

Benzodiazepinrezeptorabhängige Modulation intrazellulärer Amino- und alpha-Ketosäuren sowie ausgewählter Immunfunktionen polymorphkerniger Granulozyten

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer
DOKTORIN DES FACHBEREICHS MEDIZIN
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Mariam Halabi
aus Erbach/Odenwald

Gießen 2007

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

Wissenschaftliche Betreuung:

Prof. Dr. med. Jörg Mühling, MBA

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Mühling, MBA
2. Gutachter: PD Dr. H. Jomaa

Tag der Disputation: 22. Januar 2008

Meinen Eltern und Stefan

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Polymorphkernige Granulozyten	1
1.2 Immunfunktionsmarker	3
1.3 Intragranulozytärer Aminosäurestoffwechsel	5
1.4 Intragranulozytärer α -Ketosäurestoffwechsel	9
1.5 Intrazelluläre Aminosäure- und α -Ketosäureanalytik in PMN	9
1.6 Midazolam, Rezeptoragonisten bzw. –antagonisten	10
1.7 Fragestellungen	13
2 Material und Methodik	14
2.1 Hochselektive Separation von PMN aus Vollblut	14
2.2 Quantitative Aminosäureanalyse	15
2.2.1 Puffer, Lösungen und Reagenzien zur Probenvorbereitung und Fluoreszenzderivatisierung	16
2.2.1.1 Standardextraktionspuffer (primäre Aminosäuren)	16
2.2.1.2 Externe Aminosäurestandardproben (primäre Aminosäuren)	16
2.2.1.3 Boratpuffer	17
2.2.1.4 o-Phthaldialdehyd-Mercaptoethanol-Reagenz (OPA)	18
2.2.1.5 0,75 N HCl-Lösung	18
2.2.1.6 Methanol-Natriumacetatpuffer	18
2.2.1.7 HPLC- „Spüllösung“	19
2.2.2 Geräteanforderung: Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	19
2.2.3 Automatisierte Vorsäulen-Derivatisierung	20
2.2.4 Gradienten	22
2.3 Bestimmung plasmatischer und freier intrazellulärer α -Ketosäuren in PMN	23
2.3.1 Puffer, Lösungen und Reagenzien zur Probenvorbereitung und Fluoreszenzderivatisierung	23
2.3.1.1 Standardextraktionspuffer für die α -Ketosäureanalytik (SEP-KS)	23
2.3.1.2 Externe α -Ketosäurestandardproben	23
2.3.1.3 o-Phenyldiaminreagenz (PDA)	24
2.3.2 Pipettierschema der PDA-Reagenz-vermittelten halbautomatischen α -Ketosäure- Derivatisierung	25
2.3.3 Gradienten	27
2.4 Bestimmung der Immunfunktionsparameter	28
2.4.1 Bestimmung der granulozytären Superoxidanionbildung	28
2.4.2 Bestimmung der granulozytären Wasserstoffperoxidbildung	29
2.4.3 Bestimmung der Aktivität der von PMN freigesetzten Myeloperoxidase	30

2.5	Inkubation mit Anästhetika und Rezeptoragonisten bzw. –antagonisten	31
2.5.1	Midazolam	32
2.5.2	Rezeptoragonisten sowie –antagonisten	32
2.5.3	Midazolam + Rezeptoragonisten sowie –antagonisten	33
2.6	Statistische Auswertung	34
3	Ergebnisse	36
3.1	PMN-Separation aus Vollblut	36
3.2	Bestimmung plasmatischer und freier Aminosäuren sowie α-Ketosäuren	36
3.2.1	Ergebnisse der Standardisierungs- und Validierungsverfahren	36
3.2.2	Quantifizierung primärer intragranulozytärer Amino- und α -Ketosäuren	39
3.3	Midazolam, Rezeptoragonisten und –antagonisten	43
3.3.1	Midazolam	43
3.3.1.1	Midazolam und intragranulozytärer Aminosäurepool	43
3.3.1.2	Midazolam und intragranulozytärer α -Ketosäurepool	45
3.3.1.3	Midazolam und granulozytäre Immunfunktionsmarker	46
3.3.2	Rezeptoragonisten und –antagonisten	47
3.3.2.1	Ro 5-4864, PK 11195, Flumazenil sowie Naloxon und intragranulozytäre Aminosäurekonzentration	47
3.3.2.2	Ro 5-4864, PK 11195, Flumazenil sowie Naloxon und intragranulozytärer α -Ketosäurepool	48
3.3.2.3	Ro 5-4864, PK 11195, Flumazenil sowie Naloxon und granulozytäre Immunfunktionsmarker	49
3.3.3	Midazolam + Ro 5-4864, PK 11195, Flumazenil und Naloxon	50
3.3.3.1	Midazolam jeweils kombiniert mit Ro 5-4864, PK 11195, Flumazenil sowie Naloxon und intragranulozytäre Aminosäurekonzentration	50
3.3.3.2	Midazolam jeweils kombiniert mit Ro 5-4864, PK 11195, Flumazenil sowie Naloxon und intragranulozytärer α -Ketosäurepool	52
3.3.3.3	Midazolam jeweils kombiniert mit Ro 5-4864, PK 11195, Flumazenil sowie Naloxon und granulozytäre Immunfunktionsmarker	53
4	Diskussion	54
4.1	Verwendete Methoden und Messverfahren	54
4.1.1	Quantitative PMN-Separation und Aminosäurebestimmung	54
4.1.2	α -Ketosäurebestimmung	56
4.1.3	Bestimmung der Immunfunktionsparameter	57
4.2	Diskussion der Ergebnisse	58
4.2.1	Einfluß von Midazolam und Rezeptoragonisten und –antagonisten	58
4.2.1.1	Midazolam	58
4.2.1.2	Midazolam, Rezeptoragonisten und –antagonisten	64

5 Zusammenfassung	66
5.1 Zusammenfassung (deutsch)	66
5.2 Summary	68
6 Literaturverzeichnis	70
7 Anhang	88
7.1 Ergebnistabellen	88
7.1.1 Midazolam	88
7.1.2 Rezeptoragonisten und –antagonisten	95
7.1.3 Midazolam + Rezeptoragonisten und –antagonisten	102
7.2 Glossar	109
7.3 Material, Geräte und Reagenzien	113
7.3.1 Geräte und Material	113
7.3.2 Reagenzien	114
Erklärung	116
Lebenslauf	117
Danksagung	118

1 EINLEITUNG

1.1 Polymorphkernige Granulozyten

Leukozyten, oder auch weiße Blutkörperchen genannt, sind keine einheitliche Population. Sie werden im so genannten Differentialblutbild in einem gefärbten Blutausschlag auf Grund morphologischer Kriterien (Zellgröße, Kernform, Vorhandensein und Anfärbbarkeit von Granula) unterschieden.

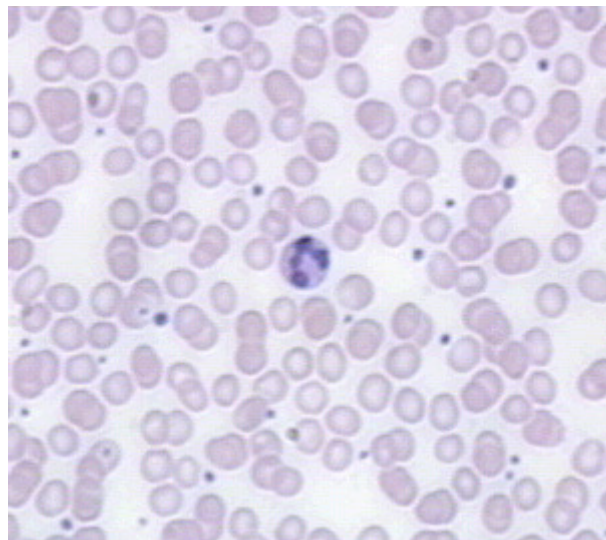


Abbildung 1: polymorphkerniger Leukozyt mit charakteristischem gelappten Kern im Blutausschlag

Neutrophile polymorphkernige Granulozyten (PMN) gehören sowohl quantitativ, mit 50-70% bilden sie die größte Leukozyten-Untergruppe, als auch qualitativ hinsichtlich ihrer immunologischen Aufgaben zu den wichtigsten Funktionsträgern der unspezifischen Infekt- und Immunabwehr des Blutes. Wie alle zellulären Bestandteile des Blutes entstehen neutrophile Granulozyten aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Ihre Reifezeit beträgt 5-10 Tage, ihre gesamte Lebenszeit etwa 12 Tage. Sie entwickeln sich im Knochenmarkstroma zu reifen Zellen. Im Blut beträgt ihre Halbwertszeit ca. 8-10 Stunden^{43,78,107}. Nur etwa 5% der Tagesproduktion befinden sich im peripheren Blut. Hiervon zirkuliert die eine Hälfte im Blutstrom, die andere Hälfte haftet als so genannter marginaler Pool am Gefäßendothel. Mehr als 90% der Granulozyten verbleiben im Knochenmark. Als hämatopoeti-

scher Wachstumsfaktor stimuliert der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF) selektiv die Granulopoese. Er induziert Differenzierung und Proliferation der Granulozytenzellreihe, bewirkt die Mobilisation des reifen neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark und reguliert Funktionen wie Chemotaxis, Migration sowie die Bildung radikaler Sauerstoffspezies^{8,9,42,107,113,167,175}.

Nach der Freisetzung aus dem Knochenmark zirkulieren polymorphkernige Granulozyten im Blutstrom, wobei sie vor allem im Kapillargebiet engen Kontakt zum Endothel haben. Bei inflammatorischen Prozessen oder auch traumatischer Gewebsschädigung kommt es zunächst durch Entzündungsmediatoren zu einer Aktivierung von Granulozyten. Zu den humoralen Stimuli gehören Komplementkomponenten (z.B. C3a und C5a), Zytokine (z.B. Interleukin-8, Tumornekrosefaktor), Leukotriene, bakterielle Toxine oder endogene Pyrogene (z.B. Lipopolysaccharide [LPS]), die PMN entlang eines steigenden Konzentrationsgradienten aus dem Kapillarsystem ins betreffende Gebiet locken (Chemotaxis)^{14,18,185}. Weiterhin induzieren Chemokine eine vermehrte Expression von Oberflächenmolekülen, so genannte Adhäsionsmoleküle. Dies sind zum einen kohlenhydratbindende, lektinähnliche Selektine, die zunächst eine reversible Bindung an das Endothel vermitteln. Der zirkulierende Granulozyt kann dadurch an der Gefäßwand „entlangrollen“ (rolling) und seine Bewegung verlangsamen. Zum anderen exprimieren Leukozyten aber auch Integrine, die mit Oberflächenstrukturen der Gefäßendothelzelle eine feste Bindung eingehen^{41,105}. Nach dieser festen Bindung (Margination) verändern PMN ihre Gestalt und emigrieren mit Hilfe von proteolytischen Enzymen durch das Endothel postkapillärer Venolen in das extravasale Gewebe (Diapedese). Damit pathogene Agenzien erkannt und schließlich entfernt werden können, müssen diese opsonisiert, d.h. mit einem spezifischen Antikörper der IgG-Klasse oder aktiviertem Komplementfaktor C3b beladen werden. Diese binden dann an spezielle granulozytäre Rezeptoren (Fcγ)^{51,165}.

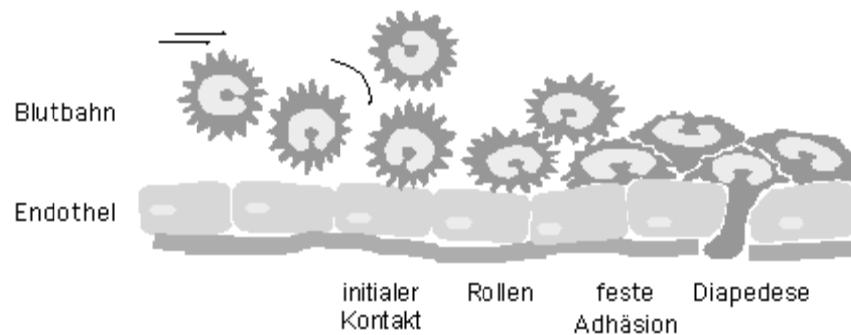
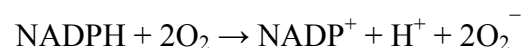


Abbildung 2: Extravasation

Nun beginnen PMN sich auszubreiten, indem sie ihre Form ändern (spreading). Sie bilden unter Aktivierung von intrazellulären Aktin- und Myosinfilamenten Zytoplasmafortsätze (Pseudopodien) aus, die den Fremdkörper bläschenartig umschließen (Phagosom)^{34,40,177}. Dieses verschmilzt im Zellinneren mit zytoplasmatischen Granula der PMN zu einem Phagolysosom, um dort durch lysosomale Enzyme und so genannte hochreaktive Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) verdaut zu werden (s. 1.2 Immunfunktionsmarker).

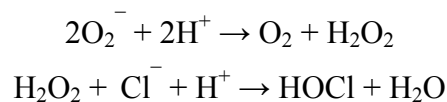
1.2 Immunfunktionsmarker

Wie bereits erwähnt, enthalten polymorphkernige Granulozyten (PMN) in ihren Granula unterschiedliche zytotoxische Stoffe und Enzyme^{63,84,129}, die im Zuge des so genannten „oxidative burst“, einer drastischen Erhöhung des nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs, gebildet werden. Die sowohl plasma- als auch lysosomenmembranständige NADPH-abhängige Oxidase^{11,28,32,45,101} bewirkt durch einen Elektronentransfer die Reduktion molekularen Sauerstoffs. Das schwach toxisch wirkende Superoxidanion-Radikal (O_2^-)^{5,85,159} gelangt anschließend durch membranständige Anionenkanäle oder auch durch direkte Membranpermeation in den Extrazellulärraum.



Durch den im entzündlichen Prozess lokal verminderten intra- und extrazellulären pH, kann das Superoxidanion durch Protonierung zu Hydroxylradikalen überführt

werden. Diese können wiederum spontan oder enzymatisch durch das Enzym Superoxiddismutase zu aktivem H_2O_2 weiterreagieren, einer gering antimikrobiellen Sauerstoffverbindung mit allerdings hoher Membrangängigkeit. Das Enzym Myeloperoxidase (MPO) wird in azurophilen Granula von PMN gespeichert und ist sowohl quantitativ als auch qualitativ besonders bedeutsam für die immunologischen Funktionen der Infektabwehr. Neben azurophilen Granula enthalten PMN sekundäre (so genannte spezifische) Granula sowie tertiäre, gelatinasehaltige Granula, welche Proteasen in enzymatisch inaktiver Form enthalten^{48,64}. Wird nun im Zuge der Degranulierung die MPO in das Phagolysosom oder nach extrazellulär sezerniert, katalysiert das Enzym in Gegenwart von H_2O_2 und Halogenionen die Oxidation insbesondere von hoch aggressiven Verbindungen wie Hypochlorit (HOCl) und Hypobromit (HOBr) aber auch weiteren sehr toxischen Metaboliten^{10,68,146,184}.



Um eine überschießende Bildung dieser hoch toxischen Substanzen zu verhindern, katalysiert die MPO interessanterweise auch die Chlorinierung von Taurin^{110,158,180}.

Neben der beschriebenen effektiven Infekt- und Immunabwehr können nun aber granulozytäre Dysfunktionen, der Ausfall einzelner granulozytärer Aufgaben, überschießende Reaktionen mit Schädigung körpereigenen Gewebes oder auch ein unzureichend wirkendes antioxidatives Schutzsystem zu einer Anzahl von Krankheitszuständen führen. Einige Beispiele hierfür sind MPO-Mangel, leucocyte adhesion deficiency (LAD) oder Humane Septische Granulomatose (CGD)^{95,99}. Auch eine „unerwünschte“ Aktivierung von Granulozyten, ausgelöst durch Stress, Trauma, natürlichen Zelluntergang oder auch durch unbekannte Faktoren, ist für viele weitere Erkrankungen verantwortlich. Neutrophile Granulozyten agieren dann als so genannte „Janus Zellen“ und tragen zu der Pathogenese entgleister Entzündungsreaktionen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis, systemischen Vaskulitiden oder auch Glomerulonephritiden, bei^{1,108,117,132,169}.

Um diese mannigfachen immunologischen Funktionen schnell und effizient zu erfüllen, bedarf es, kongruent zu anderen ausdifferenzierten Gewebe- und Organzellen,

einer Vielzahl an Stoffwechselprozessen. Zum einen sind neutrophile Granulozyten in der Lage, durch einen bedeutenden Glucosestoffwechsel (Glykolyse und Glukoneogenese) sowohl in aerober als auch anaerober Umgebung (entzündetes, schlecht durchblutetes Gewebe) Energie bereitzustellen^{24,142,143}. Weiterhin verfügen sie über eine eigene Protein-, Enzym- und Lipidbiosynthese, einen aktiven Harnstoff- und Zitratzyklus^{36,37,38,130,131} sowie einen für die oxidative Phosphorylierung erforderlichen Enzymkomplex^{43,49}. Von besonderer Bedeutung für die vielzähligen, immunologischen Funktionen von Neutrophilen, wie im nachfolgenden Teil ausführlich beschrieben, scheint allerdings ein aktiver Amino- und α -Ketosäurestoffwechsel zu sein. Obwohl Zusammensetzung und Konzentrationen der intragranulozytären Amino- und α -Ketosäurepools deutliche zellartspezifische Besonderheiten aufweisen, gleichen auch an dieser Stelle PMN anderen differenzierten kernhaltigen Gewebezellen (z.B. Nieren-, Muskel- und Leberzellen). Dies macht sie speziell für wissenschaftliche, aber vor allem für klinisch-therapeutische Fragestellungen, z.B. im Rahmen eines diskontinuierlichen Monitoring schwerkranker Patienten, so interessant²⁰.

1.3 Intragranulozytärer Aminosäurestoffwechsel

Ein sehr aktiver intragranulozytärer Amino- und α -Ketosäurestoffwechsel stellt eine wichtige Komponente für die vielfältigen immunologischen Funktionen dar^{20,22,49,122,156}.

Aminosäuren sind sowohl Bausteine verschiedener Proteine und Peptide und können über den Prozess der Transaminierung ineinander umgewandelt werden. Durch ihre verschiedenen funktionellen Gruppen gewährleisten sie einen Schutz vor Oxidation und sind an der Biosynthese stickstoffhaltiger Nukleinsäuren sowie Stickstoffmonoxid (NO) beteiligt. Weiterhin gewährleisten Aminosäuren die Aufrechterhaltung vielzähliger zellulärer Funktionen durch einen effizienten Energiestoffwechsel und bewahren ihre Integrität durch osmoregulatorische und immunmodulatorische Eigenschaften.

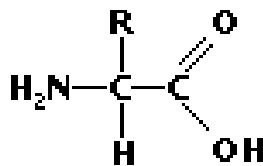


Abbildung 4: allgemeine Grundstruktur einer Aminosäure

Aminosäuren sind überdies essentielle Lieferanten für vielfältige Stoffwechsel- und Regulationsmechanismen, welche primär auf einem ausgeglichenen Bestand an intrazellulären und erst in zweiter Linie auf extrazellulären Substanzen beruhen. Betrachtet man den freien intrazellulären Aminosäurebestand, stellt man fest, dass ihre Zusammensetzung sowohl besonderen Stoffwechselsituationen und Anforderungen als auch zellspezifischen, physiologischen Funktionen angepasst ist. Die erforderlichen Aminosäuren werden teilweise aktiv aus dem Extrazellulärraum in die Zelle geschleust oder auch von der Zelle selbst produziert, um dort entgegen einer zum Teil sehr hohen Konzentrationsdifferenz zwischen Extra- und Intrazellulärraum weiter verwendet zu werden (Taurin zum Beispiel besitzt eine, verglichen mit menschlichem Plasma, bis zu 200fache höhere Konzentration) ⁵⁵. Darüber hinaus scheinen insbesondere auch Glutamin/Glutamat, Arginin und Ornithin mit wichtigen immunologischen Funktionen assoziiert zu sein.

Zum Beispiel Glutamin, eine nicht essentielle Aminosäure, zeigt eine hohen Stoffwechselrate in Zellen des Immunsystems ^{24,130,131} und gehört mit ca. 3×10^{-16} Mol/PMN-Zelle zu den in polymorphkernigen Granulozyten hoch angereicherten Aminosäuren. Glutamin wird nur zu einem geringen Teil vollständig oxidiert, hauptsächlich aber zu Glutamat, Aspartat, Alanin, Laktat und NH_3 verstoffwechselt und gespeichert (s. Diskussion 4.2.1.1). Glutamin liefert als Energie-, Stickstoff- und Kohlenstoffquelle eine Vielzahl an Präkursoren. Aber auch das aus der Glutaminase-Reaktion entstandene Glutamat nimmt als so genannte „intrazelluläre Drehscheibe“ der Aminostickstoff-Metabolisierung eine stoffwechselphysiologische Schlüsselstellung ein. Glutamat, mit einer hohen intrazellulären Konzentration von ca. 6×10^{-16} Mol/PMN-Zelle und einem hohen intra- versus extrazellulären Konzentrationsgradienten (ca. 40:1), dient der schnellen Bereitstellung anaboler Substrate, sowohl der Biosynthese vieler wichtiger Makromoleküle (Proteine, Nukleotide) als auch der Aminosäure- und eigenen Neusynthese ^{24,36,37,38,58}. Jüngere Untersuchungen an Zel-

len des Immunsystems, wie z.B. auch an PMN, konnten darlegen, dass eine Abnahme der Glutaminkonzentration sowohl in vitro als auch in vivo zu einer verminderten Phagozytosefähigkeit, Zytokinbildung und einer reduzierten Bildung zytotoxischer Stoffe und freier O₂-Radikale führt und Glutamin so zu einer wichtigen Aminosäure macht ^{56,130,131}. Die Metabolisierung von Glutamin führt zu einer gesteigerten Produktion an NADPH. Immunfunktionell besitzt NADPH für PMN-Zellen essentielle Bedeutung aufgrund seines Einflusses auf die Bildung der hochreaktiven Sauerstoffspezies (NADPH-abhängige Oxidase) ¹⁴². Weiterhin fördert Glutamin die Proliferation und Opsonisierungsfähigkeit polymorphkerniger Granulozyten. Im Rahmen gesteigerter metabolischer Anforderungen oder kataboler Prozesse wie Trauma, Operationen, Infektions- und Tumorerkrankungen, fällt ein beträchtliches intra- sowie extrazelluläres Glutamindefizit auf, welches weder durch zelleigene Neusynthese, noch durch Aufnahme aus dem Extrazellulärraum ausgeglichen werden kann ¹³. Dies macht Glutamin zu einer konditionell essentiellen Aminosäure ^{130,131}.

Auch Arginin und Ornithin sind nicht-essentielle Aminosäuren mit einer hohen intragranulozytären Stoffwechselrate, die vermutlich wie Glutamin im Rahmen gesteigerten Bedarfs zu einer konditionell essentiellen Aminosäure wird. Arginin spielt eine zentrale Rolle im Harnstoffzyklus, wo im Rahmen der so genannten „Arginase-Reaktion“ aus Arginin sowohl Harnstoff durch Hydrolyse freigesetzt wird als auch Ornithin entsteht ^{6,190}. Interessanterweise zeigen im Gegensatz zu Makrophagen und dendritischen Zellen, die in Ruhe keine Arginase exprimieren, Granulozyten bereits in Ruhe eine hohe Arginase-Aktivität ¹²⁸. Aus der Aminosäure Ornithin kann durch die mitochondriell gelegene Ornithin-Aminotransferase Prolin als Kollagenbaustein synthetisiert werden ¹⁸⁶. Durch das Enzym Ornithin-Decarboxylase wird Ornithin zu den Polyaminen Putrescin, Spermidin und Spermin umgewandelt und nimmt einen bedeutenden Einfluß auf Wachstums-, Proliferations- und Apoptoseprozesse ^{26,171,189}. Weiterhin sind PMN in der Lage, durch das Enzym NO-Synthetase aus Arginin Stickstoffmonoxid (NO) zu bilden, früher bekannt als „endothelium-derived vascular relaxant factor“ ¹. NO spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung von physiologischen Prozessen, Abwehrmechanismen, Entzündungsreaktionen und Immunfunktionen, wie zum Beispiel durch Vasodilatation, Ödembildung und speziell bei Immunzellen durch Zytotoxizität, Verhinderung der Zellwandadhäsion und Regulierung von

Immunzellaktivität, -wachstum und -untergang¹. Es sind drei Isoformen der NO-Synthetase bekannt. Zwei konstitutive Isoformen synthetisieren calcium-abhängig kleine Mengen an NO, die als Botenstoffe bei vielen physiologischen Prozessen beteiligt sind. Der dritten Isoform, der so genannten „induzierbare NO-Synthetase“ (iNOS), kommt eine besondere pathophysiologische Bedeutung zu. Dieses calcium-unabhängige Isoenzym führt zu deutlich höheren Konzentrationen an Stickstoffmonoxid als die anderen Formen. Sowohl Endotoxine als auch proinflammatorische Zytokine (TNF, Interleukine) triggern eine iNOS Produktion. Polymorphkernige Granulozyten weisen bereits kurze Zeit nach Stimulation nicht nur einen höheren Nitritgehalt und eine erhöhte Aktivität der iNOS auf, sondern sind auch schneller in der Lage Arginin aufzunehmen. Einen großen Teil seiner biologischen Wirkung entfaltet NO über die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen. Dabei reagiert NO mit dem durch das NADPH generierte O_2^- zu toxischem Peroxinitrit ($ONOO^-$). Diese reaktive Stickstoffverbindung wirkt zum einen bei der Abwehr pathogener Agenzien mit, reguliert aber andererseits über einen negativen „Feedback-Mechanismus“ die exzessive Bildung von toxischem Superoxidradikalen^{3,103,160}.

Die höchste Konzentration in PMN vertritt die Aminosäure Taurin (ca. 40×10^{-16} Mol / PMN-Zelle), welche auch bei sinkenden extrazellulären Taurinspiegeln gegen einen hohen Gradienten (ca. 100:1) aufrechterhalten wird. Sie wird beim Menschen durch Oxidation von Cysteamin gebildet und schien bislang nur eine wichtige Rolle bei der Konjugation von Gallensäuren oder beim Sehvorgang zu spielen⁸¹. Trotz der bemerkenswert hohen Konzentration in neutrophilen Granulozyten, unterliegt Taurin keinem der üblichen metabolischen Stoffwechselprozesse. Es wird jedoch angenommen, dass Taurin weniger als metabolisches oder anaboles Substrat fungiert, sondern in vielfältiger Weise an zellulären Regulationsmechanismen und Immunfunktionen beteiligt ist. Von besonderer Bedeutung ist die Hypothese, dass Taurin als Antioxidant, Osmoregulator und Membranstabilisator für den Erhalt und den Schutz vor reaktiven Sauerstoffradikalen und anderen Degranulationsprodukten sorgt^{4,35,46,86}.

1.4 Intragranulozytärer α -Ketosäurestoffwechsel

Bedeutsam im Aminosäuremetabolismus sind auch dessen Trans- und Desaminierungsprodukte, die α -Ketosäuren. Sie spielen eine wichtige Rolle beim Aufbau nicht essentieller Aminosäuren und fungieren als Aminogruppenakzeptor. Vor allem α -Ketoglutarat, Pyruvat aber auch p-Hydroxy-Phenylpyruvat stellen über eine weitere Verstoffwechselung energiereiche Verbindungen zur Verfügung. Aber auch α -Ketoisocapronat, α -Ketomethylvalerianat und α -Ketobutyrat besitzen hinsichtlich des Proteolyse- und Proteinbiosynthesegleichgewichts bedeutende stoffwechselregulatorische Funktionen^{74,75,135,154}. Mögliche Einflussgrößen auf einen ausgewogenen Bestand an intrazellulären α -Ketosäuren menschlicher PMN sind nur sehr selten untersucht worden. Aufgrund großer methodischer Anforderungen hinsichtlich Probenvorbereitung oder auch nachfolgender Analytikverfahren, beschränken sich derzeitige Studien bislang fast ausschließlich nur auf die extrazelluläre Bestimmung von α -Ketosäuren im Plasma^{47,69,80,83,152,168,187}. Nach den bisher vorliegenden eigenen Ergebnissen ist ein ausgewogener Bestand an intrazellulären Amino- und α -Ketosäuren jedoch eine wesentliche Grundvoraussetzung für die vielfältigen granulozytären Aufgaben in einem suffizient funktionierenden Immunsystem.

1.5 Intrazelluläre Aminosäure- und α -Ketosäureanalytik in PMN

Voraussetzung eines exakten intragranulozytären Aminosäure- und α -Ketosäuremonitoring in PMN ist zum einen eine rasche und schonende Granulozytenseparation, mit vollständigem Erhalt der Zellvitalität und -reinheit sowie Stoffwechselneutralität bzw. deren anschließend stabile Lagerung und stoffwechselneutrale PMN-Zellyse zur weiteren Aminosäure- und α -Ketosäureanalytik im Rahmen der nachfolgenden Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC). Im Gegensatz zu früher verwendeten Nachweismethoden macht die so genannte „Reversed-Phase-HPLC-Technik“ eine gleichzeitige Trennung polarer und unpolarer Aminosäure- sowie α -Ketosäuren möglich. Weiterhin muss eine geeignete Bezugsgröße des intrazellulär gemessenen Aminosäure- und α -Ketosäuregehalts gewählt werden. In dieser Arbeit wurde der gemessene intrazelluläre Amino- und α -Ketosäuregehalt auf

Einzelzellniveau gewählt, denn der Bezug auf biologische Parameter, wie intrazellulärer Wassergehalt, Osmolalität oder Proteingehalt, kann durch krankheitsbedingte Veränderungen verfälscht sein und so auf die Messergebnisse Einfluss nehmen^{123,127}.

1.6 Midazolam, Rezeptoragonisten bzw. -antagonisten

Schon frühe Untersuchungen zeigten, dass Medikamente einen bedeutenden Einfluss auf immunologische Funktionen und die intrazelluläre Homöostase von PMN nehmen können. Bereits in einer 1903 publizierten tierexperimentellen Arbeit mit dem Titel „Immunität und Narkose“ wurde die Beeinträchtigung des zum damaligen Zeitpunkt kaum erforschten Immunsystems durch Anästhetika diskutiert¹⁶¹. Dazu gehören auch die in der Anästhesie und Intensivmedizin häufig eingesetzten Benzodiazepine. Benzodiazepine werden klinisch als Antikonvulsiva, Anxiolytika, Sedativa bzw. Hypnotika eingesetzt. Ihre Effekte werden dabei vorwiegend durch Bindung an so genannte zentrale Benzodiazepinrezeptoren (ZBR) des zentralen Nervensystems (ZNS) vermittelt. Der ZBR ist Bestandteil des GABA_A-Rezeptors (gamma amino butyric acid), welcher mit den GABA_B und GABA_C-Rezeptoren zu der Familie der GABA-Rezeptoren gehört.

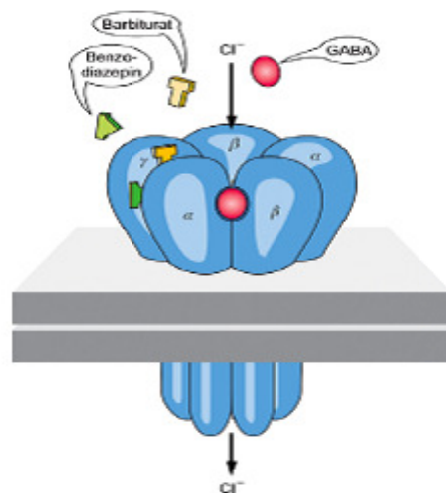


Abbildung 5: Struktur des GABA_A-Rezeptors

Dabei vermitteln Benzodiazepine ihre Wirkung durch Bindung an die α-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors, einem Liganden-gesteuerten Ionenkanal. GABA bewirkt

durch die Öffnung von Chloridkanälen eine Zunahme der Chloridleitfähigkeit. Benzodiazepine verstärken diese GABAerge Wirkung, indem sie die Affinität von GABA an ihren Rezeptor erhöhen. Rezeptoren vom zentralen Typ befinden sich vorwiegend auf Gehirnzellmembranen, vor allem in der frontalen und okzipitalen Hirnrinde, im Hippocampus und im Kleinhirn^{12,137,138,191}.

Benzodiazepine binden aber auch mit hoher Spezifität an einen weiteren Rezeptor. Neben den im ZNS vorkommenden „zentralen“ Bindungsstellen fanden Braestrup und Squires 1977 in mehreren peripheren Geweben weitere Benzodiazepin-Bindungsstellen¹⁶. Diese peripheren Benzodiazepinrezeptoren (PBR) sind neben einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe und Zellen, einschließlich Nieren, Herz, Gehirn, besonders stark in den oberflächlichen Schichten der menschlichen Epidermis, Granulozyten und anderen Zellen des Abwehrsystems nachgewiesen worden. Innerhalb der Zelle ist der PBR in der äußeren Mitochondrien- oder Plasmamembran lokalisiert^{19,21,23,33,87,97,112,116,147,164,178}. Ein klassisches Benzodiazepin, welches 1987 in die Klinik eingeführt wurde, ist zum Beispiel Midazolam (Dormicum®). Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit und geringen Toxizität im Vergleich zu anderen Anästhetika findet Midazolam eine breite Anwendung und zeigt eine hohe Affinität zum GABA_A-Rezeptor.

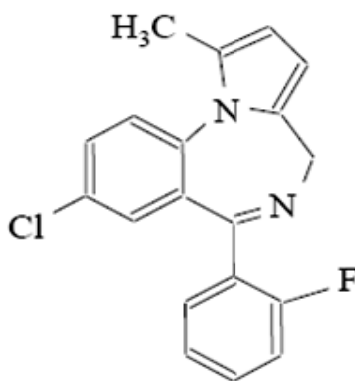
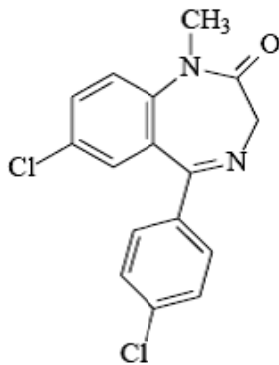


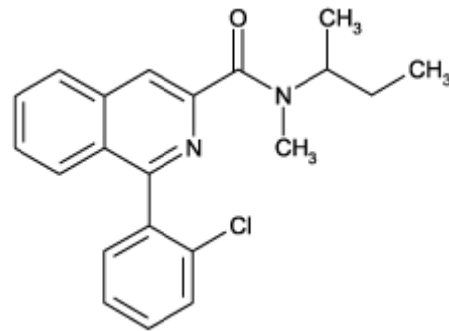
Abbildung 6: Strukturformel Midazolam

Zur pharmakologischen Charakterisierung des zentralen und peripheren Benzodiazepinrezeptors werden heutzutage exogene, synthetische Liganden eingesetzt. So bindet das Benzodiazepin Ro 5-4864 mit hoher Affinität an den PBR, jedoch nur gering an zentrale Bindungsstellen. Ein weiterer Ligand ist das synthetische Isochinolincarboxamid PK 11195, welches, trotz struktureller Unterschiede zu Benzodiazepinen, eine starke Bindung zum PBR aufweist, jedoch keine nennenswerte Bindung an zent-

rale Rezeptoren. Ro 5-4864 fungiert hierbei als Agonist, PK 11195 als Antagonist an den Rezeptoren vom peripheren Typ.



Ro 5-4864



PK 11195

Abbildung 7: exogene Liganden am PBR

Studien verschiedener Arbeitsgruppen und eigene Untersuchungen konnten nachweisen, dass nicht nur der operative Eingriff mit nachfolgender Intensivtherapie, sondern auch Anästhetika, zum Teil in klinisch relevanten Dosierungen bzw. Plasmaspiegeln, einen signifikanten Einfluss auf Funktion, Stoffwechsel und Integrität von polymorphkernigen Granulozyten haben (Phagozytoserate, Abtöten von Bakterien, "oxidative burst" etc.)^{61,92,93,116,124,125,126}.

1.7 Fragestellungen

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit konzentriert sich auf den Einfluß von Midazolam auf den intragranulozytären Aminosäure- und α -Ketosäuregehalt in neutrophilen polymorphkernigen Granulozyten sowie auf essentielle granulozytäre Immunfunktionsparameter. Daraus leiten sich folgende differenzierte Fragestellungen ab:

1. Führt das hier untersuchte Sedativum Midazolam dosis- und expositionszeitabhängig zu Veränderungen der intragranulozytären Amino- und α -Ketosäurezusammensetzung?
2. Beeinflusst Midazolam parallel granulozytäre Immunfunktionen gemessen an der Superoxidanion- und Wasserstoffperoxidproduktion sowie der Myeloperoxidaseaktivität?
3. Sind mögliche Effekte auf den Amino- und α -Ketosäuregehalt sowie auf granulozytäre Immunfunktionen rezeptorvermittelt? Können diese durch periphere und zentrale Benzodiazepinrezeptorantagonisten und -agonisten bzw. Opiatrezeptorantagonisten verstärkt bzw. aufgehoben werden?

