimmung der Superoxidanionbildung beruhte hierbei grundsätzlich auf der Reduktion von im Versuchsansatz befindlichem Cytochrom C durch das generierte Superoxidanion selbst. Die von einer definierten PMN-Konzentration extrazellulär freigesetzte Superoxidaniongesamtmenge kann, wie die Ergebnisse anderer Untersucher und die eigenen Befunde zeigen, unter Berücksichtigung eines optimalen Verhältnisses zwischen in der Probe befindlichem Cytochrom C und der eingesetzten PMN-Anzahl ($0,8 \times 10^6$ PMN/ ml) hierbei reproduzierbar quantifiziert werden [1, 21, 22, 23, 27, 50, 62, 109, 112, 113, 119, 125]. Direkte Methodenvergleiche sowie theoretische Effizienzberechnungen zeigten überdies, dass der photometrische Nachweis mittels Cytochrom C, verglichen mit alternativen Analytikverfahren (z. B. Nitroblau-Tetrazolium-Reduktion, Epinephrin-Oxidation, Lucigenin- bzw. Luminol-Chemilumineszenz, Guaiacol-Oxidation, Serum-PMN-Elastasebestimmung), eine zuverlässige quantitative Aussage über die Superoxidaniongenerierung durch PMN gestattet [14, 78, 125, 149].

Die Bestimmung des von PMN extrazellulär freigesetzten Wasserstoffperoxids mittels Phenolrot bietet ebenfalls, verglichen mit alternativen Messmethodiken, ein etabliertes Messverfahren zur reproduzierbaren Registrierung dieses granulozytären Immunparameters. Sie beruht auf der durch Meerrettich-Peroxidase vermittelten Oxidation von Phenolrot durch Wasserstoffperoxid. Mit diesem Untersuchungsverfahren ist, wie die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bzw. die Ergebnisse der eigenen Arbeiten zeigen, eine genaue und reproduzierbare photometrische Beurteilung des von einer definierten PMN-Gesamtmenge extrazellulär generierten Wasserstoffperoxids möglich [20, 63, 88, 111, 118, 123].

Hinsichtlich der Bestimmung der extrazellulären Aktivität von PMN exozytierter Myeloperoxidase gewährleiten die von Schmitt et al. [128] sowie Krumholz und Mitarbeitern [66, 67] entwickelten Methoden, verglichen mit alternativen Analytikverfahren zur Quantifizierung der extrazellulären Myeloperoxidaseaktivität, befriedigende analyti-

sche Ergebnisse. Nach Stimulation einer definierten Granulozytenzahl kann hierbei, wie die Ergebnisse früherer Untersuchungen und auch die eigenen Resultate zeigen, die extrazellulär sezernierte Myeloperoxidaseaktivität anhand der katalytischen Oxidation eines Chromogens (ABTS) reproduzierbar photometrisch bei 405 nm quantifiziert werden [7, 15, 53, 80, 110, 117, 124, 137, 147, 148, 152].

Um eine möglichst große Vergleichbarkeit der Immunfunktionsbefunde mit den Ergebnissen der intragranulozytären Aminosäurebestimmungen zu ermöglichen, wurden die von den oben beschriebenen Arbeitsgruppen vorgenommenen Inkubationsverfahren allerdings modifiziert, um die Inkubation vor dem Hintergrund der hier gewählten variablen Inkubationszeiten nicht an isolierten PMN vornehmen zu müssen. Aus diesem Grund wurden daher alle Inkubationsansätze, die der Quantifizierung der genannten Immunfunktionsparameter dienen, analog zu den Aminosäureuntersuchungen, ebenfalls im Vollblut durchgeführt. Hierdurch war es möglich, alle nachfolgenden PMN-Separations- sowie PMN-Stimulationsverfahren auf ein für die Analytik notwendiges zeitliches Minimum zu reduzieren.

Durch Untersuchungen an isolierten Zellpopulationen aber auch im Vollblut-Assay ist eine vollständige und abschließende Bewertung der besonderen immunologischen Gegebenheiten und der vielfältigen Wechselwirkungen von Stimulantien und PMN nicht möglich, da die immunologische Antwort von PMN immer auch von den Interaktionen mit Endothelzellen sowie zellulären und immunologischen Prozessen, beispielsweise in einem Entzündungsgebiet, beeinflusst wird. Aufgrund dieses modellhaften Charakters muss die Aussagekraft der hier untersuchten granulozytären Immunfunktionen durch das Fehlen einer endothelialen Oberfläche, neurohumoraler Regelkreise und einer „pathophysiologisch alle relevanten Faktoren enthaltenden Entzündungsregion“, als begrenzt angesehen werden [149].

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Morphin

In der hier vorliegenden Studie ist der Gehalt freier intrazellulärer Aminosäuren in PMN durch Morphin nicht verändert worden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die intrazelluläre Homöostase der Zellen unangetastet geblieben ist. Ein ausgeklügeltes System von Aminosäureneusynthese, -aufnahme aus dem Extrazellulärraum und

-abbau konnte hierbei das intrazelluläre Aminosäuregleichgewicht aufrechterhalten und zudem als Grundlage für Stoffwechselwege, wie beispielsweise dem Zitrat- oder Harnstoffzyklus und der Proteinbiosynthese der Zelle dienen. Auch die hier gefundenen Veränderungen bei den gemessenen Immunparametern, bei denen sich ein Abfall des gemessenen Wasserstoffperoxid- und Superoxidaniongehalts vor allem in supraklinischen Konzentrationen und bei längerer Inkubationszeit zeigte, passen gut in das Bild der Ergebnisse anderer Studien [19, 42, 83, 156, 157].

Die genauen Mechanismen der granulozytären Immunreaktion sind Gegenstand weltweiter aktiver Forschungstätigkeit und sind auch bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist, dass eine bakterielle Invasion durch Opsonierung von Komplementfaktoren und Immunglobulinen an der Oberfläche der Zielbakterien zu einer ausgeprägten Steigerung der granulozytären Stoffwechselaktivität mit dem Ziel einer raschen Phagozytose und Aufnahme der Bakterien in intrazelluläre Phagosomen sowie zu einer vermehrten Produktion zytotoxischer Sauerstoffmetabolite im Rahmen des sogenannten „oxidative burst“ führt. Hierbei wird die membranständige NADPH-Oxidase aktiviert, die in der Zellmembran und in der Membran der Phagosomen enthalten ist. Als Folge kann der „oxidative burst“ sowohl intraphagosomal als auch extrazellulär ablaufen. Unter der Katalyse durch die NADPH-Oxidase (siehe Abbildung 28) entsteht aus Sauerstoff (O_2) das toxische und hochreaktive Superoxidanion (O_2^-), welches über die Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und dann über die Myeloperoxidase (MPO) weiter zu dem hochtoxischen Hydroxidion (OH^-) umgewandelt wird [33]. Wird parallel dazu durch die PMN auch noch Stickstoffmonoxid (NO) gebildet, kommt es zu einer Verlagerung des Reaktionsgleichgewichts und es entsteht mehr Peroxinitrit ($ONOO^-$), da diese Reaktion ungefähr 3,5 mal schneller abläuft als der Reaktionsweg über die Superoxiddismutase hin zu Wasserstoffperoxid [146].

An dieser Stelle muss kritisch angemerkt werden, dass in keiner der vorliegenden Studien zum Thema „Opioide und oxidative burst“ wirklich alle Parameter des „oxidative burst“ sowohl intra- als auch extrazellulär untersucht worden sind. So könnte ein vermeintlicher Anstieg oder Abfall von einem der entstehenden Sauerstoffmetabolite durchaus gar nicht aus einem Anstieg oder Abfall der Produktion durch PMN herrühren, sondern lediglich durch eine Verschiebung (z. B. über Enzyminduktion) inner-

halb der komplizierten Reaktionsgleichgewichte zustande gekommen sein. Dies ist eine Erklärung dafür, warum die Ergebnisse in der Literatur so unterschiedlich sind.

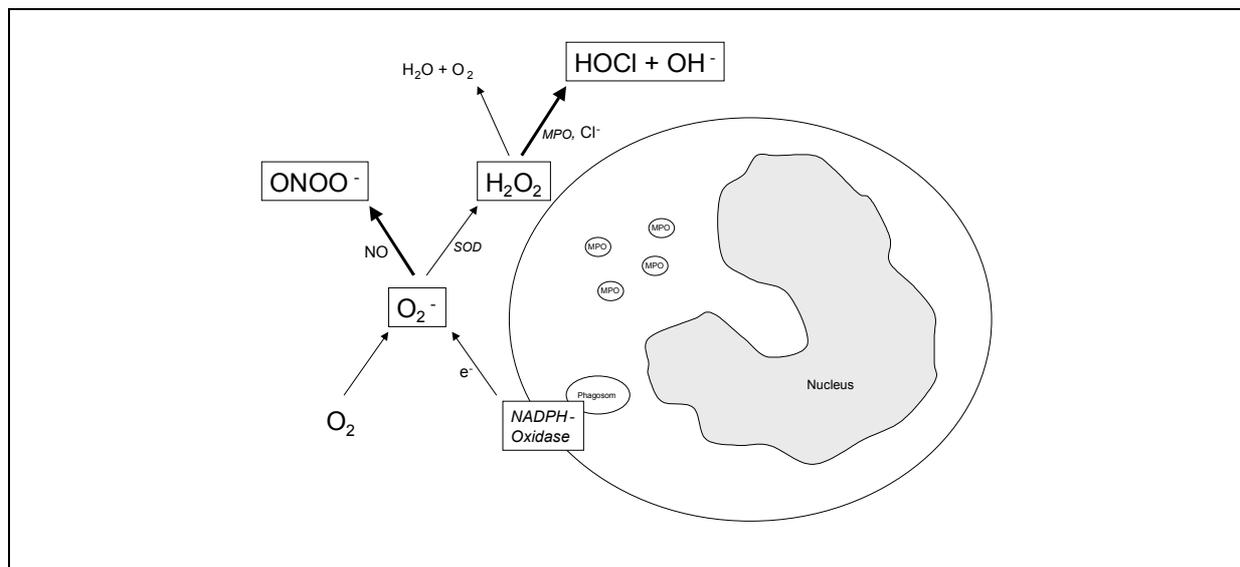


Abbildung 28: Vereinfachte Darstellung des „oxidative burst“ bei PMN (Erläuterungen siehe Text)

Jüngere Untersuchungen tragen zum Verständnis des intrazellulären Wirkmechanismus von Morphin in PMN bei. Richtungsweisend hierfür sind die Arbeiten von Makman et al. [85] und Welters et al. [155, 156, 157] sowie die Arbeit von Fimiani et al. [40]. Bis 1995 waren für PMN nur die beiden Opioidpeptid-sensitiven δ_1 - und δ_2 -Rezeptoren bekannt. Neu war der Opioidalkaloid-sensitive, aber Opioidpeptid-insensitive μ_3 -Rezeptor [85], über den die Morphin-Effekte vermittelt werden. Dies konnte in einer Studie mit „knock-out-Mäusen“ gezeigt werden. Gesunde Mäuse zeigen bei chronischer Morphingabe eine Atrophie der lymphoiden Organe, eine verminderte CD4/CD8 T-Zell-Ratio sowie eine reduzierte NK-Zell-Aktivität. Die „knock-out-Mäuse“, denen der μ -Rezeptor fehlte, zeigten unter chronischer Morphingabe keine Veränderungen im Immunsystem, sodass für die Wirkung von Morphin auf das Immunsystem für den μ -Rezeptor eine entscheidende Rolle angenommen werden muss [47]. Der Grund für das selektive Bindungsverhalten scheint in der molekularen Struktur des μ_3 -Rezeptors zu liegen, bei der es sich vermutlich um eine Splice-Variante des μ_1 -Rezeptors handelt [157]. Bis zum heutigen Tag ist der μ_3 -Rezeptor molekularbiologisch noch nicht vollständig erforscht. Dieser G-Protein gekoppelte Rezeptor führt bei Rezeptoraktivierung durch Morphin zu einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration. Die erhöhten Calciumspiegel wiederum führen über die calciumabhängige NO-Synthase (cNOS) zu einer vermehrten NO-Bildung. Für die-

ses vermehrt auftretende NO konnte gezeigt werden, dass es unter anderem zu einer Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch Morphin beiträgt. NF- κ B spielt eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung proinflammatorischer Mediatoren, wie beispielsweise TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6 und IL-8. Auf diese Weise führt Morphin in PMN zu einer Hemmung der Aktivierung proinflammatorischer Mediatoren, was dann zu einer herabgesetzten Immunantwort der PMN auf einen exogenen Stimulus führt. Dies ist ein Erklärungsmodell für die beobachtete Hemmung bei der Wasserstoffperoxidbildung und der Superoxidanionproduktion.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass es zu einer erhöhten Umwandlung von NO und Superoxidanion zu dem hochreaktiven Peroxynitrit kommt (siehe oben). Dies könnte den gemessenen Abfall von Superoxidanion und Wasserstoffperoxid erklären, wäre dann allerdings nicht Ausdruck einer Hemmung der Immunfunktion, sondern eher Ausdruck einer vermehrten Aktivierung. Tatsache ist jedoch, dass die gemessenen immunologischen Veränderungen sowohl in der eigenen Studie, als auch bei allen anderen Autoren zumindest in klinischen Konzentrationsbereichen nur sehr gering waren, so beispielsweise in den Arbeiten von Welters und Mitarbeitern [156, 157]. Auf der Ebene der Rezeptoraktivierung konnte die Arbeitsgruppe von Welters in diesen Arbeiten außerdem zeigen, dass nicht die rasche Expression von Rezeptoren aus einem präexistenten Pool beeinträchtigt wird, sondern bei längeren Inkubationszeiten deren intrazelluläre Neusynthese. Hier müssen für die Zukunft weiterführende Studien gefordert werden, welche die Langzeitwirkung von Opioiden auf PMN und auf deren intrazellulären Aminosäurepool untersuchen.

