Differente Effekte von Opiaten und Opioidpeptiden auf die Funktion neutrophiler Granulozyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Axel Menzebach
aus Soest

Gießen 2001

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anaesthesiologie und Urologie
Abteilung für Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin
des Universitätsklinikums Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Gunter Hempelmann

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Hempelmann

Gutachter: Prof. Dr. Bux

Tag der Disputation: 1.Oktober 2001

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 8

1.1 Darstellung der Thematik 8

1.1.1 Neutrophile Granulozyten 8

1.1.2 Opiate und Opioidpeptide 10

1.1.3 Durchflußzytometrisches Verfahren 12

1.2 Zielsetzung der Studie 13

2 MATERIAL UND METHODEN 15

2.1 Probenmaterial 15

2.1.1 Probanden 15

2.1.2 Ausschlußkriterien 15

2.1.3 Probengewinnung und –aufarbeitung 15

2.1.4 Isolierung von Granulozyten aus dem Vollblut 16

2.1.5 Inkubation mit Opiaten und Opioidpeptiden 16

2.2 Bestimmung der Oberflächenantigene CD 11b, CD 16 und CD 35 17

2.2.1 Testprinzip 17

2.2.2 Rezeptor-Markierung 17

2.3 Der Phagozytose-Test 18

2.3.1 Testprinzip 18

2.3.2 Bakterien 18

2.3.3 Fluoreszenzmarkierung der Bakterien 18

2.3.4 Durchführung 19

2.4 Der Oxidative-Burst-Test 20

2.4.1 Testprinzip 20

2.4.2 Durchführung 20

2.5 Die Durchflußzytometrie 22

2.5.1 Optisches System 22

2.5.2 Flüssigkeitssystem 24

2.5.3 Signalverarbeitung 25

2.6 Darstellung der Messergebnisse 25

2.7 Statistische Auswertung 30

3 ERGEBNISSE 31

3.1 Vitalitätsprüfung 31

3.2 Morphin 31

3.2.1 CR 3 (CD 11b/CD 18-Expression) 31

3.2.2 CD 16-Expression 33

3.2.3 CR 1 (CD 35)-Expression 34

3.2.4 Phagozytoseaktivität 36

3.2.5 Oxidativer Burst 37

3.3 Fentanyl 40

3.3.1 CR 3 (CD 11b/CD 18-Expression) 40

3.3.2 CD 16-Expression 41

3.3.3 CR 1 (CD 35)-Expression 41

3.3.4 Phagozytoseaktivität 42

3.3.5 Oxidativer Burst 43

3.4 DAMGO 44

3.4.1 CR 3 (CD 11b/CD 18-Expression) 44

3.4.2 CD 16-Expression 45

3.4.3 CR 1 (CD 35)-Expression 46

3.4.4 Phagozytoseaktivität 46

3.4.5 Oxidativer Burst 47

3.5 β-Endorphin $_{1-31}$ 48

3.5.1 CR 3 (CD 11b/CD 18-Expression) 48

3.5.2 CD 16 Expression 49

3.5.3 CR 1 (CD 35)-Expression 51

3.5.4 Phagozytoseaktivität 52

3.5.5 Oxidativer Burst 55

3.6 β-Endorphin$_{27-31}$ 58
3.6.1 CR 3 (CD 11b/CD 18-Expression) 58
3.6.2 CD-16-Expression 59
3.6.3 CR 1 (CD 35)-Expression 59
3.6.4 Phagozytoseaktivität 60
3.6.5 Oxidativer Burst 60

3.7 Met-Enkephalin 61
3.7.1 CR 3 (CD 11b/CD 18-Expression) 61
3.7.2 CD 16-Expression 62
3.7.3 CR 1 (CD 35)-Expression 64
3.7.4 Phagozytoseaktivität 65
3.7.5 Oxidativer Burst 66

3.8 DADLE 68
3.8.1 CR 3 (CD 11b/CD 18-Expression) 68
3.8.2 CD 16-Expression 70
3.8.3 CR 1 (CD 35)-Expression 71
3.8.4 Phagozytoseaktivität 73
3.8.5 Oxidativer Burst 74