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 Hochselektive Separation von PMN aus Vollblut

Die von uns verwendeten Methodiken zur hochselektiven Separation vitaler PMN aus menschlichem Vollblut sind signifikante Weiterentwicklungen der von Eggleton et al.⁴⁴ sowie Krumholz und Mitarbeitern⁸⁹ beschriebenen Verfahren. Die Extraktion der PMN aus Vollblut erfolgte hierbei mittels eines gekühlten (4°C) Percoll®-Gradienten (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Direkt nach Blutentnahme (Bestimmung der Referenzbereiche der primären Aminosäure- sowie α -Ketosäurekonzentrationen in PMN) bzw. im unmittelbaren Anschluss an die nachfolgend beschriebenen Inkubationsverfahren (siehe Methodikteil 2.5) wurden jeweils 4 ml der heparinisierten Vollblutproben (10 I.E. Heparin-Natrium/ml) auf einen mit 0,9%-iger NaCl-Lösung vorbereiteten sowie auf 4°C gekühlten 55%:70%igen Percoll®-Gradienten überschichtet und anschließend 15 Minuten (350 x g, 4 °C) zentrifugiert (Biofuge®, Heraeus, Hanau). Nach Auftrennung der Zellfraktionen wurden die PMN aus der Probe entnommen (Sterican® 20G; B. Braun, Melsungen) und mit 10 ml gekühltem (4°C) sowie vorher 1:10 verdünntem PBS®-Puffer [10x (w/o Ca^{2+} / Mg^{2+}) Gibco, Karlsruhe] resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (350 x g, 5 Minuten, 4°C) wurde der PBS-Puffer verworfen und die in der Probe verbliebenen Erythrozyten mittels 2 ml gekühltem (4°C) Aqua destillata (Pharmacia, Uppsala, Schweden) hämolysiert. Nach exakt 20 Sekunden erfolgte durch Applikation von 1 ml 2,7%-iger NaCl-Lösung (Merck, Darmstadt) eine Re-Isotonisierung der Probe, die direkt anschließend erneut mit verdünntem PBS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation (350 x g, 5 Minuten, 4°C) wurde der PBS-Puffer-Überstand erneut verworfen, die verbliebene PMN-Suspension homogenisiert (Rüttelmixer) und anschließend 2 Aliquots zur lichtmikroskopischen Kontrolle (Zeiss, Oberkochen) der Anzahl und Reinheit (Neubauer-Zählkammer; Färbung mit „Türks-Lösung®“, Merck, Darmstadt) sowie auch der Vitalität (Färbung mit „Trypanblau®“, Merck, Darmstadt) der in der Probe vorhandenen PMN entnommen. Proben mit einem PMN-Reinheitsgehalt <96% bzw. solche mit >4% avitalen PMN wurden verworfen. Unmittelbar nach Entnahme und Aufbereitung wurden die entnommenen und gekühlten PMN-Proben bei -20°C eingefroren und anschließend zur

kurzfristigen Lagerung (Aminosäureproben <4 Wochen; α -Ketosäureproben <2 Wochen) bei -80°C tiefgefroren. Im weiteren Verlauf wurden die PMN-Proben einem sogenannten „Lyophilisierungsverfahren“ (Gefriertrocknung unter Hochvakuum bei -80°C, CIT-2[®], Heraeus, Hanau) unterzogen. Die Lyophilisierung ermöglichte zum einen die schonende -nicht chemisch vermittelte- PMN-Zellyse sowie die längerfristige Lagerfähigkeit der Proben. Die Qualität der PMN-Zellyse mittels Lyophilisierung wurde darüber hinaus bei Einrichtung der vorliegenden Aminosäureanalytikverfahren mit einem standardisierten aminosäure- und proteinschonenden Zellyseverfahren verglichen [Lysepuffer nach Laemmli et al.⁹⁶: 20 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazino)-Ethansulfonsäure; pH 7,4), 100 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 15 mM Na₄P₂O₇, 1 mM PMSF, 2 µg/ml, Leupeptin, 2 µg/ml Pepstatin, 2 µg/ml Antipain, 10 µl Triton x-100 1%; (Roth, Karlsruhe; Merck, Darmstadt; Sigma, Deisenhofen), n= 40]^{73,88}. Die so vorbereiteten Proben wurden anschließend bis zur weiteren Analyse im Rahmen der Fluoreszenz-HPLC lichtgeschützt bei -80°C gelagert (Proben primärer Aminosäuren < 6 Monate, α -Ketosäureproben < 4 Wochen).

2.2 Quantitative Aminosäureanalyse

Die Analytik zur exakten Quantifizierung des intrazellulären Gehaltes primärer Aminosäuren in menschlichen polymorphkernigen Granulozyten (PMN) bis auf Einzelzellniveau wurde für die vorliegenden Untersuchungen völlig neu entwickelt sowie präzise standardisiert und validiert. Die verwendeten Methodiken sind signifikante Weiterentwicklungen der von Fuchs et al.^{53,54} sowie Riedel et al.^{151,152,153} zur Bestimmung primärer Aminosäuren im Plasma beschriebenen Analytikverfahren.

2.2.1 Puffer, Lösungen und Reagenzien zur Probenvorbereitung und Fluoreszenz-derivatisierung

2.2.1.1 Standardextraktionspuffer (primäre Aminosäuren)

Der so genannte „Standardextraktionspuffer“ (SEP) diente zur Resuspendierung der bei -80°C eingelagerten und lyophilisierten Standard- und PMN-Proben. Der SEP bestand aus einem Gemisch von 80% „Methanol für die HPLC“ und 20% „H₂O für die HPLC“ (beide Merck, Darmstadt), der zusätzlich zur internen Standardisierung der Analytik das in physiologischen Aminosäuregemischen nicht vorkommende Homoserin (Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 4 µg/ml beinhaltete. Darüber hinaus gewährleistete der Standardextraktionspuffer die kurzfristige Lagerungsfähigkeit der resuspendierten Aminosäurelyophilisate im Rahmen der sich anschließenden automatisierten Vorsäulen-Derivatisierung („chemische Konservierung“ für wenigstens 55-60 Stunden) ⁵³. Die gefriergetrockneten primären Aminosäurestandard-, Plasma- und PMN-Proben wurden mittels 280 µl dieses Standardextraktionspuffers resuspendiert.

2.2.1.2 Externe Aminosäurestandardproben (primäre Aminosäuren)

Zur externen Standardisierung und Kalibrierung der Aminosäureanalytik kamen eigene Aminosäurestandardproben in physiologischer NaCl-Konzentration unter Verwendung analysenreiner Reagenzien und Lösungen zur Anwendung (Sigma, Deisenhofen). Den Standardproben wurde zusätzlich humanes Serumalbumin (4%; Merck, Darmstadt) zugemischt. Folgende Einwaagen wurden in jeweils 20 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung (Merck, Darmstadt) vorgenommen:

Lösung 1:	2 mg:	Tyrosin (Tyr)
Lösung 2:	10 mg:	Valin (Val)
	je 20 mg:	Glutamin (Gln), Threonin (Thr)
	50 mg:	Ornithin (Orn)
Lösung 3:	je 20 mg:	Glutaminsäure (Glu), Alanin (Ala), Phenylalanin (Phe)
	je 50 mg:	Histidin (His), Lysin (Lys)

Lösung 4:	10 mg:	Isoleucin (Ile)
	je 20 mg:	Asparagin (Asn), Citrullin (Cit), Taurin (Tau) α -Aminobuttersäure (Aba)
	40 mg:	Tryptophan (Trp)
Lösung 5:	10 mg:	Leucin (Leu)
	je 20 mg:	Serin (Ser), Glycin (Gly), Methionin (Met), Asparaginsäure (Asp), Hypotaurin (H-Tau)
	50 mg:	Arginin (Arg)

4 ml der Lösung 1 und je 400 μ l der Lösungen 2-5 wurden vereinigt und 800 mg humanes Serumalbumin (Merck, Darmstadt) dazugegeben und gelöst. Anschließend wurden jeweils 200 μ l dieser Stammlösung in Eppendorfgefäße gefüllt und zunächst bei -20°C eingefroren. Direkt im Anschluss wurden die bei -20°C eingefrorenen Standardproben bei -80°C zwischengelagert und am nächsten Tag dem oben beschriebenen Lyophilisierungsverfahren unterzogen und bei -80°C eingelagert (Lagerzeit: < 6 Monate).

2.2.1.3 Boratpuffer

Die reproduzierbare und vollständige Bildung von Isoindol-Derivaten aus primären Aminosäuren erfolgte im alkalischen Medium (pH 9,5). Die Vorbereitung zur Fluoreszenzmarkierung im Rahmen der automatisierten Vorsäulenderivatisierung wurde mittels eines speziell hergestellten Boratpuffers durchgeführt. Hierzu wurden 5,03 g Tetraborat (Merck, Darmstadt) durch 5-minütiges Kochen bei 100°C in 200 ml „H₂O für die HPLC“ gelöst und nach Abkühlen der Lösung mittels HCl- bzw. NaOH-Lösungen auf einen pH-Wert von exakt 9,5 eingestellt. 5-minütiges Kochen gewährleistet hierbei reproduzierbare Pufferkapazitäten⁵³. Dieser Boratpuffer wurde lichtgeschützt bei 20°C eingelagert und war unter diesen Bedingungen mindestens 3 Monate haltbar.

2.2.1.4 o-Phtaldialdehyd-Mercaptoethanol-Reagenz (OPA)

Zur Fluoreszenzmarkierung der primären Aminosäuren im Rahmen der automatisierten Vorsäulenderivatisierung wurde o-Phtaldialdehyd-Mercaptoethanol-Reagenz (OPA-Thiol-Reagenz) verwendet. Zur Herstellung des OPA-Thiol-Reagenz wurden 100 mg o-Phtaldialdehyd (Merck, Darmstadt) in 9 ml „Methanol für die HPLC“ vollständig gelöst und 1 ml des Boratpuffers (siehe oben) sowie 100 µl 2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt) dazugegeben. Dieses OPA-Thiol-Reagenz wurde vor jeder Fluoreszenz-HPLC-Aminosäureanalyse frisch hergestellt und bis zum Analysenbeginn bei 4°C zwischengelagert. Die Haltbarkeit des OPA-Thiol-Reagenz bei Raumtemperatur beträgt hierbei mindestens 3 Tage⁵³.

2.2.1.5 0,75 N HCl-Lösung

Um die Stabilität der im alkalischen Medium fluoreszenzmarkierten primären Aminosäuren zu gewährleisten wie auch die Stabilität des Säulenmaterials zu schonen, wurden die Fluoreszenzderivate im Rahmen der automatisierten Vorsäulenderivatisierung mittels 0,75 N HCl auf pH-Werte von durchschnittlich 7,3-7,4 abgepuffert. Hierzu wurde 1 N HCL-Lösung (Merck, Darmstadt) mittels „H₂O für die HPLC“ zu einer 0,75 N HCL-Lösung verdünnt. Da die Pufferkapazität des Boratpuffers von der Auflösungstemperatur abhängt, konnte im automatisierten Analysenschritt bei der Titration mittels 0,1 N HCl eine reproduzierbare Neutralisation und somit reproduzierbare pH-Werte ($7,4 \pm 0,15$) gewährleistet werden.

2.2.1.6 Methanol-Natriumacetatpuffer

Zur optimalen Trennung des komplexen OPA-Thiol-Aminosäurederivatgemisches wurde ein binäres Eluentensystem aus Methanol/Acetatpuffer verwendet. Es wurde zunächst mit „H₂O für die HPLC“ eine 0,5 M Acetatlösung hergestellt und diese mittels 6M HCl auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt. Dieser 0,5 M Acetatpuffer war dann lichtgeschützt bei 20°C unbegrenzt lagerbar. Unmittelbar vor der Methanolzugabe wurde dieser Puffer mit „H₂O für die

HPLC“ 1:10 verdünnt (= 0,05 M Acetatpuffer) und „Methanol für die HPLC“ dazu-
gegeben. Folgende Elutionspuffer kamen zur Anwendung:

Elutionspuffer A: 19% Methanol und 81% 0,05 M Acetatpuffer

Elutionspuffer B: 75% Methanol und 25% 0,05 M Acetatpuffer

2.2.1.7 HPLC- „Spüllösung“

Als Wasch- und Spüllösung zur Reinigung des gesamten Systems sowie der Probenschleife und Injektionsnadel des Autosamplers wurde eine Lösung bestehend aus 50% „Methanol für die HPLC“ sowie 50% „H₂O für die HPLC“ angewendet. Nach Vermischen wurde diese Lösung über einen Zeitraum von 15 Minuten mittels Ultraschall (Sonorex Super RK 103[®], Bandelin, Berlin) entgast.

2.2.2 Geräteanforderung: Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Die Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeitschromatographische Analytik von primären Aminosäuren und α -Ketosäuren erforderte folgende Gerätekonfiguration:

1. Eine hydrostatische Gradientenpumpe mit angeschlossener Kontrolleinheit zur Gradientenprogrammierung (600 E[®], Waters, U.S.A.).
2. Ein 3-Kanal-Degaser (Knauer, Berlin) zur kontinuierlichen Entgasung der Elutionspuffer.
3. Eine programmierbare Autosampler-Pipettiereinheit (Triathlon[®], Spark, Holland) mit integriertem Rheodyne-Injektionsventil und daran angeschlossener 100 μ l fassender Probenschleife (AS 300[®], Sunchrom, Friedrichsdorf) zur automatisierten Vorsäulenderivatisierung.
4. Eine „Reversed-Phase“ F-HPLC-Trennsäule (Nova Pak RP-C-18[®], 300 x 3,9 mm, I.D.; 60 Å, 4 μ m; Waters, U.S.A.).
5. Ein Säulenofen (Knauer, Berlin) zur kontinuierlichen Temperierung der Trennsäule (35°C) während der Analytik.
6. Ein Fluoreszenzspektrometer (RF-530[®], Shimadzu, Kyoto, Japan).

7. Eine Interfacebox (Knauer, Berlin) zur digitalen Umwandlung der analog vom Fluoreszenzspektrometer aufgenommenen Daten.
8. Eine computergestützte Meßwerterfassung und Datenauswertung (Compaq, U.S.A.) unter Zuhilfenahme einer speziell für Aminosäurechromatogramme aus biologischen Proben entwickelten Integrationssoftware (EuroChrom 2000 für Windows[®], Version 1,65; Knauer, Berlin).

2.2.3 Automatisierte Vorsäulen-Derivatisierung

Wie aus dem nachfolgend aufgeführten Schema zu ersehen ist (Tabelle 1), wurden die lyophilisierten Proben vor der Vorsäulenderivatisierung manuell durch Aufpipettieren von Standardextraktionspuffer gelöst und so ein methanolischer Extrakt der Probe hergestellt. Nach Inkubation und Zentrifugation (Rotixa/ KS[®], Tuttlingen) wurde die Probe in ein spezielles Probengefäß überführt (2-CRV[®], Chromacoll, Trumbull, U.S.A), nachfolgend (200 µl Extrakt) automatisiert mit 0,5 M Boratpuffer basisch gepuffert (pH= 9,5), OPA-Thiol-Reagenz zugesetzt und die Derivatisierung nach exakt 120 Sekunden durch Neutralisierung mittels 0,75 N HCL gestoppt (pH $\approx$ 7,2). Dieser Ansatz wurde weiterhin mit dem Elutionspuffer A 1:4 verdünnt und 50 µl dieser Lösung in das System injiziert.

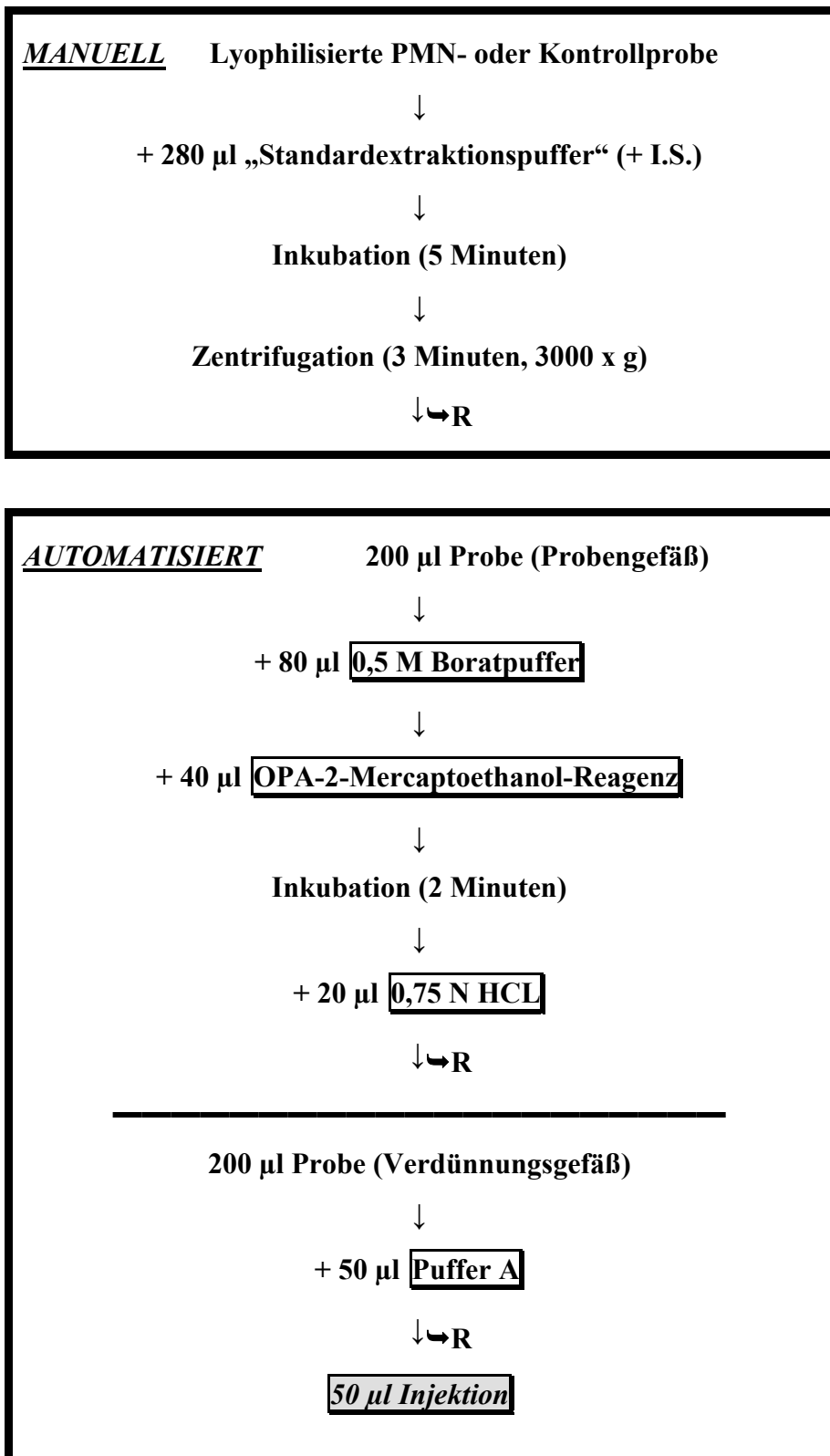


Tabelle 1: Pipettierschema der automatisierten OPA-Thiol-Fluoreszenz-Vorsäulenderivatisierung.
(R= Verwerfen; = als Reagenz im Autosampler bereitstellen)

2.2.4 Gradienten

Nach sorgfältiger Äquilibration der Analytik (≥ 4 h) erfolgte die Gradientenelution wie in Tabelle 2 beschrieben.

<i>Gradientenzeitverläufe (primäre Aminosäuren)</i>		
<i>Zeit [min]</i>	<i>Puffer A</i>	<i>Puffer B</i>
0	97	3
3	97	3
3,1	100	0
37	70	30
63	0	100
67	97	3
<i>Puffer A:</i> 19% Methanol/ 81% 0,05 M Acetat, pH 7,2 <i>Puffer B:</i> 75% Methanol/ 25% 0,05 M Acetat, pH 7,2 <i>Flußrate:</i> 1 ml/min <i>Druck:</i> 2900 PSI* $\pm$ 150 PSI* (A: 97%/ B: 3%) <i>Fluoreszenzdetektion:</i> Anregungswellenlänge: 330 nm Emissionswellenlänge: 450 nm		

Tabelle 2: Elutionsbedingungen des binären Gradientenelutionssystems zur Analyse freier primärer Aminosäuren. Zur Verwendung kamen 2 vorgemischte Methanol-Acetat-Puffer. *1 PSI = 6894,76 Pa.

Zur Verwendung kam ein binäres Eluentensystem mit Methanol-Acetat-Puffern (0,05 M). Die Elutionspuffer wurden mit einer Flußrate nach den in Tabelle 2 beschriebenen Mischungsverhältnissen in das Fluoreszenz-HPLC-System eingespeist. Die von der Gradientenpumpe erzeugte Flußrate betrug $1 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$, der aufgrund dieser Flußrate im System entstehende Arbeitsdruck, je nach Puffer-Mischungsverhältnis, zwischen 2900 und 3500 PSI. Die zur Fluoreszenzdetektion primärer Aminosäuren verwendete Anregungswellenlänge betrug 330 nm, die Emissionswellenlänge 450 nm.

2.3 Bestimmung plasmatischer und freier intrazellulärer α -Ketosäuren in PMN

Wie in den Zielsetzungen der Arbeit angesprochen, wurde neben der exakten Quantifizierung des intrazellulären Gehalts primärer Aminosäuren in menschlichen polymorphkernigen Granulozyten zum ersten Mal eine exakte Analytik zur Bestimmung von stoffwechselrelevanten intragranulozytären α -Ketosäuren neu entwickelt, präzise standardisiert, validiert und die eingangs gesetzten Fragestellungen untersucht. Die Analytik erlaubt ebenfalls erstmals eine genaue Quantifizierung des intragranulozytären α -Ketosäuregehalts bis auf Einzelzellniveau. Die hier neu entwickelte Methodik ist eine signifikante Weiterentwicklung der von Farshidfar⁴⁷ und Riedel et al.^{151,152,153} bei plasmatischen α -Ketosäuren beschriebenen Analytikverfahren.

2.3.1 Puffer, Lösungen und Reagenzien zur Probenvorbereitung und Fluoreszenzderivatisierung

2.3.1.1 Standardextraktionspuffer für die α -Ketosäureanalytik (SEP-KS)

Als interner Standard wurde die in physiologischen Gemischen nicht vorkommende α -Ketosäure α -Ketovalerianat (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Zunächst wurde das in flüssiger Form hochkonzentriert vorliegende α -Ketovalerianat (116 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) mittels „H₂O für HPLC“ weiterverdünnt und 200 μl dieser verdünnten Lösung (α -Ketovalerianatkonzentration: 2,322 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit 3,8 ml Methanol versetzt und vermischt. Die gefriergetrockneten α -Ketosäurestandard-, Plasma- wie aber auch die PMN-Proben wurden mittels 250 μl dieses Standardextraktionspuffers resuspendiert.

2.3.1.2 Externe α -Ketosäurestandardproben

Zur externen Standardisierung und Kalibrierung der α -Ketosäureanalytik kamen eigene α -Ketosäurestandardproben in physiologischer NaCl-Konzentration unter Verwendung analysenreiner Reagenzien und Lösungen zur Anwendung (Sigma, Deisenhofen). Den Standardproben wurde zusätzlich humanes Serumalbumin (4%; Merck, Darmstadt) zugemischt. Folgende Einwaagen wurden in jeweils 20 ml „NaCl für die HPLC“ vorgenommen:

Lösung 1:	20 mg:	α -Ketoglutarat (KG)
Lösung 2:	je 20 mg:	Pyruvat (PYR), α -Ketobutyrat (KB)
Lösung 3:	je 20 mg:	α -Ketoisovalerianat (KIV), α -Ketoisocapronat (KIC), Phenylpyruvat (PhePYR), α -Keto- β -methylvalerianat (KMV)

240 μ l der Lösung 1 und je 120 μ l der Lösungen 2 und 50 μ l der Lösung 3 wurden mit 19,59 ml NaCl vereinigt (Σ = 20 ml) und 800 mg humanes Serumalbumin (Merck, Darmstadt) dazugegeben und gelöst. Anschließend wurden jeweils 50 μ l dieser Stammlösung in Eppendorfgefäße gefüllt und zunächst bei -20°C eingefroren. Direkt im Anschluss wurden die bei -20°C eingefrorenen Standardproben bei -80°C tiefgefroren und am nächsten Tag einer Lyophilisierung unterzogen und wiederum bei -80°C eingelagert (Lagerzeit: < 4 Wochen).

2.3.1.3 o-Phenyldiaminreagenz (PDA)

Zur Fluoreszenzmarkierung der α -Ketosäuren verwendeten wir das sehr oxidations-empfindliche o-Phenyldiamin (Sigma, Deisenhofen). Da oxidative Veränderungen dieses Moleküls als Verunreinigungen die Analytik erheblich beeinträchtigen können (Fluoreszenzstörraktivität im zu untersuchenden Spektrum), musste das käuflich erworbene o-Phenyldiamin, welches selbst analysenrein nur in brauner (= oxidiert) Kristallform vorlag, zunächst umkristallisiert werden. Dieser Reinigungsschritt wurde im Institut für Organische Chemie der Justus-Liebig-Universität vorgenommen. Die Umkristallisation erfolgte nach Lösen von o-Phenyldiamin in Heptan bei 100-120°C (Ölbad, Merck, Darmstadt) und anschließendem Verdampfen des Moleküls in einem Rotationsverdampfer (Merck, Darmstadt). Das so umkristallisierte und anschließend getrocknete o-Phenyldiamin (weiße Kristalle) wurde nun unter Stickstoffbegasung (Messer, Griesheim) luftdicht verpackt und war so bei 4°C und unter Lichtabschluss mehrere Monate chemisch stabil. Unmittelbar vor der Probenaufbereitung erfolgte die Herstellung des o-Phenyldiaminreagenz. Hierzu wurden pro zu untersuchender Messprobe 5 mg o-Phenyldiamin in 5 ml 3 M HCl (Sigma, Deisenhofen) gelöst und anschließend 10 μ l 2-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen)

hinzupipettiert. Diese Lösung war lichtgeschützt bei Raumtemperatur bis zu 6 Stunden stabil lagerbar.

2.3.2 Pipettierschema der PDA-Reagenz-vermittelten halbautomatischen α -Ketosäurederivatisierung

Wie aus dem nachfolgend dargestellten Pipettierschema zu ersehen ist (Tabelle 3), wurden zur Probenvorbereitung vor der Fluoreszenz-HPLC-Analytik die lyophilisierten Proben (Standard- bzw. PMN-Proben) in 250 μ l Standardextraktionspuffer für α -Ketosäureanalytik (SEP-KS) resuspendiert. Nach 3-minütiger Inkubation (Rüttelmixer, Eppendorf, Hamburg) und 3-minütiger Zentrifugation (3000 x g, Rotixa KS[®], Tuttlingen) wurden von jeder Probe 200 μ l Überstand abpipettiert und in Glasgefäße (10 ml, Knauer, Berlin) überführt. Anschließend erfolgte ein Eindampfen des Methanols unter Stickstoff (Messer, Griesheim), bis die Probe vollständig getrocknet war und sich ein weißer Niederschlag bildete. Dies erfolgte bei den PMN-Proben im Durchschnitt nach ca. 8 ± 2 Minuten. Jede getrocknete Probe wurde anschließend mit je 5 ml PDA-Reagenz resuspendiert (Ika-Vibrax[®], Merck) und danach 60 Minuten bei 80°C in einem Wasserbad mit prozessorgesteuerter Temperaturkontrolle (Sigma, Deisenhofen) inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine 15-minütige Abkühlung der Proben bei 4°C. Danach wurden alle Proben einem 3-maligen Extraktionsverfahren mittels Essigsäureethylester (Ethylacetat, Merck, Darmstadt) unterzogen (7 Minuten, Überkopfmischer, Merck, Darmstadt), die Essigsäureethylester-Phasen danach abpipettiert und unter Stickstoffzufuhr (Messer, Griesheim) eingedampft und damit vollständig getrocknet. Mit dem Eindampfen des Essigsäureethylester bzw. dem Trocknen der Probe wurde direkt nach der 1. Essigsäureethylestrextraktion begonnen. Das zweite Trocknungsverfahren benötigte im Durchschnitt ca. 43 ± 7 Minuten, um alle 3 Essigsäureethylesterphasen vollständig aus der Probe zu entfernen.

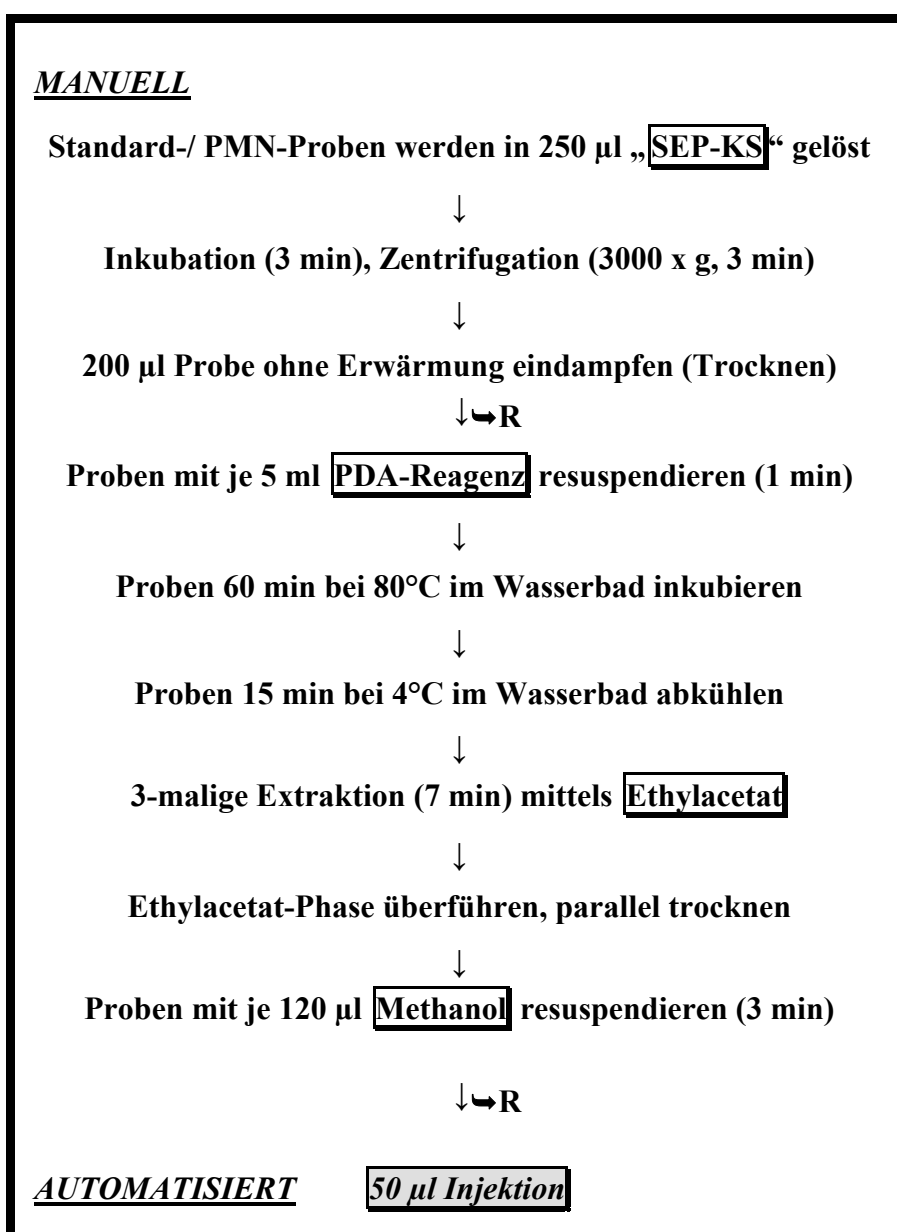


Tabelle 3: Pipettierschema der manuellen o-Phenyldiamin-2-Mercaptoethanol-Fluoreszenz-Vorsäulenderivatisierung (R= Verwerfen; = als vorbereitetes Analysereagenz bereitstellen).

Nach vollzogener Probentrocknung wurden diese mittels 120 µl Methanol resuspendiert und anschließend bis zur weiteren Aufbereitung in der Fluoreszenz-HPLC-Analytik bei -20°C gelagert (<1 h). Jeweils 50 µl methanolischer Extrakt einer Probe wurden der Fluoreszenz-HPLC-Analytik zugeführt.

2.3.3 Gradienten

Nach sorgfältiger Äquilibration der Analytik (≥ 4 h) erfolgte die Gradientenelution wie in Tabelle 4 beschrieben.

Gradientenzeitverläufe (α-Ketosauren)		
Zeit [min]	Puffer A	Puffer B
0	80	20
1	53	47
16	33	67
26	33	67
30	80	20
Puffer A: 19% Methanol/ 81% 0,05 M Acetat, pH 7,2 Puffer B: 75% Methanol/ 25% 0,05 M Acetat, pH 7,2 Flußrate: 1 ml/min Druck: 3100 PSI* $\pm$ 150 PSI* (A: 80%/ B: 20%) Fluoreszenzdetektion: Anregungswellenlänge: 360 nm Emissionswellenlänge: 415 nm		

Tabelle 4: Elutionsbedingungen des binären Gradientenelutionssystems zur Analyse freier intragranulozytärer α -Ketosauren. Zur Verwendung kamen 2 vorgemischte Methanol-Acetat-Puffer. * 1 PSI = 6894,76 Pa.

Zur Verwendung kam, analog zu der Analytik freier Aminosäuren, ein binäres Eluentensystem mit Methanol-Acetatpuffern. Die verwendeten Acetatpuffer bzw. Spüllösungen waren mit denen unter 2.2.1.6 und 2.2.1.7 beschriebenen kongruent. Die hier dargestellte Fluoreszenz-HPLC-Analytik entspricht hinsichtlich der Geräteanforderungen der im Methodikteil unter 2.2.2 beschriebenen Konfiguration. Wie bei den primären Aminosäuren gelangte ebenfalls eine Nova-Pak[®]-Säule zur Anwendung (RP-C-18; 300 x 3,9 mm I.D; 60 Å, 4 µm; Waters, U.S.A.). Die von der Gradientenpumpe erzeugte Flußrate betrug 1 ml/min. Der aufgrund dieser Flußrate im System entstehende Arbeitsdruck lag, je nach Puffer-Mischungsverhältnis, zwischen 3100 und 3500 PSI. Die zur Fluoreszenzdetektion verwendete Anregungswellenlänge betrug 360 nm, die Emissionswellenlänge 415 nm.

2.4 Bestimmung der Immunfunktionsparameter

Die von uns verwendeten Methodiken zur Bestimmung der granulozytären Superoxidanion- und Wasserstoffperoxidbildung sowie die Quantifizierung der von PMN freigesetzten Myeloperoxidaseaktivität vitaler PMN waren Weiterentwicklungen der von Weening et al.¹⁸³, Stangel et al.¹⁶³, Pick und Keisari¹⁴¹, Schmitt et al.¹⁵⁷ sowie Krumholz und Mitarbeitern^{89,90,91,92} beschriebenen Analytikverfahren. Um auszuschließen, dass es bei den photometrischen Immunfunktionsmethodiken nicht zu einer die Messungen verfälschenden Reaktion zwischen den zu untersuchenden Testsubstanzen und den erforderlichen Nachweisreagenzien kam, wurden Vorversuche mit zellfreien Ansätzen durchgeführt. Hierbei waren bei keiner der untersuchten Substanzen deletäre Effekte nachweisbar.

2.4.1 Bestimmung der granulozytären Superoxidanionbildung

Diese Methodik beruht im Wesentlichen auf der Reduktion von Cytochrom C durch Superoxidanion. Zu diesem Zweck wurden vorbereitend 100 mg Cytochrom C (Typ IV; Sigma, Deisenhofen) in 30 ml PBS®-Puffer (Phosphate buffered saline; Gibco, Karlsruhe) gelöst und nach Portionierung (250 µl) bei einer Temperatur von -20°C eingefroren. Zur Stimulation der Granulozyten diente voropsoniertes Zymosan (Sigma, Deisenhofen), welches wir nach Inkubation (37°C, 30 min, Schüttelwasserbad) von 100 mg Zymosan mit 6 ml gepooltem AB-Serum gewannen. Nach 2-maligem Waschen in 0,9%-iger NaCl-Lösung und anschließender Zentrifugation (350 x g, 10 min) 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 (siehe Methodikteil unter 2.5) wurden die PMN mittels einer Modifikation des unter 2.1 beschriebenen PMN-Separationsverfahrens isoliert. Im Anschluss an die Überschichtung des vorbereiteten Percoll-Gradienten (55%/70%) und schrittweisen Zentrifugationen (15 und 5 min; 20°C, 350 x g) wurden die in der Probe verbliebenen Erythrozyten mittels 2 ml Aqua destillata in der eingangs beschriebenen Weise hämolysiert, mittels 2,7%-iger NaCl-Lösung reosotonisiert und mittels PBS®-Puffer auf 10 ml resuspendiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die PMN-Suspension, wie oben beschrieben,

homogenisiert (Rüttelmixer). Nach Entnahme von Aliquots zur Kontrolle von Zellzahl, Reinheit und Vitalität erfolgte die Einstellung der PMN-Konzentration ($0,8 \times 10^6$ PMN/ml) mittels eines Glukose-PBS®-Puffers (9,9 g Glukose pro Liter PBS®). 500 µl dieser PMN-Probe ($0,4 \times 10^6$ PMN) wurden nun 500 µl Zymosan, 150 µl AB-Serum, 250 µl Cytochrom C zugesetzt und unter erneuter Zugabe der zu untersuchenden Testsubstanz in der entsprechenden Dosierung 15 Minuten bei 37 °C inkubiert (Schüttelwasserbad). Als Nullwert diente ein Ansatz, der statt Zymosan 500 µl Glukose-PBS®-Puffer enthielt. Direkt im Anschluss an das Inkubationsverfahren wurde die Reaktion durch Einbringen der Probe in Eiswasser abgestoppt. Nach 3-minütiger Zentrifugation ($350 \times g$, 4°C) wurde der Probenüberstand gewonnen und die Extinktion bei 546 nm in einem Digitalphotometer (Digitalphotometer 6114 S®; Eppendorf, Hamburg) gegen den Nullwert ermittelt. Die gebildete Superoxidanionmenge berechnete sich aus der Extinktion, der Schichtdicke und dem Extinktionskoeffizienten des Cytochrom C [$21/(\text{mMol} \times \text{cm})$] unter Berücksichtigung des Probenvolumens nach dem Gesetz von Lambert & Beer^{150,176}. Simultan zu den Messproben wurden stets auch testsubstanzfreie Ansätze mituntersucht. Die gebildete Superoxidanionmenge ist in den Ergebnissen in „fMol/(PMN x min)“ angegeben.