Interessant ist jedoch zu diskutieren, warum für die hemmenden Effekte keine Auswirkungen im freien intrazellulären Aminosäurenstoffwechsel gesehen werden konnten. Vorstudien mit anderen in der Anästhesie eingesetzten Pharmaka zeigten deutliche Veränderungen bei den freien intrazellulären Aminosäuren, so zum Beispiel bei Etomidate [104] und Propofol [99], bei Barbituraten [101, 102] und Benzodiazepinen [103, 154]. Zu der Fragestellung der Veränderung freier intrazellulärer Aminosäuren in PMN bei Stimulation mit Morphin gibt es zur Zeit weltweit keine veröffentlichten Daten. Für einzelne Aminosäuren sind einige wenige Interaktionen mit Morphin beschrieben, allerdings nicht in PMN.

In Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigte sich die Aminosäure Taurin als sehr empfindliche „Markeraminosäure“ für PMN, welche vor allem bei Blockade von Ionenkanälen der Zelle, die zu einer Veränderung der Osmolalität führte, in ihrer Konzentration stark abgefallen ist [99, 101, 102, 103, 104, 154]. Auch andere Autoren konnten vielfältig die Bedeutung von Taurin, die mit immerhin 60% anteilmäßig die in PMN am meisten vertretene Aminosäure darstellt, in ihren Studien zeigen [121, 139, 140]. Doch nicht nur der intrazelluläre Tauringehalt, sondern auch bei extrazellulärer Zuführung spielt Taurin für PMN eine wichtige Rolle. So kann Taurin die Funktion von PMN in vivo und in vitro beeinflussen [130], beispielsweise steigt die Phagozytoseleistung von PMN bei Ratten unter Taurinzuführung an [91] und in einer anderen Studie konnte eine Aktivitätssteigerung der MPO nachgewiesen werden [105]. Eine andere Arbeitsgruppe stellte für Taurin einen Antagonismus gegenüber der analgetischen Komponente von Morphin bei Mäusen fest [107], der jedoch von Contreras in einem ähnlichen Modell in Frage gestellt wurde [26]. Interessanterweise konnten die Arbeitsgruppe um Kuriyama Veränderungen des Tauringehalts von Zellen in Kerngebieten des Rückenmarks und in Zellen des Thalamus der Ratte bei längerer Morphininkubation zeigen [77]. Vor dem Hintergrund der so tiefgreifenden Bedeutung von Taurin für PMN spricht der unveränderte Tauringehalt in der vorliegenden Studie dafür, dass die stoffwechselfysiologische Integrität der Zellen bei Morphininkubation unangetastet bleibt.

Ein weiteres Augenmerk muss dem Glutamin-Glutamat-Metabolismus gelten. Glutamin scheint ein wichtiges Substrat für immunkompetente, schnell proliferierende Zellen wie PMN zu sein und hat einzigartige metabolische Funktionen [106, 127]. Es konnte gezeigt werden, dass hohe intrazelluläre Glutaminsatzraten zu einer hohen intrazellulären Kohlenstoff- und Stickstoffkonzentration als Basis für die Synthese von Makromolekülen und Aminosäuren in PMN führen und dass die Glutaminolyse der grundlegende Energieproduktionsweg für PMN ist, vergleichbar der Glycolyse in anderen Geweben [18, 106]. Eine schwerwiegende Beeinflussung des Glutamin-Glutamat-Metabolismus geht immer auch mit einer Einschränkung der Zellfunktion des PMN einher [99, 101, 102, 103, 104, 154]. In der Literatur ist lediglich eine Studie verzeichnet, die Glutamin-Morphin-Interaktionen untersuchte. Hier konnten die Autoren keine Veränderungen des Glutamin-Alanin-Gehalts von Zellen des Hippocampus bei Ratten nach intrathekaler Morphinapplikation nachweisen [108]. Im Umkehrschluss kann der in der eigenen Studie unverändert gebliebene Glutamin- und Glu-

tamatspiegel als weiterer Anhaltspunkt dafür dienen, dass Morphin die PMN in ihrer intrazellulären Stoffwechselhomöostase nicht beeinflusst.

Interessanter gestaltet sich die Diskussion des Arginin-Citrullin-Stoffwechsels. Ausgehend von einer gesteigerten NO-Produktion (siehe oben) sind auch Veränderungen im Arginin-Citrullin-Stoffwechsel zu erwarten [8], da Arginin in der Zelle unter Zusatz von Sauerstoff und dem Enzym NO-Synthase zu NO und Citrullin umgewandelt wird. Zu unterscheiden sind hier die beiden Isoformen des Enzyms. Einerseits tritt die konstitutiv exprimierte, calciumabhängige cNOS auf und andererseits die durch Entzündungsmediatoren induzierte iNOS, die calciumunabhängig ist. Die cNOS produziert NO im nanomolaren Bereich, während die iNOS mikromolare Konzentrationen von NO über einen längeren Zeitraum produzieren kann [142]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Morphin in unterschiedlichen Zellen, darunter auch in neutrophilen Granulozyten, eine NO-Freisetzung bewirken kann [39, 84, 143]. Vermutlich waren die aufgetretenen Effekte jedoch so gering, dass sich trotz der hochempfindlichen HPLC-Methodik beim Aminosäurestoffwechsel keine Veränderungen zeigten oder fehlendes Arginin konnte über den in PMN vorhandenen Harnstoffzyklus (Arginasereaktion) zu jeder Zeit in ausreichenden Mengen nachgebildet werden.

Eine genaue Erklärung der Interaktionen zwischen Morphin und PMN und deren Stoffwechsel kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht gegeben werden und muss die Aufgabe weiterführender Studien sein, insbesondere auch vor dem Hintergrund, dass in der hier vorliegenden Studie bewusst nur auf die zeitlich begrenzte Sofortwirkung eingegangen wurde. Dass Opiode, über einen längeren Zeitraum verabreicht, tatsächlich eine immunsuppressive Wirkung haben, zeigen Untersuchungen bei Morphindauertherapie von Mäusen [55] und an Heroinabhängigen [57]. Analog zu der Diskussion um die Immunparameter darf auch hier nicht außer Acht gelassen werden, dass aufgrund des modellhaften Charakters eines in vitro Versuchs die Aussagekraft durch das Fehlen einer endothelialen Oberfläche, zentraler Regelkreise, wie auch einer pathophysiologisch alle relevanten Faktoren enthaltenden Entzündungsregion als begrenzt angesehen werden muss. Dennoch bleibt abschließend festzuhalten, dass die hier aufgeführten Ergebnisse sich mit den Erfahrungen aus der klinischen Routine decken, in der sich Morphin als jahrzehntelang bewährtes und häufig angewendetes Pharmakon gezeigt hat.

4.2.2 Fentanyl

Die vorliegenden Ergebnisse stehen im Einklang mit denen früherer Studien anderer Autoren. Wie bereits oben ausgeführt, konnte bislang lediglich eine Arbeitsgruppe überhaupt eine Wirkung von Fentanyl auf die Funktion von PMN nachweisen. Hofbauer et al. zeigten in dieser Studie, dass Fentanyl unter bestimmten Bedingungen die Transmigration von PMN durch endotheliale Zellmonolayer hemmt. Hierzu war es allerdings erforderlich, dass sowohl die PMN als auch die Endothelzellen mit dem Opioid präinkubiert wurden. Bei den Endothelzellen führte dies zu einer signifikanten Abnahme der Expression des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 und stellte somit schon von sich aus einen erheblichen Hemmfaktor der Transmigration dar. Für die alleinige Inkubation von PMN mit Fentanyl konnte eine signifikante Hemmung der Transmigration erst in supraklinischen Konzentrationen gezeigt werden [56].

Gänzlich neu ist die Darstellung der freien intragranulozytären Aminosäuren. Während mit diesem Verfahren bei anderen in der Anästhesie eingesetzten Pharmaka zum Teil drastische Veränderungen im intragranulozytären Aminosäurestoffwechsel nachgewiesen werden konnten [102, 104], zeigen sich unter Fentanyl-Stimulation auch hier keinerlei Veränderungen. Selbst der für PMN sehr sensitive Parameter des intrazellulären Taurinspiegels blieb in dieser Studie unberührt.

Weitaus interessanter ist die Diskussion um die Immunfunktion von PMN bei Fentanyl-Stimulation und das hier von Makman erstmalig aufgestellte Modell. 1995 beschrieben Makman et al. den μ_3 -Rezeptor als eine Untergruppe der Opiatrezeptoren auf PMN [85]. Dieser Rezeptor weist keine Affinität für Fentanyl auf. 1998 konnten Bilfinger et al zeigen, dass Fentanyl im Gegensatz zu Morphin keine NO-Freisetzung in PMN verursacht. Ebenso bleibt in dieser Studie die Granulozytenadhärenz an humane venöse oder arterielle Endothelzellen bei Stimulation mit Fentanyl unbeeinträchtigt [12]. Die Vermutung, dass sich Fentanyl gegenüber PMN inert verhält, wurde zwei Jahre später durch die Arbeit von Welters et al. unterstützt, die für Fentanyl keine Veränderungen bei wichtigen granulozytären Immunfunktionsparametern, wie der Expression von Komplementrezeptoren (CD 35, CD11b/CD18), der Phagozytose, dem „oxidative burst“ sowie der NO-Freisetzung feststellen konnten [157]. Unterstützt wurden die Ergebnisse durch die eigene Studie. Mit ihr wird gezeigt, dass Fentanyl keine Auswirkungen auf die Immunfunktion von PMN wie Superoxidationbil-

dung, Wasserstoffperoxidbildung und Aktivität der granulozytären Myeloperoxidase hat.

4.2.3 β -Endorphin

β -Endorphin hat bezüglich seiner auftretenden Plasmaspiegel einen sehr weiten Konzentrationsbereich. Als endogenes Opioidpeptid kommt es im unstimulierten Organismus in einer Konzentration von 10^{-12} bis 10^{-10} M vor [41]. Die zur Stimulation von PMN erforderlichen β -Endorphin-Konzentrationen liegen je nach Autor zwischen 10^{-14} M [133] und 10^{-3} M [114]. Allgemeiner Konsens herrscht darüber, dass es in den niedrigeren Konzentrationsbereichen zu einer Zellaktivierung kommt [37, 97, 114, 132, 150, 151, 159] und in den höheren Konzentrationsbereichen mit einer Hemmung der Zellfunktion zu rechnen ist [93, 97, 114, 131, 132, 133].

Die Wirkungen des hochpotenten Opioidpeptids β -Endorphin treten bei Stimulation von PMN sehr schnell ein. Fischer et al. konnten bereits innerhalb der ersten zwei Minuten der Stimulation das sog. „flattening“, eine Veränderung der Zellform, als Zeichen der PMN-Aktivierung beobachten [41]. Übereinstimmend wurde von Autoren anderer Studien mit β -Endorphin und PMN festgehalten, dass die Effekte innerhalb der ersten 15 Minuten nach Stimulationsbeginn zu beobachten sind [4, 41, 132]. Ein weiterer, wahrscheinlich entscheidender Faktor für das Fehlen von Veränderungen bei Inkubationszeiten über 15 Minuten, stellt das Vorhandensein eines Enzyms dar, das β -Endorphin inaktiviert. Es handelt sich dabei um die „Neutrale Endopeptidase 24.11“ (NEP) aus der Gruppe der Enkephalinasen, auch bekannt unter dem Namen „common acute lymphoblastic antigen“ (CALLA, CD 10). Dieses Enzym ist in PMN nachgewiesen [5, 25, 35] und es konnte gezeigt werden, dass es β -Endorphin abbaut und somit seine Wirkung aufhebt [5, 6, 35, 36, 87, 134, 135]. Aufgrund dieser Vorarbeiten wurde bei β -Endorphin auf eine Zeitreihe verzichtet.

Zu der Fragestellung der Veränderung freier intrazellulärer Aminosäuren in PMN bei Stimulation mit β -Endorphin gibt es zur Zeit weltweit keine veröffentlichten Daten. Selbst für einzelne Aminosäuren sind in der Literatur keine Interaktionen mit β -Endorphin beschrieben. Die eigenen Daten zeigen klar, dass es trotz ihrer zentralen stoffwechselphysiologischen Rolle unter den gegebenen Voraussetzungen keinen Einfluss auf die freien intrazellulären Aminosäuren in PMN gibt.

Während sich der Gehalt an freien intrazellulären Aminosäuren nach Stimulation mit β -Endorphin nicht veränderte, zeigten sich bei der Superoxidanionproduktion und der Wasserstoffperoxidbildung ein leichter Abfall, wenn auch unterhalb des Signifikanzniveaus ($p=0,05$). Diese Inhibierung lag bei der Superoxidanionproduktion bei 14,6 % gegenüber dem Leerwert (hohe β -Endorphin-Konzentration mit 10^{-9} M) und bei der Wasserstoffperoxidbildung bei 11,5 % (hohe β -Endorphin-Konzentration mit 10^{-9} M). Ähnliche Ergebnisse konnten von Diamant und Mitarbeitern gezeigt werden [31]. Schwierig gestaltet sich jedoch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da verschiedene Stimulantien verwendet wurden. In der eigenen Studie wurde Zymosan eingesetzt, da es als lange erprobtes und sicheres Stimulationsagens gilt [49, 78, 82, 148] und eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu früheren Studien der eigenen Arbeitsgruppe gegeben sein sollte. Der Einsatz anderer Stimulanzien, auch vor dem Hintergrund der insgesamt nur schwach ausgeprägten Effekte, muss die Aufgabe weiterführender Studien bleiben. Die von vielen Autoren (s. o.) beschriebene Aktivierung von PMN durch Opioidpeptide konnte in der eigenen Studie nicht gezeigt werden. Opioidpeptide wie β -Endorphin stimulieren PMN in niedrigen Konzentrationen über den δ_2 -Rezeptor, der von Makman 1992 erstmals als neue Unterteilung der δ -Rezeptoren auf PMN beschrieben wurde [144]. Untersuchungen von Makman lassen vermuten, dass PMN mit dem δ_2 -Rezeptor und dem μ_3 -Rezeptor zwei wahrscheinlich korrespondierende Rezeptorsysteme besitzen, über die gegensätzliche Effekte vermittelt werden: eine Aktivierung über den Opioidpeptid-sensitiven, Morphin-insensitiven δ_2 -Rezeptor und eine Inhibierung über den Morphin-sensitiven, Opioidpeptid-insensitiven μ_3 -Rezeptor [85]. Nach seiner Ansicht ermöglicht dieses Gegenspielerprinzip eine sehr exakte Regulierung der zellulären Immunaktivität, wobei auch hier genaue Daten zum vollständigen Verständnis der Regelkreise bislang noch fehlen.