2.4.2 Bestimmung der granulozytären Wasserstoffperoxidbildung

Auch die in der vorliegenden Untersuchung angewendeten Methodiken zur Bestimmung der Wasserstoffperoxidproduktion von PMN basierten auf signifikanten Weiterentwicklungen der von Pick und Keisari¹⁴¹, Stangel et al.¹⁶³ sowie Krumholz und Mitarbeitern^{89,90,91,92} beschriebenen Analytikverfahren. Das angewendete Messprinzip beruht hierbei im Wesentlichen auf der durch Meerettich-Peroxidase vermittelten Oxidation von Phenolrot durch Wasserstoffperoxid. Versuchsvorbereitend wurden Phenolrot (10 mg/ml; Sigma, Deisenhofen) in Aqua destillata (Merck, Darmstadt) sowie Meerettich-Peroxidase (5 mg/ml; Typ II, Sigma, Deisenhofen) in Glukose-PBS®-Puffer (Ansatz siehe oben) gelöst. Nach Inkubation des Vollblutes mit der zu untersuchenden Testsubstanz sowie nach erfolgter PMN-Isolation (Isolationsverfahren wie oben beschrieben), wurden die PMN mittels voropsoniertem Zymosan (Vorbereitung siehe Superoxidanionbestimmung) stimuliert. Der endgültige Versuchsansatz bestand aus 500 µl PMN-Suspension (2×10^6 PMN/ml), 500 µl vorop-

soniertem Zymosan, 125 µl AB-Serum, 12,5 µl Meerettich-Peroxidase-Lösung, 12,5 µl Phenolrotlösung, 12,5 µl Natriumazidlösung (200 mM; Merck, Darmstadt) sowie aus der zu untersuchenden Testsubstanz in der entsprechenden Dosierung. Dieser Testansatz wurde nun über einen Zeitraum von 15 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert und im direkten Anschluss daran 3 Minuten bei 350 x g zentrifugiert. Nach Zusatz von 25 µl NaOH-Lösung (1N, Merck, Darmstadt) erfolgte die photometrische Extinktionsbestimmung des Überstandes bei 623 nm gegen einen unstimulierten Nullwert. Die Wasserstoffperoxidkonzentration wurde an Hand von in regelmäßigen Intervallen durchgeführten Eichmessungen ermittelt. Die Wasserstoffperoxidbildung ist in den Ergebnissen in „fMol/(PMN x min)“ angegeben.

2.4.3 Bestimmung der Aktivität der von PMN freigesetzten Myeloperoxidase

Zur Quantifizierung der Aktivität der von PMN freigesetzten Myeloperoxidase wendeten wir eine Weiterentwicklung der primär von Schmitt et al.¹⁵⁷ und Krumholz und Mitarbeitern^{89,90,91,92} entwickelten Analytikverfahren. Vorbereitend wurde zunächst 1 mM 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin)-Sulfonsäure (ABTS, Sigma, Deisenhofen) in 0,1 M Zitratpuffer (Behring, Marburg) gelöst. Das Vollblutinkubationsverfahren wie auch die nachfolgende PMN-Isolation erfolgte wie beschrieben. 100 µl PMN-Suspension (2×10^6 PMN/ml) wurden nun mit 0,5 µg Cytochalasin B (Sigma, Deisenhofen) und unter erneuter Zugabe der zu untersuchenden Testsubstanz 5 Minuten im Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Nach Hinzufügen von 100 µl voropsoniertem Zymosan, welches wie oben beschrieben hergestellt wurde, und erneuter Ergänzung der zu untersuchenden Testsubstanz wurde abermals inkubiert (10 min; 37°C) und anschließend 1 ml ABTS-Lösung beigelegt. Nach 3-minütiger Zentrifugation (700 x g, 20°C) wurde 1 ml des Überstandes abpipettiert und mit 30%-iger Wasserstoffperoxidlösung versetzt (Merck, Darmstadt). Nach kurzer Homogenisierung (Rüttelmixer) wurde die Extinktion bei 405 nm photometrisch bestimmt. Die Aktivität der freigesetzten Myeloperoxidase wurde nachfolgend anhand von in regelmäßigen Intervallen unter Verwendung bekannter Meerettich-Peroxidasekonzentrationen erstellten linearen Eichkurven errechnet. Die Aktivitäten sind in den Ergebnissen in „Units/l Überstand“ angegeben.

2.5 Inkubationen mit Anästhetika und Rezeptoragonisten bzw. -antagonisten

Für die Standardisierung der Methodiken wie auch für die nachfolgenden Versuche wurde heparinisiertes venöses Vollblut (10 I.E. Heparin-Natrium/ml, Sigma, Deisenhofen) verwandt. Das Blut stammte von freiwilligen weiblichen und männlichen Spendern (Alter: 29 ± 6 Jahre; Körpergröße $1,79 \pm 0,09$ m; Körpergewicht: 73 ± 11 kg). Bei Probanden mit metabolischen, kardiopulmonalen, neurologischen oder allergischen Erkrankungen sowie bei Medikamenteneinnahme in der Anamnese wurde von einer Blutentnahme abgesehen. Die Entnahme von 20 ml Blut erfolgten nach 8 bis 10-stündiger Nüchternheit morgens zwischen 08:00 und 10:00 Uhr. Im unmittelbaren Anschluss an die Blutentnahme wurden die heparinisierten Vollblutproben portioniert, in spezielle Inkubationsröhrchen (Merck, Darmstadt) überführt und nach Zusatz der zu untersuchenden Testsubstanzen im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Hierbei wurde 1 ml Vollblut jeweils mit 25 µl der entsprechenden Testsubstanz versetzt. Die Testsubstanzen selbst wurden mit „Hank’s balanced salt solution“ (HBSS[®], Sigma, Deisenhofen) vorbereitet und in die jeweilig zu untersuchenden Konzentrationsbereiche dilutiert (pH 7,4). Zu allen Messzeitpunkten der nachfolgend dargestellten Untersuchungen erfolgte eine parallele Prüfung mit testsubstanzfreien Versuchsansätzen (Kontrolluntersuchungen). Die Volumendifferenzen bei den Kontrollproben wurden mit HBSS[®] ausgeglichen. Die Standardinkubationszeiten betrugen 10 und 120 Minuten. Bei den weiterführenden Untersuchungen (Kombinationstestungen) orientierten sich die Dosierungen und Inkubationszeiten an den signifikanten Stoffwechsel- und Immunfunktionsbefunden der vorher durchgeführten und ausgewerteten Einzeluntersuchungen. Auf längere Inkubationszeiten wurde in der vorliegenden Arbeit aus folgenden Gründen verzichtet: In Voruntersuchungen hatte sich gezeigt, dass höhere Inkubationszeiten ($>2\frac{1}{2}$ Stunden) unter den vorgegebenen *in vitro* Bedingungen auch bei den Kontrolluntersuchungen selbst zu unspezifischen und nicht reproduzierbaren Veränderungen des intrazellulären Aminosäure- und α -Ketosäurepools wie auch der granulozytären Immunfunktionen führen. Außerdem ließ sich eine präzise PMN-Zellseparation bzw. eine exakte Zellzahlbestimmung bei Inkubationszeiten über $2\frac{1}{2}$ -3 Stunden ebenfalls nicht mehr einwandfrei gewährleisten. Die ausgewählten Konzentrationsbereiche orientierten sich ausschließlich an den Angaben und Ergebnissen früherer Untersuchungen (die Lite-

raturangaben hierzu befinden sich an den entsprechenden Positionen im Diskussions-
teil).

2.5.1 Midazolam

Im Rahmen der freien intrazellulären Aminosäure- und α -Ketosäurequantifizierung und der Immunfunktionsbestimmungen wurde in der vorliegenden Arbeit das Anästhetikum Midazolam (Dormicum[®], Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) in 3 unterschiedlichen Konzentrationsbereichen ausführlich untersucht. Midazolam wurde hierbei in Hinsicht auf die -aus der Einleitung zu dieser Arbeit abgeleiteten- Fragestellungen, unter Berücksichtigung eigener früherer Befunde, vergleichenden Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen sowie direkten Voruntersuchungen zu dieser Arbeit, stellvertretend ausgewählt. Die unteren Konzentrationsbereiche entsprachen der „minimalen effektiven Plasmakonzentration“, bei der von verschiedenen Untersuchern eine beginnende klinische Wirksamkeit des Präparates beschrieben wurde. Die mittlere Anästhetikakonzentration korrespondierte mit den durchschnittlichen Referenzbereichen einer „effektiven oder auch optimalen Plasmakonzentration“. In diesem Konzentrationsbereich konnte von differierenden Beobachtern eine klinisch signifikante hypnotische, sedative oder auch analgetische Wirksamkeit gefunden werden. Die höchste angewendete Konzentration unterschied sich um den Faktor 10 von den klinisch effektiven Wirkkonzentrationen des verwendeten Anästhetikums. Darüber hinaus erfolgte pro Anästhetikumkonzentration auch eine Prüfung auf eine mögliche Zeitabhängigkeit (Inkubationszeiten: 10, 30, 60 und 120 Minuten) potentieller Effekte. Es wurde von uns Midazolam in 3 unterschiedlichen Konzentrationen untersucht:

- 40 und 100 ng, sowie 1 μ g/ml

2.5.2 Rezeptoragonisten sowie -antagonisten

Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit auch die Einflüsse von 7-Chloro-5-(4'-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2 [Ro 5-4864 (4'-Chlorodiazepam); Sigma, Deisenhofen], 1-(2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolincarboxamid (PK 11195; Sigma, Deisenhofen), Flu-

mazenil (Anexate[®], Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen)] und Naloxon (Narcan[®], Du Pont Pharma, Bad Homburg) getestet. Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um den möglichen Einfluss von Benzodiazepin- und Opiatrezeptoren auf den intrazellulären Aminosäure- und α -Ketosäurepool in PMN wie auch auf ausgesuchte granulozytäre Immunfunktionen zu bestimmen (Inkubationszeiten 10 und 120 Minuten). Es wurden folgende Konzentrationen untersucht:

- 1) Ro 5-4864: 1 μ M und 100 μ M
(Agonist an „peripheren“ Benzodiazepinrezeptoren)
- 2) PK 11195: 1 μ M und 100 μ M
(Antagonist an „peripheren“ Benzodiazepinrezeptoren)
- 3) Flumazenil: 1 μ M und 100 μ M
(Antagonist an „zentralen“ Benzodiazepinrezeptoren)
- 4) Naloxon: 1 μ M und 100 μ M
(Opiatrezeptorantagonist)

2.5.3 Midazolam + Rezeptoragonisten sowie –antagonisten

Ebenso wurde das eingangs beschriebene Anästhetikum nach einer zehnminütigen Vorinkubation mit den oben genannten Rezeptoragonisten bzw. -antagonisten erneut getestet. Diese Inkubationen wurden durchgeführt, um die Bedeutung von Opiat- sowie Benzodiazepinrezeptoren in der midazolaminduzierten Aminosäurestoffwechsel- bzw. Immunmodulation zu bestimmen. Die erforderlichen Konzentrationen wählten wir analog zu früheren Untersuchungen, in denen eine signifikante Beeinflussung der jeweilig relevanten zellulären Stoffwechselwege beschrieben worden war. Um mögliche Effekte klar zu erfassen, orientierten sich die Dosierungen und Inkubationszeiten dieser Testungen an den signifikanten Stoffwechselbefunden der oben beschriebenen Einzeluntersuchungen. Folgende Versuchsansätze gelangten zur Untersuchung:

Midazolam: 100 ng/ml und 1 µg/ml
+ Ro 5-4864 (100 µM)
+ PK 11195 (100 µM)
+ Flumazenil (100 µM)
+ Naloxon (100 µM)

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen (Leiter: Prof. Dr. J. Dudeck).

Für die mittels der oben beschriebenen Analytiken bestimmten freien Amino- und α -Ketosäuren wurde nach detaillierter Sichtung der ermittelten Messwerte prinzipiell Normalverteilung vorausgesetzt. Die Darstellung der berechneten Ergebnisse erfolgte deshalb -getrennt nach Dosierung, Inkubationszeit sowie hinsichtlich der gewählten Inkubationsansätze- unter Zuhilfenahme von Mittelwerts- und Standardabweichungsberechnungen. Zur Beurteilung der Effekte durch die beschriebenen Einflussgrößen wurden ein- bzw. zweifaktorielle Varianzanalysen mit Messwiederholungen herangezogen, welche -falls Haupteffekte nachweisbar waren- durch einen Paarvergleich nach Bonferoni ergänzt wurden. Es ist hier zusätzlich anzumerken, dass die Analyse der Amino- und α -Ketosäuredaten explorativen Charakter hatte, bei der eine Vielzahl von Hypothesen statistisch getestet wurden. Kriterien für die Annahme bzw. Beibehaltung der ermittelten Hypothesen war daher die errechnete Wahrscheinlichkeit für den Fehler der 1. Art p , der im Ergebnisteil reduziert auf ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ angegeben wird.

Die im Rahmen der Immunfunktionsuntersuchungen ermittelten Messwerte wurden zunächst unter Zuhilfenahme des Kolmogoroff-Smirnoff-Anpassungstests hinsichtlich ihrer Normalverteilung geprüft. Außerdem erfolgte mittels des Bartlett-Tests eine Prüfung aller Messresultate auf ihre Varianzhomogenität ($p < 0,1$). Waren diese Voraussetzungen erfüllt, erfolgte eine ein- bzw. zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen, welche -falls Haupteffekte nachweisbar waren- ebenfalls durch einen Paarvergleich nach Bonferoni ergänzt wurde. Waren die Vorbedingungen für eine Varianzanalyse jedoch nicht erfüllt, so erfolgte die Anwendung des

Friedman-Tests. Als Folgeverfahren diene hier der Miller-Test. Das Signifikanzniveau für alle angewendeten statistischen Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit $p \leq 0,05$ angesetzt.

3 ERGEBNISSE

PMN Separation aus Vollblut

Es konnten pro 4 ml Vollblutprobe durchschnittlich $3,67 \times 10^6 \pm 1,19 \times 10^6$ PMN-Zellen separiert werden. Bei zweimaliger Zellzählung betrug die prozentuale Abweichung $3,9 \pm 1,6 \%$ mit einer durchschnittlichen Zellreinheit von $98,6\% \pm 0,8\%$ und einer Zellvitalität von $99,1\% \pm 0,7\%$. Proben mit einem Reinheitsgehalt von weniger als 96 % bzw. solche mit mehr als 4 % avitalen PML wurden verworfen. Die durchschnittliche Dauer der PMN Separation konnte von uns, verglichen mit anderen Arbeitsgruppen, auf 34 ± 4 Minuten maximal verkürzt werden.

3.2 Bestimmung plasmatischer und freier intrazellulärer Aminosäuren sowie α -Ketosäuren

Um die Qualität und Quantität der Messergebnisse im Rahmen der Hochdruck-Fluoreszenz-Flüssigkeitschromatographie zu gewährleisten, wurde die Analytik mittels interner und externer Standardisierungsverfahren fortlaufend überwacht.

3.2.1 Ergebnisse der Standardisierungs- und Validierungsverfahren

Eine Qualitätssicherung der angewendeten Methode demonstriert die Vergleichbarkeit und Konstanz zwischen Reihen- und „Tag-zu-Tag“-Analysen sowohl der Flächenquotienten als auch der Retentionszeiten, die in den Tabellen 5 und 6 angegeben sind:

Aminosäurestandardproben:

Der *Variationskoeffizient der Flächen* liegt durchschnittlich bei:

<u>Reihenanalysen</u>	zwischen 0,86 % (Methionin) und 2,34 % (Leucin)
<u>Tag-zu-Tag-Analysen</u>	zwischen 1,88 % (Glycin) und 4,69 % (Lysin).

Der *Variationskoeffizient der Retentionszeiten* liegt durchschnittlich bei:

Reihenanalysen zwischen 0,02 % (Lysin) und 0,23 % (Citrullin)
„Tag-zu-Tag“-Analysen zwischen 0,04 % (Lysin) und 0,72 % (Threonin).

α -Ketosäurestandardproben:

Der *Variationskoeffizient der Flächen* liegt durchschnittlich bei:

Reihenanalysen 1,8% (Pyruvat) und 3,7% (α -Ketoisovalerianat)
„Tag-zu-Tag“-Analysen 3,8% (α -Ketoisocapronat) und 5,4% (α -Ketoisovalerianat)

Der *Variationskoeffizient der Retentionszeit* liegt im Durchschnitt bei:

Reihenanalysen 0,17% (Pyruvat) - 0,22 (α -Keto- β -methylvalerianat)
„Tag-zu-Tag“-Analysen 0,48% (α -Ketoglutarat) und 0,84 (α -Keto- β -methylvalerianat)

	<i>Reihenanalyse</i>			<i>„Tag zu Tag-Analyse“</i>		
	<i>R.-Zeit</i>	<i>Flächen</i>	<i>R.-Zeit</i>	<i>R.-Zeit</i>	<i>Flächen</i>	<i>R.-Zeit</i>
	<i>t</i>	<i>VK</i>	<i>VK</i>	<i>t</i>	<i>VK</i>	<i>VK</i>
	<i>[min]</i>	<i>[%]</i>	<i>[%]</i>	<i>[min]</i>	<i>[%]</i>	<i>[%]</i>
<i>α-Ketosäure</i>						
α -KG	2,36	2,2	0,19	2,34	4,8	0,48
PYR	8,60	1,8	0,17	8,54	3,9	0,58
α -KB	12,59	2,5	0,20	12,52	4,1	0,49
α -KV (I.S.)	17,03	2,6	0,20	16,93	4,5	0,61
α -KIV	19,72	3,7	0,21	19,60	5,4	0,47
α -KIC	21,57	2,1	0,21	21,44	3,8	0,68
PhePYR	22,56	2,4	0,19	22,43	4,6	0,76
α -KMV	25,49	3,1	0,22	25,33	5,2	0,84

Tabelle 5: Reproduzierbarkeit und Linearität der Flächenquotienten (**Flächen**) sowie Retentionszeiten (**R.-Zeit**) von *α -Ketosäurestandardproben* [*α -Ketoglutarat (α -KG), Pyruvat (PYR = α -Ketoalaninat), α -Ketobutyrat (α -KB), α -Ketovalerianat (α -KV= Interner Standard), α -Ketoisovalerianat (α -KIV), α -Ketoisocapronat (α -KIC), *p*-Hydroxy-Phenylpyruvat (PhePYR), α -Keto- β -methylvalerianat (α -KMV)] bei Reihen- (n= 12) und „Tag-zu-Tag“-Analysen (n= 10); VK= Variationskoeffizient [%], t= Zeit [min], I.S. = Interner Standard.*

	<i>Reihenanalyse</i>			„Tag zu Tag-Analyse“		
	<i>R.-Zeit</i>	<i>Flächen</i>	<i>R.-Zeit</i>	<i>R.-Zeit</i>	<i>Flächen</i>	<i>R.-Zeit</i>
	<i>t</i>	<i>VK</i>	<i>VK</i>	<i>t</i>	<i>VK</i>	<i>VK</i>
	[min]	[%]	[%]	[min]	[%]	[%]
<i>Aminosäure</i>						
Aspartat	3,36	1,18	0,16	3,39	2,84	0,31
Glutamat	4,58	1,26	0,12	4,64	1,91	0,47
Asparagin	8,74	1,04	0,09	8,82	1,97	0,54
Serin	11,35	1,31	0,12	11,49	2,11	0,52
Glutamin	14,53	1,22	0,14	15,01	2,61	0,69
Histidin	16,43	1,37	0,15	16,97	3,08	0,63
Homoserin (I.S.)	20,16	2,69	0,19	21,06	3,05	0,68
Glycin	24,24	1,76	0,20	24,77	1,88	0,64
Threonin	27,12	1,15	0,21	27,94	2,23	0,72
Citrullin	28,43	1,66	0,23	29,05	1,99	0,50
Arginin	34,67	1,29	0,11	35,14	3,83	0,21
Taurin	39,23	1,12	0,06	39,48	4,49	0,18
Hypotaurin	40,48	1,69	0,06	40,72	3,29	0,15
Alanin	41,81	1,38	0,05	42,04	3,61	0,11
Tyrosin	44,48	1,43	0,05	44,63	3,44	0,10
α-Aminobutyrat	49,45	0,85	0,04	49,67	2,72	0,09
Tryptophan	52,95	1,07	0,03	53,21	2,37	0,08
Methionin	53,33	0,86	0,03	53,59	3,53	0,07
Valin	54,13	1,33	0,03	54,52	2,86	0,07
Phenylalanin	55,63	0,94	0,02	56,04	3,37	0,06
Isoleucin	58,11	1,28	0,02	58,49	3,89	0,05
Leucin	59,10	2,34	0,02	59,52	3,28	0,05
Ornithin	62,47	2,22	0,02	62,86	3,07	0,04
Lysin	64,13	1,79	0,02	64,58	4,69	0,04

Tabelle 6: Reproduzierbarkeit und Linearität der Flächenquotienten (**Flächen**) sowie Retentionszeiten (**R.-Zeit**) von Aminosäurestandardproben bei Reihen- (n= 40) und „Tag-zu-Tag“-Analysen (n= 20); VK= Variationskoeffizient [%], t= Zeit [min], I.S. = Interner Standard.

Es ergaben sich keine Hinweise, dass es nach Resuspendierung der lyophilisierten Standardamino- bzw. α -Ketosäurestandardproben als auch im Rahmen der weiteren Probenvorbereitung zu einer nachfolgenden chemischen Umsetzung bzw. dem Verlust der Fluoreszenzaktivität kam. Die Wiederfindungsrate betrug sowohl bei den Aminosäure-/ α -Ketosäurestandardproben ebenso wie bei den PMN- und Plasmaproben für alle hier untersuchten Standardamino- bzw. α -Ketosäuren 100%.

3.2.2 Quantifizierung primärer intragranulozytärer Amino- und α -Ketosäuren

Von jeder Zell- bzw. Standardprobe wurde ein Chromatogramm erstellt. Abbildung 7 und 8 zeigen ein typisches Verteilungsmuster des mittleren intragranulozytären Amino- bzw. α -Ketosäuregehalts bezogen sowohl auf Einzelzellniveau als auch auf das ermittelte PMN Zellvolumen.

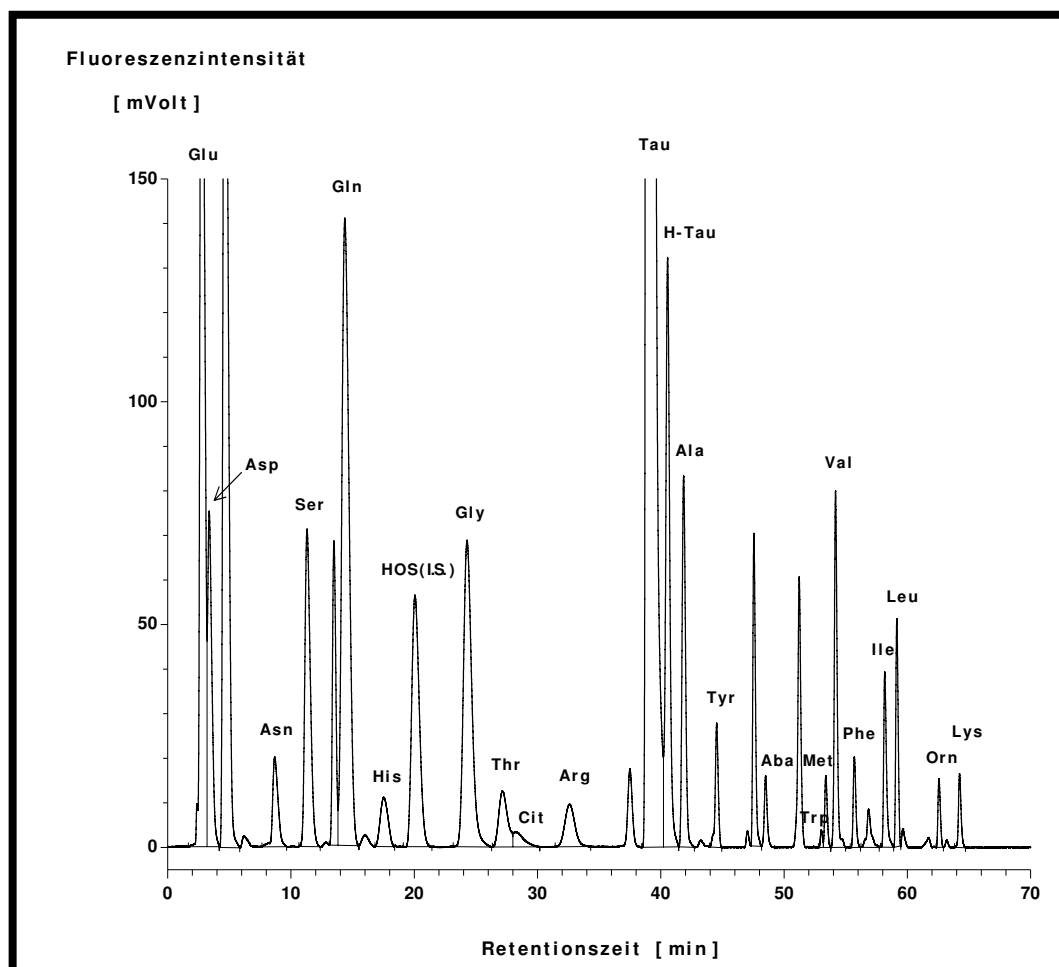


Abbildung 7: Verteilungsmuster intragranulozytärer Aminosäuren

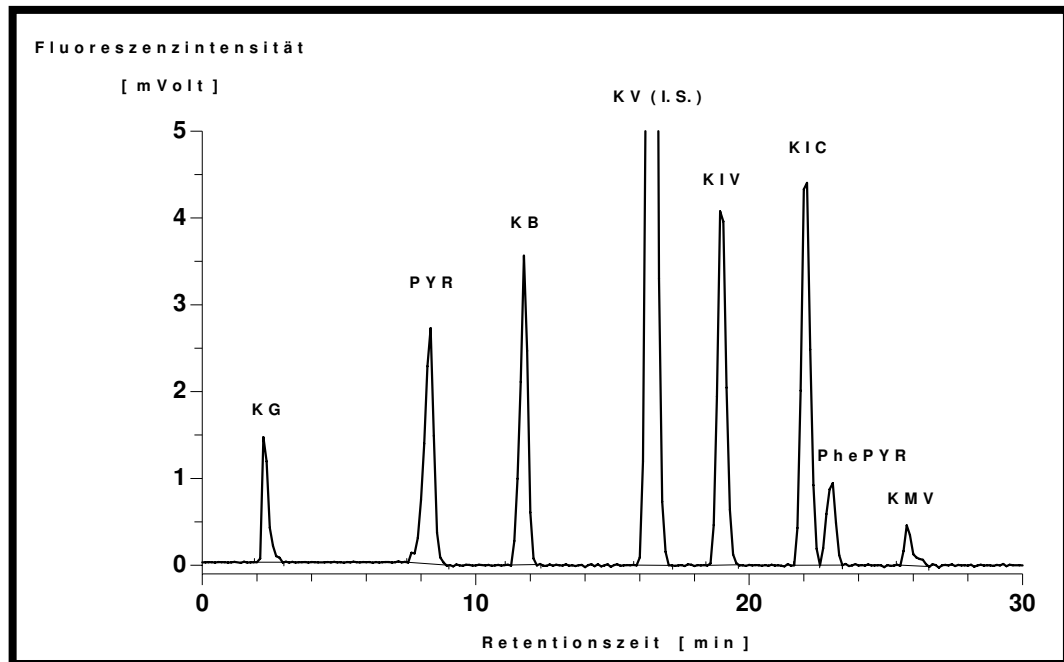


Abbildung 8: Verteilungsmuster intragranulozytärer α -Ketosäuren

Die Flächen unter den Chromatogrammkurven wurden mittels Planimetrie unter Zuhilfenahme des Softwareprogramms EuroChrome™ 2000 für Windows (Version 1.6, Knauer, Berlin) errechnet.

Der intrazelluläre, plasmatische sowie mittlere Aminosäure- bzw. α -Ketosäuregehalt bezogen auf die PMN-Einzelzelle wie das PMN-Zellvolumen sind in den Tabellen 7 und 8 dargestellt.

<i>Aminosäure</i>		<i>PMN</i>		<i>PLASMA</i>	<i>GRADIENT</i>
	<i>(Abb.)</i>	<i>[10⁻¹⁶ Mol/ Zelle]</i>	<i>[μMol/l NZV]</i>	<i>[μMol/l]</i>	<i>i.z./ e.z.</i>
Aspartat	(Asp)	2,57 $\pm$ 1,74	566 $\pm$ 383	12 $\pm$ 3	47,1
Glutamat	(Glu)	5,83 $\pm$ 1,76	1284 $\pm$ 387	31 $\pm$ 14	41,4
Asparagin	(Asn)	0,41 $\pm$ 0,21	90 $\pm$ 46	58 $\pm$ 11	1,6
Serin	(Ser)	2,33 $\pm$ 0,91	513 $\pm$ 200	121 $\pm$ 21	4,2
Glutamin	(Gln)	3,03 $\pm$ 1,30	667 $\pm$ 286	536 $\pm$ 81	1,2
Histidin	(His)	1,11 $\pm$ 0,54	244 $\pm$ 119	88 $\pm$ 23	2,7
Glycin	(Gly)	3,22 $\pm$ 1,39	709 $\pm$ 306	253 $\pm$ 42	2,8
Threonin	(Thr)	1,24 $\pm$ 0,69	273 $\pm$ 151	134 $\pm$ 36	2,0
Citrullin	(Cit)	0,15 $\pm$ 0,10	33 $\pm$ 22	32 $\pm$ 9	1,0
Arginin	(Arg)	0,46 $\pm$ 0,25	101 $\pm$ 55	84 $\pm$ 13	1,2
Taurin	(Tau)	41,8 $\pm$ 16,3	9207 $\pm$ 3590	114 $\pm$ 21	80,7
Hypotaurin	(H-Tau)	1,39 $\pm$ 0,62	306 $\pm$ 136	1,7 $\pm$ 0,4	180,0
Alanin	(Ala)	1,87 $\pm$ 0,98	412 $\pm$ 216	357 $\pm$ 83	1,2
Tyrosin	(Tyr)	0,73 $\pm$ 0,39	138 $\pm$ 81	56 $\pm$ 14	2,5
α -Aminobutyrat	(Aba)	0,18 $\pm$ 0,11	39 $\pm$ 24	22 $\pm$ 5	1,8
Tryptophan	(Trp)	0,17 $\pm$ 0,12	37 $\pm$ 26	65 $\pm$ 14	0,6
Methionin	(Met)	0,18 $\pm$ 0,14	40 $\pm$ 31	23 $\pm$ 6	1,7
Valin	(Val)	0,65 $\pm$ 0,41	143 $\pm$ 90	215 $\pm$ 41	0,7
Phenylalanin	(Phe)	0,94 $\pm$ 0,59	207 $\pm$ 129	69 $\pm$ 16	3,0
Isoleucin	(Ile)	0,46 $\pm$ 0,28	101 $\pm$ 61	66 $\pm$ 15	1,5
Leucin	(Leu)	0,52 $\pm$ 0,25	114 $\pm$ 55	127 $\pm$ 32	0,9
Ornithin	(Orn)	0,45 $\pm$ 0,30	99 $\pm$ 66	42 $\pm$ 19	2,4
Lysin	(Lys)	0,55 $\pm$ 0,31	121 $\pm$ 68	191 $\pm$ 50	0,6

Tabelle 7: Gehalt freier Aminosäuren [10^{-16} Mol] pro PMN-Zelle (n= 112) sowie ihre Konzentration bezogen auf das PMN-Einzelzellvolumen (NZV; $454 \pm 258 \times 10^{-15}$ l; $\text{NZV} = \text{Leukokrit}_{\text{Ansatz}} \times \text{PMN-Zahl}^{-1}$) sowie bezogen auf die Aminosäurekonzentration im Plasma; (MW $\pm$ SD). Zusätzlich sind die intra- (i.z.) versus extrazellulären (e.z.) Konzentrationsgradienten dargestellt.

Die einzelnen Aminosäuren lassen deutliche Konzentrationsunterschiede erkennen. In polymorphkernigen Granulozyten besitzt die Aminosäure Taurin die höchste Anreicherung ($41,8 \pm 16,3 \times 10^{-16}$ Mol/Zelle), gefolgt von der 7-fach geringer konzentrierten Aminosäure Glutamat ($5,83 \pm 1,76 \times 10^{-16}$ Mol/Zelle). Ferner sind noch Glycin, Glutamin, Aspartat, Serin, Alanin und Hypotaurin in absteigender Reihenfolge stark vertreten. Hervorzuheben ist weiterhin die Aufrechterhaltung eines hohen intra- versus extrazellulären Konzentrationsgradienten (i.z./e.z.) der Aminosäuren Hypotaurin (180), Taurin (80,7), Aspartat (47,1) und Glutamat (41,4). Nahezu plasmaitotone Konzentrationsverhältnisse findet man bei Tryptophan (0,6) Lysin (0,6), Valin (0,7) und Leucin (0,9).

<i>α-Ketosäure</i>	<i>PMN</i>		<i>PLASMA GRADIENT</i>	
	<i>[10⁻¹⁷ Mol/ Zelle]</i>	<i>[μMol/l NCV]</i>	<i>[μMol/l]</i>	<i>i.z./ e.z.</i>
α -Ketoglutarat	1,26 $\pm$ 0,67	30,3 $\pm$ 16,1	7,06 $\pm$ 2,01	4,3
Pyruvat	6,07 $\pm$ 3,58	145,9 $\pm$ 8,6	110,6 $\pm$ 35,1	1,3
α -Ketobutytrat	4,31 $\pm$ 2,57	103,6 $\pm$ 61,8	7,81 $\pm$ 1,82	13,3
α -Ketoisovalerianat	2,16 $\pm$ 1,05	51,9 $\pm$ 25,2	14,74 $\pm$ 3,64	3,5
α -Ketoisocapronat	0,39 $\pm$ 0,24	9,3 $\pm$ 5,8	40,08 $\pm$ 6,93	0,23
p-Hydroxy-Phenylpyruvat	0,33 $\pm$ 0,21	7,9 $\pm$ 5,0	7,39 $\pm$ 2,65	1,07
α -Keto- β -methylvalerianat	0,77 $\pm$ 0,59	18,5 $\pm$ 14,2	22,09 $\pm$ 4,90	0,83

Tabelle 8: Gehalt freier intrazellulärer α -Ketosäuren [10^{-17} Mol] pro PMN-Zelle (n= 51) sowie ihre Konzentration bezogen auf das PMN-Einzelzellvolumen (NZV; $416 \pm 263 \times 10^{-15}$ l; NZV= Leukokrit_{Ansatz} x PMN-Zahl⁻¹) bzw. bezogen auf die α -Ketosäurekonzentrationen im Plasma; (MW $\pm$ SD). Zusätzlich sind die intra- (i.z.) versus extrazellulären (e.z.) Konzentrationsgradienten dargestellt.

α -Ketosäuren sind insgesamt um eine Zehnerpotenz niedriger konzentriert als intragranulozytäre Aminosäuren (Tabelle 7). Die höchsten Konzentrationen findet man für Pyruvat ($6,07 \pm 3,58 \times 10^{-17}$ Mol/Zelle), gefolgt von α -Ketobutytrat ($4,31 \pm 2,57 \times 10^{-17}$ Mol/Zelle), α -Ketoisovalerianat ($2,16 \pm 1,05 \times 10^{-17}$ Mol/Zelle) und α -Ketoglutarat ($1,26 \pm 0,67 \times 10^{-17}$ Mol/Zelle). Hohe intra- versus extrazelluläre Konzentrationsgradienten zeigen sich bei α -Ketobutytrat (13,3), α -Ketoglutarat (4,3) und α -Ketoisovalerianat (3,5).

3.3 *Midazolam, Rezeptoragonisten und -antagonisten*

3.3.1 Midazolam

3.3.1.1 Midazolam und intragranulozytärer Aminosäurepool

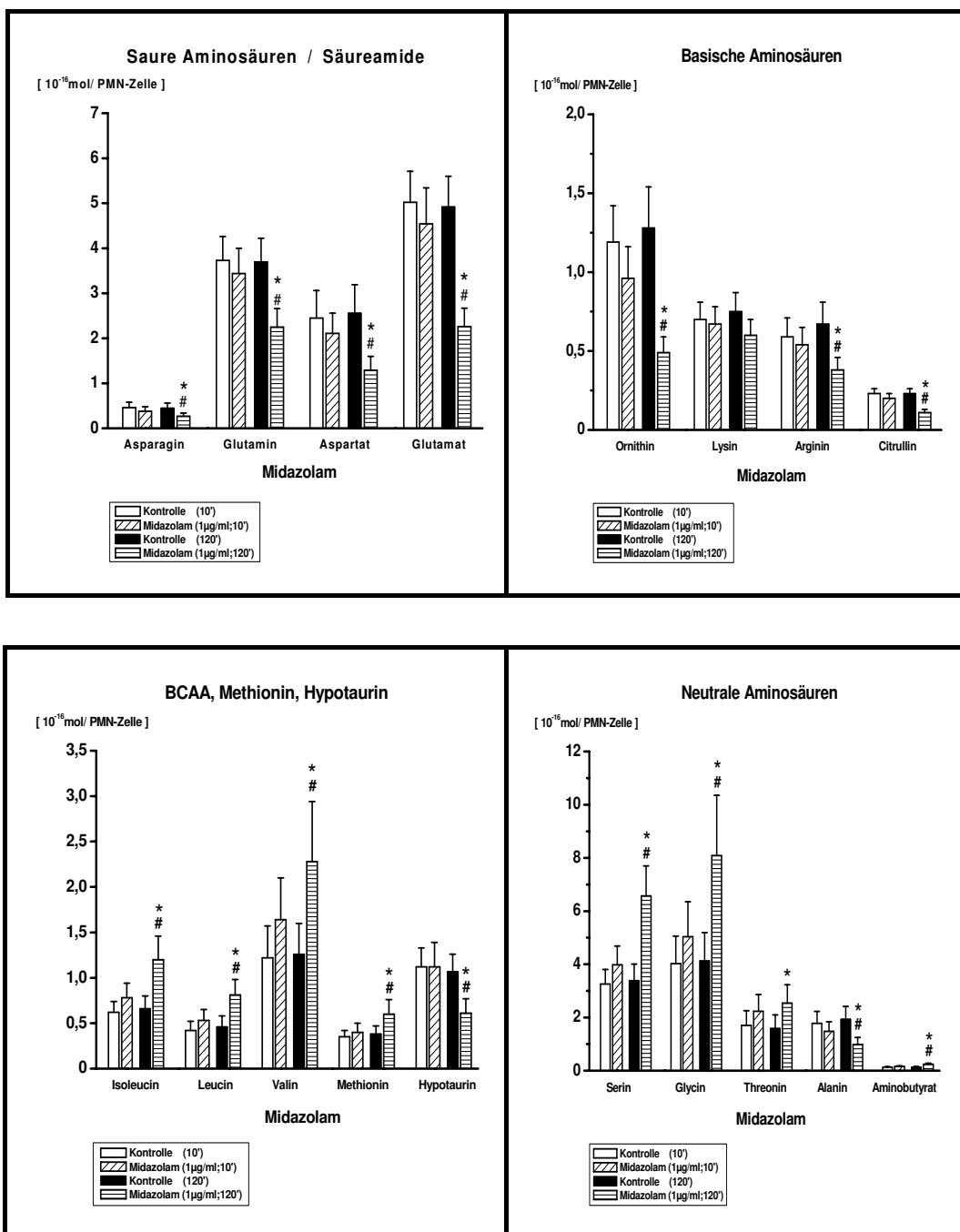


Abbildung 9: Freier intragranulozytärer Aminosäuregehalt [10⁻¹⁶ Mol] pro PMN nach Inkubation (10,120 min) mit Midazolam (1 µg/ml), n=10, * ≤ 0,05 versus Kontrolle; # ≤ 0,05 versus 10 min, [BCCA: branched-chain amino acids]

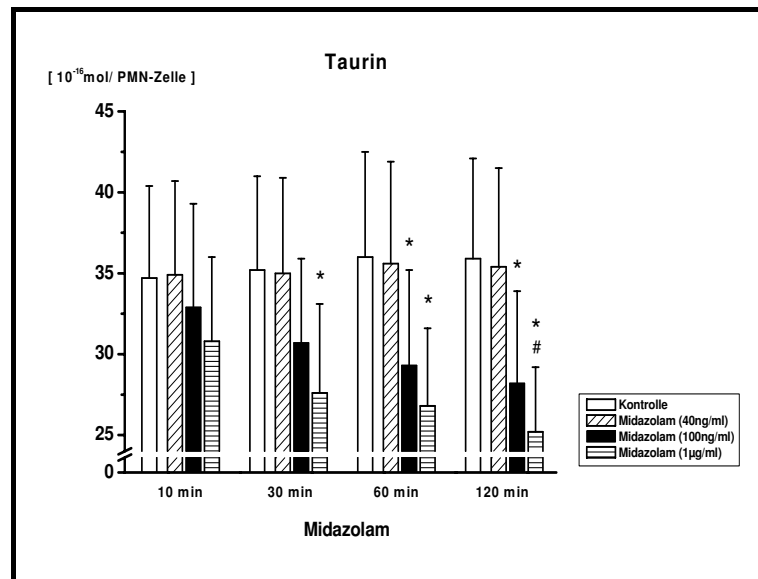


Abbildung 10: Freier intragranulozytärer Tauringehalt [10^{-16} Mol] pro PMN nach Inkubation (10, 30, 60, 120 min) mit Midazolam (40, 100 ng/ml; $1\mu\text{g/ml}$), $n=10$, * $\leq 0,05$ versus Kontrolle; # $\leq 0,05$ versus 10 min

Die 10-, 30-, 60- und 120-minütige Inkubation mit Midazolam in Konzentrationen von 40 und 100 ng/ml sowie $1\mu\text{g/ml}$ zeigte sowohl dosisabhängig als auch im Zeitverlauf Veränderungen der intragranulozytären Aminosäurekonzentrationen. Besonders bei Midazolamkonzentrationen von ≥ 100 ng/ml und einer Inkubationszeit von 120 Minuten bzw. Konzentrationen von $1\mu\text{g/ml}$ bei ≥ 30 Minuten zeigten sich signifikante Veränderungen des gemessenen Aminosäuregehalts (Abbildung 9 und 10, Tabelle 9-13 [Anhang]).

Midazolam führte zu einer intrazellulären *Verminderung* von Asparagin, Glutamin, Aspartat, Glutamat, Ornithin, Arginin, Citrullin, Hypotaurin, Alanin und Taurin.

Dagegen zeigte sich eine *Konzentrationserhöhung* bei Isoleucin, Leucin, Valin, Methionin, Serin, Glycin, Threonin, α -Aminobutyrat und Histidin.

3.3.1.2 Midazolam und intragranulozytärer α -Ketosäurepool

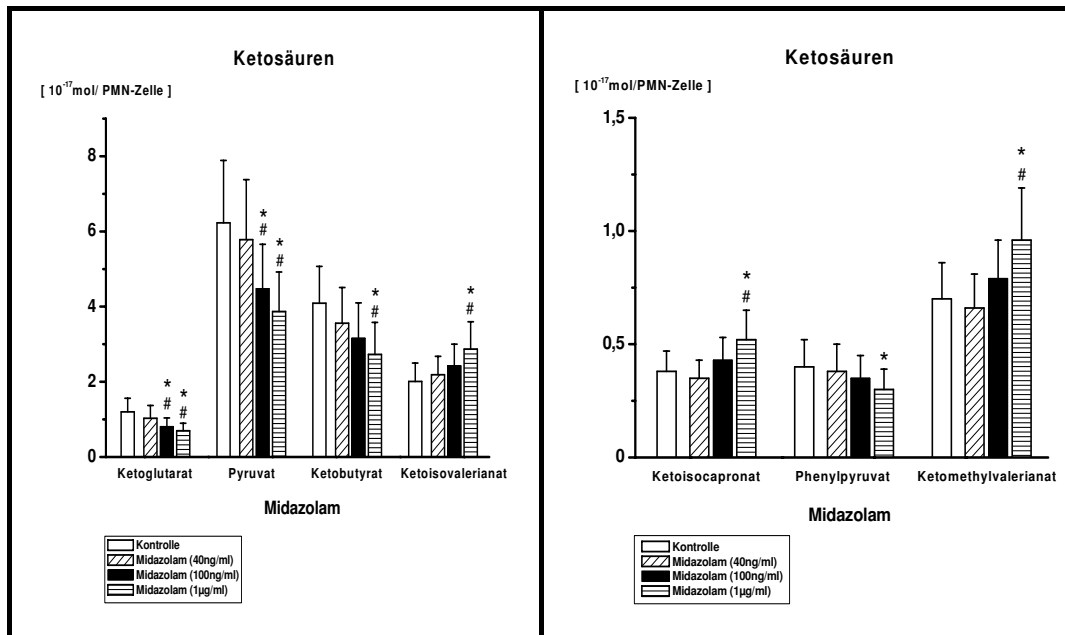


Abbildung 11: Freier intragranulozytärer α -Ketosäuregehalt [10^{-17} Mol] pro PMN nach Inkubation (120 min) mit Midazolam (40, 100 ng/ml; 1 μ g/ml), n=10, * $\leq$ 0,05 versus Kontrolle; # $\leq$ 0,05 versus 10 min

Hier zeigten sich bei Konzentrationen von ≥ 100 ng/ml und einer 120-minütigen Inkubationszeit signifikante dosis- und inkubationszeitabhängige *Abnahmen* von α -Ketoglutarat, Pyruvat, α -Ketobutyrat und Phenylpyruvat (Abbildung 11, Tabelle 14 [Anhang]).

Signifikante *Anstiege* bei Konzentrationen von 1 μ g/ml und einer 120-minütigen Inkubation konnte bei: α -Ketoisovalerianat, α -Ketoisocapronat und α -Keto- β -methylvalerianat beobachtet werden.

3.3.1.3 Midazolam und granulozytäre Immunfunktionsmarker

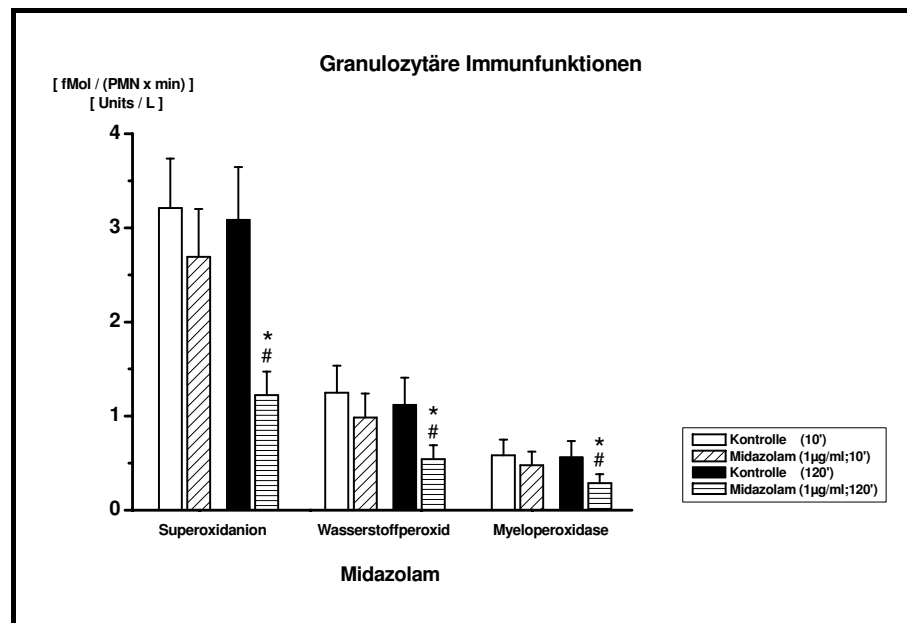


Abbildung 12: Superoxidanionbildung, Wasserstoffperoxidproduktion [fMol/(PMN x min)]; Myeloperoxidaseaktivität [Units/l MPO] nach Inkubation (10, 120 min) mit Midazolam (1µg/ml), n=10, * ≤ 0,05 versus Kontrolle; # ≤ 0,05 versus 10 min

Hier zeigten sich eine bedeutsame dosis- und inkubationszeitabhängige *Abnahme* der Superoxidanion (O_2^-)- und Wasserstoffperoxidproduktion (H_2O_2) sowie der Myeloperoxidaseaktivität (MPO) (Abbildung 12, Tabelle 15 [Anhang]).

Wie auch schon bei midazolaminduzierten Aminosäure- und α -Ketosäureveränderungen, konnte dies bei Konzentrationen von ≥ 100 ng/ml und Inkubationszeiten von ≥ 30 Minuten beobachtet werden.

3.3.2 Rezeptoragonisten und -antagonisten

3.3.2.1 Ro 5-4864, PK 11195, Flumazenil sowie Naloxon und intragranulozytäre Aminosäurekonzentration

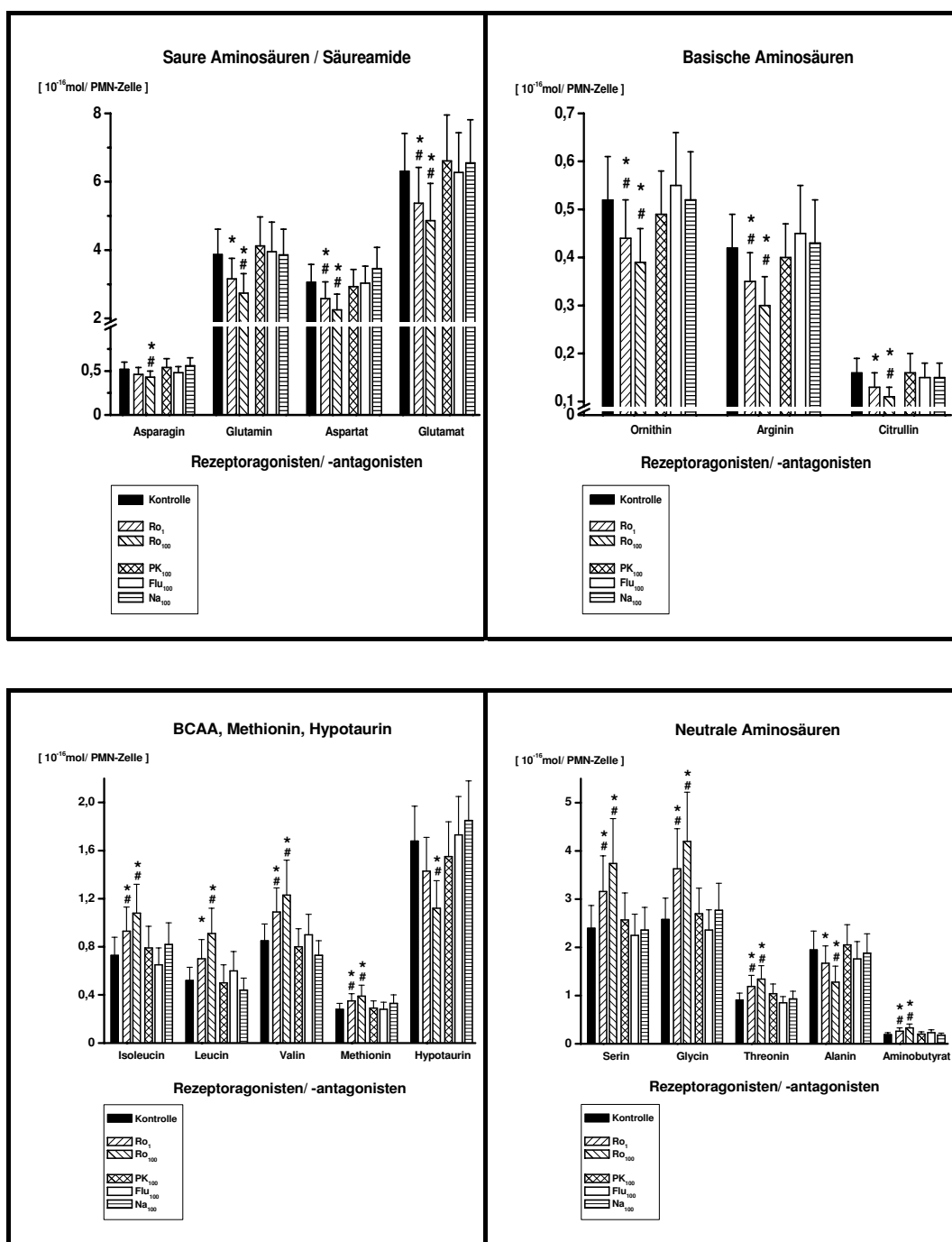


Abbildung 13: Freier intragranulozytärer Aminosäuregehalt [10^{-16} Mol] pro PMN-Zelle nach Inkubation (120 min) mit Ro 5-4864 (1, 100 μ M), PK 11195 (100 μ M), Flumazenil (100 μ M), Naloxon (100 μ M), n=10, * $\leq 0,05$ versus Kontrolle; # $\leq 0,05$ versus 10 min, [BCCA: branched-chain amino acids]

Ausschließlich der periphere Benzodiazepinrezeptoragonist Ro 5-4864 führte zu bedeutsamen inkubations- und dosisabhängigen Veränderungen intragranulozytärer Aminosäurekonzentrationen (Abbildung 13, Tabelle 16-20 [Anhang]).

Mit dem Anstieg der Ro 5-4864 Konzentration bei Inkubationszeiten von 120 Minuten (eine 10-minütige Inkubationszeit zeigte keinerlei Effekt) kam es zu einer signifikante *Verminderung* von Asparagin, Glutamin, Aspartat, Glutamat, Ornithin, Arginin, Citrullin, Taurin, Hypotaurin und Alanin. Eine intragranulozytäre *Konzentrationserhöhung* zeigte sich bei Isoleucin, Leucin, Valin, Methionin, Serin, Glycin, Threonin, α -Aminobutyrat und Histidin. *Keinerlei* Veränderungen zeigte die alleinige Inkubation mit den übrigen Benzodiazepin- und Opiatrezeptorantagonisten (PK 11195, Naloxon, Flumazenil).

3.3.2.2 Ro 5-4864, PK 11195, Flumazenil sowie Naloxon und intragranulozytärer α -Ketosäurepool

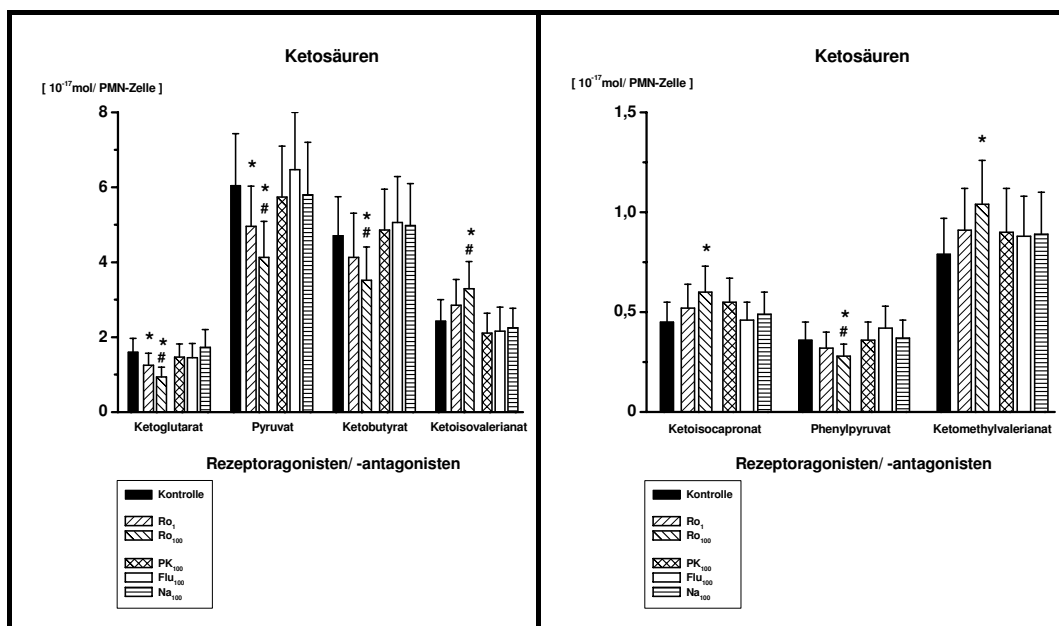


Abbildung 14: freier intragranulozytärer α -Ketosäuregehalt [10^{-17} Mol] pro PMN nach Inkubation (120 min) mit Ro 5-4864 (1, 100 μ M), PK 11195 (100 μ M), Flumazenil (100 μ M), Naloxon (100 μ M), n=10, * $\leq 0,05$ versus Kontrolle; # $\leq 0,05$ versus 10 min

Auch hier führte nur Ro 5-4864 zu signifikanten dosis- und inkubationszeitabhängigen Veränderung der intragranulozytären α -Ketosäurekonzentration (Abbildung 14, Tabelle 21 [Anhang]). Eine 120-minütige Inkubation mit 1 μ M Ro 5-4864 führte zu einer bedeutsamen Reduktion von α -Ketoglutarat sowie Pyruvat,

während Dosierungen von 100 μM Ro 5-4864 zusätzlich zu einer *Abnahme* von α -Ketobutyrat und Phenylpyruvat sowie zu einem *Anstieg* von Ketoisovalerianat, α -Ketoisocapronat und α -Keto- β -methylvalerianat führten.

3.3.2.3 Ro 5-4864, PK 11195, Flumazenil sowie Naloxon und granulozytäre Immunfunktionsmarker

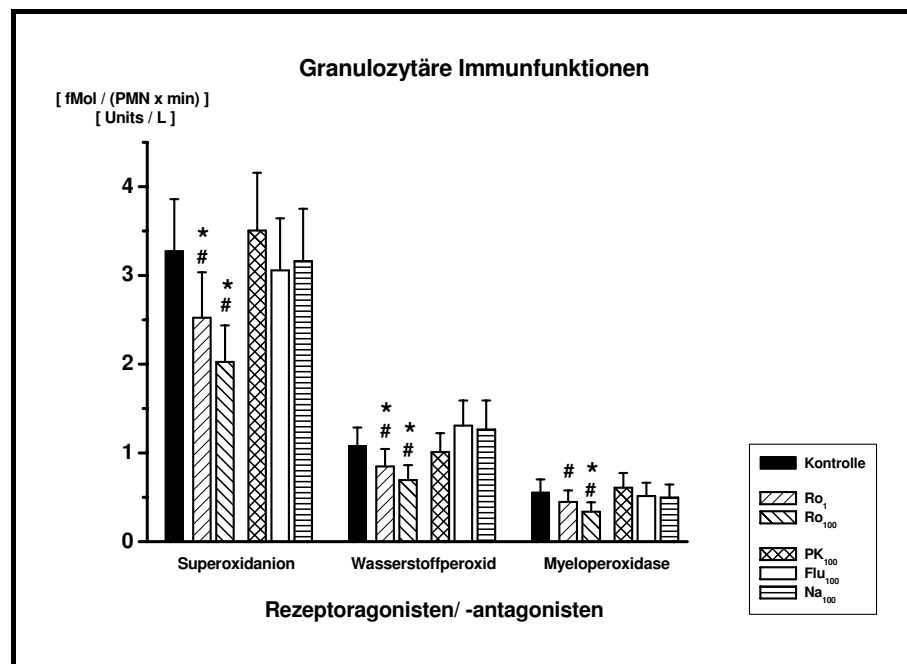


Abbildung 15: Superoxidanionbildung, Wasserstoffperoxidproduktion [fMol/(PMN x min)]; Myeloperoxidaseaktivität [Units/l MPO] nach Inkubation (120 min) mit Ro 5-4864 (1, 100 μM), PK 11195 (100 μM), Flumazenil (100 μM), Naloxon (100 μM), n=10, * $\leq 0,05$ versus Kontrolle; # $\leq 0,05$ versus 10 min

Übereinstimmend mit den dosis- (100 μM > 1 μM) als auch inkubationszeitabhängigen Veränderungen (120 Minuten) der bereits beschriebenen intragranulozytären Amino- und α -Ketosäurekonzentrationen, zeigte sich auch hier nur durch Ro 5-4864 eine signifikante *Reduktion* der Superoxidanion- und Wasserstoffperoxidproduktion sowie eine bedeutsame *Abnahme* der von PMN freigesetzten Myeloperoxidase (Abbildung 15, Tabelle 22 [Anhang]).

3.3.3 Midazolam + Ro 5-4864, PK 11195, Flumazenil und Naloxon

3.3.3.1 Midazolam jeweils kombiniert mit Ro 5-4864, PK 11195, Flumazenil sowie Naloxon und intragranulozytäre Aminosäurekonzentration

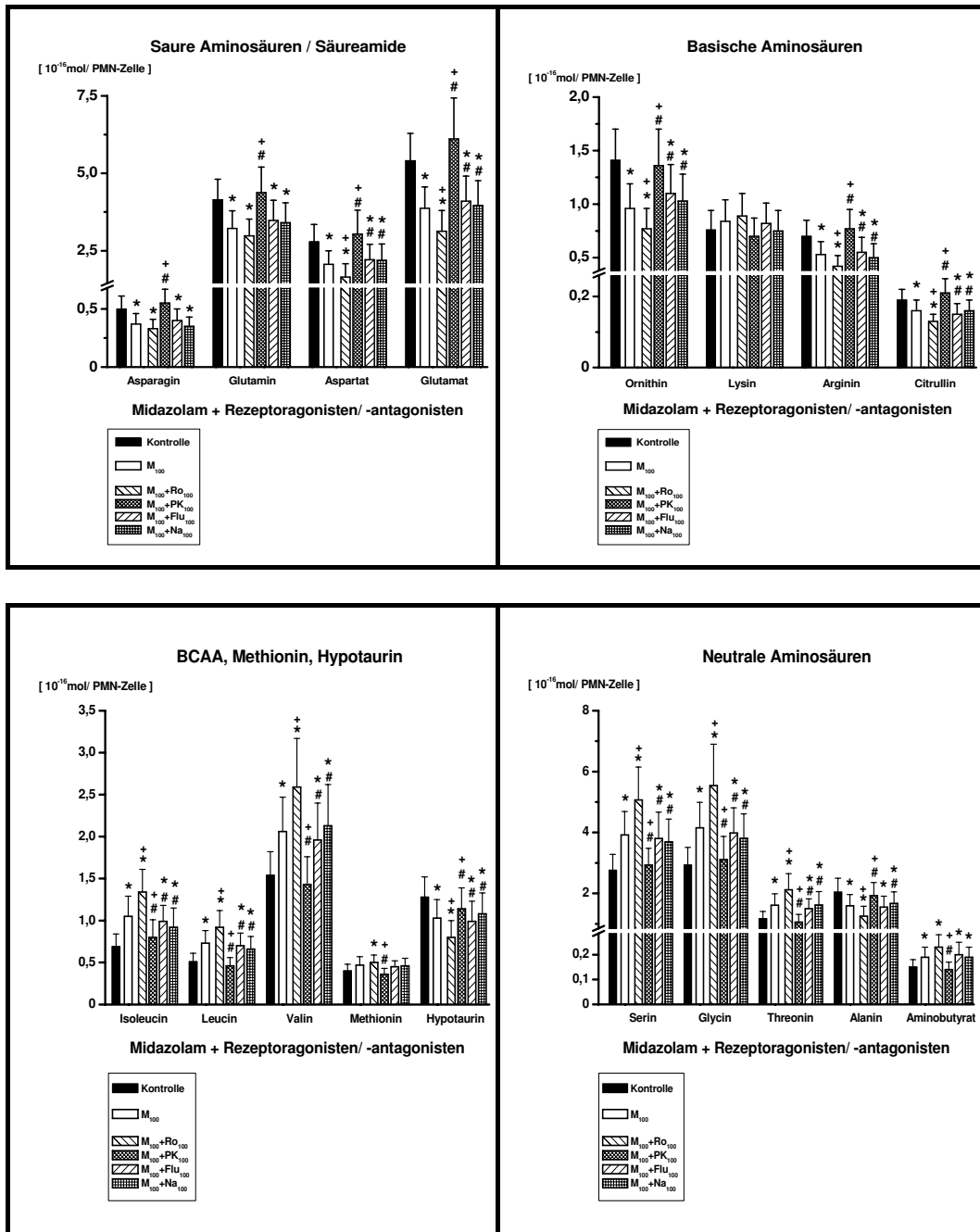


Abbildung 16: Freier intragranulozytärer Aminosäuregehalt [10^{-16} Mo] pro PMN-Zelle nach Inkubation (120 min) mit Midazolam (100 ng/ml) und einer 10-minütigen Vorinkubation der jeweiligen Rezeptoragonisten/ -antagonisten, n=10, * $\leq 0,05$ versus Kontrolle; + $\leq 0,05$ versus M_{100} ; # $\leq 0,05$ versus $M_{100} + Ro_{100}$. [BCCA: branched-chain amino acids]

Verglichen mit einer alleinigen Inkubation mit Midazolam, führte eine 10-minütige Vorinkubation mit 100 μ M Ro 5-4864 und eine nachfolgende Inkubation mit 100 ng/ml bzw. 1 μ g/ml Midazolam zu signifikanten dosisabhängigen Veränderungen des Aminosäurepools in PMN (Abbildung 16, Tabelle 23-27 [Anhang]). Jedoch bei geringeren Dosen von 100 ng/ml Midazolam zeigten sich additive Veränderungen. Zu beobachten war eine *zusätzliche Verminderung* der Aminosäurekonzentration von Aspartat, Glutamat, Ornithin, Arginin, Citrullin, Hypotaurin und Alanin (M_{100} : -15-31%; $M_{100}+R_{100}$: -38-46%) sowie ein *zusätzlicher Anstieg* des Gehaltes an Isoleucin, Leucin, Valin, Serin, Glycin und Threonin (M_{100} : +33-52%; $M_{100}+R_{100}$: +68-89%). Durch eine Vorinkubation mit dem peripheren Benzodiazepin-rezeptorantagonisten PK11195, konnten midazolamabhängige Effekte vollständig aufgehoben werden. Die Vorinkubation sowohl mit Flumazenil als auch Naloxon zeigten weder additive noch antagonisierende Veränderungen.

3.3.3.2 Midazolam jeweils kombiniert mit Ro 5-4864, PK 11195, Flumazenil sowie Naloxon und intragranulozytärer α -Ketosäurepool

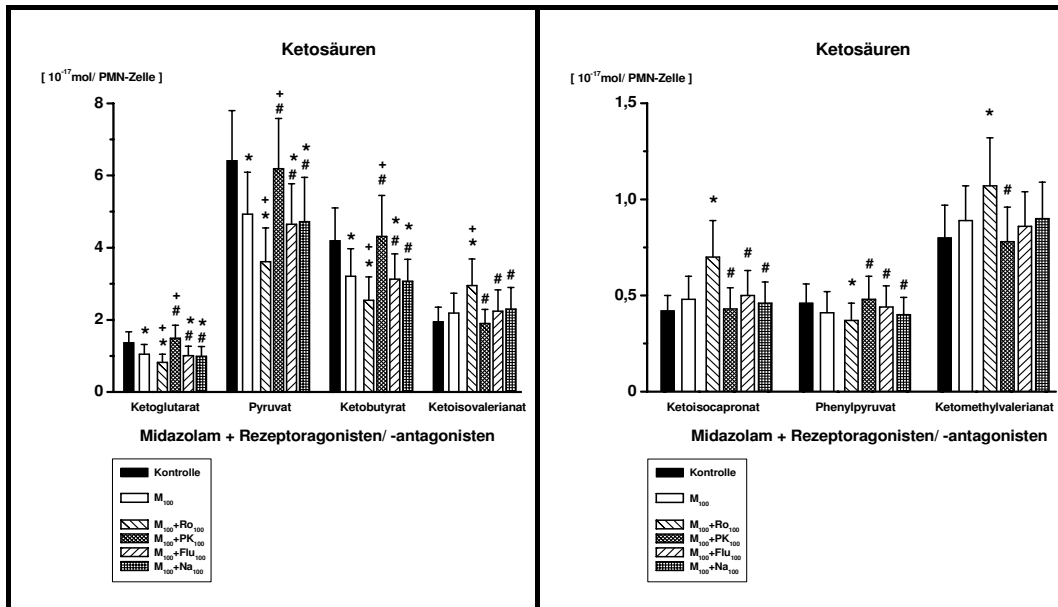


Abbildung 17: Freier intragranulozytärer α -Ketosäuregehalt $[10^{-17} \text{ Mo}]$ pro PMN-Zelle nach Inkubation (120 min) mit Midazolam (100 ng/ml) und einer 10-minütigen Vorinkubation der jeweiligen Rezeptoragonisten/ -antagonisten, $n=10$, * $\leq 0,05$ versus Kontrolle; + $\leq 0,05$ versus M_{100} ; # $\leq 0,05$ versus $M_{100} + Ro_{100}$

Übereinstimmend mit den Veränderungen der bereits beschriebenen intragranulozytären Aminosäurekonzentrationen, zeigten sich auch hier signifikante additive Effekte bei der kombinierten Applikation von Midazolam in einer niedrigen Dosierung von 100 ng/ml und der Vorinkubation mit Ro 5-4864 (Abbildung 17, Tabelle 28 [Anhang]).

Eine *weitere Reduktion* konnte bei folgenden α -Ketosäuren beobachtet werden: α -Ketoglutarat, Pyruvat, α -Ketobutyrat (M_{100} : -20-23%; $M_{100} + R_{100}$: -39-45%) sowie Phenylpyruvat ($M_{100} + R_{100}$: -30%). Eine *weitere Zunahme* zeigte sich bei α -Ketoisovalerianat ($M_{100} + R_{100}$: +51%), α -Ketoisocapronat ($M_{100} + R_{100}$: +67%) und α -Keto- β -methylvalerianat ($M_{100} + R_{100}$: +42%). Höhere Midazolamkonzentrationen in Kombination mit Ro 5-4864 zeigten auch hier keine zusätzlichen additiven Effekte. Ebenfalls konnten midazolamabhängige Effekte auf den α -Ketosäuregehalt in PMN vollständig durch eine Vorinkubation mit PK 11195 aufgehoben werden. Ein kombinierter Zusatz mit Flumazenil bzw. Naloxon führte zu keinen weiteren additiven oder antagonisierenden Effekten.

3.3.3.3 Midazolam jeweils kombiniert mit Ro 5-4864, PK 11195, Flumazenil sowie Naloxon und granulozytäre Immunfunktionsmarker

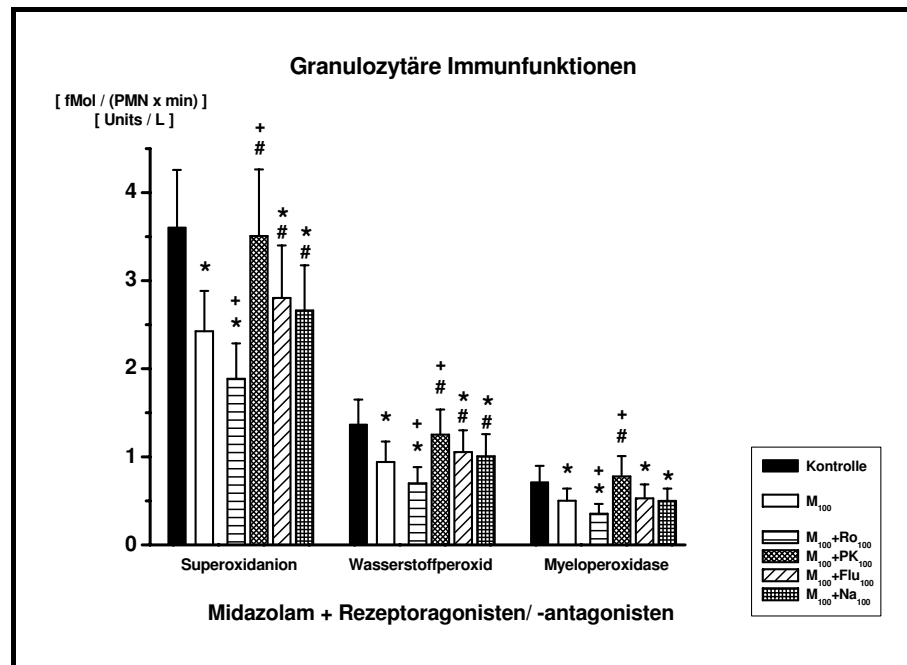


Abbildung 18: Superoxidanionbildung, Wasserstoffperoxid [fMol/(PMN x min)]; Myeloperoxidaseaktivität [Units/l MPO] nach Inkubation (120 min) mit Midazolam (100ng/ml) und einer 10-minütigen Vorinkubation der jeweiligen Rezeptoragonisten/ -antagonisten, n=10, * ≤ 0,05 versus Kontrolle; + ≤ 0,05 versus M₁₀₀; # ≤ 0,05 versus M₁₀₀ + Ro₁₀₀

Eine Vorinkubation mit Ro 5-4864 zeigte ebenfalls kombiniert mit Midazolam eine additive Reduktion der granulozytären Immunfunktionsmarker, sowohl bei einer Midazolamkonzentration von 100 ng/ml aber auch gleichermaßen bei 1 µg/ml (Abbildung 18, Tabelle 29 [Anhang]). Übereinstimmend mit den vorhergehenden Ergebnissen konnte dies vollständig durch Vorinkubation mit PK 11195 aufgehoben werden. Eine Kombination mit Naloxon bzw. Flumazenil führte weder zu additiven noch zu antagonisierenden Effekten.

4. DISKUSSION

4.1 Verwendete Methoden und Messverfahren

4.1.1 Quantitative PMN-Separation und Aminosäurebestimmung

Für die Vergleichbarkeit des intragranulozytären Stoffwechsels bei Blutabnahme ist eine zügige und schonende Vorgehensweise der Granulozytenseparation unerlässlich, um Zellvitalität und -reinheit sowie Stoffwechselneutralität zu wahren. Die in dieser Arbeit beschriebene Methode zur Granulozytenseparation unterscheidet sich von der in früheren Untersuchungen häufig verwendeten Ficollgradientenmethode mit sucrosehaltigen Dichtegradienten. In den letzten Jahren wurde die Verwendung des Sucrose-Polymers immer mehr verlassen, da der Gebrauch dieses Dichtegradienten Formänderungen von PMN, eine gehemmte Chemotaxis oder aber auch eine Modulation der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies induzieren und schließlich zu Missinterpretationen führen kann^{15,66,149}. Diese Effekte konnten mit dem von uns gewählten sucrosefreien Gradienten Percoll bislang nicht beobachtet werden^{44,106,179}.