Mit der eigenen Studie wird gezeigt, dass weder wie bereits dargestellt eine Aktivierung des μ_3 -Rezeptors noch eine Aktivierung des δ_2 -Rezeptors von PMN deren freien intrazellulären Aminosäuregehalt beeinflusst.

4.2.4 Naloxon

Naloxon wurde in anderen Studien bislang zur Demonstration der Reversibilität opiat-induzierter Effekte verwendet [31, 43, 76, 94, 129, 133, 150, 156, 157].

Zu der Fragestellung der Veränderung freier intrazellulärer Aminosäuren in PMN oder deren Immunfunktion bei Stimulation mit Naloxon gibt es zur Zeit weltweit keine veröffentlichten Daten. In der eigenen Arbeit zeigte Naloxon keinerlei Auswirkungen auf die freien intrazellulären Aminosäuren in PMN.

Die Superoxidanionfreisetzung stellt den einzigen, von anderen Arbeitsgruppen untersuchten Immunparameter bei PMN dar und hier gibt es differente Ergebnisse. So konnte sowohl gezeigt werden, dass Naloxon keinen Effekt auf die Superoxidanionbildung in PMN ausübt [131] als auch eine Hemmung der Superoxidanionfreisetzung hervorruft [136]. In der eigenen Studie konnten bei keinem der drei bestimmten Immunparameter Veränderungen festgestellt werden.

Im Falle einer signifikanten Veränderung der freien intrazellulären Aminosäuren in PMN bei Opioidinkubation wäre Naloxon als Antagonist zur Darstellung der Reversibilität der opioidinduzierten Effekte zum Einsatz gekommen. Hierfür war es wichtig zu zeigen, dass Naloxon alleine die freien intrazellulären Aminosäuren in PMN nicht beeinflusst.

5 ZUSAMMENFASSUNG

- Morphin führt bei PMN zu einer signifikanten Reduktion der Superoxidanion- und Wasserstoffperoxidproduktion ab einer Inkubationszeit von 60 Minuten und einer Konzentration von $1,3 \times 10^{-5}$ M. Ein Einfluss von Morphin auf die freien intrazellulären Aminosäuren in PMN kann nicht festgestellt werden.
- Fentanyl verhält sich gegenüber PMN in den getesteten Konzentrationen und nach den eingehaltenen Inkubationszeiten sowohl bei den gemessenen Immunfunktionsparametern als auch bei den freien intrazellulären Aminosäuren inert.
- β -Endorphin zeigt in dieser Studie lediglich die Tendenz einer Hemmung spezieller Immunfunktionen von PMN (hier Superoxidanionproduktion und Wasserstoffperoxidbildung) unter Stimulation mit hohen β -Endorphin-Konzentrationen (10^{-9} M). Diese Effekte sind jedoch nicht signifikant. Die freien intrazellulären Aminosäuren in PMN werden durch β -Endorphin nicht beeinflusst.
- Der Opioidantagonist Naloxon alleine beeinflusst weder die gemessenen Immunfunktionsparameter noch die freien intrazellulären Aminosäuren in PMN.

6 ANHANG

6.1 Ergebnistabellen

6.1.1 Kontrollen

		K 10 min		K 60 min		K 120 min	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
SAS	Asp	22,61	11,96	26,34	12,15	17,72	5,24
	Glu	68,65	15,29	72,68	12,34	66,96	11,18
SAM	Asn	2,55	1,04	7,54	2,79	2,19	1,01
	Gln	19,20	6,07	19,34	7,43	17,00	6,65
BAS	Orn	4,46	2,61	3,07	1,07	4,80	1,40
	Lys	2,18	0,82	2,33	1,22	2,41	1,33
	Arg	2,51	1,88	3,64	2,18	2,88	1,54
	Cit	1,57	0,67	2,19	1,15	1,41	0,39
NAS	Ser	11,81	6,15	19,89	12,49	23,93	17,62
	Gly	18,83	9,52	13,45	1,81	17,15	7,07
	Thr	5,06	1,78	4,48	0,30	4,63	1,51
	Ala	10,12	1,45	22,99	13,15	16,35	8,14
	Aba	0,53	0,36	1,23	0,92	0,52	0,17
VAS	Ile	2,37	0,95	4,74	3,03	2,25	1,26
	Leu	2,61	1,13	1,99	0,46	1,95	0,64
	Val	4,66	1,69	2,80	0,52	3,03	1,24
AAS	Trp	1,01	0,48	0,87	0,27	0,55	0,21
	Tyr	3,52	1,10	2,90	1,02	3,42	1,77
	Phe	2,62	1,43	1,87	0,69	1,86	0,89
	His	1,03	0,20	12,73	8,35	0,98	0,23
SON	Met	0,92	0,39	0,52	0,09	0,46	0,20
	Tau	257,96	70,51	280,15	105,78	223,72	111,87

Tabelle 7: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN. Dargestellt sind die Kontrollwerte (K) zu verschiedenen Inkubationszeiten für saure Aminosäuren (SAS), Säureamide (SAM), basische Aminosäuren (BAS), neutrale Aminosäuren (NAS), verzweigtkettige Aminosäuren (VAS), aromatische Aminosäuren (AAS) und sonstige Aminosäuren (SON). Die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl n=10.

	K 10 min		K 60 min		K 120 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
O_2^- [10^{-12} mol/PMN/min]	3,388	0,616	3,604	0,562	3,236	0,556
H_2O_2 [10^{-12} mol/PMN/min]	1,376	0,307	1,285	0,244	1,326	0,235
MPO [Units/l]	0,549	0,155	0,586	0,178	0,537	0,143

Tabelle 8: Kontrollwerte (K) unstimulierter PMN für die untersuchten Immunparameter bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) für die gemessene Superoxidanionproduktion (O_2^-) und die gemessene Wasserstoffperoxidproduktion (H_2O_2) sowie für die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) bei einer Probenanzahl von n=10.

6.1.2 Morphin

		K		P1 (0,1 μ g/ml)		P2 (5,0 μ g/ml)	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
SAS	Asp	9,02	5,91	7,09	6,27	9,72	7,07
	Glu	44,55	37,40	40,13	37,11	43,97	42,20
SAM	Asn	2,75	2,19	2,43	2,23	2,50	2,36
	Gln	32,06	26,74	28,75	27,41	28,68	26,64
BAS	Orn	4,49	3,19	3,57	3,27	4,64	3,69
	Lys	2,98	2,42	2,54	2,41	2,75	2,68
	Arg	2,50	1,99	2,03	2,15	2,23	1,93
	Cit	1,05	0,87	0,95	0,88	1,04	0,94
NAS	Ser	11,40	8,56	9,29	8,98	11,93	10,22
	Gly	20,93	16,24	17,87	17,42	19,35	18,48
	Thr	6,04	4,84	5,50	4,98	5,83	5,41
	Ala	14,56	12,98	12,93	11,87	13,77	12,52
	Aba	0,26	0,20	0,33	0,24	1,06	0,24
VAS	Ile	2,48	2,17	2,20	2,01	2,34	2,21
	Leu	4,32	3,90	3,98	3,47	4,11	3,87
	Val	7,06	5,66	6,34	5,55	7,08	6,47
AAS	Trp	0,70	0,67	0,61	0,63	0,64	0,61
	Tyr	3,04	2,57	2,84	2,61	2,99	2,63
	Phe	2,94	2,20	2,58	2,34	2,57	2,35
	His	1,37	1,01	1,15	0,89	1,33	1,16
SON	Met	1,22	1,06	1,13	0,94	1,16	1,07
	Tau	367,97	271,34	338,45	297,94	306,22	304,98

Tabelle 9: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Inkubation mit Morphin. Dargestellt sind die zwei unterschiedlichen Morphinkonzentrationen (P1, P2) gegenüber den Kontrollwerten (K) für saure Aminosäuren (SAS), Säureamide (SAM), basische Aminosäuren (BAS), neutrale Aminosäuren (NAS), verzweigt-kettige Aminosäuren (VAS), aromatische Aminosäuren (AAS) und sonstige Aminosäuren (SON). Die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl n=16.

		K 10 min		P 10 min		K 60 min		P 60 min		K 120 min		P 120 min	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
SAS	Asp	22,61	11,96	19,07	6,66	30,70	12,15	18,90	6,90	17,72	5,24	18,29	2,94
	Glu	55,65	15,29	56,04	15,41	94,89	33,61	60,65	10,74	66,96	11,18	52,71	18,84
SAM	Asn	2,55	1,04	2,56	1,14	7,54	2,79	1,84	0,65	2,19	1,01	2,02	0,88
	Gln	19,20	6,07	23,68	9,53	19,34	7,43	17,43	7,41	17,00	6,65	17,62	7,77
BAS	Orn	4,46	2,61	4,93	1,46	3,07	1,07	3,17	1,37	4,80	1,40	4,06	1,70
	Lys	2,18	0,82	2,23	0,68	2,33	1,22	4,28	2,50	2,41	1,33	2,93	1,24
	Arg	0,43	0,30	0,40	0,35	3,64	2,18	2,66	1,22	1,84	1,54	1,50	0,95
	Cit	1,57	0,67	0,79	0,19	2,19	1,15	0,70	0,14	1,41	0,39	0,82	0,24
NAS	Ser	11,81	6,15	10,38	3,80	19,89	12,49	11,87	5,74	23,93	17,62	19,65	7,88
	Gly	18,83	9,52	14,92	3,35	13,45	1,81	15,44	6,06	17,15	7,07	22,18	9,59
	Thr	5,06	1,78	4,65	1,23	4,48	0,30	4,45	1,80	4,63	1,51	4,10	1,63
	Ala	10,12	1,45	11,67	3,15	22,99	13,15	21,60	10,65	16,35	8,14	12,31	4,44
	Aba	0,53	0,36	0,47	0,20	1,23	0,92	0,41	0,18	0,52	0,17	0,52	0,20
VAS	Ile	2,37	0,95	2,38	1,71	4,74	3,03	1,01	0,35	2,25	1,26	2,30	0,77
	Leu	2,61	1,13	2,60	0,36	1,99	0,46	2,05	0,84	1,95	0,64	1,88	0,60
	Val	4,66	1,69	2,50	0,84	2,80	0,52	2,33	0,58	3,03	1,24	2,76	1,16
AAS	Trp	1,01	0,48	0,78	0,18	0,87	0,27	0,61	0,21	0,55	0,21	0,61	0,25
	Tyr	3,52	1,10	3,09	1,17	2,90	1,02	3,17	1,79	3,42	1,77	2,14	1,03
	Phe	2,62	1,43	2,16	0,99	1,87	0,69	2,78	1,32	1,86	0,89	1,89	1,00
	His	1,03	0,20	1,67	1,07	12,73	8,35	7,85	5,58	0,98	0,23	1,21	0,41
SON	Met	0,92	0,39	0,71	0,15	0,52	0,09	0,42	0,15	0,46	0,20	0,39	0,06
	Tau	257,96	70,51	267,56	103,18	280,15	105,78	244,66	120,15	223,72	111,87	227,1	136,13

Tabelle 10: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Morphininkubation. Dargestellt sind die mit 5,0 µg/ml Morphin inkubierten Proben (P) gegenüber den unstimulierten Kontrollwerten (K) zu verschiedenen Inkubationszeiten für saure Aminosäuren (SAS), Säureamide (SAM), basische Aminosäuren (BAS), neutrale Aminosäuren (NAS), verzweigtkettige Aminosäuren (VAS), aromatische Aminosäuren (AAS) und sonstige Aminosäuren (SON). Die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl n=10.

	K		P1 (0,1 µg/ml)		P2 (5,0 µg/ml)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
O ₂ ⁻ [10^{-12} mol/PMN/min]	3,156	0,534	3,418	0,798	2,892	0,585
H ₂ O ₂ [10^{-12} mol/PMN/min]	1,147	0,271	1,385	0,302	1,026	0,280
MPO [Units/l]	0,628	0,187	0,559	0,181	0,687	0,193

Tabelle 11: PMN-Immunparameter bei Inkubation mit Morphin. Dargestellt sind die zwei unterschiedlichen Morphinkonzentrationen (P1, P2) gegenüber den unstimulierten Kontrollwerten (K). Angegeben sind jeweils die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) für die gemessene Superoxidionproduktion (O₂⁻) und die gemessene Wasserstoffperoxidproduktion (H₂O₂) sowie für die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) bei einer Probenanzahl von n=16.

	K 10 min		P 10 min		K 60 min		P 60 min		K 120 min		P 120 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
O ₂ ⁻	3,388	0,616	3,685	0,723	3,604	0,562	*2,869	0,684	3,236	0,556	*2,318	0,581
H ₂ O ₂	1,376	0,307	1,293	0,246	1,285	0,244	1,147	0,271	1,326	0,235	*1,019	0,243
MPO	0,549	0,155	0,621	0,202	0,586	0,178	0,575	0,192	0,537	0,143	0,496	0,134

Tabelle 12: PMN-Immunparameter bei Inkubation mit Morphin. Dargestellt sind die mit 5,0 µg/ml Morphin inkubierten Proben (P) gegenüber den unstimulierten Kontrollwerten (K) zu verschiedenen Inkubationszeiten. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) für die gemessene Superoxidanionproduktion (O₂⁻ [10⁻¹² mol/PMN/min]) und die gemessene Wasserstoffperoxidproduktion (H₂O₂ [10⁻¹² mol/PMN/min]) sowie für die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO [Units/l]) bei einer Probenanzahl von n=10. Signifikante Veränderungen (Signifikanzniveau p<0,05) sind mit * gekennzeichnet.

6.1.3 Fentanyl

		K		P1 (0,01 µg/ml)		P2 (0,1 µg/ml)	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
SAS	Asp	8,55	5,44	8,27	6,53	7,41	6,03
	Glu	48,11	19,03	44,88	25,46	45,46	23,15
SAM	Asn	2,98	1,35	2,63	1,52	2,69	1,26
	Gln	34,32	14,32	30,58	17,35	32,30	13,07
BAS	Orn	4,17	2,34	3,72	2,50	3,80	2,93
	Lys	3,41	1,51	2,86	1,93	2,96	1,52
	Arg	2,57	1,30	2,22	1,48	2,35	1,24
	Cit	1,17	0,46	0,97	0,56	1,07	0,47
NAS	Ser	11,02	5,60	9,79	5,92	9,57	6,39
	Gly	22,80	10,51	20,65	12,73	21,10	11,26
	Thr	6,49	2,41	5,90	3,17	5,81	2,60
	Ala	15,22	5,19	14,06	9,09	14,15	6,77
	Aba	0,48	0,40	0,24	0,16	0,29	0,12
VAS	Ile	3,17	2,33	2,35	1,53	2,32	1,29
	Leu	5,05	1,90	4,35	2,78	4,35	2,21
	Val	6,67	2,62	6,32	2,93	6,30	2,51
AAS	Trp	0,72	0,25	0,63	0,27	0,61	0,18
	Tyr	3,33	1,19	3,03	1,72	3,05	1,45
	Phe	2,82	0,96	2,66	1,42	2,61	1,24
	His	1,40	0,45	1,24	0,69	1,16	0,56
SON	Met	1,33	0,52	1,17	0,77	1,20	0,56
	Tau	345,02	178,60	313,93	221,89	319,29	159,19

Tabelle 13: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Inkubation mit Fentanyl. Dargestellt sind die zwei unterschiedlichen Fentanylkonzentrationen (P1, P2) gegenüber den unstimulierten Kontrollwerten (K) für saure Aminosäuren (SAS), Säureamide (SAM), basische Aminosäuren (BAS), neutrale Aminosäuren (NAS), verzweigtkettige Aminosäuren (VAS), aromatische Aminosäuren (AAS) und sonstige Aminosäuren (SON). Die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10⁻¹⁷ mol/PMN angegeben, Probenanzahl n=16.

		K 10 min		P 10 min		K 60 min		P 60 min		K 120 min		P 120 min	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
SAS	Asp	22,61	11,96	24,09	12,53	30,70	12,15	21,52	4,54	17,72	5,24	15,13	6,09
	Glu	55,65	15,29	60,56	15,36	94,89	33,61	68,73	22,29	66,96	11,18	65,64	16,80
SAM	Asn	2,55	1,04	2,24	0,91	7,54	2,79	1,80	0,42	2,19	1,01	2,22	1,07
	Gln	19,20	6,07	19,86	5,89	19,34	7,43	13,44	5,63	17,00	6,65	14,16	6,18
BAS	Orn	4,46	2,61	5,35	2,07	3,07	1,07	3,66	2,00	4,80	1,40	4,05	1,87
	Lys	2,18	0,82	2,35	1,23	2,33	1,22	2,75	1,32	2,41	1,33	2,15	1,05
	Arg	0,43	0,30	2,19	1,82	3,64	2,18	1,03	0,24	1,84	1,54	2,00	1,48
	Cit	1,57	0,67	1,04	0,38	2,19	1,15	1,18	0,62	1,41	0,39	0,89	0,39
NAS	Ser	11,81	6,15	10,88	4,49	19,89	12,49	8,58	3,48	23,93	17,62	12,33	5,99
	Gly	18,83	9,52	15,74	3,13	13,45	1,81	23,73	12,71	17,15	7,07	15,66	7,59
	Thr	5,06	1,78	5,01	1,50	4,48	0,30	5,04	1,94	4,63	1,51	4,36	1,27
	Ala	10,12	1,45	14,11	6,93	22,99	13,15	14,17	6,54	16,35	8,14	14,11	6,35
	Aba	0,53	0,36	0,37	0,14	1,23	0,92	0,39	0,18	0,52	0,17	0,49	0,18
VAS	Ile	2,37	0,95	1,62	0,69	4,74	3,03	2,03	0,92	2,25	1,26	2,04	1,21
	Leu	2,61	1,13	2,59	0,88	1,99	0,46	2,92	1,12	1,95	0,64	2,37	0,87
	Val	4,66	1,69	3,46	1,63	2,80	0,52	4,35	2,14	3,03	1,24	3,34	1,56
AAS	Trp	1,01	0,48	1,04	0,45	0,87	0,27	1,06	0,51	0,55	0,21	0,58	0,23
	Tyr	3,52	1,10	4,33	2,45	2,90	1,02	3,74	1,68	3,42	1,77	2,84	1,18
	Phe	2,62	1,43	2,68	1,29	1,87	0,69	2,02	1,31	1,86	0,89	1,24	0,13
	His	1,03	0,20	1,87	1,94	12,73	8,35	7,51	5,44	0,98	0,23	7,14	5,20
SON	Met	0,92	0,39	0,65	0,18	0,52	0,09	0,86	0,47	0,46	0,20	0,48	0,13
	Tau	257,96	70,51	398,29	164,71	280,15	105,78	214,54	51,10	223,72	111,87	221,04	75,07

Tabelle 14: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Fentanylinkubation. Dargestellt sind die mit 0,1 µg/ml Fentanyl stimulierten Proben (P) gegenüber den unstimulierten Kontrollwerten (K) zu verschiedenen Inkubationszeiten für saure Aminosäuren (SAS), Säureamide (SAM), basische Aminosäuren (BAS), neutrale Aminosäuren (NAS), verzweigt-kettige Aminosäuren (VAS), aromatische Aminosäuren (AAS) und sonstige Aminosäuren (SON). Die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl n=10.

	K		P1 (0,01 µg/ml)		P2 (0,1 µg/ml)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
O ₂ ⁻ [10^{-12} mol/PMN/min]	2,854	0,565	2,547	0,413	3,096	0,739
H ₂ O ₂ [10^{-12} mol/PMN/min]	1,316	0,283	1,454	0,357	1,237	0,211
MPO [Units/l]	0,751	0,260	0,886	0,233	0,685	0,207

Tabelle 15: PMN-Immunparameter bei Inkubation mit Fentanyl. Dargestellt sind die zwei unterschiedlichen Fentanylkonzentrationen (P1, P2) gegenüber den unstimulierten Kontrollwerten (K). Angegeben sind jeweils die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) für die gemessene Superoxidionproduktion (O₂⁻) und die gemessene Wasserstoffperoxidproduktion (H₂O₂) sowie für die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) bei einer Probenanzahl von n=16.

	K 10 min		P 10 min		K 60 min		P 60 min		K 120 min		P 120 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
O ₂ ⁻	3,502	0,584	3,398	0,771	3,616	0,878	3,342	0,561	3,375	0,722	3,577	0,854
H ₂ O ₂	1,164	0,253	1,306	0,322	0,986	0,239	1,123	0,196	1,037	0,184	1,085	0,219
MPO	0,709	0,202	0,643	0,197	0,625	0,198	0,687	0,183	0,749	0,253	0,598	0,203

Tabelle 16: PMN-Immunparameter bei Inkubation mit Fentanyl. Dargestellt sind die mit 0,1 µg/ml Fentanyl inkubierten Proben (P) gegenüber den unstimulierten Kontrollwerten (K) zu verschiedenen Inkubationszeiten. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) für die gemessene Superoxidanionproduktion (O₂⁻ [10⁻¹² mol/PMN/min]) und die gemessene Wasserstoffperoxidproduktion (H₂O₂ [10⁻¹² mol/PMN/min]) sowie für die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO [Units/l]) bei einer Probenanzahl von n=10.

6.1.4 β-Endorphin

		K		P1 (1 fM)		P2 (1 nM)	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
SAS	Asp	6,78	2,82	8,13	5,47	6,86	3,73
	Glu	40,56	9,43	45,61	17,40	40,26	14,96
SAM	Asn	2,39	0,61	2,44	0,41	2,29	0,60
	Gln	26,76	6,14	28,61	6,03	25,23	7,38
BAS	Orn	3,35	1,25	3,68	1,27	3,25	0,93
	Lys	2,61	0,94	2,63	0,76	2,39	0,72
	Arg	2,10	0,65	2,11	0,71	1,82	0,55
	Cit	1,00	0,23	0,98	0,26	0,89	0,30
NAS	Ser	9,92	3,53	10,53	3,58	9,45	3,27
	Gly	16,95	3,76	18,20	2,43	16,99	3,32
	Thr	5,16	1,27	5,56	1,00	4,79	1,10
	Ala	12,25	2,15	12,88	1,67	11,82	2,53
	Aba	0,19	0,09	0,61	0,18	0,23	0,15
VAS	Ile	2,19	0,62	2,22	0,64	1,99	0,64
	Leu	4,15	1,18	4,17	1,20	3,76	1,17
	Val	5,41	1,23	5,79	1,41	5,11	1,77
AAS	Trp	0,92	0,21	0,95	0,23	0,84	0,18
	Tyr	2,65	0,87	2,56	0,62	2,27	0,65
	Phe	2,22	0,49	2,37	0,57	2,07	0,61
	His	0,95	0,30	1,02	0,35	0,80	0,18
SON	Met	1,15	0,38	1,13	0,33	1,02	0,42
	Tau	292,41	106,77	301,67	70,01	272,47	76,95

Tabelle 17: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Inkubation mit β-Endorphin. Dargestellt sind die zwei unterschiedlichen β-Endorphinkonzentrationen (P1, P2) gegenüber den unstimulierten Kontrollwerten (K) für saure Aminosäuren (SAS), Säureamide (SAM), basische Aminosäuren (BAS), neutrale Aminosäuren (NAS), verzweigtkettige Aminosäuren (VAS), aromatische Aminosäuren (AAS) und sonstige Aminosäuren (SON). Die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10⁻¹⁷ mol/PMN angegeben, Probenanzahl n=16.

	K		P1 (1 fM)		P2 (1 nM)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
O ₂ ⁻ [10 ⁻¹² mol/PMN/min]	2,763	0,548	2,608	0,576	2,359	0,611
H ₂ O ₂ [10 ⁻¹² mol/PMN/min]	1,087	0,259	1,006	0,285	0,961	0,248
MPO [Units/l]	0,693	0,214	0,747	0,205	0,602	0,196

Tabelle 18: PMN-Immunparameter bei Inkubation mit β -Endorphin. Dargestellt sind die zwei unterschiedlichen β -Endorphinkonzentrationen (P1, P2) gegenüber den unstimulierten Kontrollwerten (K). Angegeben sind jeweils die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) für die gemessene Superoxid-anionproduktion (O₂⁻) und die gemessene Wasserstoffperoxidproduktion (H₂O₂) sowie für die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) bei einer Probenanzahl von n=16.

6.1.5 Naloxon

		K		P1 (1 μ M)		P2 (100 μ M)	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
SAS	Asp	6,78	2,82	8,17	5,07	7,90	6,50
	Glu	40,56	9,43	47,54	15,65	41,71	35,17
SAM	Asn	2,39	0,61	2,69	0,76	2,49	2,40
	Gln	26,76	6,14	30,24	10,75	28,98	24,31
BAS	Orn	3,35	1,25	3,80	1,97	4,36	3,72
	Lys	2,61	0,94	2,96	1,30	2,77	2,44
	Arg	2,10	0,65	2,14	1,00	2,15	2,08
	Cit	1,00	0,23	1,01	0,37	0,98	0,86
NAS	Ser	9,92	3,53	10,77	4,86	11,04	11,34
	Gly	16,95	3,76	19,57	6,81	19,35	16,83
	Thr	5,16	1,27	5,66	1,73	5,57	5,15
	Ala	12,25	2,15	13,37	3,31	13,01	11,69
	Aba	0,19	0,09	0,35	0,18	0,22	0,20
VAS	Ile	2,19	0,62	2,20	0,67	2,27	2,02
	Leu	4,15	1,18	4,21	1,71	4,17	3,57
	Val	5,41	1,23	5,76	1,99	6,63	5,56
AAS	Trp	0,92	0,21	0,55	0,15	0,64	0,66
	Tyr	2,65	0,87	2,93	1,09	2,94	2,67
	Phe	2,22	0,49	2,32	0,82	2,50	2,21
	His	0,95	0,30	1,11	0,65	1,18	0,94
SON	Met	1,15	0,38	1,16	0,50	1,03	0,91
	Tau	292,41	106,77	304,60	78,77	318,05	259,22

Tabelle 19: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Inkubation mit Naloxon. Dargestellt sind die zwei unterschiedlichen Naloxonkonzentrationen (P1, P2) gegenüber den unstimulierten Kontrollwerten (K) für saure Aminosäuren (SAS), Säureamide (SAM), basische Aminosäuren (BAS), neutrale Aminosäuren (NAS), verzweigtkettige Aminosäuren (VAS), aromatische Aminosäuren (AAS) und sonstige Aminosäuren (SON). Die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10⁻¹⁷ mol/PMN angegeben, Probenanzahl n=16.