Weiterhin war es uns möglich mit nur geringen Vollblutmengen hohe Zellzahlen zu separieren, die weder in ihrer Zellreinheit noch in ihrer Vitalität und Integrität beeinträchtigt wurden, sowie die Probenvorbereitungs- und Separationszeiten auf ein Minimum von durchschnittlich 34 Minuten zu reduzieren⁵⁵. Durch anschließende lichtmikroskopische Kontrollen mit zweimaliger Zellzählung konnten einerseits Proben herausgefiltert werden, bei denen eine PMN Aktivierung stattgefunden hat (mikroskopisch sichtbare PMN-Aggregation) und andererseits exakte Zellzählungen (mit einer Abweichung von < 4%) vorgenommen werden. Es wurde strikt bei einer Temperatur von 4°C gearbeitet. Die Zellprobe wurde direkt im Anschluss an die Separation bei -80°C eingefroren, um die weitere Stoffwechselaktivität von PMN möglichst weit einzuschränken. Bisher verwendete PMN-Lysetechniken konnten eine erforderliche Stoffwechselneutralität hier häufig nicht gewährleisten, denn durch zeitaufwändige Lyse-Verfahren mit mehr als 3 h Lysezeit, komplexe Gefrier- und AuftauprozEDUREN (teilweise mit Erwärmung auf 37°C oder sogar 100°C) oder gar chemische Lyse-Verfahren konnten weitere Aminosäureveränderungen während der Probenvorbereitung nicht ausgeschlossen wer-

den ^{22,55}. Eine weitere wichtige Voraussetzung für eine exakte Analyse ist die Gewährleistung einer stabilen Lagerung der Zellen, um eine Verfälschung der Messergebnisse zu verhindern. Sowohl eine sofortige Aufarbeitung der Proben, um einen raschen Zerfall wichtiger Aminosäuren zu verhindern (besonders empfindlich sind die Amide Glutamin und Asparagin), der Schutz vor bakterieller Kontamination als auch eine sichere Lagerung aller Proben (inklusive Standards) ist unbedingt erforderlich. Jedoch ist eine Tiefgefrierung auf z.B. -80°C für eine langfristige, stabile Lagerung (> 3 Wochen) hier nicht ausreichend. Nach Fuchs et al. ^{53,54} gewährleistet die hier durchgeführte Lyophilisierung der Proben nach mehrmonatiger Lagerung (bei -80°C bis zu 6 Monate) eine mit frischen biologischen Proben verglichene exakte Konzentrationsbestimmung ohne Qualitätsverlust. Eine anhaltende Konservierung wurde daher durch an die PMN-Separation unmittelbar anschließende Tiefgefriertrocknung (Lyophilisierung bei -80°C) ^{53,54} erreicht, so dass eine längerfristige Lagerfähigkeit ohne Veränderungen der Aktivität aminosäurestoffwechselrelevanter, intragranulozytärer Enzymsysteme, als auch eine schnelle und vollständige Lyse der PMN ohne Zusatz von möglicherweise proteolytisch wirksamen Reagenzien, gewährleistet werden konnte. Außerdem lassen sich die Aminosäuren lyophilisierter Proben effektiv mittels einer methanolischen Extraktionslösung (80% Methanol / 20% H₂O) aus ihrer Probenmatrix extrahieren ¹²⁷.

Eine weitere Voraussetzung einer exakten Analytik stellt die Wahl einer geeigneten Bezugsgröße dar. In dieser Arbeit wurde der gemessene intrazelluläre Aminosäuregehalt auf das Einzelzellniveau gewählt, denn der Bezug auf biologische Parameter, wie intrazellulärer Wassergehalt, Osmolalität oder Proteingehalt, kann durch krankheitsbedingte Veränderungen verfälscht sein und auf die Messergebnisse Einfluss nehmen ¹²⁷.

Im Rahmen der Umkehrphasen-HPLC wurde ortho-Phtaldialdehyd-Mercaptoethanol (OPA) als Fluorophor- bzw. Derivatisierungsreagenz verwendet. Die Bildung der Isonidol-Derivate (pH 9,5-10 in 0,5M 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 Fluorophor-Teil und Aminosäurerest, der höchste Selektivität und Sensitivität gewährleistet ^{53,54}.

4.1.2 α -Ketosäurebestimmung

Neben der intragranulozytären Aminosäuren-Analytik wurden in dieser Arbeit zelluläre α -Ketosäuren in menschlichen PMN bestimmt und untersucht. Aufgrund ihrer starken Polarität und hohen Instabilität ergeben sich hohe Anforderungen an eine qualitativ und quantitativ exakte und effektive Analytik.

Wie bereits erwähnt beruht die chromatographische Trennung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an Umkehrphasen (RP-HPLC) auf einer Wechselwirkung zwischen funktionellen hydrophoben Gruppen der Probenmoleküle und der hydrophoben unpolaren stationären Phase¹¹⁸. Dies macht eine effektive Trennung von stark polaren α -Ketosäuregemischen an Umkehr-Phase-Säulen unmöglich⁵⁴. Um die Adsorption und somit die unpolare Trennung der zu untersuchenden α -Ketosäuren an die stationäre Phase zu erhöhen, erfordert dies eine so genannte Vorsäulenderivatisierung⁷². Auch die Wahl eines geeigneten Derivatisierungsreagenz ist, in Hinblick auf eine ungestörte, effiziente α -Ketosäurebestimmung, von größter Bedeutung.

Wir wählten nach Untersuchungen von Farshidfar, Fuchs, Hara und Riedel et al.^{47,54,65,151,152,153,154} eine RP-HPLC gestützte Trennung mit o-Phenyldiamin (PDA) als Derivatisierungsreagenz^{69,70}. Die aus dieser Reaktion entstehenden fluoreszierenden Chinoxalinol-Derivate zeigen weder störende Stereoisomerieeffekte, verglichen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin als Derivatisierungsreagenz^{47,80,168}, und können zudem qualitativ und quantitativ sehr präzise erfasst werden. Das sehr oxidations- und lichtempfindliche o-Phenyldiamin musste vor Verwendung zunächst mittels Heptan umkristallisiert werden und anschließend unter Lichtausschluss und Stickstoffbegasung luftdicht bei 2-8°C aufbewahrt werden⁸⁰. Mögliche fluoreszierende Reaktions- und Nebenprodukte, welche die Analytik durch ähnliche Retentionszeiten erheblich stören könnten, wurden durch die Zugabe von 2-Mercaptoethanol verhindert. Nach Ergebnissen von Woolf und Kieber et al.^{47,83,187} muss zur maximalen, schnellen und exakten Umsetzung die Herstellung Chinoxalinol-Derivate mit einem hohen Überschuss an PDA vorgenommen werden (100-1000-fach). Auch die für eine optimale Derivatisierungsreaktion ermittelte Temperatur von 80°C und Reaktionszeit von 60 Minuten ist konsequent einzuhalten. Durch die Anwendung von Säulenmaterial mit hoher Belegungsdichte der Silicageloberfläche als stationäre Phase (C18-Silane) und Verwendung eines geringen Säulen-

durchmessers (3,9 mm), kann sowohl die Trennleistung vergrößert, die Analysezeiten verkürzt als auch die Elutionsauflösung erhöht werden.

4.1.3 Bestimmung der Immunfunktionsparameter

In der vorliegenden Arbeit wurden ferner wichtige granulozytäre Immunfunktionsparameter untersucht. Um eine direkte Vergleichbarkeit mit Befunden früherer Forschungstätigkeit gewährleisten zu können, wählten wir als Grundlage unserer Untersuchungen etablierte und gängige Analytikverfahren. Die von uns verwendeten Methoden zur Bestimmung der granulozytären Superoxidanion- und Wasserstoffperoxidbildung sowie die Quantifizierung der von PMN freigesetzten Myeloperoxidaseaktivität vitaler PMN waren hierbei Weiterentwicklungen von Weening et al.¹⁸³, Stangel et al.¹⁶³, Pick und Keisari¹⁴¹, Schmitt et al.¹⁵⁷ sowie Krumholz und Mitarbeitern^{89,90,91,92,93}. Als Stimulans der zu untersuchenden PMN verwendeten wir voropsonisiertes Zymosan aus der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*, um eine Produktion granulozytärer Immunfunktionsparameter zu provozieren⁹⁴. Alle Inkubationsansätze zur Bestimmung des extrazellulär freigesetzten O_2^- - H_2O_2 -MPO-Systems wurden ebenfalls in Vollblut durchgeführt.

Wie bereits erwähnt, beruht die Quantifizierung der granulozytären Superoxidanionbildung auf der Reduktion von Cytochrom C, welches anschließend photometrisch nachgewiesen werden kann^{2,134,174}. Hierbei kann die Menge an extrazellulär sezerniertem Superoxidanion einer definierten PMN-Konzentration unter Berücksichtigung des Verhältnisses zwischen in der Probe befindlichen Cytochrom C und dem Probenvolumen (8×10^6 PMN/ ml) bestimmt werden^{2,29,30,31,39,60,79,134,139,140,148,155}. Der photometrische Nachweis unter Verwendung von Cytochrom C erlaubt, verglichen mit alternativen Analytikverfahren (Nitroblau-Tetrazolium-Reduktion, Epinephrin-Oxidation, Lucigenin- bzw. Luminol-Chemilumineszenz, Guaiacol-Oxidation, Serum-PMN-Elastasebestimmung) eine zuverlässige quantitative Bestimmung der Superoxidanionbildung^{17,94,155,174}.

Auch die Bestimmung des von PMN extrazellulär freigesetzten Wasserstoffperoxids mittels Phenolrot bietet, verglichen mit alternativen Messmethodiken [z. B. Luminol- bzw. Isoluminol-Chemilumineszenz, p-Hydroxy-Phenylacetat-(PHPA)-Oxidation, Cy-

tochrom C-Reduktion, Elektronenspinresonanz-Spintrapping mittels 5,5-Dimethylpyrrolin-N-Oxid (DMPO); Scopoletin-Oxidation, Homovanilinsäure-Oxidation] ein etabliertes Messverfahren zur reproduzierbaren Registrierung dieses granulozytären Immunparameters. Sie beruht grundsätzlich auf der durch Meerrettich-Peroxidase vermittelten Oxidation von Phenolrot durch Wasserstoffperoxid^{82,115}. Auch bezüglich der Bestimmung der extrazellulären Aktivität von PMN exozytierter Myeloperoxidase gewährleisteten die von uns angewendeten Methodiken, verglichen mit alternativen Analytikverfahren zur Quantifizierung der extrazellulären Myeloperoxidaseaktivität [Dianisidin-H₂O₂-Assay, Myeloperoxidase-katalysierte HOBr- und HOCl-Bildung, DMPO-Elektronenspinresonanz, kolorimetrischer Nachweis mittels o-Phenyldiamin (PDA), Guaiacol-Oxidation zu Tetraguaiacol] befriedigende analytische Ergebnisse⁷. 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. Anzumerken ist allerdings, dass die hier untersuchten granulozytären Immunfunktionsparameter nicht unter streng pathophysiologischen Bedingungen, also ohne Interaktion mit Endothelzellen und daran gekoppelten Wechselwirkungen, bestimmt wurden und so nur eine begrenzte Aussagekraft haben¹⁷⁴.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Einfluß von Midazolam, Rezeptoragonisten und –antagonisten

4.2.1.1 Midazolam

Schon Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts wurde die Beeinflussung des damals kaum erforschten Immunsystems durch Anästhetika diskutiert¹⁶¹. Snell konnte im Jahre 1903 bei Meerschweinchen unter Äther-, Chloroform- und Chloralhydratnarkose eine erhöhte Sterblichkeit nach Milzbrandinfektion aufzeigen. Auch Platania berichtete bereits 1889 über eine gesteigerte Inzidenz an Milzbranderkrankungen bei Tierspezies, die gegen den Milzbranderreger als resistent galten¹⁴⁵. In den folgenden Untersuchun-

gen verschiedener Arbeitsgruppen konnte eine durch verschiedene Anästhetika induzierte Modulation immunologischer granulozytärer Aufgaben bestätigt werden.

So beschrieb Goto ⁶¹ eine durch Benzodiazepine verminderte Apoptoserate neutrophiler Granulozyten, die für den Fortgang und die Dauer der Entzündung wesentlich verantwortlich ist. Marino ¹¹² beobachtete an isolierten PMN eine verminderte Migrations- und Phagozytoserate nach Zusatz von Diazepam. Eine durch Midazolam suppressierte Zytokin- ^{71,120} und Wasserstoff-peroxidproduktion ⁷⁷ oder auch eine reduzierte Leukozytenaggregation und Gefäßwandadhäsion ^{166,173} konnte durch weitere Studien belegt werden.

Wie bereits erwähnt, ist ein ausgewogener Bestand an intrazellulären Amino- und α -Ketosäuren für vielfältige Immunfunktionen von großer Bedeutung. In dieser Arbeit konnten signifikante Veränderungen des intragranulozytären Aminosäure-, α -Ketosäuregehalts und den Gehalt an Immunfunktionsparametern durch den Einfluss von Midazolam nachgewiesen werden. Mit klinisch üblichen und auch höheren Dosierungen ($\geq 100\text{ng/ml}$) konnte zeitabhängig ($\geq 30\text{ min}$) eine signifikante Veränderung wichtiger intragranulozytärer Aminosäurekonzentrationen, wie der Gehalt an Glutamin, Glutamat, Alanin, Taurin, Ornithin sowie Arginin, beobachtet werden. Aber ebenso erfuhren die Pools anderer wichtiger Aminosäuren, wie Isoleucin, Leucin, Valin, Methionin, Serin, Glycin, Threonin, α -Aminobutyrat und Histidin signifikante Modifikationen. Lysin und die aromatischen Aminosäuren zeigten dagegen keine Veränderungen.

Weiterhin kam es zu einer Konzentrationsabnahme der mit Glutamin und Glutamat stoffwechselphysiologisch verbundenen α -Ketosäuren α -Ketoglutarat und Pyruvat. Parallel dazu führte Midazolam dosis- und inkubationszeitabhängig zu einer Beeinträchtigung der gemessenen Immunfunktionsparameter, im Sinne einer Abnahme der Wasserstoffperoxid- und Superoxidanionproduktion sowie der Myeloperoxidaseaktivität.

Wie andere Studien belegen, spielen besonders die Aminosäuren Glutamin/Glutamat, Arginin, Ornithin und Taurin eine zentrale Rolle im granulozytären Metabolismus als Grundlage für die mannigfachen neutrophile Funktionen.

Glutamin ist mit ca. $3 \times 10^{-16}\text{ Mol/PMN}$ (bzw. $\approx 667\text{ }\mu\text{Mol/l PMN-Zellvolumen}$) eine intrazellulär hoch angereicherte Aminosäure. Ihre Metabolisierungsrate in neutrophilen Granulozyten ist hoch und liefert als Energie-, Stickstoff- und Kohlenstoffquelle eine Vielzahl an Präkursoren ^{24,130,131}. Glutamin dient zum einen über Glutaminolyse als ein

wichtiger Energielieferant, gerade in katabolen Situationen, wenn Glucosevorräte erschöpft sind. Dabei kann Glutamin zu verschiedenen Graden oxidiert werden und dem Bedarf entsprechend Energie in Form von ATP bereitstellen^{24,38,56,58,144}. Besondere stoffwechselphysiologische Relevanz besitzt hierbei die primäre intrazelluläre Weiterverstoffwechselung von Glutamin zu Glutamat. Der hierzu erforderliche Enzymkomplex, eine phosphatabhängige Glutaminase, ist speziell in PMN-Zellen hochaktiv (≈ 56 nMol/min/mg Protein)^{38,24,58}. In der Tat besitzt das aus dieser Reaktion entstandene Glutamat als sogenannte „intrazelluläre Drehscheibe der Aminostickstoff-Metabolisierung“ eine stoffwechselphysiologische Schlüsselstellung, da es sehr rasch in weitere essentielle Zellsubstrate umgewandelt werden kann. An erster Stelle müssen, unter Freisetzung von NH_3 , reversible Transaminierungsreaktionen genannt werden. So wird zum Beispiel durch die Alanin-Aminotransferase die Aminogruppe des Glutamats unter Entstehung von Alanin und α -Ketoglutarat auf Pyruvat übertragen. Bei der durch das Enzym Aspartat-Aminotransferase katalysierten Reaktion entsteht Aspartat und α -Ketoglutarat, hier wird die freiwerdende Aminogruppe an Oxalacetat gebunden. In Form von α -Ketoglutarat kann so das durch Glutaminoxidation entstandene Kohlenstoffgerüst direkt in den Zitratzyklus (Tricarboxylic-Acid-Cycle, TCA-Zyklus) eingeschleust werden und steht damit metabolisch zum Beispiel den Enzymen des Harnstoffzyklus als Substrat zur Verfügung^{38,130}. Besonders bedeutsam für die Metabolisierung von α -Ketoglutarat durch die Enzymkette des TCA-Zyklus ist die Konvertierung von Malat zu Oxalacetat durch die NADP^+ -abhängige Malatdehydrogenase¹³⁰. Glutamin kann damit letztendlich zu Pyruvat umgewandelt werden, aus welchem dann die Endprodukte des metabolischen Glutaminabbaus – nämlich Laktat bzw. Acetyl-CoA und damit CO_2 – entstehen können. Pyruvat gilt ebenfalls als Ausgangsprodukt für die „de novo Synthese“ von Glukose aus α -Ketoglutarat.

Glutamin wird nur zu einem geringen Teil vollständig zu CO_2 und Wasser oxidiert. Der weitaus größere Anteil wird zu Glutamat, α -Ketoglutarat, Aspartat und Alanin metabolisiert und intragranulozytär „zwischengelagert“. Interessanterweise liegen Glutamat ($\approx 6 \times 10^{-16}$ Mol/PMN bzw. ≈ 31 $\mu\text{Mol/l}$ PMN-Zellvolumen; Plasma: ≈ 31 $\mu\text{Mol/l}$), Aspartat ($\approx 2,5 \times 10^{-16}$ Mol/PMN bzw. ≈ 550 $\mu\text{Mol/l}$ PMN-Zellvolumen; Plasma: ≈ 12 $\mu\text{Mol/l}$) und α -Ketoglutarat ($\approx 1,2 \times 10^{-17}$ Mol/PMN bzw. ≈ 30 $\mu\text{Mol/l}$ PMN-Zellvolumen; Plasma: ≈ 7 $\mu\text{Mol/l}$) intragranulozytär höher konzentriert vor als extrazel-

lulär, was die Vermutung nahe legt, dass gerade diese Substrate für die vielfältigen Aufgaben und Funktionen von PMN essentiell sind. Weiterhin liefert Glutamin über den Pentosephosphatweg oder Zitrat-Malat-Pyruvat-Zyklus (Ball-Zyklus) NADPH und nimmt so durch Glutaminsubstitution oder –depletion Einfluß auf die Bildung der hochreaktiven Sauerstoffspezies (NADPH-abhängige iNOS und NADPH-Oxidase) ^{36,142}. Furukawa konnte durch Glutaminsupplementierung eine verbesserte Phagozytosefähigkeit sowie Sauerstoffradikal- und Bakterizidbildung feststellen ^{56,130,131}, Lagranha und Pithon-Curi et al eine verzögerte Apoptoserate neutrophiler Granulozyten ^{98,143}. Das mit Glutamin über Glutamat verbundene Glutathion-System zählt zu den wichtigsten granulozytären Antioxidantien. Dieser Oxidationsschutz gewährleistet einen Rückhalt gegen eventuelle oxidative Schäden bei überschießender Granulozytenaktivität ^{67,102}.

Auch Arginin ($\approx 0,5 \times 10^{-16}$ Mol/PMN bzw. ≈ 100 μ Mol/l PMN-Zellvolumen; Plasma: ≈ 85 μ Mol/l) beteiligt sich an zahlreichen inflammatorischen Prozessen. Diese Aminosäure kann zum einen durch die Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase) zu dem zytotoxischen Produkt NO metabolisiert werden, welches mit reaktiven Sauerstoffverbindungen an zytotoxischen und antimikrobiellen Abwehrmechanismen beteiligt ist. Es existieren 3 Isoformen der NO-Synthase, zwei konstitutive Formen und die während inflammatorischen Prozessen stimulierte „induzierbare“ NO-Synthase. Ihr kommt eine besondere pathologische Bedeutung zu, denn dieses calcium-unabhängige Isoenzym katalysiert bedeutend höhere Konzentrationen an NO als die anderen Isoformen. In der so genannten „Arginase-Reaktion“ des Harnstoffzyklus entsteht aus Arginin Ornithin und Harnstoff. Ornithin (ebenfalls $\approx 0,5 \times 10^{-16}$ Mol/PMN bzw. ≈ 100 μ Mol/l PMN-Zellvolumen; Plasmakonzentration, verglichen mit Arginin, jedoch nur ≈ 40 μ Mol/l) kann wiederum durch die Ornithin-Aminotransferase zu Prolin als Kollagenbaustein synthetisiert werden oder die Ornithin-Decarboxylase zu den Polyaminen Putrescin, Spermidin und Spermin, welche unter anderem bei der Zellreplikation im Rahmen von Reparaturprozessen von Bedeutung sind. Munder et al. konnte eine bereits in Ruhe deutlich erhöhte Arginase-Aktivität (Arginase I) in den azurophilen Granula von PMN nachweisen und postuliert eine Beteiligung an der antimikrobiellen Abwehrreaktion im Phagolysosom ¹²⁸. Andere Autoren beschreiben eine gesteigerte Arginase I Aktivität als Prävention überschießender Immunreaktionen, denn durch ihre Metabolisierung von Arginin durch Arginase steht diese Aminosäure einer durch die iNOS katalysierte Bil-

dung von Stickstoffmonoxid nicht in vollem Masse zur Verfügung ^{59,133}. Polyamine spielen nicht nur eine wichtige Rolle in Wundheilungs- und Reparaturprozessen durch eine membranstabilisierende und wachstumsregulierende Wirkung. Sie scheinen auch eine Art Selbstschutz vor toxischen Sauerstoffradikalen ^{25,181} zu gewährleisten oder auch durch ihre Oxidation zu Wasserstoffperoxid den programmierten Zelltod von unkontrolliert aktivierten Makrophagen ^{26,189} zu regulieren. Es finden sich jedoch auch Studien, die eine durch Spermin suppressierte Superoxidproduktion und durch Putrescin verhinderte Apoptose beobachten konnten ¹³⁶. Weiter konnte gezeigt werden zeigen, dass eine Blockade der Ornithin-Decarboxylase durch α -difluoromethylornithin (DFMO) sowohl zu einer reduzierten Superoxidanion- und Wasserstoffperoxidbildung als auch eine verminderte Sekretion an Myeloperoxidase führt ^{122,162}.

In polymorphkernigen Granulozyten ist Taurin in sehr hohen Konzentrationen vertreten ($\approx 40 \times 10^{-16}$ Mol/PMN bzw. ≈ 9200 μ Mol/l PMN-Zellvolumen; Plasma: ≈ 114 μ Mol/l) und spielt während immunologischen Prozessen eine wichtige Rolle als Antioxidans der gebildeten hochtoxischen Sauerstoffradikale. Wie bereits erwähnt, katalysiert die in den azurophilen Granula von PMN gespeicherte Myeloperoxidase nicht nur die Bildung aggressiver Halogenverbindungen, wie z.B. Hypochlorit oder –bromit, sondern auch die Chlorinierung verschiedener Aminosäuren. Diese Komplexbildung zu Chloraminen schützt körpereigenes Gewebe vor unregulierten und ausgedehnten Schäden ^{4,119,158,180}. Jedoch abhängig von Struktur und Membrangängigkeit können selbst Chloramine zytotoxisch wirken. Denn besonders lipophile Chloramine, die eine hohe Penetrationsfähigkeit biologischer Membranen aufweisen, reagieren mit intragranulozytären Komponenten und inhibieren neutrophile Funktionen. Taurin-Chloramin, als hydrophiles Derivat, penetriert hingegen nur sehr langsam die Zelle, akkumuliert extrazellulär und vermag dort als potenter Radikalfänger zu fungieren ^{62,111}. Dabei vermindern steigende HOCl-Spiegel die Aktivität der Myeloperoxidase, während Taurin sie erhöht. Im Rahmen der Infektabwehr scheint dies auch durchaus sinnvoll zu sein, zumal Taurin einen protektiven Effekt auf dieses essentielle Enzym ausübt. Jedoch bleibt diese taurininduzierte Aktivitätssteigerung der MPO nicht unkontrolliert, denn eine progrediente Taurin-Chloramin Bildung bewirkt einen gegenteiligen Effekt ^{109,188}. Taurin besitzt neben membranstabilisierenden auch osmoregulatorische Eigenschaften ³⁵. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass pharmakologisch oder infektiologisch bedingte Ver-

änderungen der Volumenhomöostase Konzentrationsverschiebung osmotisch aktiver Metabolite nach sich ziehen ^{100,170}. Dazu gehören Taurin, aber auch neutrale Aminosäuren und Alanin. Spezielle Taurintransporter (TAUT) oder volumen-sensitive Taurinkanäle sorgen für einen erhöhten Taurininflux oder -efflux je nach Tonizitätslage unterstützt von einer gegensätzlichen transmembranösen Verschiebung der neutralen Aminosäuren und Alanin ^{52,76,182}. Interessanterweise konnten wir diese gegenläufige Konzentrationsveränderung der Aminosäuren Taurin, Alanin und der neutralen Aminosäuren auch durch Midazolam induzieren.

4.2.1.2 Midazolam, Rezeptoragonisten und –antagonisten

Welche Mechanismen zu den midazolaminduzierten Veränderungen der metabolischen und immunologischen Funktionen menschlicher Granulozyten führen, ist bislang noch nicht vollständig erforscht. In Übereinstimmung mit anderen Studien scheinen interessanterweise periphere Benzodiazepinrezeptoren hier eine Schlüsselfunktion einzunehmen^{21,33,50,164}. Wie bereits besprochen, existieren zwei verschiedene Isoformen dieses Rezeptors. Während zentrale Benzodiazepinrezeptoren hauptsächlich auf Zellmembranen des ZNS lokalisiert sind, findet sich der periphere Typ in verschiedenen Organen, in den oberflächlichen Schichten der menschlichen Epidermis, aber auch, mit anderen Zellen der Immunabwehr verglichen, in hoher Dichte auf granulozytären Membranen. Zudem unterscheiden sich die beiden Isoformen sowohl in ihrer molekularen Struktur als auch in ihrer pharmakologischen Affinität zu verschiedenen Rezeptorliganden. Zur besseren Charakterisierung des peripheren Rezeptors und seiner Funktionen wurden die synthetischen Rezeptorliganden Ro 5-4864 und PK 11195 verwendet. Midazolam agiert als Agonist an beiden Rezeptorenarten, während Ro 5-4864 als Agonist und PK 11195 als Antagonist mit hoher Affinität an den peripheren, aber in kaum nennenswertem Umfang an den zentralen Benzodiazepinrezeptor, binden. Flumazenil gilt als klassischer Antagonist an zentralen Benzodiazepinrezeptoren und Naloxon als Vertreter der Opiatantagonisten am GABA-Rezeptor. Dem peripheren Benzodiazepinrezeptor kann eine Vielzahl an Funktionen zugeschrieben werden, so unter anderem auch Modulation der zellulären Immunantwort, was die hohe Expressionsdichte auf polymorphkernigen Granulozyten auch vermuten lässt. Durch die Nähe zu spannungsabhängigen Anionenkanälen der Mitochondrienmembran, die eine zentrale Rolle bei Apoptosevorgängen spielen, werden PBR mit der Regulation von Zelltod und antioxidativen Eigenschaften in Verbindung gebracht^{23,27,57,114,164}. PBR werden weiterhin mit einer Suppression von Zellwachstum und –differenzierung, von Migration, Phagozytose und ROS Produktion assoziiert^{33,50,97,104,112,116,172}.

In dieser Arbeit wurde eine rezeptorvermittelte Modulation intragranulozytärer Aminosäure- und α -Ketosäurekonzentrationen sowie Immunfunktionsparameter untersucht. Interessanterweise konnte der periphere Benzodiazepinrezeptoragonist Ro 5-4864 midazolaminduzierte Effekte imitieren, in Kombination mit Midazolam sogar auch additi-

ve Effekte erzielen. Auch diese Ergebnisse waren dosis- und zeitabhängig und ließen sich durch den selektiven Rezeptorantagonisten PK 11195 vollständig aufheben. Dies gelang weder durch den Antagonisten an zentralen Benzodiazepinrezeptoren Flumazenil noch durch den am GABA-Komplex wirkenden Opiatantagonisten Naloxon. Die alleinige Inkubation der Rezeptorantagonisten zeigte keinerlei Eigeneffekt, welches eine denkbare anästhetikainduzierte Immunsuppression zusätzlich negativ beeinflusst hätte. Für den Therapeuten sind diese ersten Befunde nicht unerheblich, denn die Kombination einer medikamentös induzierten Hemmung oder Blockierung wichtiger zellulärer Aminosäurestoffwechselprozesse in Verbindung mit einem Verlust der für die ungestörte Zellfunktion so wichtigen Amino- und α -Ketosäuresubstrathomöostase könnte hier, und dies speziell bei Patienten mit schon vorbestehenden oder auch sekundär krankheitsbedingten Veränderungen intrazellulärer Stoffwechselreaktionen sowie der systemischen und intrazellulären Substrathaushalte, weitere pathologische Veränderungen der granulozytären Integrität und Funktion induzieren. Zusätzliche Forschungsaktivität wird erforderlich sein, um die vielfältigen metabolischen und stoffwechselphysiologischen Effekte medikamentöser Therapieverfahren auf den intragranulozytären Amino- sowie α -Ketosäurestoffwechsel auch klinisch zu sichern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

5.1 Zusammenfassung (deutsch)

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von Midazolam auf den intragranulozytären Aminosäure- und α -Ketosäuregehalt in neutrophilen polymorphkernigen Granulozyten (PMN) sowie auf essentielle granulozytäre Immunfunktionsparameter. Dabei fungiert der intrazelluläre Aminosäure- und α -Ketosäurebestand als relevanter Parameter für einen physiologischen Zellmetabolismus und als ein Indikator hinsichtlich des Zustands grundlegender PMN-Zellfunktionen im Rahmen pathophysiologischer oder immunonutritiver Geschehen. Ferner sollte der Einfluß von peripheren Benzodiazepin- sowie Opiatrezeptoren als potentieller Mechanismus im Rahmen der Signalweitergabe möglicher midazolam-induzierter zellulärer Stoffwechselveränderungen identifiziert werden. Insbesondere PMN sind hier wissenschaftlich von besonderem Interesse, da sie eine wichtige Komponente im Rahmen der Immunabwehr im menschlichen Körper darstellen, einen aktiven Aminosäure- und α -Ketosäurestoffwechsel aufweisen, anderen differenzierten kernhaltigen Gewebezellen (z.B. Nieren-, Muskel- und Leberzellen) in Komplexität und Vielfalt ihrer intrazellulären Stoffwechselwege gleichen und speziell auch für die intermittierende Probengewinnung im Rahmen eines erweiterten klinischen Monitorings (z.B. bei kritisch kranken Patienten) leicht zugänglich sind.

Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass Midazolam signifikante dosis- wie auch expositionszeitabhängige Modulationen der freien intrazellulären Amino- und α -Ketosäurepools, sowie parallel auch wichtige Veränderungen granulozytärer Immunfunktionsparameter induzieren kann. Midazolamvermittelte Effekte finden sich hierbei insbesondere bei intragranulozytären glutamin-, arginin-, ornithin- und taurinabhängigen Stoffwechselprozessen. Ferner belegen die erhobenen Befunde eine Benzodiazepinrezeptorvermittelte Modulation der gemessenen granulozytären Immunfunktionsmarker und ebenso auch der intragranulozytären Amino- und α -Ketosäuregehalte, denn midazolaminduzierte Effekte ließen sich ebenfalls durch den peripheren Benzodiazepinrezeptoragonisten Ro 5-4864 auslösen bzw. durch den selektiven Rezeptorantagonisten PK 11195 vollständig aufheben. Eine Kombination von Ro 5-4864 mit Midazolam indu-

zierte hier sogar additive dosis- und inkubationszeitabhängige Effekte. Dies gelang weder durch den Antagonisten an zentralen Benzodiazepinrezeptoren Flumazenil noch durch den am GABA-Komplex wirkenden Opiatantagonisten Naloxon. Da die Modulation der beobachteten Amino- bzw. α -Ketosäuren allerdings nicht zwangsläufig die Beeinflussung einzelner spezifischer zellulärer Stoffwechselwege widerspiegeln muss, kann daher auch im Rahmen dieser Arbeit nur vermutet werden, dass pharmakologisch induzierte Konzentrations- sowie Kompositionsveränderungen der freien intragranulozytären Amino- und α -Ketosäurepools relevante stoffwechselphysiologische Determinanten darzustellen scheinen, welche die Ausprägung und Qualität der granulozytären Immunantwort indirekt beeinflussen können.

Alle in dieser Arbeit beobachteten Effekte müssen bei den behandelten Patienten daher nicht zwangsläufig zu einer perioperativen Immunsuppression führen, jedoch könnte der klinische Einsatz von Midazolam oder anderen Benzodiazepinen mit ähnlichen pharmakologischen Eigenschaften eine bereits geschwächte Immunabwehr nach Trauma, Operation oder während eines Intensivaufenthalts möglicherweise zusätzlich beeinträchtigen. Weitere klinische Forschungstätigkeit wird erforderlich sein, um diese Frage hinreichend klären zu können.

5.2 *Summary*

This paper deals with the influence of midazolam on the intragranulocyte amino and α -keto acid pool in neutrophil polymorphonuclear granulocytes (PMN) as well as on essential granulocyte immune function parameters. The intracellular amino and α -keto acid content serves as a relevant parameter of physiological cell metabolism and as an indicator for the state of basic PMN functions in the context of pathophysiological or immunonutritive processes. Furthermore, the influence of peripheral benzodiazepine as well as opioid receptors as a possible mechanism within the signal transduction of potential midazolam-induced cellular metabolic changes should be identified. PMN in particular are of a great academic interest, since they are an important component of the human immune defence, exhibit an active amino and α -keto acid metabolism, resemble other differentiated eukaryotic tissue cells (e.g. kidney, muscle and liver cells) in complexity and variety and are readily accessible for an intermittent sampling throughout extended clinical monitoring (e.g. critically ill patients).

Present results indicate, that midazolam induces significant dose- and exposure-time-dependent effects on the free intracellular amino and α -keto acid pool, as well as on important intragranulocyte immune functions. In particular midazolam-mediated effects can be demonstrated in intragranulocyte glutamine-, arginine-, ornithine- and taurine-dependent metabolic processes. Furthermore, these findings proves a benzodiazepine-mediated modulation of measured granulocyte immune function parameters as well as intragranulocyte amino and α -keto acid content, since midazolam-induced effects could also be initiated by the peripheral benzodiazepine receptor agonist Ro 5-4864 and completely reversed by the specific receptor antagonist PK 11195. The combined application of Ro 5-4864 and midazolam induced additive dose- and exposure-time-dependent effects. This was accomplished neither by flumazenil, the specific antagonist on central benzodiazepine receptors, nor by naloxone, the antagonist of opiate receptors linked to the GABA-complex. Since the modulation of the observed amino and α -keto acids does not necessarily reflect an influence on specific cellular pathways, we can only assume that pharmacologically induced alterations in concentration and composition of a free intragranulocyte amino and α -keto acid pool represent relevant metabolic determinants,

which indirectly influence the characteristic and quality of the granulocyte immune response.

These effects described here do not necessarily imply perioperative immune suppression, but the clinical use of midazolam or other benzodiazepines with similar pharmacological characteristics may have the potential to compromise additionally an already depressed host defence after trauma, operation or during intensive care treatment. Further clinical research is required to clear up this question.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001; 15(5):831-845.
- 2 Aiboshi J, Moore EE, Ciesla DJ, Silliman CC. Blood transfusion and the two-insult model of post-injury multiple organ failure. *Shock* 2001; 15(4):302-306.
- 3 Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357(Pt 3):593-615.
- 4 Atmaca G. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. *Yonsei Med J* 2004; 45(5):776-788.
- 5 Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397(2):342-344.
- 6 Bansal V, Ochoa JB. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6(2):223-228.
- 7 Barr DP, Aust SD. On the mechanism of peroxidase-catalyzed oxygen production. *Arch Biochem Biophys* 1993; 303(2):377-382.
- 8 Basu S, Hodgson G, Zhang HH, Katz M, Quilici C, Dunn AR. "Emergency" granulopoiesis in G-CSF-deficient mice in response to *Candida albicans* infection. *Blood* 2000; 95(12):3725-3733.
- 9 Basu S, Hodgson G, Katz M, Dunn AR. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood* 2002; 100(3):854-861.
- 10 Benbarek H, Grulke S, Deby-Dupont G, Deby C, Mathy-Hartert M, Caudron I et al. Cytotoxicity of stimulated equine neutrophils on equine endothelial cells in culture. *Equine Vet J* 2000; 32(4):327-333.
- 11 Bengtsson T, Orselius K, Wettero J. Role of the actin cytoskeleton during respiratory burst in chemoattractant-stimulated neutrophils. *Cell Biol Int* 2006; 30(2):154-163.
- 12 Beurdeley-Thomas A, Miccoli L, Oudard S, Dutrillaux B, Poupon MF. The peripheral benzodiazepine receptors: a review. *J Neurooncol* 2000; 46(1):45-56.
- 13 Boelens PG, Houdijk AP, de Thouars HN, Teerlink T, van Engeland MI, Haarman HJ et al. Plasma taurine concentrations increase after enteral glutamine sup-

- plementation in trauma patients and stressed rats. *Am J Clin Nutr* 2003; 77(1):250-256.
- 14 Bokoch GM. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* 1995; 86(5):1649-1660.
- 15 Boogaerts MA, Vercelotti G, Roelant C, Malbrain S, Verwilghen RL, Jacob HS. Platelets augment granulocyte aggregation and cytotoxicity: uncovering of their effects by improved cell separation techniques using Percoll gradients. *Scand J Haematol* 1986; 37(3):229-236.
- 16 Braestrup C, Squires RF. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(9):3805-3809.
- 17 Britigan BE, Cohen MS, Rosen GM. Detection of the production of oxygen-centered free radicals by human neutrophils using spin trapping techniques: a critical perspective. *J Leukoc Biol* 1987; 41(4):349-362.
- 18 Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol* 2001; 99(1):7-17.
- 19 Caldiroli E, Marino F, Cosentino M, De Ponti F, Fietta AM, Mazzone A et al. Peripheral benzodiazepine receptor expression on leukocytes and neutrophil function during anticonvulsant monotherapy. *Pharmacology* 1998; 57(4):215-221.
- 20 Canepa A, Filho JC, Gutierrez A, Carrea A, Forsberg AM, Nilsson E et al. Free amino acids in plasma, red blood cells, polymorphonuclear leukocytes, and muscle in normal and uraemic children. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(3):413-421.
- 21 Carayon P, Portier M, Dussossoy D, Bord A, Petitpretre G, Canat X et al. Involvement of peripheral benzodiazepine receptors in the protection of hematopoietic cells against oxygen radical damage. *Blood* 1996; 87(8):3170-3178.
- 22 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; 30 (Pt 6):559-564.
- 23 Casellas P, Galiegue S, Basile AS. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int* 2002; 40(6):475-486.