		K 10 min		P 10 min		K 60 min		P 60 min		K 120 min		P 120 min	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
SAS	Asp	22,61	11,96	37,19	24,40	30,70	12,15	21,85	5,94	17,72	5,24	15,27	5,59
	Glu	55,65	15,29	54,52	15,10	94,89	33,61	76,80	19,94	66,96	11,18	66,23	15,16
SAM	Asn	2,55	1,04	2,45	0,79	7,54	2,79	2,40	1,17	2,19	1,01	2,64	1,49
	Gln	19,20	6,07	20,99	10,91	19,34	7,43	19,57	9,94	17,00	6,65	15,32	6,93
BAS	Orn	4,46	2,61	7,41	4,35	3,07	1,07	5,08	1,54	4,80	1,40	4,07	2,02
	Lys	2,18	0,82	2,77	0,97	2,33	1,22	1,78	0,67	2,41	1,33	2,44	1,45
	Arg	0,43	0,30	1,43	1,10	3,64	2,18	3,00	1,46	1,84	1,54	1,69	0,88
	Cit	1,57	0,67	0,96	0,23	2,19	1,15	0,76	0,13	1,41	0,39	0,92	0,43
NAS	Ser	11,81	6,15	14,25	6,91	19,89	12,49	14,87	2,54	23,93	17,62	12,13	6,67
	Gly	18,83	9,52	18,14	6,73	13,45	1,81	17,20	5,41	17,15	7,07	19,00	11,25
	Thr	5,06	1,78	5,83	1,85	4,48	0,30	5,04	1,51	4,63	1,51	5,28	2,37
	Ala	10,12	1,45	14,07	4,60	22,99	13,15	26,30	17,16	16,35	8,14	14,50	6,21
	Aba	0,53	0,36	0,42	0,21	1,23	0,92	0,90	0,60	0,52	0,17	0,48	0,19
VAS	Ile	2,37	0,95	1,85	0,60	4,74	3,03	1,30	0,47	2,25	1,26	1,90	0,80
	Leu	2,61	1,13	4,37	2,52	1,99	0,46	2,60	1,08	1,95	0,64	2,54	1,14
	Val	4,66	1,69	4,73	2,10	2,80	0,52	3,46	1,34	3,03	1,24	3,40	1,66
AAS	Trp	1,01	0,48	1,32	0,77	0,87	0,27	0,71	0,19	0,55	0,21	0,55	0,13
	Tyr	3,52	1,10	4,85	2,78	2,90	1,02	3,47	1,88	3,42	1,77	3,49	1,72
	Phe	2,62	1,43	2,79	1,00	1,87	0,69	2,32	1,33	1,86	0,89	1,28	0,62
	His	1,03	0,20	1,31	0,38	12,73	8,35	8,44	4,48	0,98	0,23	0,73	0,21
SON	Met	0,92	0,39	1,08	0,56	0,52	0,09	0,49	0,12	0,46	0,20	0,53	0,20
	Tau	257,96	70,51	254,51	100,38	280,15	105,78	283,31	161,76	223,72	111,87	219,49	74,63

Tabelle 20: Freie intrazelluläre Aminosäuren in PMN bei Inkubation mit Naloxon. Dargestellt sind die mit 100 μM Naloxon inkubierten Proben (P) gegenüber den unstimulierten Kontrollwerten (K) zu verschiedenen Inkubationszeiten für saure Aminosäuren (SAS), Säureamide (SAM), basische Aminosäuren (BAS), neutrale Aminosäuren (NAS), verzweigt-kettige Aminosäuren (VAS), aromatische Aminosäuren (AAS) und sonstige Aminosäuren (SON). Die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der intrazellulären Aminosäuremassen sind in 10^{-17} mol/PMN angegeben, Probenanzahl $n=10$.

	K		P1 (1 μM)		P2 (100 μM)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
O_2^- [10^{-12} mol/PMN/min]	3,429	0,768	3,177	0,822	3,681	0,664
H_2O_2 [10^{-12} mol/PMN/min]	1,425	0,366	1,140	0,314	1,208	0,247
MPO [Units/l]	0,538	0,147	0,502	0,161	0,629	0,218

Tabelle 21: PMN-Immunparameter bei Inkubation mit Naloxon. Dargestellt sind die zwei unterschiedlichen Naloxonkonzentrationen (P1, P2) gegenüber den unstimulierten Kontrollwerten (K). Angegeben sind jeweils die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) für die gemessene Superoxidionproduktion (O_2^-) und die gemessene Wasserstoffperoxidproduktion (H_2O_2) sowie für die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) bei einer Probenanzahl von $n=16$.

	K 10 min		P 10 min		K 60 min		P 60 min		K 120 min		P 120 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
O₂⁻	3,156	0,517	3,189	0,646	3,088	0,691	2,897	0,634	3,387	0,629	3,204	0,519
H₂O₂	1,307	0,270	1,412	0,332	1,410	0,243	1,275	0,229	1,195	0,294	1,108	0,281
MPO	0,658	0,206	0,721	0,254	0,723	0,241	0,639	0,178	0,701	0,188	0,604	0,190

Tabelle 22: PMN-Immunparameter bei Inkubation mit Naloxon. Dargestellt sind die mit 100 µM Naloxon inkubierten Proben (P) gegenüber den unstimulierten Kontrollwerten (K) zu verschiedenen Inkubationszeiten. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) für die gemessene Superoxidanionproduktion (O₂⁻ [10⁻¹² mol/PMN/min]) und die gemessene Wasserstoffperoxidproduktion (H₂O₂ [10⁻¹² mol/PMN/min]) sowie für die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO [Units/l]) bei einer Probenanzahl von n=10.

6.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AAS	aromatische Aminosäuren
Aba	α -Aminobuttersäure
ABTS	2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazoline)-Sulfonsäure
Ala	Alanin
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
BAS	basische Aminosäuren
Cit	Citrullin
cNOS	calciumabhängige NO-Synthase
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
FMLP	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin
g	Gramm
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
His	Histidin
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
K	Kontrolle
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	Molar (mol/l)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
Met	Methionin
min	Minuten
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NAS	neutrale Aminosäuren
NEP	Neutrale Endopeptidase 24.11
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Orn	Ornithin
P	Probe
Pa	Pascal
Phe	Phenylalanin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt

Pro	Prolin
P.S.I.	pounds per square inch
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAM	Säureamide
SAS	saure Aminosäuren
Ser	Serin
SD	Standardabweichung
SON	sonstige Aminosäuren
Tau	Taurin
Thr	Threonin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
VAS	verzweigt-kettige Aminosäuren

6.3 Materialverzeichnis

Material	Produktbezeichnung, Hersteller
1-N HCl	Fa. Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Fa. Merck, Darmstadt
AB-Serum	gepooltes AB-Serum, Blutbank der Uniklinik Giessen
ABTS	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aminosäuren	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Antipain	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aqua dest.	Aqua ad iniectabilia, Fa. Baxter, Unterschleißheim
Citratpuffer	0,1 M, Fa. Behring, Marburg
Cytochalsin B	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cytochrom C	Typ IV, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA-Monovetten	Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Eisenroth
Eppendorfhütchen	Reagiergefäße 1,5 ml, Fa Sarstedt, Nümbrecht
Fentanyl	Fentanyl-Janssen; Fa. JANSSEN-Cilag, Neuss
Humanalbumin	Fa. Merck, Darmstadt
humanes β -Endorphin	Institut für Pharmakologie der JLU Giessen
Meerettich-Peroxidase	5 mg/ml, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	Fa. Merck, Darmstadt
Morphin	MSI 10 Mundipharma; Fa. Mundipharma, Limburg
NaCl 0,9%	Fa. Merck, Darmstadt
Naloxon	Naloxon 0,4 mg Curamed; Fa. Curamed, Karlsruhe
NaOH-Lösung	1N, Fa. Merck, Darmstadt
Natriumazetatpuffer	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumazidlösung	200 mM; Fa. Merck, Darmstadt
Neubauer-Zählkammer	Fa. Superior, Marienfeld
Leukopipette	Fa. Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Leupeptin	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
o-Phtaldialdehyd	Fa. Merck, Darmstadt
PBS-Puffer	PBS 10x, w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$; Fa. Gibco, Karlsruhe
Pepstatin A	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Percoll	Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Phenolrot	10 mg/ml, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PMSF	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Polystyrol-Röhrchen	Röhren 13 ml, 95 x 16,8 mm, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Probengefäß	2 CRV, Fa. Chromacoll, Trumbull, U.S.A
Tetraborat	Fa. Merck, Darmstadt
Trypanblau	Fa. Merck, Darmstadt
Türk's-Lösung	Fa. Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxidlösung	Fa. Merck, Darmstadt
Zy mosan	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

6.4 Literaturverzeichnis

1. Aiboshi, J.; Moore, E. E.; Ciesla, D. J.; Silliman, C. C.
Blood transfusion and the two-insult model of post-injury multiple organ failure
Shock, 2001, Vol. 15, Seite 302-306
2. al Sawaf, H. A.; al Ghamdi, M. A.; al Bekairi, A. M.; Tawfik, A. F.; Abu-Jayyab, A. R.
Changes in free amino acids in peripheral blood (PB) lymphocytes and polymorphonuclear (PMN) leukocytes after treatment with diazepam
Int. J. Immunopharmacol., 1993, Vol. 15, Seite 455-462
3. Algermissen, B.; Nündel, M.; Riedel, E.
Analytik von Aminosäuren mit Fluoreszenz-HPLC
GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium, 1989, Vol. 33, Seite 783-790
4. Azuma, Y.; Wang, P. L.; Shinohara, M.; Ohura, K.
Immunomodulation of the neutrophil respiratory burst by endomorphins 1 and 2
Immunol. Lett., 2000, Vol. 75, Seite 55-59
5. Balog, T.; Marotti, T.; Abramic, M.; Beusan-Svoboda, I.; Sobocanec, S.; Hrsak, I.
Neutrophil neutral endopeptidase variation and its regulation by opioid peptides
Int. Immunopharmacol., 2001, Vol. 1, Seite 569-579
6. Balog, T.; Marotti, T.; Abramic, M.; Svoboda-Beusen, I.; Hrsak, I.
The role of aminopeptidase N in Met-enkephalin modulated superoxide anion release
Immunopharmacology, 1999, Vol. 41, Seite 11-20
7. Barr, D. P.; Aust, S. D.
On the mechanism of peroxidase-catalyzed oxygen production
Arch. Biochem. Biophys., 1993, Vol. 303, Seite 377-382
8. Beaumier, L.; Castillo, L.; Yu, Y. M.; Ajami, A. M.; Young, V. R.
Arginine: new and exciting developments for an "old" amino acid
Biomed. Environ. Sci., 1996, Vol. 9, Seite 296-315
9. Berger, M.; O'Shea, J.; Cross, A. S.; Folks, T. M.; Chused, T. M.; Brown, E. J.; Frank, M. M.
Human neutrophils increase expression of C3bi as well as C3b receptors upon activation
J. Clin. Invest., 1984, Vol. 74, Seite 1566-1571
10. Bergmann, L.; Schaefer, C. L.
Lehrbuch der Experimentalphysik, 3. Band Optik und Atomphysik
Walter de Gruyter & Co, Berlin 1962
11. Bergstrom, J.; Fürst, P.; Vinnars, E.
Effect of a test meal, without and with protein, on muscle and plasma free amino acids
Clin. Sci. (Colch.), 1990, Vol. 79, Seite 331-337
12. Bilfinger, T. V.; Fimiani, C.; Stefano, G. B.
Morphine's immunoregulatory actions are not shared by fentanyl
Int. J. Cardiol., 1998, Vol. 64 Suppl 1, Seite S61-S66
13. Bocchini, G.; Bonanno, G.; Canevari, A.
Influence of morphine and naloxone on human peripheral blood T-lymphocytes
Drug Alcohol Depend., 1983, Vol. 11, Seite 233-237

14. Britigan, B. E.; Cohen, M. S.; Rosen, G. M.
Detection of the production of oxygen-centered free radicals by human neutrophils using spin trapping techniques: a critical perspective
J. Leukoc. Biol., 1987, Vol. 41, Seite 349-362
15. Bruno, J. G.; Herman, T. S.; Cano, V. L.; Stribling, L.; Kiel, J. L.
Selective cytotoxicity of 3-amino-L-tyrosine correlates with peroxidase activity
In Vitro Cell Dev. Biol. Anim, 1999, Vol. 35, Seite 376-382
16. Canepa, A.; Perfumo, F.; Carrea, A.; Sanguineti, A.; Piccardo, M. T.; Gusmano, R.
Measurement of free amino acids in polymorphonuclear leukocytes by high-performance liquid chromatography
J. Chromatogr., 1989, Vol. 491, Seite 200-208
17. Carrea, A.; Canepa, A.; Perfumo, F.; Ancarani, P.; Verrina, E.; Gusmano, R.
Proteolytic activity and free amino acid concentrations in polymorphonuclear leucocytes
Ann. Clin. Biochem., 1993, Vol. 3064
18. Castell, L. M.; Bevan, S. J.; Calder, P. C.; Newsholme, E.
The role of glutamine in the immune system and in intestinal function in catabolic states
Amino. Acids, 1994, Vol. 7, Seite 231-243
19. Chen, S. Y.; Huo, Q. L.; Huang, J. B.; Chen, Z. L.; Shi, X. H.; Liao, X. L.
Morphine inhibited respiratory burst of neutrophils and scavenged oxygen free radicals
Zhongguo Yao Li Xue. Bao., 1995, Vol. 16, Seite 445-448
20. Chen, T. P.; Roberts, R. L.; Wu, K. G.; Ank, B. J.; Stiehm, E. R.
Decreased superoxide anion and hydrogen peroxide production by neutrophils and monocytes in human immunodeficiency virus-infected children and adults
Pediatr. Res., 1993, Vol. 34, Seite 544-550
21. Ciesla, D. J.; Moore, E. E.; Gonzalez, R. J.; Biffi, W. L.; Silliman, C. C.
Hypertonic saline inhibits neutrophil (PMN) priming via attenuation of p38 MAPK signaling
Shock, 2000, Vol. 14, Seite 265-269
22. Ciesla, D. J.; Moore, E. E.; Musters, R. J.; Biffi, W. L.; Silliman, C. A.
Hypertonic saline alteration of the PMN cytoskeleton: implications for signal transduction and the cytotoxic response
J. Trauma, 2001, Vol. 50, Seite 206-212
23. Ciesla, D. J.; Moore, E. E.; Zallen, G.; Biffi, W. L.; Silliman, C. C.
Hypertonic saline attenuation of polymorphonuclear neutrophil cytotoxicity: timing is everything
J. Trauma, 2000, Vol. 48, Seite 388-395
24. Cline, M. J.
Metabolism of the circulating leukocyte
Physiol Rev., 1965, Vol. 45, Seite 674-720
25. Connelly, J. C.; Skidgel, R. A.; Schulz, W. W.; Johnson, A. R.; Erdős, E. G.
Neutral endopeptidase 24.11 in human neutrophils: cleavage of chemotactic peptide
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1985, Vol. 82, Seite 8737-8741
26. Contreras, E.; Tamayo, L.
Effects of taurine on tolerance to and dependence on morphine in mice
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 1984, Vol. 267, Seite 224-231