- 24 Castell L, Vance C, Abbott R, Marquez J, Eggleton P. Granule localization of glutaminase in human neutrophils and the consequence of glutamine utilization for neutrophil activity. *J Biol Chem* 2004; 279(14):13305-13310.
- 25 Chattopadhyay MK, Tabor CW, Tabor H. Polyamine deficiency leads to accumulation of reactive oxygen species in a spe2Delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2006; 23(10):751-761.
- 26 Chaturvedi R, Cheng Y, Asim M, Bussiere FI, Xu H, Gobert AP et al. Induction of polyamine oxidase 1 by *Helicobacter pylori* causes macrophage apoptosis by hydrogen peroxide release and mitochondrial membrane depolarization. *J Biol Chem* 2004; 279(38):40161-40173.
- 27 Chelli B, Lena A, Vanacore R, Pozzo ED, Costa B, Rossi L et al. Peripheral benzodiazepine receptor ligands: mitochondrial transmembrane potential depolarization and apoptosis induction in rat C6 glioma cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(1):125-134.
- 28 Chlopicki S, Olszanecki R, Janiszewski M, Laurindo FR, Panz T, Miedzobrodzki J. Functional role of NADPH oxidase in activation of platelets. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6(4):691-698.
- 29 Ciesla DJ, Moore EE, Gonzalez RJ, Biffl WL, Silliman CC. Hypertonic saline inhibits neutrophil (PMN) priming via attenuation of p38 MAPK signaling. *Shock* 2000; 14(3):265-269.
- 30 Ciesla DJ, Moore EE, Zallen G, Biffl WL, Silliman CC. Hypertonic saline attenuation of polymorphonuclear neutrophil cytotoxicity: timing is everything. *J Trauma* 2000; 48(3):388-395.
- 31 Ciesla DJ, Moore EE, Musters RJ, Biffl WL, Silliman CA. Hypertonic saline alteration of the PMN cytoskeleton: implications for signal transduction and the cytotoxic response. *J Trauma* 2001; 50(2):206-212.
- 32 Clark RA, Epperson TK, Valente AJ. Mechanisms of activation of NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57(5):S22-S23.
- 33 Cosentino M, Marino F, Cattaneo S, Di Grazia L, Francioli C, Fietta AM et al. Diazepam-binding inhibitor-derived peptides induce intracellular calcium changes and modulate human neutrophil function. *J Leukoc Biol* 2000; 67(5):637-643.

- 34 Coughlin MF, Schmid-Schonbein GW. Pseudopod projection and cell spreading of passive leukocytes in response to fluid shear stress. *Biophys J* 2004; 87(3):2035-2042.
- 35 Cuisinier C, Michotte DW, Verbeeck RK, Poortmans JR, Ward R, Sturbois X et al. Role of taurine in osmoregulation during endurance exercise. *Eur J Appl Physiol* 2002; 87(6):489-495.
- 36 Curi R, Newsholme P, Pithon-Curi TC, Pires-de-Melo M, Garcia C, Homem-de-Bittencourt Junior PI et al. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32(1):15-21.
- 37 Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC et al. Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol* 2005; 204(2):392-401.
- 38 Curi TC, De Melo MP, De Azevedo RB, Zorn TM, Curi R. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase. *Am J Physiol* 1997; 273(4 Pt 1):C1124-C1129.
- 39 Daher AH, Fortenberry JD, Owens ML, Brown LA. Effects of exogenous nitric oxide on neutrophil oxidative function and viability. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16(4):407-412.
- 40 Del Fabbro M, Francetti L, Pizzoni L, Rozza R, Weinstein RL. [Neutrophil physiology: role and mechanism of action in the immune response at gingival level]. *Minerva Stomatol* 2000; 49(5):227-248.
- 41 Diez-Fraile A, Meyer E, Burvenich C. Regulation of adhesion molecules on circulating neutrophils during coliform mastitis and their possible immunomodulation with drugs. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 86(1-2):1-10.
- 42 Droemann D, Hansen F, Aries SP, Braun J, Zabel P, Dalhoff K et al. Neutrophil Apoptosis, Activation and Anti-Inflammatory Cytokine Response in Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Treated Patients with Community-Acquired Pneumonia. *Respiration* 2005.
- 43 Edwards S. *Biochemistry and physiology of the neutrophil*. Press Syndicate of the university of Cambridge, 1994.
- 44 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; 121(1):105-113.

- 45 El Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005; 53(3):199-206.
- 46 Engel JM, Muhling J, Weiss S, Karcher B, Lohr T, Menges T et al. Relationship of taurine and other amino acids in plasma and in neutrophils of septic trauma patients. *Amino Acids* 2006; 30(1):87-94.
- 47 Farshidfar G. Vergleichende Untersuchungen zur Bestimmung von alpha-Ketosäuren mittels GLC und HPLC. Diplomarbeit im Fach Biochemie an der Freien Universität Berlin. 1990. 1990.
- 48 Faurschou M, Sorensen OE, Johnsen AH, Askaa J, Borregaard N. Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1591(1-3):29-35.
- 49 Fauth U, Heinrichs W, Puente-Gonzalez I, Halmagyi M. [Maximal turnover rates of glycolysis enzymes and of the citrate cycle of separated granulocytes in the postoperative period]. *Infusionstherapie* 1990; 17(4):178-183.
- 50 Finnerty M, Marczyński TJ, Amirault HJ, Urbancic M, Andersen BR. Benzodiazepines inhibit neutrophil chemotaxis and superoxide production in a stimulus dependent manner; PK-11195 antagonizes these effects. *Immunopharmacology* 1991; 22(3):185-193.
- 51 Fjaertoft G, Pauksen K, Hakansson L, Xu S, Venge P. Cell surface expression of FcγRI (CD64) on neutrophils and monocytes in patients with influenza A, with and without complications. *Scand J Infect Dis* 2005; 37(11-12):882-889.
- 52 Friedrich B, Alexander D, Aicher WK, Duszenko M, Schaub TP, Passlick-Deetjen J et al. Influence of standard haemodialysis treatment on transcription of human serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 and taurine transporter TAUT in blood leukocytes. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(4):768-774.
- 53 Fuchs M. Entwicklung einer vollautomatischen quantitativen Aminosäurebestimmung mittels hochauflösender Liquidchromatographie nach Fluoreszenzderivatisierung. Diplomarbeit im Fach Biochemie an der Freien Universität Berlin 1990. 1990.

- 54 Fuchs M. Untersuchungen zur Regulation der Homöostase im Aminosäure- und alpha-Ketosäurestoffwechsel von Hepatozyten im Perfusionsmodell. Inaugural Dissertation im Fach Biochemie an der Freien Universität Berlin. 1998.
- 55 Fürst P, Stehle P. What are the essential elements needed for the determination of amino acid requirements in humans? *J Nutr* 2004; 134(6 Suppl):1558S-1565S.
- 56 Furukawa S, Saito H, Matsuda T, Inoue T, Fukatsu K, Han I et al. Relative effects of glucose and glutamine on reactive oxygen intermediate production by neutrophils. *Shock* 2000; 13(4):274-278.
- 57 Galiegue S, Tinel N, Casellas P. The peripheral benzodiazepine receptor: a promising therapeutic drug target. *Curr Med Chem* 2003; 10(16):1563-1572.
- 58 Garcia C, de Oliveira MC, Verlengia R, Curi R, Pithon-Curi TC. Effect of dexamethasone on neutrophil metabolism. *Cell Biochem Funct* 2003; 21(2):105-111.
- 59 Gobert AP, Cheng Y, Akhtar M, Mersey BD, Blumberg DR, Cross RK et al. Protective role of arginase in a mouse model of colitis. *J Immunol* 2004; 173(3):2109-2117.
- 60 Gonzalez RJ, Moore EE, Ciesla DJ, Biffl WL, Offner PJ, Silliman CC. Phospholipase A(2)--derived neutral lipids from posthemorrhagic shock mesenteric lymph prime the neutrophil oxidative burst. *Surgery* 2001; 130(2):198-203.
- 61 Goto Y, O'Malley C, Fanning NF, Wang J, Redmond HP, Shorten GD. Benzodiazepines inhibit the rate of neutrophil apoptosis. *Ir J Med Sci* 2003; 172(4):191-194.
- 62 Grisham MB, Jefferson MM, Melton DF, Thomas EL. Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activities of the chloramines. *J Biol Chem* 1984; 259(16):10404-10413.
- 63 Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998; 92(9):3007-3017.
- 64 Hansson M, Olsson I, Nauseef WM. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys* 2006; 445(2):214-224.
- 65 Hara S, Takemori Y, Yamaguchi M, Nakamura M, Ohkura Y. Determination of alpha-keto acids in serum and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1985; 344:33-39.

- 66 Haslett C, Guthrie LA, Kopaniak MM, Johnston RB, Jr., Henson PM. Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol* 1985; 119(1):101-110.
- 67 Hattori H, Imai H, Hanamoto A, Furuhashi K, Nakagawa Y. Up-regulation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat casein-induced polymorphonuclear neutrophils. *Biochem J* 2005; 389(Pt 2):279-287.
- 68 Hawkins CL, Brown BE, Davies MJ. Hypochlorite- and hypobromite-mediated radical formation and its role in cell lysis. *Arch Biochem Biophys* 2001; 395(2):137-145.
- 69 Hayashi T, Tsuchiya H, Todoriki H, Naruse H. High-performance liquid chromatographic determination of alpha-keto acids in human urine and plasma. *Anal Biochem* 1982; 122(1):173-179.
- 70 Hayashi T, Tsuchiya H, Naruse H. High-performance liquid chromatographic determination of alpha-keto acids in plasma with fluorometric detection. *J Chromatogr* 1983; 273(2):245-252.
- 71 Helmy SA, Al Attiyah RJ. The immunomodulatory effects of prolonged intravenous infusion of propofol versus midazolam in critically ill surgical patients. *Anaesthesia* 2001; 56(1):4-8.
- 72 Henschen A, Hupf KP, Lottspeich F. High-performance-liquid-chromatography in biochemistry. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. 1. Auflage ed. 1989.
- 73 Hippenstiel S, Kratz T, Krull M, Seybold J, Eichel-Streiber C, Suttrop N. Rho protein inhibition blocks protein kinase C translocation and activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245(3):830-834.
- 74 Holecek M, Sprongl L, Tilser I. Metabolism of branched-chain amino acids in starved rats: the role of hepatic tissue. *Physiol Res* 2001; 50(1):25-33.
- 75 Holecek M. The BCAA-BCKA cycle: its relation to alanine and glutamine synthesis and protein balance. *Nutrition* 2001; 17(1):70.
- 76 Hosoi M, Takeuchi K, Sawada H, Toyohara H. Expression and functional analysis of mussel taurine transporter, as a key molecule in cellular osmoconforming. *J Exp Biol* 2005; 208(Pt 22):4203-4211.
- 77 Inada T, Taniuchi S, Shingu K, Kobayashi Y, Fujisawa J, Nakao S. Propofol depressed neutrophil hydrogen peroxide production more than midazolam, whereas

- adhesion molecule expression was minimally affected by both anesthetics in rats with abdominal sepsis. *Anesth Analg* 2001; 92(2):437-441.
- 78 Janeway C, Travers P. *Immunologie*. 1997.
- 79 Johnson JL, Moore EE, Partrick DA, Tamura DY, Zallen G, Elzi DJ et al. Extracellular signal-related kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways serve opposite roles in neutrophil cytotoxicity. *Arch Surg* 1999; 134(10):1074-1078.
- 80 Katrukha SP, Kukes VG. Derivatization of endogenous and exogenous compounds in plasma for high-performance liquid chromatographic analysis. *J Chromatogr* 1986; 365:105-110.
- 81 Kendler BS. Taurine: an overview of its role in preventive medicine. *Prev Med* 1989; 18(1):79-100.
- 82 Kettle AJ, Carr AC, Winterbourn CC. Assays using horseradish peroxidase and phenolic substrates require superoxide dismutase for accurate determination of hydrogen peroxide production by neutrophils. *Free Radic Biol Med* 1994; 17(2):161-164.
- 83 Kieber DJ, Mopper K. RP-HPLC analysis of alpha-ketoacid quinoxalinol. *J Chromatogr* 1983; 281:135-144.
- 84 Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005; 77(5):598-625.
- 85 Kobayashi T, Tsunawaki S, Seguchi H. Evaluation of the process for superoxide production by NADPH oxidase in human neutrophils: evidence for cytoplasmic origin of superoxide. *Redox Rep* 2001; 6(1):27-36.
- 86 Kontny E, Chorazy-Massalska M, Rudnicka W, Marcinkiewicz J, Maslinski W. Comparison of taurine chloramine and taurine bromamine effects on rheumatoid arthritis synoviocytes. *Amino Acids* 2006.
- 87 Krueger KE. Peripheral-type benzodiazepine receptors: a second site of action for benzodiazepines. *Neuropsychopharmacology* 1991; 4(4):237-244.
- 88 Krüll M, Klucken AC, Wuppermann FN, Fuhrmann O, Magerl C, Seybold J et al. Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J Immunol* 1999; 162(8):4834-4841.

- 89 Krumholz W. Der Einfluß ausgewählter intravenöser Anästhetika auf verschiedene Funktionen polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten. Gießen: Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 1991. 1991.
- 90 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; 37(4):386-389.
- 91 Krumholz W, Demel C, Jung S, Meuthen G, Knecht J, Hempelmann G. The effects of thiopentone, etomidate, ketamine and midazolam on several bactericidal functions of polymorphonuclear leucocytes in vitro. *Eur J Anaesthesiol* 1995; 12(2):141-146.
- 92 Krumholz W, Weidenbusch H, Menges T. The effect of midazolam and flunitrazepam on the liberation of lysozyme and beta-glucuronidase from neutrophil granulocytes in vitro. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2000; 35(5):316-318.
- 93 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; 18(3):151-158.
- 94 Kuwabara M, Takahashi TA, Nagahata H, Inanami O. Spin-trapping detection of superoxides in polymorphonuclear leukocytes stimulated with serum-opsonized zymosan. *Jpn J Vet Res* 2000; 48(1):3-13.
- 95 Kyono W, Coates TD. A practical approach to neutrophil disorders. *Pediatr Clin North Am* 2002; 49(5):929-71, viii.
- 96 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680-685.
- 97 Laghi PF, Ceccatelli L, Capecchi PL, Orrico A, Pasqui AL, Di Perri T. Benzodiazepines inhibit in vitro free radical formation from human neutrophils induced by FMLP and A23187. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1987; 9(1):101-114.
- 98 Lagranha CJ, Senna SM, de Lima TM, Silva EP, Doi SQ, Curi R et al. Beneficial effect of glutamine on exercise-induced apoptosis of rat neutrophils. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36(2):210-217.

- 99 Lakshman R, Finn A. Neutrophil disorders and their management. *J Clin Pathol* 2001; 54(1):7-19.
- 100 Lambert IH. Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells. *Neurochem Res* 2004; 29(1):27-63.
- 101 Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(3):181-189.
- 102 Lauzon K, Zhao X, Bouetard A, Delbecchi L, Paquette B, Lacasse P. Antioxidants to prevent bovine neutrophil-induced mammary epithelial cell damage. *J Dairy Sci* 2005; 88(12):4295-4303.
- 103 Lee C, Miura K, Liu X, Zweier JL. Biphasic regulation of leukocyte superoxide generation by nitric oxide and peroxynitrite. *J Biol Chem* 2000; 275(50):38965-38972.
- 104 Lee DH, Kang SK, Lee RH, Ryu JM, Park HY, Choi HS et al. Effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2004; 198(1):91-99.
- 105 Lee WL, Downey GP. Neutrophil activation and acute lung injury. *Curr Opin Crit Care* 2001; 7(1):1-7.
- 106 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; 227(1-2):75-84.
- 107 Lord BI, Woolford LB, Molineux G. Kinetics of neutrophil production in normal and neutropenic animals during the response to filgrastim (r-metHu G-CSF) or filgrastim SD/01 (PEG-r-metHu G-CSF). *Clin Cancer Res* 2001; 7(7):2085-2090.
- 108 Mahmudi-Azer S, van Eeden SF. Neutrophil 'connectivity': key to neutrophil-mediated tissue injury? *Crit Care* 2003; 7(4):285-287.
- 109 Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, Bryniarski K, Nowak B. Taurine chloramine down-regulates the generation of murine neutrophil inflammatory mediators. *Immunopharmacology* 1998; 40(1):27-38.
- 110 Marcinkiewicz J, Chain B, Nowak B, Grabowska A, Bryniarski K, Baran J. Antimicrobial and cytotoxic activity of hypochlorous acid: interactions with taurine and nitrite. *Inflamm Res* 2000; 49(6):280-289.

- 111 Marcinkiewicz J, Mak M, Bobek M, Biedron R, Bialecka A, Koprowski M et al. Is there a role of taurine bromamine in inflammation? Interactive effects with nitrite and hydrogen peroxide. *Inflamm Res* 2005; 54(1):42-49.
- 112 Marino F, Cattaneo S, Cosentino M, Rasini E, Di Grazia L, Fietta AM et al. Diazepam stimulates migration and phagocytosis of human neutrophils: possible contribution of peripheral-type benzodiazepine receptors and intracellular calcium. *Pharmacology* 2001; 63(1):42-49.
- 113 Marshall JC. The effects of granulocyte colony-stimulating factor in preclinical models of infection and acute inflammation. *Shock* 2005; 24 Suppl 1:120-129.
- 114 Martini C, Chelli B, Betti L, Montali M, Mancuso M, Giannaccini G et al. Peripheral benzodiazepine binding sites in platelets of patients affected by mitochondrial diseases and large scale mitochondrial DNA rearrangements. *Mol Med* 2002; 8(12):841-846.
- 115 Maslen C, Stevens TR, Hall ND. The generation of lipid peroxides by stimulated human neutrophils. Detection using phenol red oxidation. *J Immunol Methods* 1987; 98(1):71-76.
- 116 Massoco C, Palermo-Neto J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 95(1-2):11-19.
- 117 Matute-Bello G, Frevert CW, Kajikawa O, Skerrett SJ, Goodman RB, Park DR et al. Septic shock and acute lung injury in rabbits with peritonitis: failure of the neutrophil response to localized infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(1):234-243.
- 118 Meyer V. Praxis der HPLC. Verlag Diesterweg-Salle-Sauerländer. Frankfurt am Main. 1986.
- 119 Midwinter RG, Peskin AV, Vissers MC, Winterbourn CC. Extracellular oxidation by taurine chloramine activates ERK via the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2004; 279(31):32205-32211.
- 120 Miyawaki T, Sogawa N, Maeda S, Kohjitani A, Shimada M. Effect of midazolam on interleukin-6 mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells in the absence of lipopolysaccharide. *Cytokine* 2001; 15(6):320-327.

- 121 Moinard C, Caldefie F, Walrand S, Felgines C, Vasson MP, Cynober L. Involvement of glutamine, arginine, and polyamines in the action of ornithine alpha-ketoglutarate on macrophage functions in stressed rats. *J Leukoc Biol* 2000; 67(6):834-840.
- 122 Moinard C, Caldefie F, Walrand S, Tridon A, Chassagne J, Vasson MP et al. Effects of ornithine 2-oxoglutarate on neutrophils in stressed rats: evidence for the involvement of nitric oxide and polyamines. *Clin Sci (Lond)* 2002; 102(3):287-295.
- 123 Mühling J, Fuchs M, Dehne MG, Sablotzki A, Menges T, Weber B et al. 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; 728(2):157-166.
- 124 Mühling J, Knulle V, Fuchs M, Dehne MG, Weiss S, Hempelmann G. The effects of thiopentone on free intracellular amino acids in polymorphonuclear leucocytes. *Amino Acids* 2000; 18(3):239-249.
- 125 Mühling J, Fuchs M, Sablotzki A, Krull M, Ogal HP, Weiss S et al. Methohexital affects neutrophil (PMN) dynamic free amino acid pool and immune functions in vitro. *Eur J Anaesthesiol* 2001; 18(6):366-376.
- 126 Mühling J, Campos ME, Sablotzki A, Krull M, Dehne MG, Gonther J et al. Effects of propofol and taurine on intracellular free amino acid profiles and immune function markers in neutrophils in vitro. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40(2):111-121.
- 127 Mühling J, Fuchs M, Campos ME, Gonter J, Engel JM, Sablotzki A et al. Quantitative determination of free intracellular alpha-keto acids in neutrophils. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 789(2):383-392.
- 128 Munder M, Mollinedo F, Calafat J, Canchado J, Gil-Lamaignere C, Fuentes JM et al. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood* 2005; 105(6):2549-2556.
- 129 Murav'ev RA, But PG, Fomina VA, Rogovin VV. [The mechanism of bactericidal activity in phagosomes of neutrophils]. *Izv Akad Nauk Ser Biol* 2002;(4):437-441.

- 130 Newsholme P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J Nutr* 2001; 131(9 Suppl):2515S-2522S.
- 131 Newsholme P, Procopio J, Lima MM, Pithon-Curi TC, Curi R. Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct* 2003; 21(1):1-9.
- 132 Nussler AK, Wittel UA, Nussler NC, Beger HG. Leukocytes, the Janus cells in inflammatory disease. *Langenbecks Arch Surg* 1999; 384(2):222-232.
- 133 Ochoa JB, Bernard AC, O'Brien WE, Griffen MM, Maley ME, Rockich AK et al. Arginase I expression and activity in human mononuclear cells after injury. *Ann Surg* 2001; 233(3):393-399.
- 134 Ohmori M, Kitoh Y, Harada K, Sugimoto K, Fujimura A. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) functions in SHR, L-. *J Hypertens* 2000; 18(6):703-707.
- 135 Pailla K, Blonde-Cynober F, Aussel C, De Bandt JP, Cynober L. Branched-chain keto-acids and pyruvate in blood: measurement by HPLC with fluorimetric detection and changes in older subjects. *Clin Chem* 2000; 46(6 Pt 1):848-853.
- 136 Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA. Polyamines inhibit NADPH oxidase-mediated superoxide generation and putrescine prevents programmed cell death induced by polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide. *Planta* 2005; 220(6):826-837.
- 137 Papadopoulos V, Amri H, Li H, Yao Z, Brown RC, Vidic B et al. Structure, function and regulation of the mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor. *Therapie* 2001; 56(5):549-556.
- 138 Papadopoulos V. In search of the function of the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Endocr Res* 2004; 30(4):677-684.
- 139 Partrick DA, Moore EE, Fullerton DA, Barnett CC, Jr., Meldrum DR, Silliman CC. Cardiopulmonary bypass renders patients at risk for multiple organ failure via early neutrophil priming and late neutrophil disability. *J Surg Res* 1999; 86(1):42-49.
- 140 Partrick DA, Moore EE, Offner PJ, Meldrum DR, Tamura DY, Johnson JL et al. Maximal human neutrophil priming for superoxide production and elastase release

- requires p38 mitogen-activated protein kinase activation. Arch Surg 2000; 135(2):219-225.
- 141 Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. J Immunol Methods 1980; 38(1-2):161-170.
- 142 Pithon-Curi TC, Trezena AG, Tavares-Lima W, Curi R. Evidence that glutamine is involved in neutrophil function. Cell Biochem Funct 2002; 20(2):81-86.
- 143 Pithon-Curi TC, Schumacher RI, Freitas JJ, Lagranha C, Newsholme P, Palanch AC et al. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. Am J Physiol Cell Physiol 2003; 284(6):C1355-C1361.
- 144 Pithon-Curi TC, De Melo MP, Curi R. Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a comparative study. Cell Biochem Funct 2004; 22(5):321-326.
- 145 Platania. Dell' influenza del sistema nervoso sulle infezioni. Giornale internazionale delle science mediche 1890.
- 146 Pullar JM, Vissers MC, Winterbourn CC. Living with a killer: the effects of hypochlorous acid on mammalian cells. IUBMB Life 2000; 50(4-5):259-266.
- 147 Rajtar G, Zolkowska D, Kleinrok Z. Effect of diazepam and clonazepam on the function of isolated rat platelet and neutrophil. Med Sci Monit 2002; 8(4):I37-I44.
- 148 Ratasirayakorn W, Leone P, Leblebicioglu B, Walters JD. Polyamines found in the inflamed periodontium inhibit priming and apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. J Periodontol 1999; 70(2):179-184.
- 149 Rebecchi IM, Ferreira NN, 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; 18(2):127-132.
- 150 Rick W. Klinische Chemie und Mikroskopie. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1977. 1977.
- 151 Riedel E, Hampl H, Nundel M, Busche D, Fuchs H. Severity of anaemia influences pattern of amino acids and alpha-keto acids in haemodialysis patients. Contrib Nephrol 1992; 98:98-104.

- 152 Riedel E, Hampl H, Nundel M, Farshidfar G. Essential branched-chain amino acids and alpha-ketoanalogues in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1992; 7(2):117-120.
- 153 Riedel E, Hampl H. Correction of amino acid metabolism during rhEPO therapy in hemodialysis patients results from a better oxygen availability. *Nephron* 1995; 69(2):196-197.
- 154 Riedel E, Nundel M, Wendel G, Hampl H. Amino acid and alpha-keto acid metabolism depends on oxygen availability in chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 2000; 53(1 Suppl):S56-S60.
- 155 Rose S, Fiebrich M, Weber P, Dike J, Buhren V. Neutrophil activation after skeletal muscle ischemia in humans. *Shock* 1998; 9(1):21-26.
- 156 Roth E, Karner J. [Intracellular amino acid concentrations in various disease states]. *Infusionsther Klin Ernahr* 1987; 14(4):147-150.
- 157 Schmitt M, Keller HU, Cottier H. Qualitative and quantitative assessment of human polymorphonuclear leukocyte (PMNL) functions. *Beitr Infusionsther Klin Ernahr* 1986; 15:196-230.
- 158 Schuller-Levis GB, Park E. Taurine and its chloramine: modulators of immunity. *Neurochem Res* 2004; 29(1):117-126.
- 159 Seguchi H, Kobayashi T. Study of NADPH oxidase-activated sites in human neutrophils. *J Electron Microsc (Tokyo)* 2002; 51(2):87-91.
- 160 Sethi S, Dikshit M. Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide. *Thromb Res* 2000; 100(3):223-247.
- 161 Snell JJ. Immunität und Narkose. *Berliner Klin Wochenschr* 1903; 40:212-220.
- 162 Soulet D, Rivest S. Polyamines play a critical role in the control of the innate immune response in the mouse central nervous system. *J Cell Biol* 2003; 162(2):257-268.
- 163 Stangel W, Seidel J, Mirkani J, Behrmann M, Hulsheger H. [Granulocyte functions in stored blood]. *Beitr Infusionsther Klin Ernahr* 1986; 15:231-252.
- 164 Stoebner PE, Carayon P, Casellas P, Portier M, Lavabre-Bertrand T, Cuq P et al. Transient protection by peripheral benzodiazepine receptors during the early events of ultraviolet light-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2001; 8(7):747-753.

- 165 Stokol T, O'Donnell P, Xiao L, Knight S, Stavrakis G, Botto M et al. C1q governs deposition of circulating immune complexes and leukocyte Fcγ receptors mediate subsequent neutrophil recruitment. *J Exp Med* 2004; 200(7):835-846.
- 166 Szekely A, Heindl B, Zahler S, Conzen PF, Becker BF. Nonuniform behavior of intravenous anesthetics on postischemic adhesion of neutrophils in the guinea pig heart. *Anesth Analg* 2000; 90(6):1293-1300.
- 167 Tegg EM, Tuck DM, Lowenthal RM, Marsden KA. The effect of G-CSF on the composition of human bone marrow. *Clin Lab Haematol* 1999; 21(4):265-270.
- 168 Teigland M, Klungsoyr L. Accumulation of alpha-ketoisocaproate from leucine in homogenates of tissues from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) and rat. An improved method for determination of branched chain keto acids. *Comp Biochem Physiol B* 1983; 75(4):703-705.
- 169 Tinker AC, Wallace AV. Selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase: potential agents for the treatment of inflammatory diseases? *Curr Top Med Chem* 2006; 6(2):77-92.
- 170 Tomassen SF, Fekkes D, de Jonge HR, Tilly BC. Osmotic swelling-provoked release of organic osmolytes in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286(6):C1417-C1422.
- 171 Tong BC, Barbul A. Cellular and physiological effects of arginine. *Mini Rev Med Chem* 2004; 4(8):823-832.
- 172 Torres SR, Frode TS, Nardi GM, Vita N, Reeb R, Ferrara P et al. Anti-inflammatory effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands in two mouse models of inflammation. *Eur J Pharmacol* 2000; 408(2):199-211.
- 173 Tsai CS, Hsu PC, Huang GS, Lin TC, Hong GJ, Shih CM et al. Midazolam attenuates adenosine diphosphate-induced P-selectin expression and platelet-leucocyte aggregation. *Eur J Anaesthesiol* 2004; 21(11):871-876.
- 174 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.

- 175 van Eeden SF, Lawrence E, Sato Y, Kitagawa Y, Hogg JC. Neutrophils released from the bone marrow by granulocyte colony-stimulating factor sequester in lung microvessels but are slow to migrate. *Eur Respir J* 2000; 15(6):1079-1086.
- 176 van GELDER B, SLATER EC. The extinction coefficient of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 1962; 58:593-595.
- 177 Van Haastert PJ, Devreotes PN. Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(8):626-634.
- 178 Veenman L, Gavish M. The peripheral-type benzodiazepine receptor and the cardiovascular system. Implications for drug development. *Pharmacol Ther* 2006; 110(3):503-524.
- 179 Venaille TJ, Misso NL, Phillips MJ, Robinson BW, Thompson PJ. Effects of different density gradient separation techniques on neutrophil function. *Scand J Clin Lab Invest* 1994; 54(5):385-391.
- 180 Verdrengh M, Tarkowski A. Inhibition of septic arthritis by local administration of taurine chloramine, a product of activated neutrophils. *J Rheumatol* 2005; 32(8):1513-1517.
- 181 von Deutsch AW, Mitchell CD, Williams CE, Dutt K, Silvestrov NA, Klement BJ et al. Polyamines protect against radiation-induced oxidative stress. *Gravit Space Biol Bull* 2005; 18(2):109-110.
- 182 Voss JW, Pedersen SF, Christensen ST, Lambert IH. Regulation of the expression and subcellular localization of the taurine transporter TauT in mouse NIH3T3 fibroblasts. *Eur J Biochem* 2004; 271(23-24):4646-4658.
- 183 Weening RS, Wever R, Roos D. Quantitative aspects of the production of superoxide radicals by phagocytizing human granulocytes. *J Lab Clin Med* 1975; 85(2):245-252.
- 184 Winterbourn CC. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology* 2002; 181-182:223-227.
- 185 Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 2000; 80(5):617-653.

- 186 Witte MB, Vogt N, Stuelten C, Gotoh T, Mori M, Becker HD. Arginase acts as an alternative pathway of L-arginine metabolism in experimental colon anastomosis. *J Gastrointest Surg* 2003; 7(3):378-385.
- 187 Woolf LI, Hasinoff C, Perry A. Estimation of branched-chain alpha-keto acids in blood by gas chromatography. *J Chromatogr* 1982; 231(2):237-245.
- 188 Ximenes VF, Paino IM, Faria-Oliveira OM, Fonseca LM, Brunetti IL. Indole ring oxidation by activated leukocytes prevents the production of hypochlorous acid. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38(11):1575-1583.
- 189 Yoda H, Yamaguchi Y, Sano H. Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. *Plant Physiol* 2003; 132(4):1973-1981.
- 190 Yu YM, Ryan CM, Castillo L, Lu XM, Beaumier L, Tompkins RG et al. Arginine and ornithine kinetics in severely burned patients: increased rate of arginine disposal. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280(3):E509-E517.
- 191 Zavala F. Benzodiazepines, anxiety and immunity. *Pharmacol Ther* 1997; 75(3):199-216.

7 ANHANG

7.1 Ergebnistabellen

7.1.1 Midazolam

<i>Saure Aminosäuren</i>				
<i>MIDAZOLAM</i>				
<i>Säureamide</i>				
<i>Kontrolle</i>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>
<i>Asparagin</i>	0,46 ± 0,12	0,47 ± 0,11	0,47 ± 0,12	0,45 ± 0,11
<i>Glutamin</i>	3,73 ± 0,53	3,84 ± 0,55	3,78 ± 0,53	3,70 ± 0,52
<i>Aspartat</i>	2,45 ± 0,61	2,57 ± 0,65	2,49 ± 0,61	2,56 ± 0,63
<i>Glutamat</i>	5,02 ± 0,69	5,09 ± 0,71	4,88 ± 0,65	4,92 ± 0,68
<i>40 ng/ml</i>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>
<i>Asparagin</i>	0,48 ± 0,13	0,51 ± 0,14	0,45 ± 0,12	0,40 ± 0,11
<i>Glutamin</i>	3,80 ± 0,48	4,04 ± 0,61	3,97 ± 0,59	3,99 ± 0,60
<i>Aspartat</i>	2,46 ± 0,62	2,47 ± 0,56	2,31 ± 0,50	2,26 ± 0,47
<i>Glutamat</i>	4,88 ± 0,72	4,69 ± 0,66	4,52 ± 0,63	4,25 ± 0,59
<i>100 ng/ml</i>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>
<i>Asparagin</i>	0,43 ± 0,12	0,40 ± 0,11	0,38 ± 0,09	0,35 ± 0,08
<i>Glutamin</i>	3,86 ± 0,54	3,49 ± 0,53	3,27 ± 0,44	2,94 ± 0,43*#
<i>Aspartat</i>	2,27 ± 0,47	2,09 ± 0,44	1,89 ± 0,40	1,71 ± 0,37*#
<i>Glutamat</i>	4,78 ± 0,81	4,38 ± 0,76	4,01 ± 0,66*#	3,81 ± 0,57*#
<i>1 µg/ml</i>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>
<i>Asparagin</i>	0,38 ± 0,10	0,33 ± 0,09*	0,30 ± 0,08*#	0,27 ± 0,07*#
<i>Glutamin</i>	3,44 ± 0,56	3,15 ± 0,51*	2,79 ± 0,43*#	2,25 ± 0,41*#
<i>Aspartat</i>	2,11 ± 0,45	1,79 ± 0,37*#	1,54 ± 0,33*#	1,29 ± 0,31*#
<i>Glutamat</i>	4,54 ± 0,80	3,49 ± 0,56*#	2,93 ± 0,47*#	2,26 ± 0,41*#

Tabelle 9: Einfluss von Midazolam (40 und 100 ng/ml; 1 µg/ml; Inkubationszeiten: 10, 30, 60 sowie 120 min; n= 10) auf den freien intrazellulären Gehalt saurer Aminosäuren [Asparagin, Glutamin] sowie ihrer Säureamide [Aspartat, Glutamat] in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10^{-16} Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; # ≤ 0,05 versus 10 min.

<i>Basische Aminosäuren</i>		<i>MIDAZOLAM</i>			
<i>Kontrolle</i>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>	
<i>Ornithin</i>	1,19 ± 0,23	1,24 ± 0,25	1,20 ± 0,24	1,28 ± 0,26	
<i>Lysin</i>	0,70 ± 0,11	0,66 ± 0,10	0,73 ± 0,12	0,75 ± 0,12	
<i>Arginin</i>	0,59 ± 0,12	0,63 ± 0,13	0,60 ± 0,12	0,67 ± 0,14	
<i>Citrullin</i>	0,23 ± 0,03	0,22 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,23 ± 0,03	
<i>40 ng/ml</i>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>	
<i>Ornithin</i>	1,10 ± 0,20	1,12 ± 0,20	1,03 ± 0,21	0,99 ± 0,19	
<i>Lysin</i>	0,65 ± 0,10	0,68 ± 0,11	0,62 ± 0,10	0,66 ± 0,10	
<i>Arginin</i>	0,64 ± 0,13	0,66 ± 0,13	0,70 ± 0,14	0,75 ± 0,15	
<i>Citrullin</i>	0,22 ± 0,03	0,22 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,22 ± 0,03	
<i>100 ng/ml</i>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>	
<i>Ornithin</i>	1,07 ± 0,20	0,98 ± 0,19	0,85 ± 0,17*#	0,79 ± 0,16*#	
<i>Lysin</i>	0,66 ± 0,10	0,71 ± 0,11	0,79 ± 0,13	0,80 ± 0,13	
<i>Arginin</i>	0,60 ± 0,12	0,56 ± 0,12	0,49 ± 0,11*#	0,46 ± 0,10*#	
<i>Citrullin</i>	0,22 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,19 ± 0,03*#	0,17 ± 0,03*#	
<i>1 µg/ml</i>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>	
<i>Ornithin</i>	0,96 ± 0,20	0,68 ± 0,12*#	0,60 ± 0,11*#	0,49 ± 0,10*#	
<i>Lysin</i>	0,67 ± 0,11	0,71 ± 0,12	0,68 ± 0,12	0,60 ± 0,10	
<i>Arginin</i>	0,54 ± 0,11	0,48 ± 0,10*	0,42 ± 0,09*#	0,35 ± 0,08*#	
<i>Citrullin</i>	0,20 ± 0,03	0,16 ± 0,02*#	0,13 ± 0,02*#	0,11 ± 0,01*#	

Tabelle 10: Einfluss von Midazolam (40 und 100 ng/ml; 1 µg/ml; Inkubationszeiten: 10, 30, 60 sowie 120 min; n= 10) auf den freien intrazellulären Gehalt basischer Aminosäuren [Ornithin, Lysin, Arginin, Citrullin] in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10^{-16} Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; # ≤ 0,05 versus 10 min.

<i>BCAA, Methionin</i>				
<i>MIDAZOLAM</i>				
<i>Taurin, Hypotaurin</i>				
<u>Kontrolle</u>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>
<i>Isoleucin</i>	0,62 ± 0,12	0,65 ± 0,13	0,68 ± 0,15	0,66 ± 0,14
<i>Leucin</i>	0,42 ± 0,10	0,40 ± 0,11	0,45 ± 0,12	0,46 ± 0,12
<i>Valin</i>	1,22 ± 0,35	1,29 ± 0,32	1,31 ± 0,36	1,26 ± 0,34
<i>Methionin</i>	0,35 ± 0,07	0,33 ± 0,08	0,38 ± 0,10	0,38 ± 0,09
<i>Taurin</i>	34,7 ± 5,7	35,2 ± 5,8	36,0 ± 6,5	35,9 ± 6,2
<i>Hypotaurin</i>	1,12 ± 0,21	1,18 ± 0,23	1,02 ± 0,20	1,07 ± 0,19
<u>40 ng/ml</u>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>
<i>Isoleucin</i>	0,61 ± 0,12	0,66 ± 0,13	0,70 ± 0,16	0,64 ± 0,13
<i>Leucin</i>	0,40 ± 0,10	0,41 ± 0,11	0,43 ± 0,12	0,42 ± 0,12
<i>Valin</i>	1,31 ± 0,36	1,27 ± 0,31	1,33 ± 0,37	1,25 ± 0,43
<i>Methionin</i>	0,36 ± 0,07	0,35 ± 0,07	0,38 ± 0,08	0,37 ± 0,08
<i>Taurin</i>	34,9 ± 5,8	35,0 ± 5,9	35,6 ± 6,3	35,4 ± 6,1
<i>Hypotaurin</i>	1,27 ± 0,28	1,14 ± 0,22	1,10 ± 0,22	1,02 ± 0,19
<u>100 ng/ml</u>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>
<i>Isoleucin</i>	0,70 ± 0,14	0,79 ± 0,15	0,95 ± 0,22*	1,04 ± 0,23*#
<i>Leucin</i>	0,50 ± 0,11	0,52 ± 0,13	0,62 ± 0,13*	0,68 ± 0,15*#
<i>Valin</i>	1,37 ± 0,37	1,64 ± 0,40	1,72 ± 0,43	1,80 ± 0,45*
<i>Methionin</i>	0,37 ± 0,09	0,39 ± 0,09	0,45 ± 0,10	0,47 ± 0,12
<i>Taurin</i>	32,9 ± 6,4	30,7 ± 5,2	29,3 ± 5,9*	28,2 ± 5,7*
<i>Hypotaurin</i>	1,23 ± 0,25	1,16 ± 0,27	0,93 ± 0,24	0,84 ± 0,21*#
<u>1 µg/ml</u>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>
<i>Isoleucin</i>	0,78 ± 0,16	1,06 ± 0,24*#	1,11 ± 0,25*#	1,20 ± 0,26*#
<i>Leucin</i>	0,53 ± 0,12	0,69 ± 0,15*#	0,75 ± 0,16*#	0,81 ± 0,17*#
<i>Valin</i>	1,64 ± 0,46	1,89 ± 0,53*	2,12 ± 0,62*#	2,28 ± 0,66*#
<i>Methionin</i>	0,40 ± 0,10	0,52 ± 0,13*#	0,54 ± 0,14*#	0,60 ± 0,16*#
<i>Taurin</i>	30,8 ± 5,2	27,6 ± 5,5*	26,8 ± 4,8*	25,2 ± 4,0*#
<i>Hypotaurin</i>	1,12 ± 0,27	0,98 ± 0,25	0,72 ± 0,19*#	0,61 ± 0,16*#

Tabelle 11: Einfluss von *Midazolam* (40 und 100 ng/ml; 1 µg/ml; Inkubationszeiten: 10, 30, 60 sowie 120 min; n= 10) auf den freien intrazellulären Gehalt *verzweigtkettiger Aminosäuren* [*BCAA: Isoleucin, Leucin, Valin*] sowie *Taurin, Hypotaurin* und *Methionin* in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10^{-16} Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; # ≤ 0,05 versus 10 min.

<i>Neutrale Aminosäuren</i>		<i>MIDAZOLAM</i>			
<u>Kontrolle</u>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>	
<i>Serin</i>	3.26 ± 0.55	3.33 ± 0.57	3.24 ± 0.58	3.39 ± 0.62	
<i>Glycin</i>	4.02 ± 1.04	3.91 ± 0.98	3.97 ± 1.00	4.13 ± 1.06	
<i>Threonin</i>	1.70 ± 0.56	1.64 ± 0.54	1.62 ± 0.53	1.59 ± 0.51	
<i>Alanin</i>	1.78 ± 0.45	1.84 ± 0.46	1.90 ± 0.48	1.93 ± 0.49	
<i>α-Aminobutyrat</i>	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.02	
<u>40 ng/ml</u>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>	
<i>Serin</i>	3.11 ± 0.52	3.25 ± 0.53	3.30 ± 0.55	3.40 ± 0.64	
<i>Glycin</i>	3.81 ± 0.99	3.85 ± 0.97	4.80 ± 1.24	4.16 ± 1.08	
<i>Threonin</i>	1.81 ± 0.50	1.70 ± 0.56	2.00 ± 0.58	1.56 ± 0.51	
<i>Alanin</i>	1.99 ± 0.50	1.90 ± 0.48	1.71 ± 0.43	1.66 ± 0.39	
<i>α-Aminobutyrat</i>	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	
<u>100 ng/ml</u>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>	
<i>Serin</i>	3.78 ± 0.66	4.62 ± 0.83*#	4.76 ± 0.82*#	5.22 ± 0.83*#	
<i>Glycin</i>	4.86 ± 1.20	5.37 ± 1.34*	5.73 ± 1.44*#	6.27 ± 1.63*	
<i>Threonin</i>	1.92 ± 0.54	2.04 ± 0.58	2.21 ± 0.63	2.29 ± 0.66*	
<i>Alanin</i>	1.80 ± 0.46	1.59 ± 0.39	1.45 ± 0.36	1.31 ± 0.32*#	
<i>α-Aminobutyrat</i>	0.14 ± 0.02	0.17 ± 0.03*#	0.19 ± 0.03*#	0.20 ± 0.04*#	
<u>1 µg/ml</u>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>	
<i>Serin</i>	3.98 ± 0.71	5.70 ± 1.08*#	6.18 ± 1.11*#	6.57 ± 1.13*#	
<i>Glycin</i>	5.04 ± 1.31	6.99 ± 1.82*#	7.59 ± 1.95*#	8.09 ± 2.26*#	
<i>Threonin</i>	2.24 ± 0.62	2.36 ± 0.64*	2.44 ± 0.67*	2.54 ± 0.69*	
<i>Alanin</i>	1.48 ± 0.36	1.22 ± 0.70*	1.08 ± 0.28*#	0.99 ± 0.26*#	
<i>α-Aminobutyrat</i>	0.16 ± 0.02	0.18 ± 0.03*	0.20 ± 0.04*#	0.24 ± 0.04*#	

Tabelle 12: Einfluss von Midazolam (40 und 100 ng/ml; 1 µg/ml; Inkubationszeiten: 10, 30, 60 sowie 120 min; n= 10) auf den freien intrazellulären Gehalt neutraler Aminosäuren [Serin, Glycin, Threonin, Alanin, α-Aminobutyrat] in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10^{-16} Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; # ≤ 0,05 versus 10 min.

<i>Aromatische Aminosäuren</i>		<i>MIDAZOLAM</i>			
<u>Kontrolle</u>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>	
<i>Tyrosin</i>	1,07 ± 0,27	1,02 ± 0,25	1,12 ± 0,29	1,15 ± 0,30	
<i>Tryptophan</i>	0,25 ± 0,08	0,27 ± 0,09	0,27 ± 0,09	0,28 ± 0,09	
<i>Phenylalanin</i>	1,34 ± 0,44	1,30 ± 0,43	1,38 ± 0,45	1,31 ± 0,42	
<i>Histidin</i>	1,28 ± 0,36	1,22 ± 0,33	1,30 ± 0,36	1,28 ± 0,35	
<u>40 ng/ml</u>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>	
<i>Tyrosin</i>	0,92 ± 0,22	1,08 ± 0,26	1,15 ± 0,30	1,10 ± 0,28	
<i>Tryptophan</i>	0,29 ± 0,09	0,26 ± 0,08	0,28 ± 0,09	0,29 ± 0,09	
<i>Phenylalanin</i>	1,18 ± 0,39	1,21 ± 0,40	1,30 ± 0,42	1,33 ± 0,43	
<i>Histidin</i>	1,34 ± 0,37	1,17 ± 0,30	1,24 ± 0,35	1,32 ± 0,37	
<u>100 ng/ml</u>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>	
<i>Tyrosin</i>	1,16 ± 0,29	1,02 ± 0,25	1,12 ± 0,27	1,22 ± 0,31	
<i>Tryptophan</i>	0,29 ± 0,10	0,27 ± 0,09	0,30 ± 0,11	0,28 ± 0,10	
<i>Phenylalanin</i>	1,48 ± 0,48	1,53 ± 0,44	1,38 ± 0,46	1,40 ± 0,45	
<i>Histidin</i>	1,34 ± 0,37	1,50 ± 0,41	1,55 ± 0,44	1,73 ± 0,44*	
<u>1 µg/ml</u>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>90 min</i>	<i>120 min</i>	
<i>Tyrosin</i>	0,98 ± 0,24	0,91 ± 0,23	0,86 ± 0,22	0,96 ± 0,25	
<i>Tryptophan</i>	0,30 ± 0,10	0,31 ± 0,10	0,32 ± 0,10	0,28 ± 0,09	
<i>Phenylalanin</i>	1,28 ± 0,42	1,37 ± 0,46	1,39 ± 0,45	1,47 ± 0,46	
<i>Histidin</i>	1,64 ± 0,46	1,79 ± 0,50*	1,92 ± 0,54*	1,99 ± 0,57*	

Tabelle 13: Einfluss von Midazolam (40 und 100 ng/ml; 1 µg/ml; Inkubationszeiten: 10, 30, 60 sowie 120 min; n= 10) auf den freien intrazellulären Gehalt aromatischer Aminosäuren [Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin, Histidin] in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10^{-16} Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; # ≤ 0,05 versus 10 min.

<i>α-Ketosäuren</i>	<i>MIDAZOLAM</i>			
<i><u>10 min</u></i>				
	<i>Kontrolle</i>	<i>40 ng/ml</i>	<i>100 ng/ml</i>	<i>1 μg/ml</i>
<i>α-KG</i>	1,25 $\pm$ 0,39	1,33 $\pm$ 0,44	1,41 $\pm$ 0,51	1,26 $\pm$ 0,40
<i>PYR</i>	6,52 $\pm$ 1,81	6,38 $\pm$ 1,75	6,14 $\pm$ 1,53	5,97 $\pm$ 1,71
<i>α-KB</i>	4,20 $\pm$ 1,09	3,85 $\pm$ 0,92	3,68 $\pm$ 0,86	4,13 $\pm$ 1,04
<i>α-KIV</i>	2,17 $\pm$ 0,51	2,13 $\pm$ 0,51	2,22 $\pm$ 0,56	2,07 $\pm$ 0,48
<i>α-KIC</i>	0,46 $\pm$ 0,10	0,42 $\pm$ 0,10	0,43 $\pm$ 0,11	0,37 $\pm$ 0,09
<i>PhePYR</i>	0,42 $\pm$ 0,11	0,41 $\pm$ 0,12	0,44 $\pm$ 0,13	0,39 $\pm$ 0,10
<i>α-KMV</i>	0,77 $\pm$ 0,18	0,74 $\pm$ 0,17	0,83 $\pm$ 0,19	0,66 $\pm$ 0,16
<i><u>120 min</u></i>				
	<i>Kontrolle</i>	<i>40 ng/ml</i>	<i>100 ng/ml</i>	<i>1 μg/ml</i>
<i>α-KG</i>	1,20 $\pm$ 0,36	1,03 $\pm$ 0,34	0,81 $\pm$ 0,23*#	0,70 $\pm$ 0,20*#
<i>PYR</i>	6,23 $\pm$ 1,66	5,78 $\pm$ 1,60	4,48 $\pm$ 1,18*#	3,87 $\pm$ 1,05*#
<i>α-KB</i>	4,09 $\pm$ 0,98	3,56 $\pm$ 0,95	3,16 $\pm$ 0,94*	2,73 $\pm$ 0,85*#
<i>α-KIV</i>	2,01 $\pm$ 0,46	2,19 $\pm$ 0,49	2,42 $\pm$ 0,58	2,87 $\pm$ 0,73*#
<i>α-KIC</i>	0,38 $\pm$ 0,09	0,35 $\pm$ 0,08	0,43 $\pm$ 0,10	0,52 $\pm$ 0,13*#
<i>PhePYR</i>	0,40 $\pm$ 0,12	0,38 $\pm$ 0,12	0,35 $\pm$ 0,10	0,30 $\pm$ 0,09*
<i>α-KMV</i>	0,70 $\pm$ 0,16	0,66 $\pm$ 0,15	0,79 $\pm$ 0,17	0,96 $\pm$ 0,23*#

Tabelle 14: Einfluss von Midazolam (40, 100 ng x ml⁻¹ und 1 μ g x ml⁻¹; Inkubationszeiten: 10 und 120 min; n= 10) auf den freien intrazellulären Gehalt von α -Ketosäuren [α -Ketoglutarat (α -KG), Pyruvat (PYR = α -Ketoalaninat), α -Ketobutyrat (α -KB), α -Ketoisovalerianat (α -KIV), α -Ketoisocapronat (α -KIC), p-Hydroxy-Phenylpyruvat (PhePYR), α -Keto- β -methylvalerianat (α -KMV)] in PMN. Die Ergebnisse sind in α -Ketosäuregehalt [10⁻¹⁷ Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW $\pm$ SD). * $\leq$ 0,05 versus Kontrolle; # $\leq$ 0,05 versus 10 min.

<i>O₂⁻, H₂O₂, MPO</i>		<i>MIDAZOLAM</i>			
<u>Kontrolle</u>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>	
<i>O₂⁻</i>	3,211 ± 0,526	3,316 ± 0,606	3,101 ± 0,555	3,087 ± 0,558	
<i>H₂O₂</i>	1,248 ± 0,287	1,264 ± 0,291	1,205 ± 0,277	1,121 ± 0,287	
<i>MPO</i>	0,583 ± 0,167	0,572 ± 0,173	0,591 ± 0,170	0,563 ± 0,172	
<u>40 ng/ml</u>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>	
<i>O₂⁻</i>	3,139 ± 0,498	3,016 ± 0,606	2,915 ± 0,553	2,827 ± 0,587	
<i>H₂O₂</i>	1,308 ± 0,331	1,227 ± 0,304	1,032 ± 0,248	0,976 ± 0,254	
<i>MPO</i>	0,618 ± 0,183	0,570 ± 0,188	0,603 ± 0,194	0,524 ± 0,166	
<u>100 ng/ml</u>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>	
<i>O₂⁻</i>	2,861 ± 0,609	2,329 ± 0,489*	2,094 ± 0,410*#	1,821 ± 0,387*#	
<i>H₂O₂</i>	1,042 ± 0,248	0,942 ± 0,186*	0,874 ± 0,152*	0,729 ± 0,137*#	
<i>MPO</i>	0,509 ± 0,157	0,488 ± 0,157	0,415 ± 0,139	0,389 ± 0,121*	
<u>1 µg/ml</u>	<i>10 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>120 min</i>	
<i>O₂⁻</i>	2,691 ± 0,551	1,764 ± 0,349*#	1,422 ± 0,299*#	1,223 ± 0,250*#	
<i>H₂O₂</i>	0,984 ± 0,256	0,698 ± 0,186*#	0,605 ± 0,159*#	0,543 ± 0,148*#	
<i>MPO</i>	0,477 ± 0,147	0,488 ± 0,157	0,399 ± 0,126*#	0,287 ± 0,095*#	

Tabelle 15: Einfluss von *Midazolam* (40 und 100 ng/ml; 1 µg/ml; Inkubationszeiten: 10, 30, 60 sowie 120 min; n=10) auf die *Superoxidanionbildung* [*O₂⁻*; fMol *O₂⁻*/(PMN x min)], die *Wasserstoffperoxidproduktion* [*H₂O₂*; fMol *H₂O₂*/(PMN x min)] sowie die *Myeloperoxidaseaktivität* [*MPO*; Units/l] isolierter PMN (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; # ≤ 0,05 versus 10 min.

7.1.2 Rezeptoragonisten und -antagonisten

Saure Aminosäuren								
Säureamide								
Ro 5-4864 / PK 11195 / Flumazenil / Naloxon								
10 Minuten								
Kontrolle	Ro ₁	Ro ₁₀₀	PK ₁	PK ₁₀₀	Flu ₁	Flu ₁₀₀	Na ₁	Na ₁₀₀
Asn	0,46 ± 0,07	0,44 ± 0,07	0,49 ± 0,08	0,50 ± 0,09	0,46 ± 0,08	0,52 ± 0,10	0,42 ± 0,06	0,47 ± 0,08
Gln	3,61 ± 0,62	3,89 ± 0,83	3,52 ± 0,63	3,44 ± 0,59	3,58 ± 0,71	3,94 ± 0,73	3,34 ± 0,58	3,46 ± 0,60
Asp	2,83 ± 0,45	2,95 ± 0,51	2,76 ± 0,44	2,87 ± 0,47	2,69 ± 0,44	3,02 ± 0,52	3,10 ± 0,57	2,96 ± 0,53
Glu	6,15 ± 1,02	6,38 ± 1,17	6,24 ± 1,13	5,97 ± 1,05	6,31 ± 1,20	5,86 ± 0,97	6,02 ± 1,01	5,91 ± 1,04
120 Minuten								
Kontrolle	Ro ₁	Ro ₁₀₀	PK ₁	PK ₁₀₀	Flu ₁	Flu ₁₀₀	Na ₁	Na ₁₀₀
Asn	0,52 ± 0,08	0,46 ± 0,08	0,43 ± 0,07*	0,51 ± 0,08	0,54 ± 0,10	0,48 ± 0,08	0,47 ± 0,07	0,50 ± 0,08
Gln	3,87 ± 0,74	3,16 ± 0,60*	2,74 ± 0,57*#	4,04 ± 0,81	4,12 ± 0,85	3,76 ± 0,70	3,95 ± 0,87	3,59 ± 0,67
Asp	3,06 ± 0,52	2,58 ± 0,49*#	2,25 ± 0,46*#	2,77 ± 0,45	2,93 ± 0,50	3,20 ± 0,49	3,03 ± 0,50	3,46 ± 0,62
Glu	6,31 ± 1,10	5,37 ± 1,05*#	4,86 ± 1,09*#	6,50 ± 1,25	6,61 ± 1,34	6,24 ± 1,06	6,27 ± 1,16	6,45 ± 1,21

Tabelle 16: Einfluss von 7-Chloro-5-(4'-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2 [Ro 5-4864 (4'-Chlorodiazepam); 1 (Ro₁) und 100 µM (Ro₁₀₀)], 1-(2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolin-carboxamid [PK 11195; 1 (PK₁) und 100 µM (PK₁₀₀)], Flumazenil [1 (Flu₁) und 100 µM (Flu₁₀₀)] oder Naloxon [1 (Na₁) und 100 µM (Na₁₀₀)] auf den freien intrazellulären Gehalt saurer Aminosäuren [Asparagin (Asp), Glutamin (Gln)] sowie ihrer Säureamide [Aspartat (Asp), Glutamat (Glu)] in PMN [Inkubationszeiten: 10 und 120 min; n= 10]. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10⁻¹⁶ Mol] pro PML-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; # ≤ 0,05 versus 10 min.

<i>Basische Aminosäuren Ro 5-4864 / PK 11195 / Flumazenil / Naloxon</i>								
10 Minuten								
Kontrolle	Ro ₁	Ro ₁₀₀	PK ₁	PK ₁₀₀	Flu ₁	Flu ₁₀₀	Na ₁	Na ₁₀₀
<i>Orn</i>	0,55 ± 0,11	0,54 ± 0,11	0,57 ± 0,12	0,56 ± 0,11	0,52 ± 0,10	0,49 ± 0,09	0,51 ± 0,10	0,59 ± 0,12 0,62 ± 0,13
<i>Lys</i>	0,83 ± 0,17	0,79 ± 0,18	0,90 ± 0,18	0,85 ± 0,17	0,76 ± 0,16	0,70 ± 0,15	0,94 ± 0,19	0,91 ± 0,17 0,85 ± 0,18
<i>Arg</i>	0,41 ± 0,07	0,45 ± 0,09	0,40 ± 0,08	0,38 ± 0,07	0,49 ± 0,10	0,46 ± 0,08	0,43 ± 0,08	0,39 ± 0,07 0,42 ± 0,08
<i>Cit</i>	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,16 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,14 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,16 ± 0,04 0,14 ± 0,03
120 Minuten								
Kontrolle	Ro ₁	Ro ₁₀₀	PK ₁	PK ₁₀₀	Flu ₁	Flu ₁₀₀	Na ₁	Na ₁₀₀
<i>Orn</i>	0,52 ± 0,09	0,44 ± 0,08*#	0,39 ± 0,07*#	0,50 ± 0,09	0,49 ± 0,09	0,53 ± 0,10	0,55 ± 0,11	0,56 ± 0,12 0,52 ± 0,10
<i>Lys</i>	0,76 ± 0,15	0,81 ± 0,17	0,80 ± 0,16	0,74 ± 0,16	0,70 ± 0,15	0,69 ± 0,16	0,85 ± 0,17	0,88 ± 0,18 0,76 ± 0,16
<i>Arg</i>	0,42 ± 0,07	0,35 ± 0,06*#	0,30 ± 0,06*#	0,37 ± 0,07	0,40 ± 0,07	0,41 ± 0,08	0,45 ± 0,10	0,46 ± 0,10 0,43 ± 0,09
<i>Cit</i>	0,16 ± 0,03	0,13 ± 0,03*	0,11 ± 0,02*#	0,17 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,16 ± 0,04 0,15 ± 0,03

Tabelle 17: Einfluss von 7-Chloro-5-(4'-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2 [Ro 5-4864 (4'-Chlorodiazepam); 1 (Ro₁) und 100 µM (Ro₁₀₀)], 1-(2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolin-carboxamid [PK 11195; 1 (PK₁) und 100 µM (PK₁₀₀)], Flumazenil [1 (Flu₁) und 100 µM (Flu₁₀₀)] oder Naloxon [1 (Na₁) und 100 µM (Na₁₀₀)] auf den freien intrazellulären Gehalt basischer Aminosäuren [Ornithin (Orn), Lysin (Lys), Arginin (Arg), Citrullin (Cit)] in PMN [Inkubationszeiten: 10 und 120 min; n= 10]. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10⁻¹⁶ Mol] pro PML-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; # ≤ 0,05 versus 10 min.

BCAA, Methionin

Ro 5-4864 / PK 11195 / Flumazenil / Naloxon

Taurin, Hypotaurin

10 Minuten

	Kontrolle	Ro ₁	Ro ₁₀₀	PK ₁	PK ₁₀₀	Flu ₁	Flu ₁₀₀	Na ₁	Na ₁₀₀
Ile	0,65±0,13	0,64±0,14	0,67±0,14	0,76±0,15	0,72±0,15	0,69±0,14	0,81±0,16	0,57±0,12	0,53±0,13
Leu	0,59±0,12	0,61±0,13	0,66±0,15	0,55±0,12	0,50±0,11	0,57±0,13	0,64±0,	0,91±0,17	0,85±0,18
Val	0,73±0,13	0,75±0,15	0,80±0,17	0,88±0,18	0,69±0,13	0,66±0,12	0,79±0,16	0,89±0,20	0,62±0,13
Met	0,27±0,05	0,25±0,05	0,26±0,05	0,29±0,06	0,31±0,06	0,23±0,05	0,26±0,05	0,31±0,06	0,29±0,06
Tau	39,3±6,3	39,8±6,6	38,4±6,2	40,6±6,9	41,5±7,4	42,0±7,8	39,6±6,5	40,0±6,9	38,0±6,1
H-Tau	1,56±0,27	1,66±0,31	1,40±0,26	1,50±0,28	1,79±0,33	1,60±0,30	1,45±0,27	1,83±0,36	1,59±0,28

120 Minuten

	Kontrolle	Ro ₁	Ro ₁₀₀	PK ₁	PK ₁₀₀	Flu ₁	Flu ₁₀₀	Na ₁	Na ₁₀₀
Ile	0,73±0,15	0,93±0,20*#	1,08±0,24*#	0,70±0,16	0,79±0,18	0,70±0,14	0,65±0,14	0,66±0,15	0,82±0,18
Leu	0,52±0,11	0,70±0,16*	0,91±0,21*#	0,54±0,12	0,50±0,15	0,59±0,14	0,60±0,16	0,48±0,11	0,44±0,10
Val	0,85±0,14	1,09±0,20*#	1,23±0,29*#	0,77±0,14	0,80±0,15	0,71±0,13	0,90±0,17	0,86±0,16	0,73±0,12
Met	0,28±0,05	0,35±0,06*#	0,38±0,08*#	0,27±0,06	0,29±0,06	0,25±0,05	0,28±0,06	0,26±0,05	0,33±0,07
Tau	37,9±6,2	34,5±6,1	31,3±5,8*#	38,6±6,4	38,9±6,6	40,1±7,1	39,5±6,8	36,4±6,0	37,0±6,1
H-Tau	1,68±0,29	1,43±0,28	1,12±0,23*#	1,57±0,28	1,55±0,29	1,60±0,30	1,73±0,32	1,80±0,34	1,85±0,33

Tabelle 18: Einfluss von 7-Chloro-5-(4'-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2 [Ro 5-4864 (4'-Chlorodiazepam); 1 (Ro₁) und 100 µM (Ro₁₀₀)], 1-(2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolin-carboxamid [PK 11195; 1 (PK₁) und 100 µM (PK₁₀₀)], Flumazenil [1 (Flu₁) und 100 µM (Flu₁₀₀)] oder Naloxon [1 (Na₁) und 100 µM (Na₁₀₀)] auf den freien intrazellulären Gehalt verzweigtkettiger Aminosäuren [**BCAA: Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Valin (Val)**] sowie **Taurin (Tau), Hypotaurin (H-Tau)** und **Methionin (Met)** in PMN [Inkubationszeiten: 10 und 120 min; n= 10]. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10⁻¹⁶ Mol] pro PML-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; # ≤ 0,05 versus 10 min.

Neutrale Aminosäuren *Ro 5-4864 / PK 11195 / Flumazenil / Naloxon*

10 Minuten

	Kontrolle	Ro ₁	Ro ₁₀₀	PK ₁	PK ₁₀₀	Flu ₁	Flu ₁₀₀	Na ₁	Na ₁₀₀
<i>Ser</i>	2,27 ± 0,43	2,20 ± 0,44	2,15 ± 0,42	2,36 ± 0,45	2,42 ± 0,48	2,50 ± 0,53	2,31 ± 0,44	2,25 ± 0,42	2,40 ± 0,47
<i>Gly</i>	2,43 ± 0,41	2,50 ± 0,44	2,55 ± 0,48	2,35 ± 0,43	2,28 ± 0,39	2,21 ± 0,38	2,76 ± 0,59	2,68 ± 0,56	2,60 ± 0,58
<i>Thr</i>	0,86 ± 0,13	0,83 ± 0,13	0,80 ± 0,14	0,88 ± 0,15	0,99 ± 0,16	0,96 ± 0,16	0,90 ± 0,15	0,79 ± 0,12	0,75 ± 0,11
<i>Ala</i>	2,04 ± 0,38	2,15 ± 0,43	1,92 ± 0,39	2,26 ± 0,43	2,30 ± 0,45	1,88 ± 0,37	1,98 ± 0,38	2,20 ± 0,44	2,11 ± 0,39
<i>Aba</i>	0,20 ± 0,05	0,19 ± 0,05	0,18 ± 0,04	0,22 ± 0,05	0,24 ± 0,06	0,21 ± 0,05	0,20 ± 0,05	0,21 ± 0,05	0,23 ± 0,06

120 Minuten

	Kontrolle	Ro ₁	Ro ₁₀₀	PK ₁	PK ₁₀₀	Flu ₁	Flu ₁₀₀	Na ₁	Na ₁₀₀
<i>Ser</i>	2,40 ± 0,47	3,16 ± 0,74*#	3,74 ± 0,93*#	2,50 ± 0,52	2,57 ± 0,56	2,33 ± 0,46	2,25 ± 0,44	2,44 ± 0,48	2,36 ± 0,47
<i>Gly</i>	2,58 ± 0,44	3,63 ± 0,83*#	4,20 ± 1,02*#	2,64 ± 0,47	2,70 ± 0,53	2,45 ± 0,43	2,36 ± 0,42	2,51 ± 0,45	2,77 ± 0,56
<i>Thr</i>	0,91 ± 0,14	1,19 ± 0,23*#	1,34 ± 0,28*#	1,07 ± 0,21	1,04 ± 0,20	0,96 ± 0,15	0,85 ± 0,13	0,82 ± 0,12	0,93 ± 0,16
<i>Ala</i>	1,95 ± 0,39	1,67 ± 0,36#	1,28 ± 0,33*#	2,17 ± 0,45	2,05 ± 0,42	1,98 ± 0,40	1,76 ± 0,36	1,73 ± 0,37	1,88 ± 0,40
<i>Aba</i>	0,19 ± 0,04	0,26 ± 0,07*#	0,33 ± 0,08*#	0,19 ± 0,05	0,20 ± 0,05	0,21 ± 0,05	0,23 ± 0,06	0,20 ± 0,05	0,18 ± 0,04

Tabelle 19: Einfluß von 7-Chloro-5-(4'-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2 [Ro 5-4864 (4'-Chlorodiazepam); 1 (Ro₁) und 100 µM (Ro₁₀₀)], 1-(2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolin-carboxamid [PK 11195; 1 (PK₁) und 100 µM (PK₁₀₀)], Flumazenil [1 (Flu₁) und 100 µM (Flu₁₀₀)] oder Naloxon [1 (Na₁) und 100 µM (Na₁₀₀)] auf den freien intrazellulären Gehalt neutraler Aminosäuren [Serin (Ser), Glycin (Gly), Threonin (Thr), Alanin (Ala), α-Aminobutyrat (Aba)] in PMN [Inkubationszeiten: 10 und 120 min; n= 10]. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10⁻¹⁶ Mol] pro PML-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; # ≤ 0,05 versus 10 min.

Aromatische Aminosäuren Ro 5-4864 / PK 11195 / Flumazenil / Naloxon

10 Minuten

	Kontrolle	Ro ₁	Ro ₁₀₀	PK ₁	PK ₁₀₀	Flu ₁	Flu ₁₀₀	Na ₁	Na ₁₀₀
Tyr	0,96 ± 0,21	0,94 ± 0,20	1,02 ± 0,24	1,06 ± 0,25	0,92 ± 0,20	0,79 ± 0,19	0,85 ± 0,23	0,89 ± 0,23	1,02 ± 0,24
Trp	0,27 ± 0,07	0,29 ± 0,07	0,25 ± 0,06	0,33 ± 0,08	0,30 ± 0,07	0,25 ± 0,06	0,26 ± 0,07	0,31 ± 0,18	0,34 ± 0,08
Phe	1,18 ± 0,33	1,05 ± 0,32	1,10 ± 0,34	1,26 ± 0,37	1,30 ± 0,39	1,16 ± 0,34	1,03 ± 0,30	1,09 ± 0,32	1,32 ± 0,39
His	0,77 ± 0,15	0,75 ± 0,16	0,80 ± 0,17	0,77 ± 0,16	0,84 ± 0,16	0,90 ± 0,18	0,76 ± 0,15	0,66 ± 0,13	0,64 ± 0,13

120 Minuten

	Kontrolle	Ro ₁	Ro ₁₀₀	PK ₁	PK ₁₀₀	Flu ₁	Flu ₁₀₀	Na ₁	Na ₁₀₀
Tyr	1,02 ± 0,23	1,14 ± 0,25	0,99 ± 0,24	0,83 ± 0,22	0,89 ± 0,24	1,14 ± 0,27	1,25 ± 0,31	1,06 ± 0,24	0,95 ± 0,23
Trp	0,30 ± 0,08	0,31 ± 0,08	0,28 ± 0,07	0,26 ± 0,06	0,34 ± 0,09	0,35 ± 0,08	0,27 ± 0,07	0,28 ± 0,08	0,32 ± 0,08
Phe	1,09 ± 0,31	1,16 ± 0,34	1,21 ± 0,37	1,07 ± 0,30	0,97 ± 0,29	1,11 ± 0,32	1,25 ± 0,36	1,16 ± 0,33	1,03 ± 0,32
His	0,70 ± 0,14	0,80 ± 0,17	0,95 ± 0,21*	0,77 ± 0,16	0,66 ± 0,15	0,75 ± 0,16	0,85 ± 0,19	0,66 ± 0,14	0,60 ± 0,12

Tabelle 20: Einfluß von 7-Chloro-5-(4'-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2 [Ro 5-4864 (4'-Chlorodiazepam); 1 (Ro₁) und 100 µM (Ro₁₀₀)], 1-(2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolincarboxamid [PK 11195; 1 (PK₁) und 100 µM (PK₁₀₀)], Flumazenil [1 (Flu₁) und 100 µM (Flu₁₀₀)] oder Naloxon [1 (Na₁) und 100 µM (Na₁₀₀)] auf den freien intrazellulären Gehalt aromatischer Aminosäuren [Tyrosin (Tyr), Tryptophan (Trp) Phenylalanin (Phe), Histidin (His)] in PMN [Inkubationszeiten: 10 und 120 min; n= 10]. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10^{-16} Mol] pro PML-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; # ≤ 0,05 versus 10 min.

α -Ketosäuren

Ro 5-4864 / PK 11195 / Flumazenil / Naloxon

10 Minuten

	Kontrolle	Ro ₁	Ro ₁₀₀	PK ₁	PK ₁₀₀	Flu ₁	Flu ₁₀₀	Na ₁	Na ₁₀₀
KG	1,46 ± 0,32	1,59 ± 0,41	1,39 ± 0,33	1,27 ± 0,30	1,35 ± 0,36	1,23 ± 0,32	1,34 ± 0,36	1,72 ± 0,47	1,62 ± 0,44
PYR	5,79 ± 1,25	6,33 ± 1,51	6,14 ± 1,47	5,85 ± 1,23	5,49 ± 1,08	6,53 ± 1,69	6,28 ± 1,51	6,02 ± 1,36	5,61 ± 1,34
KB	5,03 ± 1,23	5,19 ± 1,24	5,31 ± 1,29	4,88 ± 1,12	4,75 ± 1,18	5,10 ± 1,17	4,91 ± 1,20	5,41 ± 1,37	5,29 ± 1,35
KIV	2,24 ± 0,51	2,35 ± 0,54	2,30 ± 0,53	1,99 ± 0,48	2,05 ± 0,47	1,87 ± 0,48	1,99 ± 0,46	2,21 ± 0,52	2,13 ± 0,50
KIC	0,50 ± 0,11	0,48 ± 0,10	0,51 ± 0,11	0,55 ± 0,12	0,58 ± 0,13	0,45 ± 0,09	0,44 ± 0,09	0,49 ± 0,11	0,56 ± 0,12
PPY	0,39 ± 0,10	0,40 ± 0,10	0,37 ± 0,08	0,35 ± 0,07	0,43 ± 0,11	0,45 ± 0,11	0,42 ± 0,12	0,36 ± 0,08	0,34 ± 0,07
KMV	0,88 ± 0,19	0,95 ± 0,21	0,90 ± 0,22	0,79 ± 0,18	0,85 ± 0,20	0,76 ± 0,17	0,81 ± 0,18	0,96 ± 0,23	1,02 ± 0,24

120 Minuten

	Kontrolle	Ro ₁	Ro ₁₀₀	PK ₁	PK ₁₀₀	Flu ₁	Flu ₁₀₀	Na ₁	Na ₁₀₀
KG	1,60 ± 0,37	1,25 ± 0,32*	0,94 ± 0,26*#	1,51 ± 0,36	1,47 ± 0,35	1,34 ± 0,34	1,45 ± 0,38	1,89 ± 0,51	1,73 ± 0,47
PYR	6,05 ± 1,16	4,96 ± 1,07*	4,13 ± 0,96*#	5,56 ± 1,29	5,74 ± 1,36	6,33 ± 1,57	6,47 ± 1,53	6,12 ± 1,41	5,80 ± 1,40
KB	4,71 ± 1,04	4,13 ± 1,18	3,52 ± 0,89*#	4,52 ± 0,99	4,86 ± 1,09	4,71 ± 1,04	5,06 ± 1,23	5,25 ± 1,19	4,98 ± 1,12
KIV	2,43 ± 0,57	2,85 ± 0,69	3,29 ± 0,73*#	2,17 ± 0,55	2,11 ± 0,53	1,96 ± 0,50	2,16 ± 0,64	2,33 ± 0,60	2,25 ± 0,52
KIC	0,45 ± 0,10	0,52 ± 0,12	0,60 ± 0,13*	0,59 ± 0,13	0,55 ± 0,12	0,50 ± 0,11	0,46 ± 0,09	0,44 ± 0,09	0,49 ± 0,11
PPY	0,36 ± 0,09	0,32 ± 0,08	0,28 ± 0,06*#	0,37 ± 0,09	0,36 ± 0,09	0,40 ± 0,10	0,42 ± 0,11	0,35 ± 0,08	0,37 ± 0,09
KMV	0,79 ± 0,18	0,91 ± 0,21	1,04 ± 0,22*	0,85 ± 0,20	0,90 ± 0,22	0,70 ± 0,18	0,88 ± 0,20	0,99 ± 0,22	0,89 ± 0,21

Tabelle 21: Einfluss von 7-Chloro-5-(4'-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2 [Ro 5-4864 (4'-Chlorodiazepam); 1 (Ro₁) und 100 µM (Ro₁₀₀)], 1-(2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolincarboxamid [PK 11195; 1 (PK₁) und 100 µM (PK₁₀₀)], Flumazenil [1 (Flu₁) und 100 µM (Flu₁₀₀)] oder Naloxon [1 (Na₁) und 100 µM (Na₁₀₀)] auf den freien intrazellulären Gehalt von α -Ketosäuren [α -Ketoglutarat (KG), Pyruvat (PYR = α -Ketoalanin), α -Ketobutyrat (KB), α -Ketoisovalerianat (KIV), α -Ketoisocaproat (KIC), p-Hydroxy-Phenylpyruvat (PPY), α -Keto- β -methylvalerianat (KMV)] in PMN [Inkubationszeiten: 10 und 120 min; n=10]. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10^{-17} Mol] pro PML-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; # ≤ 0,05 versus 10 min.