27. Daher, A. H.; Fortenberry, J. D.; Owens, M. L.; Brown, L. A.
Effects of exogenous nitric oxide on neutrophil oxidative function and viability
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 1997, Vol. 16, Seite 407-412
28. Davidson, J. A.; Boom, S. J.; Pearsall, F. J.; Zhang, P.; Ramsay, G.
Comparison of the effects of four i.v. anaesthetic agents on polymorphonuclear leucocyte function
Br. J. Anaesth., 1995, Vol. 74, Seite 315-318
29. Deitch, E. A.; Xu, D.; Bridges, R. M.
Opioids modulate human neutrophil and lymphocyte function: thermal injury alters plasma beta-endorphin levels
Surgery, 1988, Vol. 104, Seite 41-48
30. Devlin, E. G.; Clarke, R. S.; Mirakhur, R. K.; McNeill, T. A.
Effect of four i.v. induction agents on T-lymphocyte proliferations to PHA in vitro
Br. J. Anaesth., 1994, Vol. 73, Seite 315-317
31. Diamant, M.; Henricks, P. A.; Nijkamp, F. P.; de Wied, D.
Beta-endorphin and related peptides suppress phorbol myristate acetate-induced respiratory burst in human polymorphonuclear leukocytes
Life Sci., 1989, Vol. 45, Seite 1537-1545
32. Dooley, D. C.; Simpson, J. F.; Meryman, H. T.
Isolation of large numbers of fully viable human neutrophils: a preparative technique using percoll density gradient centrifugation
Exp. Hematol., 1982, Vol. 10, Seite 591-599
33. Edwards, S. W.
Biochemistry and physiology of the neutrophil
Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge 1994
34. Eggleton, P.; Gargan, R.; Fisher, D.
Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers
J. Immunol. Methods, 1989, Vol. 121, Seite 105-113
35. Erdös, E. G.; Skidgel, R. A.
Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones
FASEB J., 1989, Vol. 3, Seite 145-151
36. Erdös, E. G.; Wagner, B.; Harbury, C. B.; Painter, R. G.; Skidgel, R. A.; Fa, X. G.
Down-regulation and inactivation of neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) in human neutrophils
J. Biol. Chem., 1989, Vol. 264, Seite 14519-14523
37. Falke, N. E.; Fischer, E. G.
Cell shape of polymorphonuclear leukocytes is influenced by opioids
Immunobiology, 1985, Vol. 169, Seite 532-539
38. Fauth, U.; Heinrichs, W.; Puente-Gonzalez, I.; Halmagyi, M.
Maximale Umsatzraten an Enzymen der Glykolyse und des Zitratzyklus von separierten Granulozyten in der postoperativen Phase. [Maximal turnover rates of glycolysis enzymes and of the citrate cycle of separated granulocytes in the postoperative period]
Infusionstherapie., 1990, Vol. 17, Seite 178-183

39. Fecho, K.; Marslonek, KA.; Dykstra, LA.; Lysle, DT.
Mechanisms whereby macrophage-derived nitric oxide is involved in morphine-induced suppression of splenic lymphocyte proliferation
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1995, Vol. 272, Seite 477-483
40. Fimiani, C.; Liberty, T.; Aquirre, A. J.; Amin, I.; Ali, N.; Stefano, G. B.
Opiate, cannabinoid, and eicosanoid signaling converges on common intracellular pathways nitric oxide coupling
Prostaglandins Other Lipid Mediat., 1999, Vol. 57, Seite 23-34
41. Fischer, E. G.; Falke, N. E.
Beta-endorphin modulates immune functions. A review
Psychother. Psychosom., 1984, Vol. 42, Seite 195-204
42. Flores, L. R.; Wahl, S. M.; Bayer, B. M.
Mechanisms of morphine-induced immunosuppression: effect of acute morphine administration on lymphocyte trafficking
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1995, Vol. 272, Seite 1246-1251
43. Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Starke, K.
Opioidanalgetika
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
7., völlig neu bearbeitete Auflage, Seite 207-214
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1996
44. Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Starke, K.
Zwölf wichtige Transmitter
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
7., völlig neu bearbeitete Auflage, Seite 113-127
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1996
45. Fuchs, M.
Untersuchungen zur Regulation der Homöostase im Aminosäure- und alpha-Ketosäurestoffwechsel von Hepatocyten im Perfusionsmodell
Inaugural Dissertation im Fach Biochemie an der Freien Universität Berlin, 1998
46. Fürst, P.; Stehle, P.; Graser, T. A.
Fortschritte in der Aminosäureanalytik unter besonderer Berücksichtigung der Ermittlung intrazellulärer Aminosäuremuster. [Progress in the analysis of amino acids with special reference to the determination of the intracellular amino acid pattern]
Infusionsther. Klin. Ernähr., 1987, Vol. 14, Seite 137-146
47. Gavériaux, R. C.; Matthes, H. W.; Peluso, J.; Kieffer, B. L.
Abolition of morphine-immunosuppression in mice lacking the mu-opioid receptor gene
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 1998, Vol. 95, Seite 6326-6330
48. Gelb, A. W.; Lok, P.
Etomidate reversibly depresses human neutrophil chemiluminescence
Anesthesiology, 1987, Vol. 66, Seite 60-63
49. Goldfarb, G.; Belghiti, J.; Gautero, H.; Boivin, P.
In vitro effect of benzodiazepines on polymorphonuclear leukocyte oxidative activity
Anesthesiology, 1984, Vol. 60, Seite 57-60

50. Gonzalez, R. J.; Moore, E. E.; Ciesla, D. J.; Biffi, W. L.; Offner, P. J.; Silliman, C. C.
Phospholipase A(2)-derived neutral lipids from posthemorrhagic shock mesenteric lymph prime the neutrophil oxidative burst
Surgery, 2001, Vol. 130, Seite 198-203
51. Haslett, C.; Guthrie, L. A.; Kopaniak, M. M.; Johnston, R. B.; Henson, P. M.
Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide
Am. J. Pathol., 1985, Vol. 119, Seite 101-110
52. 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, Vol. 42, Seite 518-526
53. Herwald, H.; Dedio, J.; Kellner, R.; Loos, M.; Muller-Esterl, W.
Isolation and characterization of the kininogen-binding protein p33 from endothelial cells. Identity with the gC1q receptor
J. Biol. Chem., 1996, Vol. 271, Seite 13040-13047
54. Hjorth, R.; Jonsson, A. K.; Vretblad, P.
A rapid method for purification of human granulocytes using percoll. A comparison with dextran sedimentation
J. Immunol. Methods, 1981, Vol. 43, Seite 95-101
55. Ho, W. K.; Cheung, K. W.; Leung, K. N.; Wen, H. L.
Suppression of immunological functions in morphine addicted mice
NIDA Res Monogr, 1986, Vol. 75, Seite 599-602
56. Hofbauer, R.; Frass, M.; Gmeiner, B.; Sandor, N.; Schumann, R.; Wagner, O.; Kaye, A. D.
Effects of remifentanil on neutrophil adhesion, transmigration, and intercellular adhesion molecule expression
Acta Anaesthesiol. Scand., 2000, Vol. 44, Seite 1232-1237
57. Horsburgh, C. R. J.; Anderson, J. R.; Boyko, E. J.
Increased incidence of infections in intravenous drug users
Infect Control Hosp Epidemiol, 1989, Vol. 10, Seite 211-215
58. Houpert, Y.; Tarallo, P.; Siest, G.
Quantitative determination of granulocytic amino acids in healthy men and women
Clin. Chim. Acta, 1976, Vol. 69, Seite 383-386
59. Jaeger, K.; Scheinichen, D.; Heine, J.; Andre, M.; Bund, M.; Piepenbrock, S.; Leuwer, M.
Remifentanil, fentanyl, and alfentanil have no influence on the respiratory burst of human neutrophils in vitro
Acta Anaesthesiol. Scand., 1998, Vol. 42, Seite 1110-1113
60. Johnson, C.; Metcalf, J.
Relation of protein synthesis to plasma and cell amino acids in neonates
Pediatr. Res., 1986, Vol. 20, Seite 140-146
61. Johnson, H. M.; Smith, E. M.; Torres, B. A.; Blalock, J. E.
Regulation of the in vitro antibody response by neuroendocrine hormones
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1982, Vol. 79, Seite 4171-4174

62. Johnson, J. L.; Moore, E. E.; Partrick, D. A.; Tamura, D. Y.; Zallen, G.; Elzi, D. J.; Silliman, C. C.; Patrick, D. A.
Extracellular signal-related kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways serve opposite roles in neutrophil cytotoxicity
Arch. Surg., 1999, Vol. 134, Seite 1074-1078
63. Kettle, A. J.; Carr, A. C.; Winterbourn, C. C.
Assays using horseradish peroxidase and phenolic substrates require superoxide dismutase for accurate determination of hydrogen peroxide production by neutrophils
Free Radic. Biol. Med., 1994, Vol. 17, Seite 161-164
64. Kirk, R. E.
Experimental design
2nd Edition, Brooks/Cole, Monterey, California, 1982
65. Krumholz, W.
Der Einfluß ausgewählter intravenöser Anästhetika auf verschiedene Funktionen polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten
Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 1991
66. Krumholz, W.; Demel, C.; Jung, S.; Meuthen, G.; Hempelmann, G.
The influence of fentanyl and alfentanil on functions of human polymorphonuclear leukocytes in vitro
Acta Anaesthesiol. Scand., 1993, Vol. 37, Seite 386-389
67. Krumholz, W.; Demel, C.; Jung, S.; Meuthen, G.; Hempelmann, G.
The influence of intravenous anaesthetics on polymorphonuclear leukocyte function
Can. J. Anaesth., 1993, Vol. 40, Seite 770-774
68. 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, Vol. 12, Seite 141-146
69. 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, Vol. 41, Seite 446-449
70. Krumholz, W.; Endrass, J.; Hempelmann, G.
Inhibition of phagocytosis and killing of bacteria by anaesthetic agents in vitro
Br. J. Anaesth., 1995, Vol. 75, Seite 66-70
71. Krumholz, W.; Endrass, J.; Knecht, J.; Hempelmann, G.
The effects of midazolam, droperidol, fentanyl, and alfentanil on phagocytosis and killing of bacteria by polymorphonuclear leukocytes in vitro
Acta Anaesthesiol. Scand., 1995, Vol. 39, Seite 624-627
72. Krumholz, W.; Jorgall, H.; Käbisch, S.; Hempelmann, G.
Narkoseeinleitungsmittel und Granulozytenadhärenz. [Anesthesia induction agents and granulocyte adherence]
Anästh. Intensivther. Notfallmed., 1988, Vol. 23, Seite 69-72

73. Krumholz, W.; Käbisch, S.; Biscoping, J.; Hempelmann, G.
Über Veränderungen der Adhärenz polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten durch die intravenösen Anästhetika Midazolam und Ketamin
Anästh. Intensivther. Notfallmed., 1987, Vol. 22, Seite 211-213
74. Krumholz, W.; Weber, C.; Käbisch, S.; Hempelmann, G.
Der Einfluss von Opioiden auf die Granulozytenadhärenz. [Effect of opioids on granulocyte adherence]
Anästh. Intensivther. Notfallmed., 1988, Vol. 23, Seite 313-315
75. Krumholz, W.; Weidenbusch, H.; Menges, T.; Keller, G.; Hempelmann, G.
The influence of intravenous anaesthetics on the activity of enzymes released from polymorphonuclear leucocytes in vitro
Eur. J. Anaesthesiol., 2001, Vol. 18, Seite 151-158
76. Kulkarni-Narla, A.; Walcheck, B.; Brown, D. R.
Opioid receptors on bone marrow neutrophils modulate chemotaxis and CD11b/CD18 expression
Eur. J. Pharmacol., 2001, Vol. 414, Seite 289-294
77. Kuriyama, K.; Yoneda, Y.
Morphine induced alterations of gamma-aminobutyric acid and taurine contents and L-glutamate decarboxylase activity in rat spinal cord and thalamus: possible correlates with analgesic action of morphine
Brain Res., 1978, Vol. 148, Seite 163-179
78. Kuwabara, M.; Takahashi, T. A.; Nagahata, H.; Inanami, O.
Spin-trapping detection of superoxides in polymorphonuclear leukocytes stimulated with serum-opsinized zymosan
Jpn. J. Vet. Res., 2000, Vol. 48, Seite 3-13
79. Learn, D. B.; Fried, V. A.; Thomas, E. L.
Taurine and hypotaurine content of human leukocytes
J. Leukoc. Biol., 1990, Vol. 48, Seite 174-182
80. Lee, M. E.; Kweon, S. M.; Ha, K. S.; Nham, S. U.
Fibrin stimulates microfilament reorganization and IL-1beta production in human monocytic THP-1 cells
Mol. Cells, 2001, Vol. 11, Seite 13-20
81. Lichtenberger, C.; Zakeri, S.; Baier, K.; Willheim, M.; Holub, M.; Reinisch, W.
A novel high-purity isolation method for human peripheral blood neutrophils permitting polymerase chain reaction-based mRNA studies
J. Immunol. Methods, 1999, Vol. 227, Seite 75-84
82. Lindena, J.; Burkhardt, H.
Separation and chemiluminescence properties of human, canine and rat polymorphonuclear cells
J. Immunol. Methods, 1988, Vol. 115, Seite 141-147
83. Luza, J.
Effect of morphine on phagocytic activity of the polymorphonuclears and monocytes
Acta Univ Palacki. Olomuc. Fac. Med, 1992, Vol. 134, Seite 47-50

84. Magazine, H. I.; Liu, Y.; Bilfinger, T. V.; Fricchione, G. L.; Stefano, G. B.
Morphine-induced conformational changes in human monocytes, granulocytes, and endothelial cells and in invertebrate immunocytes and microglia are mediated by nitric oxide
J. Immunol., 1996, Vol. 156, Seite 4845-4850
85. Makman, M. H.; Bilfinger, T. V.; Stefano, G. B.
Human granulocytes contain an opiate alkaloid-selective receptor mediating inhibition of cytokine-induced activation and chemotaxis
J. Immunol., 1995, Vol. 154, Seite 1323-1330
86. Malfroy, B.; Swerts, J. P.; Guyon, A.; Roques, B. P.; Schwartz, J. C.
High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine
Nature, 1978, Vol. 276, Seite 523-526
87. Marotti, T.; Balog, T.; Munic, V.; Sobocnec, S.; Abramic, M.
The link between met-enkephalin-induced down-regulation of APN activity and the release of superoxide anion
Neuropeptides, 2000, Vol. 34, Seite 121-128
88. Maslen, C.; Stevens, T. R.; Hall, N. D.
The generation of lipid peroxides by stimulated human neutrophils. Detection using phenol red oxidation
J. Immunol. Methods, 1987, Vol. 98, Seite 71-76
89. Masuda, M.; Horisaka, K.; Koeda, T.
Influences of taurine on functions of rat neutrophils
Jpn. J. Pharmacol., 1984, Vol. 34, Seite 116-118
90. Masuda, M.; Horisaka, K.; Koeda, T.
[Role of taurine in neutrophil function]
Nippon Yakurigaku Zasshi, 1984, Vol. 84, Seite 283-292
91. Masuda, M.; Horisaka, K.; Koeda, T.
Effects of taurine on neutrophil function in hyperlipidemic rats
Jpn. J. Pharmacol., 1986, Vol. 40, Seite 478-480
92. Maxwell, S.; Delaney, H.
Designing experiments and analysing data
Seite 438-449, Belmont CA, Wadsworth, 1990
93. Mazorow, D. L.; Simpkins, C. O.; Millar, D. B.
Beta-endorphin modulates calcium channel activity in human neutrophils
J. Neuroimmunol., 1994, Vol. 50, Seite 77-83
94. Mazzone, A.; Ricevuti, G.; Pasotti, D.; Fioravanti, A.; Marcoli, M.; Lecchini, S.; Notario, A.; Frigo, G. M.
Peptide opioids and morphine effects on inflammatory process
Inflammation, 1990, Vol. 14, Seite 717-726
95. McCarthy, L.; Wetzel, M.; Sliker, J. K.; Eisenstein, T. K.; Rogers, T. J.
Opioids, opioid receptors, and the immune response
Drug Alcohol Depend., 2001, Vol. 62, Seite 111-123

96. McLoughlin, D. M.; Stapleton, P. P.; Bloomfield, F. J.
Influence of taurine and a substituted taurine on the respiratory burst pathway in the inflammatory response
Biochem. Soc. Trans., 1991, Vol. 19, Seite 73-78
97. Menzebach, A.
Differente Effekte von Opiaten und Opioidpeptiden auf die Funktion neutrophiler Granulozyten
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2001
98. Morisaki, H.; Tanaka, T.; Ishimura, Y.; Takeda, J.; Sekiguchi, H.; Nagano, M.
In vitro effect of additives in benzodiazepine solutions on the superoxide anion-generating system in polymorphonuclear leucocytes
Br. J. Anaesth., 1991, Vol. 66, Seite 97-102
99. Mühling, J.; Campos, M. E.; Sablotzki, A.; Krüll, M.; Dehne, M. G.; Gonther, J.; Weiss, S.; Fuchs, M.; Hempelmann, G.
Effects of propofol and taurine on intracellular free amino acid profiles and immune function markers in neutrophils in vitro
Clin. Chem. Lab. Med, 2002, Vol. 40, Seite 111-121
100. Mühling, J.; Fuchs, M.; Dehne, M. G.; Sablotzki, A.; Menges, T.; Weber, B.; Hempelmann, G.
Quantitative determination of free intracellular amino acids in single human polymorphonuclear leucocytes. Recent developments in sample preparation and high-performance liquid chromatography
J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., 1999, Vol. 728, Seite 157-166
101. Mühling, J.; Fuchs, M.; Sablotzki, A.; Krüll, M.; Ogal, H. P.; Weiss, S.; Dehne, M. G.; Engel, J.; Hempelmann, G.
Methohexital affects neutrophil (PMN) dynamic free amino acid pool and immune functions in vitro
Eur. J. Anaesthesiol., 2001, Vol. 18, Seite 366-376
102. Mühling, J.; Knülle, V.; Fuchs, M.; Dehne, M. G.; Weiss, S.; Hempelmann, G.
The effects of thiopentone on free intracellular amino acids in polymorphonuclear leucocytes
Amino. Acids, 2000, Vol. 18, Seite 239-249
103. Mühling, J.; Sablotzki, A.; Fuchs, M.; Krüll, M.; Dehne, M. G.; Weiss, S.; Gonter, J.; Quandt, D.; Hempelmann, G.
Effects of diazepam on neutrophil (PMN) free amino acid profiles and immune functions in vitro. Metabolical and immunological consequences of L-alanyl-L-glutamine supplementation
J. Nutr. Biochem, 2001, Vol. 12, Seite 46-54
104. Mühling, J.; Weiss, S.; Knülle, V.; Sablotzki, A.; Dehne, M. G.; Hempelmann, G.
Effects of etomidate on free intracellular amino acid concentrations in polymorphonuclear leucocytes in vitro
Acta Anaesthesiol. Scand., 2000, Vol. 44, Seite 429-435
105. Naskalski, J. W.
Myeloperoxidase inactivation in the course of catalysis of chlorination of taurine
Biochim. Biophys. Acta, 1977, Vol. 485, Seite 291-300
106. Newsholme, E. A.; Calder, P. C.
The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and speculative consequences for the whole animal
Nutrition, 1997, Vol. 13, Seite 728-730

107. Ng, T. B.; Cheng, C. H.; Hui, S. T.
Peripheral administration of taurine antagonizes morphine-induced analgesia in mice
Gen. Pharmacol., 1993, Vol. 24, Seite 311-314
108. Noto, T.; Hepler, J. R.; Myers, R. D.
Profile of amino acid synthesis in rat hippocampus during push-pull perfusion of ethanol or morphine
Neuroscience, 1984, Vol. 13, Seite 367-376
109. Ohmori, M.; Kitoh, Y.; Harada, K.; Sugimoto, K.; Fujimura, A.
Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) functions in SHR, L-
J. Hypertens., 2000, Vol. 18, Seite 703-707
110. Oliveira-Silva, S.; Ximenes, V. F.; Catalani, L. H.; Campa, A.
Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils
Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, Vol. 279, Seite 657-662
111. Pabst, M. J.; Pabst, K. M.; Collier, J. A.; Coleman, T. C.; Lemons-Prince, M. L.; Godat, M. S.; Waring, M. B.; Babu, J. P.
Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine
J. Periodontol., 1995, Vol. 66, Seite 1047-1055
112. Partrick, D. A.; Moore, E. E.; Fullerton, D. A.; Barnett, C. C., Jr.; Meldrum, D. R.; Silliman, C. C.
Cardiopulmonary bypass renders patients at risk for multiple organ failure via early neutrophil priming and late neutrophil disability
J. Surg. Res., 1999, Vol. 86, Seite 42-49
113. Partrick, D. A.; Moore, E. E.; Offner, P. J.; Meldrum, D. R.; Tamura, D. Y.; Johnson, J. L.; Silliman, C. C.
Maximal human neutrophil priming for superoxide production and elastase release requires p38 mitogen-activated protein kinase activation
Arch. Surg., 2000, Vol. 135, Seite 219-225
114. Pasnik, J.; Tchorzewski, H.; Baj, Z.; Luciak, M.; Tchorzewski, M.
Priming effect of met-enkephalin and beta-endorphin on chemiluminescence, chemotaxis and CD11b molecule expression on human neutrophils in vitro
Immunol. Lett., 1999, Vol. 67, Seite 77-83
115. Pasotti, D.; Mazzone, A.; Ricevuti, G.
Sistema nervoso e sistema immunitario: ruolo della morfina e dei peptidi oppioidi su alcune funzioni dei granulociti neutrofilici. [The nervous system and the immune system: the role of morphine and opioid peptides in the function of neutrophilic granulocytes]
Minerva Med., 1992, Vol. 83, Seite 433-438
116. Pick, E.; Keisari, Y.
A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture
J. Immunol. Methods, 1980, Vol. 38, Seite 161-169
117. Pruitt, K. M.; Kamau, D. N.; Miller, K.; Mansson-Rahemtulla, B.; Rahemtulla, F.
Quantitative, standardized assays for determining the concentrations of bovine lactoperoxidase, human salivary peroxidase, and human myeloperoxidase
Anal. Biochem., 1990, Vol. 191, Seite 278-286

118. Rajkovic, I. A.; Williams, R.
Rapid microassays of phagocytosis, bacterial killing, superoxide and hydrogen peroxide production by human neutrophils in vitro
J. Immunol. Methods, 1985, Vol. 78, Seite 35-47
119. Ratasirayakorn, W.; Leone, P.; Leblebicioglu, B.; Walters, J. D.
Polyamines found in the inflamed periodontium inhibit priming and apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes
J. Periodontol., 1999, Vol. 70, Seite 179-184
120. Rebecchi, I. M.; Ferreira-Novo, N.; Julian, Y.; Campa, A.
Oxidative metabolism and release of myeloperoxidase from polymorphonuclear leukocytes obtained from blood sedimentation in a Ficoll-Hypaque gradient
Cell Biochem. Funct., 2000, Vol. 18, Seite 127-132
121. Redmond, H. P.; Stapleton, P. P.; Neary, P.; Bouchier, H. D.
Immunonutrition: the role of taurine
Nutrition, 1998, Vol. 14, Seite 599-604
122. Reyero, C.; Dorner, F.
Purification of arginases from human-leukemic lymphocytes and granulocytes: study of their physicochemical and kinetic properties
Eur. J. Biochem., 1975, Vol. 56, Seite 137-147
123. Rodriguez-Bano, J.; Pascual, A.; Ballesta, S.; Garcia, I.; Perea, E. J.
[Penetration of azithromycin into human neutrophils: effect of hydrogen peroxide production]
Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., 1997, Vol. 15, Seite 196-199
124. Rogalinska, M.; Blonski, J.; Robak, T.; Kilianska, Z. M.
Enzyme-linked immunosorbent assay in screening of leukemia-associated nuclear proteins
Cell Mol. Biol. Lett., 2001, Vol. 6, Seite 637-648
125. Rose, S.; Fiebrich, M.; Weber, P.; Dike, J.; Buhren, V.
Neutrophil activation after skeletal muscle ischemia in humans
Shock, 1998, Vol. 9, Seite 21-26
126. Roth, E.; Karner, J.
Intrazelluläre Aminosäurenkonzentrationen bei verschiedenen Krankheitszuständen. [Intracellular amino acid concentrations in various disease states]
Infusionsther. Klin. Ernähr., 1987, Vol. 14, Seite 147-150
127. Roth, E.; Spittler, A.; Oehler, R.
Glutamin: Wirkungen auf das Immunsystem, auf Eiweißshaushalt und Darmfunktionen. [Glutamine: effects on the immune system, protein balance and intestinal functions]
Wien. Klin. Wochenschr., 1996, Vol. 108, Seite 669-676
128. Schmitt, M.; Keller, H. U.; Cottier, H.
Qualitative and quantitative assesment of human polymorphonuclear leukocyte (PMNL) functions
Beitr. Infusionsther. Klin. Ernähr., 1986, Vol. 15, Seite 196-203
129. Scholz, J.; Steinfath, M.
Analgetika
Anästhesiologie (Hrsg.: Hempelmann, G.; Krier, C.; Schulte am Esch, J.), Seite 228-242
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2001