O_2^- , H_2O_2 , MPO		Ro 5-4864 / PK 11195 / Flumazenil / Naloxon							
10 Minuten									
	Kontrolle	Ro ₁	Ro ₁₀₀	PK ₁	PK ₁₀₀	Flu ₁	Flu ₁₀₀	Na ₁	Na ₁₀₀
O_2^-	3,538±0,639	3,645±0,699	3,387±0,616	3,731±0,682	3,469±0,704	3,814±0,709	3,587±0,749	3,671±0,686	3,498±0,801
H_2O_2	1,125±0,228	1,203±0,276	1,246±0,239	1,089±0,245	1,164±0,286	1,195±0,219	1,276±0,287	1,063±0,230	1,141±0,284
MPO	0,596±0,158	0,667±0,189	0,644±0,174	0,508±0,152	0,489±0,152	0,695±0,223	0,606±0,192	0,463±0,155	0,545±0,151
120 Minuten									
	Kontrolle	Ro ₁	Ro ₁₀₀	PK ₁	PK ₁₀₀	Flu ₁	Flu ₁₀₀	Na ₁	Na ₁₀₀
O_2^-	3,276±0,583	2,523±0,512*#	2,027±0,411*#	3,438±0,603	3,506±0,652	3,114±0,660	3,057±0,586	2,994±0,676	3,163±0,588
H_2O_2	1,081±0,206	0,849±0,197*#	0,695±0,168*#	0,974±0,229	1,011±0,212	1,224±0,275	1,308±0,283	1,379±0,339	1,265±0,327
MPO	0,554±0,149	0,448±0,131#	0,339±0,105*#	0,538±0,169	0,609±0,166	0,467±0,156	0,515±0,149	0,459±0,154	0,498±0,147

Tabelle 22: Einfluss von 7-Chloro-5-(4'-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2 [Ro 5-4864 (4'-Chlorodiazepam); 1 (Ro₁) und 100 µM (Ro₁₀₀)], 1-(2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolincarboxamid [PK 11195; 1 (PK₁) und 100 µM (PK₁₀₀)], Flumazenil [1 (Flu₁) und 100 µM (Flu₁₀₀)] oder Naloxon [1 (Na₁) und 100 µM (Na₁₀₀)] auf die Superoxidanionbildung [O_2^- ; fMol O_2^- /(PMN x min)], die Wasserstoffperoxidproduktion [H_2O_2 ; fMol H_2O_2 /(PMN x min)] sowie die Myeloperoxidaseaktivität [MPO; Units/l] isolierter PMN [MW ± SD; Inkubationszeiten: 10 und 120 min; n= 10]. * ≤ 0,05 versus Kontrolle; # ≤ 0,05 versus 10 min

7.1.3 Midazolam + Rezeptoragonisten und -antagonisten

Saure Aminosäuren

Midazolam+ Ro 5-4864 / + PK 11195/ + Flumazenil / +

Naloxon

Säureamide

Midazolam 100 ng/ml

	Kontrolle	M ₁₀₀	M ₁₀₀ + Ro ₁₀₀	M ₁₀₀ + PK ₁₀₀	M ₁₀₀ + Flu ₁₀₀	M ₁₀₀ + Na ₁₀₀
<i>Asparagin</i>	0,50 ± 0,11	0,37 ± 0,09*	0,33 ± 0,08*	0,55 ± 0,12♦#	0,40 ± 0,10*	0,35 ± 0,08*
<i>Glutamin</i>	4,15 ± 0,66	3,22 ± 0,57*	2,98 ± 0,54*	4,38 ± 0,82♦#	3,48 ± 0,65*	3,41 ± 0,64*
<i>Aspartat</i>	2,79 ± 0,56	2,06 ± 0,44*	1,65 ± 0,43♦*	3,04 ± 0,77♦#	2,21 ± 0,50*#	2,19 ± 0,53*#
<i>Glutamat</i>	5,41 ± 0,88	3,87 ± 0,69*	3,13 ± 0,67♦*	6,11 ± 1,32♦#	4,10 ± 0,81*#	3,96 ± 0,80*#

Midazolam 1 µg/ml

	Kontrolle	M ₁₀₀₀	M ₁₀₀₀ + Ro ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + PK ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + Flu ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + Na ₁₀₀
<i>Asparagin</i>	0,52 ± 0,12	0,28 ± 0,06*	0,25 ± 0,05*	0,36 ± 0,09*♦#	0,32 ± 0,08*	0,30 ± 0,06*
<i>Glutamin</i>	4,27 ± 0,69	2,31 ± 0,49*	2,03 ± 0,45*	3,36 ± 0,68*♦#	2,58 ± 0,60*	2,42 ± 0,54*
<i>Aspartat</i>	2,88 ± 0,57	1,61 ± 0,39*	1,50 ± 0,40*	2,12 ± 0,49*♦#	1,83 ± 0,44*	1,75 ± 0,44*
<i>Glutamat</i>	5,60 ± 0,93	3,03 ± 0,65*	2,78 ± 0,63*	4,54 ± 0,71*♦#	3,31 ± 0,76*	3,19 ± 0,72*

Tabelle 23: Einfluss von Midazolam [100 ng/ml (M₁₀₀); 1 µg/ml (M₁₀₀₀); Inkubationszeit: 120 min; n= 10] nach zehnminütiger Vorinkubation mit 7-Chloro-5-(4'-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2 [Ro 5-4864 (4'-Chlorodiazepam); 100 µM (Ro₁₀₀)], 1-(2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolincarboxamid [PK 11195; 100 µM (PK₁₀₀)], Flumazenil [100 µM (Flu₁₀₀)] oder Naloxon [100 µM (Na₁₀₀)] auf den freien intrazellulären Gehalt saurer Aminosäuren [Asparagin, Glutamin] sowie ihrer Säureamide [Aspartat, Glutamat] in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10⁻¹⁶ Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; ♦ ≤ 0,05 versus M₁₀₀; ♦ ≤ 0,05 versus M₁₀₀₀; # ≤ 0,05 versus M₁₀₀ + Ro₁₀₀ bzw. versus M₁₀₀₀ + Ro₁₀₀.

Basische Aminosäuren

Midazolam+Ro 5-4864 / +PK 11195/ +Flumazenil / +Naloxon

Midazolam 100 ng/ml

	Kontrolle	M ₁₀₀	M ₁₀₀ + Ro ₁₀₀	M ₁₀₀ + PK ₁₀₀	M ₁₀₀ + Flu ₁₀₀	M ₁₀₀ + Na ₁₀₀
Ornithin	1,41 ± 0,29	0,96 ± 0,23*	0,77 ± 0,19♦*	1,36 ± 0,34♦#	1,10 ± 0,27*#	1,03 ± 0,25*#
Lysin	0,76 ± 0,18	0,84 ± 0,20	0,89 ± 0,21	0,70 ± 0,17	0,75 ± 0,19	0,82 ± 0,19
Arginin	0,70 ± 0,15	0,53 ± 0,12*	0,42 ± 0,10♦*	0,77 ± 0,18♦#	0,55 ± 0,14*#	0,50 ± 0,13*
Citrullin	0,19 ± 0,03	0,16 ± 0,03*	0,13 ± 0,02♦*	0,21 ± 0,04♦#	0,15 ± 0,03*	0,16 ± 0,03*#

Midazolam 1 µg/ml

	Kontrolle	M ₁₀₀₀	M ₁₀₀₀ + Ro ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + PK ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + Flu ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + Na ₁₀₀
Ornithin	1,39 ± 0,31	0,72 ± 0,18*	0,61 ± 0,17*	1,10 ± 0,27*♦#	0,85 ± 0,22*	0,70 ± 0,19*
Lysin	0,80 ± 0,21	0,91 ± 0,23	0,79 ± 0,19	0,62 ± 0,15	0,69 ± 0,18	0,76 ± 0,21
Arginin	0,74 ± 0,16	0,35 ± 0,10*	0,31 ± 0,09*	0,55 ± 0,11*♦#	0,42 ± 0,11*	0,38 ± 0,10*
Citrullin	0,19 ± 0,04	0,12 ± 0,02*	0,11 ± 0,02*	0,15 ± 0,03*♦#	0,14 ± 0,03*	0,12 ± 0,02*

Tabelle 24: Einfluss von Midazolam [100 ng/ml (M₁₀₀); 1 µg/ml (M₁₀₀₀); Inkubationszeit: 120 min; n= 10] nach zehnminütiger Vorinkubation mit 7-Chloro-5-(4'-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2 [Ro 5-4864 (4'-Chlorodiazepam); 100 µM (Ro₁₀₀)], 1-(2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolincarboxamid [PK 11195; 100 µM (PK₁₀₀)], Flumazenil [100 µM (Flu₁₀₀)] oder Naloxon [100 µM (Na₁₀₀)] auf den freien intrazellulären Gehalt basischer Aminosäuren [Ornithin, Lysin, Arginin, Citrullin] in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10⁻¹⁶ Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; ♦ ≤ 0,05 versus M₁₀₀; ◇ ≤ 0,05 versus M₁₀₀₀; # ≤ 0,05 versus M₁₀₀ + Ro₁₀₀ bzw. versus M₁₀₀₀ + Ro₁₀₀.

BCAA, Methionin

Midazolam + Ro 5-4864 / + PK 11195 / + Flumazenil / + Naloxon

Taurin, Hypotaurin

Midazolam 100 ng/ml^I

	Kontrolle	M ₁₀₀	M ₁₀₀ + Ro ₁₀₀	M ₁₀₀ + PK ₁₀₀	M ₁₀₀ + Flu ₁₀₀	M ₁₀₀ + Na ₁₀₀
Isoleucin	0,69 ± 0,15	1,05 ± 0,24*	1,34 ± 0,27♦*	0,80 ± 0,21♦#	0,99 ± 0,19*#	0,92 ± 0,23*#
Leucin	0,51 ± 0,10	0,73 ± 0,15*	0,92 ± 0,20♦*	0,46 ± 0,10♦#	0,70 ± 0,15*#	0,66 ± 0,15*#
Valin	1,54 ± 0,28	2,06 ± 0,41*	2,59 ± 0,58♦*	1,43 ± 0,33♦#	1,96 ± 0,44*#	2,13 ± 0,49*#
Methionin	0,40 ± 0,08	0,47 ± 0,10	0,50 ± 0,09*	0,36 ± 0,07♦#	0,45 ± 0,07	0,46 ± 0,09
Taurin	38,3 ± 6,6	31,4 ± 6,2*	28,9 ± 6,6*	39,9 ± 7,6♦#	30,5 ± 6,0*	32,0 ± 6,3*
Hypotaurin	1,28 ± 0,24	1,03 ± 0,22*	0,80 ± 0,20♦*	1,14 ± 0,25♦#	0,99 ± 0,22*#	1,08 ± 0,25*#

Midazolam 1 µg/ml

	Kontrolle	M ₁₀₀₀	M ₁₀₀₀ + Ro ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + PK ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + Flu ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + Na ₁₀₀
Isoleucin	0,76 ± 0,18	1,39 ± 0,35*	1,55 ± 0,43*	0,98 ± 0,22*♦#	1,44 ± 0,38*	1,28 ± 0,31*
Leucin	0,55 ± 0,12	0,95 ± 0,22*	1,01 ± 0,24*	0,74 ± 0,18*♦#	0,92 ± 0,23*	0,86 ± 0,22*
Valin	1,46 ± 0,36	2,68 ± 0,56*	2,93 ± 0,61*	2,03 ± 0,37*♦#	2,85 ± 0,59*	2,76 ± 0,59*
Methionin	0,39 ± 0,08	0,73 ± 0,18*	0,76 ± 0,19*	0,50 ± 0,12*♦#	0,70 ± 0,17*	0,58 ± 0,12*
Taurin	39,1 ± 6,8	29,5 ± 6,0*	25,8 ± 6,1*	36,1 ± 7,2♦#	31,7 ± 6,4*	30,2 ± 6,9*
Hypotaurin	1,22 ± 0,25	0,67 ± 0,17*	0,60 ± 0,15*	0,93 ± 0,25*♦#	0,77 ± 0,18*	0,82 ± 0,20*

Tabelle 25: Einfluss von Midazolam [100 ng/ml (M₁₀₀); 1 µg/ml (M₁₀₀₀); Inkubationszeit: 120 min; n= 10] nach zehnminütiger Vorinkubation mit 7-Chloro-5-(4'-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2 [Ro 5-4864 (4'-Chlorodiazepam); 100 µM (Ro₁₀₀)], 1-(2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolincarboxamid [PK 11195; 100 µM (PK₁₀₀)], Flumazenil [100 µM (Flu₁₀₀)] oder Naloxon [100 µM (Na₁₀₀)] auf den freien intrazellulären Gehalt verzweigtkettiger Aminosäuren [BCAA: Isoleucin, Leucin, Valin] sowie Taurin, Hypotaurin und Methionin in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10⁻¹⁶ Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; ♦ ≤ 0,05 versus M₁₀₀; ◇ ≤ 0,05 versus M₁₀₀₀; # ≤ 0,05 versus M₁₀₀ + Ro₁₀₀ bzw. versus M₁₀₀₀ + Ro₁₀₀.

Neutrale Aminosäuren Midazolam+Ro 5-4864 / +PK 11195/ +Flumazenil / +Naloxon

Midazolam 100 ng/ml

	Kontrolle	M ₁₀₀	M ₁₀₀ + Ro ₁₀₀	M ₁₀₀ + PK ₁₀₀	M ₁₀₀ + Flu ₁₀₀	M ₁₀₀ + Na ₁₀₀
Serin	2,76 ± 0,52	3,92 ± 0,77*	5,07 ± 1,08♦*	2,93 ± 0,55♦#	3,80 ± 0,87*#	3,69±0,75*#
Glycin	2,93 ± 0,58	4,15 ± 0,84*	5,54 ± 1,36♦*	3,11 ± 0,76♦#	3,98 ± 0,83*#	3,81±0,80*#
Threonin	1,17 ± 0,24	1,61 ± 0,38*	2,12 ± 0,53♦*	1,06 ± 0,25♦#	1,50 ± 0,32*#	1,62±0,44*#
Alanin	2,04 ± 0,40	1,59 ± 0,37*	1,25 ± 0,33♦*	1,93 ± 0,43♦#	1,55 ± 0,36*	1,67±0,38*#
Aba	0,15 ± 0,03	0,19 ± 0,04*	0,23 ± 0,05*	0,14 ± 0,03♦#	0,20 ± 0,05*	0,19 ± 0,04*

Midazolam 1 µg/ml

	Kontrolle	M ₁₀₀₀	M ₁₀₀₀ + Ro ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + PK ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + Flu ₁₀₀	M ₁₀₀₀ +Na ₁₀₀
Serin	2,69 ± 0,53	5,19 ± 1,26*	5,81 ± 1,57*	3,49 ± 0,88*♦#	4,76 ± 1,02*	5,02 ± 1,31*
Glycin	2,84 ± 0,67	5,63 ± 1,45*	6,56 ± 1,74*	3,85 ± 1,06*♦#	5,19 ± 1,29*	5,47 ± 1,36*
Threonin	1,10 ± 0,29	1,92 ± 0,49*	2,21 ± 0,58*	1,42 ± 0,38*♦#	1,87 ± 0,50*	1,79 ± 0,44*
Alanin	2,15 ± 0,47	0,99 ± 0,27*	0,91 ± 0,28*	1,47 ± 0,43*♦#	1,18 ± 0,39*	1,05 ± 0,36*
Aba	0,14 ± 0,03	0,23 ± 0,05*	0,27 ± 0,06*	0,19 ± 0,04*♦#	0,22 ± 0,05*	0,25 ± 0,05*

Tabelle 26: Einfluss von Midazolam [100 ng/ml (M₁₀₀); 1 µg/ml (M₁₀₀₀); Inkubationszeit: 120 min; n= 10] nach zehnminütiger Vorinkubation mit 7-Chloro-5-(4'-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2 [Ro 5-4864 (4'-Chlorodiazepam); 100 µM (Ro₁₀₀)], 1-(2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolincarboxamid [PK 11195; 100 µM (PK₁₀₀)], Flumazenil [100 µM (Flu₁₀₀)] oder Naloxon [100 µM (Na₁₀₀)] auf den freien intrazellulären Gehalt neutraler Aminosäuren [Serin, Glycin, Threonin, Alanin, α-Aminobutytrat (Aba)] in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10⁻¹⁶ Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; ♦ ≤ 0,05 versus M₁₀₀ ; ◇ ≤ 0,05 versus M₁₀₀₀; # ≤ 0,05 versus M₁₀₀ + Ro₁₀₀ bzw. versus M₁₀₀₀ + Ro₁₀₀.

Aromatische Aminosäuren Midazolam+Ro 5-4864/ +PK 11195/ +Flumazenil / +Naloxon

Midazolam 100 ng/ml

	Kontrolle	M ₁₀₀	M ₁₀₀ + Ro ₁₀₀	M ₁₀₀ + PK ₁₀₀	M ₁₀₀ + Flu ₁₀₀	M ₁₀₀ + Na ₁₀₀
Tyrosin	0,83 ± 0,21	0,90 ± 0,24	0,95 ± 0,27	0,86 ± 0,23	1,10 ± 0,27	0,71 ± 0,19
Tryptophan	0,32 ± 0,09	0,36 ± 0,11	0,27 ± 0,07	0,33 ± 0,09	0,75 ± 0,19	0,26 ± 0,07
Phenylalanin	1,06 ± 0,30	1,20 ± 0,36	1,28 ± 0,41	1,15 ± 0,33	1,15 ± 0,32	0,96 ± 0,28
Histidin	1,19 ± 0,29	1,71 ± 0,45*	1,96 ± 0,51*	1,24 ± 0,31♦#	1,57 ± 0,32*	1,64 ± 0,35*

Midazolam 1 µg/ml

	Kontrolle	M ₁₀₀₀	M ₁₀₀₀ + Ro ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + PK ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + Flu ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + Na ₁₀₀
Tyrosin	0,91 ± 0,24	0,71 ± 0,20	1,11 ± 0,29	0,75 ± 0,21	0,85 ± 0,22	1,01 ± 0,26
Tryptophan	0,36 ± 0,10	0,27 ± 0,08	0,29 ± 0,09	0,30 ± 0,07	0,39 ± 0,12	0,40 ± 0,12
Phenylalanin	0,99 ± 0,31	0,88 ± 0,24	1,11 ± 0,31	0,94 ± 0,27	1,03 ± 0,33	0,81 ± 0,25
Histidin	1,05 ± 0,28	2,03 ± 0,54*	2,38 ± 0,68*	1,38 ± 0,34♦#	1,86 ± 0,49*	2,17 ± 0,58*

Tabelle 27: Einfluss von Midazolam [100 ng/ml (M₁₀₀); 1 µg/ml (M₁₀₀₀); Inkubationszeit: 120 min; n= 10] nach zehnminütiger Vorinkubation mit 7-Chloro-5-(4'-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2 [Ro 5-4864 (4'-Chlorodiazepam); 100 µM (Ro₁₀₀)], 1-(2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolincarboxamid [PK 11195; 100 µM (PK₁₀₀)], Flumazenil [100 µM (Flu₁₀₀)] oder Naloxon [100 µM (Na₁₀₀)] auf den freien intrazellulären Gehalt aromatischer Aminosäuren [Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin, Histidin] in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10⁻¹⁶ Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; ♦ ≤ 0,05 versus M₁₀₀; ◇ ≤ 0,05 versus M₁₀₀₀; # ≤ 0,05 versus M₁₀₀ + Ro₁₀₀ bzw. versus M₁₀₀₀ + Ro₁₀₀.

α -Ketosäuren Midazolam+ Ro 5-4864 / + PK 11195/ + Flumazenil / + Naloxon

Midazolam 100 ng/ml

	Kontrolle	M ₁₀₀	M ₁₀₀ + Ro ₁₀₀	M ₁₀₀ + PK ₁₀₀	M ₁₀₀ + Flu ₁₀₀	M ₁₀₀ + Na ₁₀₀
<i>α-KG</i>	1,37 ± 0,30	1,05 ± 0,27*	0,82 ± 0,23♦*	1,49 ± 0,36♦#	1,01 ± 0,26*#	0,99 ± 0,27*#
<i>PYR</i>	6,41 ± 1,39	4,93 ± 1,16*	3,61 ± 0,94♦*	6,19 ± 1,39♦#	4,65 ± 1,12*#	4,72 ± 1,23*#
<i>α-KB</i>	4,19 ± 0,91	3,21 ± 0,76*	2,54 ± 0,65♦*	4,31 ± 1,14♦#	3,13 ± 0,70*#	3,07 ± 0,61*#
<i>α-KIV</i>	1,95 ± 0,40	2,19 ± 0,55	2,95 ± 0,58♦*	1,90 ± 0,39#	2,24 ± 0,59#	2,30 ± 0,60#
<i>α-KIC</i>	0,42 ± 0,08	0,48 ± 0,10	0,70 ± 0,16*	0,43 ± 0,11#	0,50 ± 0,13#	0,46 ± 0,11#
<i>PhePYR</i>	0,46 ± 0,10	0,41 ± 0,11	0,32 ± 0,07*	0,48 ± 0,12#	0,44 ± 0,11#	0,40 ± 0,09#
<i>α-KMV</i>	0,80 ± 0,17	0,97 ± 0,18	1,14 ± 0,27*	0,78 ± 0,18#	1,01 ± 0,23	0,90 ± 0,19

Midazolam 1 µg/ml

	Kontrolle	M ₁₀₀₀	M ₁₀₀₀ + Ro ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + PK ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + Flu ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + Na ₁₀₀
<i>α-KG</i>	1,28 ± 0,27	0,68 ± 0,19*	0,56 ± 0,16*	0,95 ± 0,28*♦#	0,62 ± 0,21*	0,74 ± 0,20*
<i>PYR</i>	6,61 ± 1,64	3,39 ± 0,95*	2,87 ± 0,92*	4,78 ± 1,29*♦#	4,18 ± 1,03*	3,88 ± 1,05*
<i>α-KB</i>	4,31 ± 1,02	2,69 ± 0,74*	2,30 ± 0,68*	3,72 ± 0,84♦#	2,96 ± 0,80*	3,14 ± 0,98*
<i>α-KIV</i>	2,13 ± 0,47	3,22 ± 0,76*	3,67 ± 0,95*	2,34 ± 0,61♦#	3,39 ± 0,82*	3,49 ± 0,93*
<i>α-KIC</i>	0,45 ± 0,11	0,66 ± 0,15*	0,75 ± 0,18*	0,50 ± 0,13♦#	0,59 ± 0,14*	0,70 ± 0,17*
<i>PhePYR</i>	0,50 ± 0,13	0,36 ± 0,09*	0,33 ± 0,08*	0,55 ± 0,13♦#	0,37 ± 0,09*	0,35 ± 0,08*
<i>α-KMV</i>	0,74 ± 0,16	1,10 ± 0,27*	1,28 ± 0,35*	0,81 ± 0,19♦#	0,96 ± 0,21*	1,07 ± 0,29*

Tabelle 28: Einfluss von Midazolam [100 ng/ml (M₁₀₀); 1 µg/ml (M₁₀₀₀); Inkubationszeit: 120 min; n= 10] nach zehnminütiger Vorinkubation mit 7-Chloro-5-(4'-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2 [Ro 5-4864 (4'-Chlorodiazepam); 100 µM (Ro₁₀₀)], 1-(2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolincarboxamid [PK 11195; 100 µM (PK₁₀₀)], Flumazenil [100 µM (Flu₁₀₀)] oder Naloxon [100 µM (Na₁₀₀)] auf den freien intrazellulären Gehalt von α -Ketosäuren [α -Ketoglutarat (α -KG), Pyruvat (PYR = α -Ketoalanin), α -Ketobutyrat (α -KB), α -Ketoisovalerianat (α -KIV), α -Ketoisocapronat (α -KIC), p-Hydroxy-Phenylpyruvat (PhePYR), α -Keto- β -methylvalerianat (α -KMV)] in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10^{-17} Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; ♦ ≤ 0,05 versus M₁₀₀; ◇ ≤ 0,05 versus M₁₀₀₀; # ≤ 0,05 versus M₁₀₀ + Ro₁₀₀ bzw. versus M₁₀₀₀ + Ro₁₀₀.

O_2^- , H_2O_2 , MPO Midazolam+ Ro 5-4864 / + PK 11195/ + Flumazenil / + Naloxon

Midazolam 100 ng/ml

	Kontrolle	M ₁₀₀	M ₁₀₀ + Ro ₁₀₀	M ₁₀₀ + PK ₁₀₀	M ₁₀₀ + Flu ₁₀₀	M ₁₀₀ + Na ₁₀₀
O_2^-	3,603 ± 0,655	2,426 ± 0,458*	1,887 ± 0,401♦*	3,207 ± 0,757♦#	2,803 ± 0,597*#	2,665 ± 0,511*#
H_2O_2	1,366 ± 0,284	0,942 ± 0,231*	0,699 ± 0,183♦*	1,251 ± 0,286♦#	1,054 ± 0,248*#	1,006 ± 0,250*#
MPO	0,709 ± 0,189	0,501 ± 0,139*	0,353 ± 0,112♦*	0,656 ± 0,163♦#	0,527 ± 0,159*#	0,498 ± 0,141*#

Midazolam 1 µg/ml

	Kontrolle	M ₁₀₀₀	M ₁₀₀₀ + Ro ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + PK ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + Flu ₁₀₀	M ₁₀₀₀ + Na ₁₀₀
O_2^-	3,497 ± 0,643	1,546 ± 0,354*	1,053 ± 0,260♦*	2,319 ± 0,627*♦#	1,707 ± 0,415*#	1,432 ± 0,329*#
H_2O_2	1,245 ± 0,265	0,681 ± 0,155*	0,506 ± 0,131♦*	0,957 ± 0,246*♦#	0,746 ± 0,199*#	0,709 ± 0,182*#
MPO	0,651 ± 0,166	0,384 ± 0,117*	0,296 ± 0,099*	0,502 ± 0,131*♦#	0,411 ± 0,134*	0,365 ± 0,106*

Tabelle 29: Einfluss von Midazolam [100 ng/ml (M₁₀₀); 1 µg/ml (M₁₀₀₀); Inkubationszeit: 120 min; n= 10] nach zehnminütiger Vorinkubation mit 7-Chloro-5-(4'-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2 [Ro 5-4864 (4'-Chlorodiazepam); 100 µM (Ro₁₀₀)], 1-(2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolincarboxamid [PK 11195; 100 µM (PK₁₀₀)], Flumazenil [100 µM (Flu₁₀₀)] oder Naloxon [100 µM (Na₁₀₀)] auf die Superoxidanionbildung [O_2^- ; fMol O_2^- /(PMN x min)], die Wasserstoffperoxidproduktion [H_2O_2 ; fMol H_2O_2 /(PMN x min)] sowie die Myeloperoxidaseaktivität [MPO; Units/l] isolierter PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10^{-17} Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle; ♦ ≤ 0,05 versus M₁₀₀; # ≤ 0,05 versus M₁₀₀₀; # ≤ 0,05 versus M₁₀₀ + Ro₁₀₀ bzw. versus M₁₀₀₀ + Ro₁₀₀.

7.2 Glossar

Å	Ångström [10^{-10}]
Aba	α -Aminobutyrat (engl. alpha-aminobutyric acid)
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin)-Sulfonsäure
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BCAA	Verzweigtkettige Aminosäure (engl. branched-chain amino acid)
bzw.	beziehungsweise
CGD	Septische Granulomatose (engl. chronic granulomatous disease)
Cit	Citrullin
DFMO	α - Difluoromethylornithin
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraazetat
f	Femto [10^{-15}]
g	Fallbeschleunigung [$g = 9,81 \text{ m/s}^2$]
g	Gramm
GABA	Gammaaminobuttersäure (engl. gamma-aminobutyric acid)
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde (lat. hora)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2- Hydroxyethyl)-1- Piperazino)- Ethansulfonsäure
His	Histidin
HOBr	Hypobromit
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

H-Tau	Hypotaurin
I.D.	Innendurchmesser
I.E.	Internationale Einheit
I.S.	Interner Standard
ICW	Intracellular Water
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthetase
α -KB	α - Ketobutyrat
α -KG	α - Ketoglutarat
α -KIC	α - Ketoisocapronat
α -KIV	α - Ketoisovalerianat
α -KMV	α - Keto-β-methylvalerianat
KS	Ketosäure
l	Liter
LAD	Leucocyte Adhesion Deficiency
Leu	Leucin
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
m	Meter
m	Milli [10⁻³]
M	Molare Konzentration
Met	Methionin
μ	Mikro [10⁻⁶]
min	Minute
Mol	Molarer Gehalt
MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
n	Nano [10⁻⁹]
NaCl	Natriumchlorid
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduziert

NO	Stickstoffmonoxid (engl. nitric oxide)
NOS	Nitric Oxide Synthetase
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OPA	o-Phtaldialdehyd
Orn	Ornithin
p	Pico [10 ⁻¹²]
PBR	Peripherer Benzodiazepinrezeptor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDA	o-Phenyldiamin
Phe	Phenylalanin
PhePYR	Phenylpyruvat
PK 11195	1-(2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolincarboxamid
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
PSI	Pounds Per Square Inch (Druckeinheit)
PYR	Pyruvat
RNA	Ribonukleinsäure (eng. Ribonucleic Acid)
Ro 5-4864	7-Chloro-5-(4'-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2
ROI	Reactive Oxygen Intermediates
ROS	Reactive Oxygen Species
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SEP	Standardextraktionspuffer
SEP-KS	Standardextraktionspuffer-Ketosäure
Ser	Serin
Tau	Taurin
Thr	Threonin
TNF	Tumornekrosefaktor
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin

Val	Valin
VK	Variationskoeffizient
z.B.	zum Beispiel
ZBR	Zentraler Benzodiazepinrezeptor

7.3 Material, Geräte und Reagenzien

7.3.1 Geräte und Material

3-Kanal-Degaser	Knauer, Berlin
Autosampler Triathlon	Spark, Holland
Biofuge	Heraeus, Hanau
CIT-2	Heraeus, Hanau
Digitalphotometer 6114 S	Eppendorf, Hamburg
Eppendorfhütchen 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht-Elsenroth
EuroChrom 2000 für Windows 1,65	Knauer, Berlin
Fluoreszenzspektrometer RF-530	Shimadzu, Kyoto, Japan
Glasgefäß 10ml	Knauer, Berlin
Gradientenpumpe 600E	Waters, USA
Ika-Vibrax	Merck, Darmstadt
Inkubationsröhrchen	Merck, Darmstadt
Interfacebox	Knauer, Berlin
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Neubauer-Zählkammer	Superior, Marienfeld
PC	Compaq, USA
Probengefäß 2-CRV, Chromacoll	Trumbull, USA
Probenschleife AS 300	Sunchrom, Friedrichsdorf
Rotationsverdampfer	Merck, Darmstadt
RP-F-HPLC Nova Pak RP-C-18	Waters, USA
Säulenofen	Knauer, Berlin
Sonorex RK 103	Bandelin, Berlin
Sterican 20G	Braun, Melsungen
Überkopfmischer	Merck, Darmstadt
Wasserbad	Sigma, Deisenhofen
Zentrifuge	Rotixa/KS, Tuttlingen

7.3.2 Reagenzien

AB-Serum, gepoolt	Blutbank JLU Giessen
ABTS	Sigma, Deisenhofen
Aminosäuren	Sigma, Deisenhofen
Aqua destillata	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Cytochalasin B	Sigma, Deisenhofen
Cytochrom C, Typ IV	Sigma, Deisenhofen
Dormicum	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Whylen
EDTA	Kabe, Nürnbrecht-Elsenroth
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
H ₂ O ₂ für die HPLC	Merck, Darmstadt
HBSS	Sigma, Deisenhofen
HCl, 1 N	Merck, Darmstadt
HCl, 3M	Sigma, Deisenhofen
Homoserin	Sigma, Deisenhofen
α -Ketosäuren	Sigma, Deisenhofen
α -Ketovalerianat	Sigma, Deisenhofen
Meerettich-Peroxidase, 5mg/ml	Sigma, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol für die HPLC	Merck, Darmstadt
NaCl 0,9%	Merck, Darmstadt
NaCl 2,7%	Merck, Darmstadt
NaOH, 1N	Merck, Darmstadt
Narcanti	Du Pont Pharma, Bad Homburg
Natriumacetatpuffer	Merck, Darmstadt
Natriumazidlösung, 200mM	Merck, Darmstadt
Ölbäd	Merck, Darmstadt
OPA	Merck, Darmstadt
o-Phenyldiamin	Sigma, Deisenhofen
PBS-Puffer 10 x (w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Gibco, Karlsruhe
Percoll	Pharmacia, Uppsala, Schweden

Phenolrot, 10mg/ml	Sigma, Deisenhofen
PK 11195	Sigma, Deisenhofen
Ro 5-4864	Sigma, Deisenhofen
Serumalbumin 4%	Merck, Darmstadt
Stickstoff	Messer, Griesheim
Tetraborat	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Türk's-Lösung	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Zitratpuffer	Behring, Marburg
Zymosan	Sigma, Deisenhofen

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich, **Mariam Halabi**, erkläre:

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

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Halabi
Vorname	Mariam
Geburtsdatum	01. 07. 1971
Geburtsort	Erbach/Odenwald
Staatsbürgerschaft	deutsch
Familienstand	verheiratet

SCHULBILDUNG

1977-1978	Grundschule Bad Hersfeld
1978-1979	Grundschule Dissen
1979-1981	Grundschule Quakenbrück
1981-1983	Orientierungsstufe Quakenbrück
1983-1990	Artlandgymnasium Quakenbrück

FREIWILLIGES SOZIALES JAHR

06/1990 – 06/1991	Bahá'i World Center, Haifa, Israel
11/1991 – 11/1992	Deutsches Rotes Kreuz Köln, St. Hildegardis Krankenhaus Internistische Abteilung

HOCHSCHULAUSBILDUNG

1993-1999	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen
12/1999	Abschluss des Studiums (3. Staatsexamen)

BERUFLICHE TÄRIGKEIT

7/2000 – 12/2001	Ärztin im Praktikum Abteilung für Anästhesie und operative Intensivmedizin Städtisches Klinikum Solingen, Prof. Dr. med. J. Busse
01/2002 – 03/2004	Assistenzärztin Abteilung für Anästhesie und operative Intensivmedizin Klinikum Leverkusen, Prof. Dr. med. G. Molter
08/2004 – 07/2006	Assistenzärztin Abteilung für Anästhesie und operative Intensivmedizin Amper Kliniken Dachau, Dr. med. M. Rist

WEITERBILDUNG

06/2007	Anerkennung als Fachärztin für Anästhesiologie durch die Bayerische Landesärztekammer
---------	---

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Gunter Hempelmann für die Überlassung dieses Themas sowie die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und der labortechnischen Mittel.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jörg Mühling, MBA für die hervorragende Betreuung, die ständige Ansprechbarkeit, für seine unermüdliche Geduld und Unterstützung sowie nicht zuletzt für seine äußerst motivierende Art, die mir auch in schweren Stunden meine Arbeit erleichtert hat.

Weiterhin danke ich Frau Birgit Weber und den medizinisch technischen Assistentinnen der Abteilung Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie für eine freundliche Atmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft und fachliche Unterstützung.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Hansjörg Teschemacher und Frau Beate Dickopf des Rudolf-Buchheim-Instituts für Pharmakologie Giessen für die gute Zusammenarbeit und die Lyophilisierung einer Vielzahl an Proben.

Ferner möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Dr. Roland Zetzmann aus unserem Giessener Institut für Organische Chemie für seine fachmännische Unterstützung bei der Umkristallisierung von käuflichem o-Phenyldiamin bedanken.

Ganz herzlich danken möchte ich auch meinen Mann Stefan, der mich besonders in der letzten Phase dieser Arbeit ertragen und sämtliche Höhen und Tiefen mit mir durchlebt hat. Es ist sicherlich schwer, wenn man nicht bemerkt nach Hause kommt.

Zu guter Letzt möchte ich aber auch meinen Eltern danken, die mir meine Ausbildung ermöglicht und immer an mich geglaubt haben.