130. Schuller-Levis, G. B.; Sturman, J. A.
"Activation" of alveolar leukocytes isolated from cats fed taurine-free diets
Adv. Exp. Med. Biol., 1992, Vol. 315, Seite 83-90
131. Seifert, R.; Burde, R.; Schultz, G.
Lack of effect of opioid peptides, morphine and naloxone on superoxide formation in human neutrophils and HL-60 leukemic cells
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 1989, Vol. 340, Seite 101-106
132. Sharp, B. M.; Keane, W. F.; Suh, H. J.; Gekker, G.; Tsukayama, D.; Peterson, P. K.
Opioid peptides rapidly stimulate superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and macrophages
Endocrinology, 1985, Vol. 117, Seite 793-795
133. Sharp, B. M.; Tsukayama, D. T.; Gekker, G.; Keane, W. F.; Peterson, P. K.
Beta-endorphin stimulates human polymorphonuclear leukocyte superoxide production via a stereoselective opiate receptor
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1987, Vol. 242, Seite 579-582
134. Shipp, M. A.; Stefano, G. B.; D'Adamio, L.; Switzer, S. N.; Howard, F. D.; Sinisterra, J.; Scharrer, B.; Reinherz, E. L.
Downregulation of enkephalin-mediated inflammatory responses by CD10/neutral endopeptidase 24.11
Nature, 1990, Vol. 347, Seite 394-396
135. Shipp, M. A.; Stefano, G. B.; Switzer, S. N.; Griffin, J. D.; Reinherz, E. L.
CD10 (CALLA)/neutral endopeptidase 24.11 modulates inflammatory peptide-induced changes in neutrophil morphology, migration, and adhesion proteins and is itself regulated by neutrophil activation
Blood, 1991, Vol. 78, Seite 1834-1841
136. Simpkins, C. O.; Alailima, S. T.; Tate, E. A.
Inhibition by naloxone of neutrophil superoxide release: a potentially useful antiinflammatory effect
Circ. Shock, 1986, Vol. 20, Seite 181-191
137. Soulika, A. M.; Khan, M. M.; Hattori, T.; Bowen, F. W.; Richardson, B. A.; Hack, C. E.; Sahu, A.; Edmunds, L. H., Jr.; Lambris, J. D.
Inhibition of heparin/protamine complex-induced complement activation by Compstatin in baboons
Clin. Immunol., 2000, Vol. 96, Seite 212-221
138. Stangel, W.; Seidel, J.; Mirkani, J.
Granulozytenfunktionen in gelagerten Blutkonserven
Beitr. Infusionsther. Klin. Ernähr., 1986, Vol. 15, Seite 231-241
139. Stapleton, P. P.; Molloy, A. M.; Rogers, S.; Bloomfield, F. J.
Neutrophil taurine in psoriasis
Ir. J. Med. Sci., 1996, Vol. 165, Seite 173-176
140. Stapleton, P. P.; O'Flaherty, L.; Redmond, H. P.; Bouchier-Hayes, D. J.
Host defense - a role for the amino acid taurine?
JPEN J. Parenter. Enteral Nutr., 1998, Vol. 22, Seite 42-48

141. Stefano, G. B.
Role of opioid neuropeptides in immunoregulation
Prog. Neurobiol., 1989, Vol. 33, Seite 149-159
142. Stefano, G. B.; Goumon, Y.; Bilfinger, T. V.; Welters, I. D.; Cadet, P.
Basal nitric oxide limits immune, nervous and cardiovascular excitation: human endothelia express a mu opiate receptor
Prog. Neurobiol., 2000, Vol. 60, Seite 513-530
143. Stefano, G. B.; Hartman, A. R.; Bilfinger, T. V.; Magazine, H. I.; Liu, Y.; Casares, F.; Goligorsky, M. S.
Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilatation
J. Biol. Chem., 1995, Vol. 270, Seite 30290-30293
144. Stefano, G. B.; Melchiorri, P.; Negri, L.; Hughes, T. K., Jr.; Scharrer, B.
TI - [D-Ala2]deltorphin I binding and pharmacological evidence for a special subtype of delta opioid receptor on human and invertebrate immune cells
AD - Multidisciplinary Center for the Study of Aging, State University of New York, Old Westbury 11568
145. Stefano, G. B.; Scharrer, B.; Smith, E. M.; Hughes, T. K.; Magazine, H. I.; Bilfinger, T. V.; Hartman, A. R.; Fricchione, G. L.; Liu, Y.; Makman, M. H.
Opioid and opiate immunoregulatory processes
Crit Rev. Immunol., 1996, Vol. 16, Seite 109-144
146. Su, Z.; Ishida, H.; Fukuyama, N.; Todorov, R.; Genka, C.; Nakazawa, H.
Peroxyntirite is not a major mediator of endothelial cell injury by activated neutrophils in vitro
Cardiovasc. Res., 1998, Vol. 39, Seite 485-491
147. Szutowicz, A.; Kobes, R. D.; Orsulak, P. J.
Colorimetric assay for monoamine oxidase in tissues using peroxidase and 2,2'-azinodi(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) as chromogen
Anal. Biochem., 1984, Vol. 138, Seite 86-94
148. Trevani, A. S.; Andonegui, G.; Giordano, M.; Lopez, D. H.; Gamberale, R.; Minucci, F.; Geffner, J. R.
Extracellular acidification induces human neutrophil activation
J. Immunol., 1999, Vol. 162, Seite 4849-4857
149. Udilova, N.
Vergleichende Untersuchungen von Methoden zum Nachweis von Superoxidradikalen in biologischen Modellsystemen
Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium im Fach Physik eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt Universität zu Berlin 1999
150. Van Epps, D. E.; Kutvirt, S. L.
Modulation of human neutrophil adherence by beta-endorphin and met-enkephalin
J. Neuroimmunol., 1987, Vol. 15, Seite 219-228
151. Van Epps, D. E.; Saland, L.
Beta-endorphin and met-enkephalin stimulate human peripheral blood mononuclear cell chemotaxis
J. Immunol., 1984, Vol. 132, Seite 3046-3053

152. Venezia, R. D.; Jenzano, J. W.; Lundblad, R. L.
Differentiation of myeloperoxidase and glandular peroxidase in biological fluids: application to human saliva
J. Clin. Lab Anal., 1991, Vol. 5, Seite 57-59

153. Weening, R. S.; Wever, R.; Roos, D.
Quantitative aspects of the production of superoxide radicals by phagocytizing human granulocytes
J. Lab. Clin. Med., 1975, Vol. 85, Seite 245-251

154. Weiss, S.; Mühling, J.; Gonter, J.; Quandt, D.; Hempelmann, G.
Flunitrazepam beeinflusst den freien intrazellulären Aminosäurestoffwechsel in polymorphkernigen Granulozyten
Intensivmedizin und Notfallmedizin, 2000, Vol. 37 Supplement 2, Seite 89-89

155. Welters, I. D.; Fimiani, C.; Bilfinger, T. V.; Stefano, G. B.
NF-kappaB, nitric oxide and opiate signaling
Med. Hypotheses, 2000, Vol. 54, Seite 263-268

156. Welters, I. D.; Menzebach, A.; Goumon, Y.; Cadet, P.; Menges, T.; Hughes, T. K.; Hempelmann, G.; Stefano, G. B.
Morphine inhibits NF-kappaB nuclear binding in human neutrophils and monocytes by a nitric oxide-dependent mechanism
Anesthesiology, 2000, Vol. 92, Seite 1677-1684

157. Welters, I. D.; Menzebach, A.; Goumon, Y.; Langefeld, T. W.; Teschemacher, H.; Hempelmann, G.; Stefano, G. B.
Morphine suppresses complement receptor expression, phagocytosis, and respiratory burst in neutrophils by a nitric oxide and mu(3) opiate receptor-dependent mechanism
J. Neuroimmunol., 2000, Vol. 111, Seite 139-145

158. White, I. W.; Gelb, A. W.; Wexler, H. R.; Stiller, C. R.; Keown, P. A.
The effects of intravenous anaesthetic agents on human neutrophil chemiluminescence
Can. Anaesth. Soc. J., 1983, Vol. 30, Seite 506-511

159. Wiedermann, C. J.; Schratzberger, P.; Kahler, C. M.
Migration of neutrophils across endothelial monolayers is stimulated by treatment of the monolayers with beta-endorphin
Brain Behav. Immun., 1994, Vol. 8, Seite 270-277

160. Yeager, M. P.; Procopio, M. A.; DeLeo, J. A.; Arruda, J. L.; Hildebrandt, L.; Howell, A. L.
Intravenous Fentanyl Increases Natural Killer Cell Cytotoxicity and Circulating CD16(+) Lymphocytes in Humans
Anesth. Analg., 2002, Vol. 94, Seite 94-99

6.5 Kurzfassung (deutsch)

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) spielen im menschlichen Immunsystem eine zentrale Rolle. Sie sind in der Lage, opsonisierte pathogene Keime im Rahmen der Phagozytose in das Zellinnere aufzunehmen und durch die Produktion zytotoxischer Sauerstoffmetabolite während des „oxidative burst“ zu zerstören. Dabei sind PMN anderen Zellen wegen ihrer Funktionalität und ihrer hohen Zellumsatzrate überlegen. Eine besondere Bedeutung für Funktion und Integrität von PMN besitzt nach neueren Untersuchungen der intragranulozytäre Aminosäurestoffwechsel. Dieser kann, nach bisher vorliegenden Erkenntnissen, unter anderem durch Medikamente gestört werden, was eine schwere Funktionseinschränkung der Zelle zur Folge haben kann.

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss von Opioidalkaloiden und Opioidpeptiden auf die freien intrazellulären Aminosäuren und die Immunfunktion von PMN zu untersuchen. Hierzu wurde gesunden freiwilligen Probanden Blut entnommen und mit Morphin, Fentanyl oder β -Endorphin inkubiert. Im Anschluss daran wurden die PMN aus dem Vollblut isoliert und die freien intrazellulären Aminosäuren mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) quantitativ analysiert. Parallel dazu wurde zur Darstellung der Immunfunktion die Fähigkeit der Zelle Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen zu produzieren sowie die Aktivität der sezernierten Myeloperoxidase spektralphotometrisch quantitativ bestimmt.

Mit diesen Untersuchungen konnte klar gezeigt werden, dass Morphin bei PMN konzentrations- und zeitabhängig zu einer signifikanten Reduktion der Superoxidanionen- und Wasserstoffperoxidproduktion führt. Ein Einfluss von Morphin auf die freien intrazellulären Aminosäuren in PMN konnte nicht festgestellt werden. Demgegenüber zeigte sich Fentanyl in allen Versuchen sowohl bei den gemessenen Immunfunktionsparametern als auch bei den freien intrazellulären Aminosäuren inert. β -Endorphin hingegen zeigte lediglich eine nicht signifikante Hemmung der Superoxidanion- und Wasserstoffperoxidbildung bei hohen β -Endorphin-Konzentrationen. Die freien intrazellulären Aminosäuren in PMN wurden durch β -Endorphin nicht beeinflusst.

6.6 Kurzfassung (englisch)

Polymorphonuclear leucocytes (PMN) play a crucial role in the human immune system. They are able to absorb opsonized pathogenic germs into the cell interior through phagocytosis and to destroy them by producing cytotoxic oxygen metabolites during the "oxidative burst". PMN are thus superior to other cells due to the way they function and their high turnover-rate. New studies show the great importance of the intracellular amino acid metabolism for the function of PMN. Current findings indicate that among other things many drugs may influence the amino acid metabolism, which can result in a severe limitation of cellular functions.

The aim of the present study was to investigate the influence of opioid alkaloids and opioid peptides on the free intracellular amino acid pool and the immune function of PMN. For this purpose blood was taken from healthy volunteers and was incubated either with morphine, fentanyl or beta-endorphine. After that PMN were extracted from the whole blood samples and the quantity of free intracellular amino acids was analysed by means of high-pressure liquid chromatography (HPLC). At the same time, to demonstrate the immune function, the ability of the cell to generate hydrogen peroxide and superoxide anion and the activity of the released myeloperoxidase was analysed by spectral photometry.

As a result of this study it can be clearly shown that morphine significantly reduces the superoxide anion and hydrogen peroxide production in PMN, whereby the rate of reduction depends on the time of incubation and the concentration. An influence of morphine on PMN's free intracellular amino acids could not be established. Fentanyl showed in the immune function assays as well as in the amino acid assays inert behaviour. Beta-endorphine only caused an insignificant inhibition of superoxide anion and hydrogen peroxide production in high concentration ranges. Free intracellular amino acids were not affected by beta-endorphine.

6.7 Erklärung zur Durchführung der Dissertation

Ich, Stefan Weiß, erkläre:

„Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, 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.“

6.8 Lebenslauf

▪ PERSÖNLICHE ANGABEN

Name	Stefan Weiß
Geburtsdatum	07.06.1974
Geburtsort	Giessen
Familienstand	ledig

▪ SCHULAUSSBILDUNG

1980 – 1984	Grundschule in Giessen-Allendorf
1984 – 1990	Brüder-Grimm-Schule in Giessen-Kleinlinden
1990 – 1993	Liebigschule in Giessen (Abschluss Abitur)

▪ ZIVILDIENT UND AUSBILDUNG

1993 – 1994	Zivildienst in der stationären Altenpflege im Altenpflegeheim der Arbeiterwohlfahrt in Giessen
1995 – 2001	Ausbildung zum Rettungssanitäter und Tätigkeit als Rettungssanitäter bei den Johannitern Giessen

▪ STUDIUM

1995 - 2001	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen (Abschluss 3. Staatsexamen)
-------------	---

▪ BERUFLICHE TÄTIGKEIT

2001 - 2002	Arzt im Praktikum in der Abteilung Anaesthesiologie, Intensivmedizin, Schmerztherapie am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Giessen
seit 2003	Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie am Klinikum der Philipps-Universität Marburg

6.9 Danksagung

Mein Dank gilt *Prof. Dr. Dr. h.c. Gunter Hempelmann* für die Überlassung des Themas dieser Arbeit sowie für die Bereitstellung der Labors und der finanziellen Mittel, die die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Ich danke meinem Betreuer *PD Dr. Jörg Mühling* für die hervorragende Betreuung, aus der nicht nur eine wissenschaftliche Arbeit, sondern auch eine Freundschaft hervorgehen konnte. Durch ihn habe ich einen Einstieg in die Forschung gefunden, der es mir ein Leben lang ermöglicht, darauf aufzubauen.

PD Dr. Ingeborg Welters danke ich für die Anregungen und Diskussionen aus ihren Forschungsarbeiten über Opiate und Immunfunktionen.

Ich danke *Prof. Dr. Hansjörg Teschemacher* und *Beate Dickopf* vom Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie in Giessen für die Bereitsstellung des β -Endorphins und für die Lyophilisierung meiner Proben.

Mein Dank gilt *Birgit Weber* und ihren MTA-Kolleginnen in der Abteilung Anaesthesiologie, Intensivmedizin, Schmerztherapie, die mich im Labor unterstützt haben.

Iris Höschele danke ich für die Unterstützung, die sie mir bei sämtlichen Höhen und Tiefen dieser Arbeit gegeben hat.