3.9 DPDPE 76
3.9.1 CR 3 (CD 11b/CD 18-Expression) 76
3.9.2 CD 16-Expression 77
3.9.3 CR 1 (CD 35)-Expression 79
3.9.4 Phagozytoseaktivität 80
3.9.5 Oxidativer Burst 82

4 DISKUSSION 84

4.1 Diskussion der Methodik 84
4.1.1 Probenaufbereitung 84
4.1.2 Auswahl der Meßparameter 87
4.1.3 Durchflußzytometrie 90

4.2 Diskussion der Ergebnisse 91

4.2.1 Morphin-Effekte 91
4.2.1.1 Bedeutung des μ-Rezeptors 94
4.2.1.2 Bedeutung von NO 95
4.2.2 Effekte von Fentanyl und DAMGO 97
4.2.3 Effekte von δ-Rezeptor Agonisten 98
4.2.3.1 Effekte von β-Endorphin$_{1-31,}$ β-Endorphin$_{1-27}$ und β-Endorphin$_{27-31}$ 100
4.2.3.2 Effekte von DADLE und DPDPE 102
4.2.4 Klinische Bedeutung 103

5 ZUSAMMENFASSUNG 106

6 LITERATURVERZEICHNIS 108

7 ANHANG 126

7.1 Abbildungsverzeichnis 126

7.2 Abkürzungen 130

7.3 Verwendete Materialien und Reagenzien 131

8 DANKSAGUNG 132

9 LEBENSLAUF 133

1 EINLEITUNG

1.1 Darstellung der Thematik

1.1.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten stellen mit 40-65 % den größten Anteil der Leukozyten im Blut und liegen etwa in einer Konzentration von 3-5 x 10^6 Zellen/ml vor. Andere Subpopulationen wie basophile (0-1%) und eosinophile Granulozyten (2-4 %) bilden numerisch einen geringen Leukozytenanteil. In Blutausstrichen werden neutrophile Granulozyten durch die unregelmäßige Struktur ihres Nukleus und anhand ihrer Färbeeigenschaften von anderen Leukozytenpopulationen differenziert. Sie besitzen im Kreislauf eine Lebensdauer von 8-20 h, im Gewebe kann diese mehrere Tage betragen. Das Knochenmark produziert täglich etwa 5-10^{10} neutrophile Granulozyten, um den hohen Zellumsatz im Organismus zu kompensieren.

Neutrophile Granulozyten stellen eine wichtige Komponente der unspezifischen Immunabwehr bei der Auseinandersetzung des Körpers mit Mikroorganismen dar [42]. Granulozyten vernichten pathogene Keime durch den Prozeß der Phagozytose, der auf verschiedenen Stufen reguliert wird. Zunächst muß der Granulozyt den eingedrungenen Mikroorganismus als Pathogen klassifizieren können. Dies geschieht mit Hilfe von Opsoninen, die der Markierung „fremder“ Mikroorganismen dienen. Als Opsonine fungieren Antikörper, Komplementfragmente, Akut-Phase-Proteine und Fibronektin. Der Prozeß der Opsonisierung ist wichtig, da Granulozyten Rezeptoren für Teile dieser Opsoninmoleküle exprimieren. Somit wird jedes mit Opsonin markierte Partikel Ziel der granulozytären Phagozytose [41]. Voraussetzung für die effektive Abwehr von Bakterien ist neben einer intakten Opsonisierungsfähigkeit des Blutes die Expression von IgG- und Komplementrezeptoren auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten. Der opsonisierte Mikroorganismus wird an diese Rezeptoren gebunden und kann nun phagozytiert werden [45; 95]. Nach dem Eindringen von Mikroorganismen in den menschlichen Organismus werden die Kaskaden des Komplementsystems angeregt. Die Komplementproteine können in löslicher Form vorliegen (C3a, C5a) und die

Chemotaxis stimulieren, oder als Opsonine dienen (z.B. C3b, C3bi) zur Phagozytose oder Adhäsion.

Ein wichtiger Oberflächenrezeptor neutrophiler Granulozyten ist der CR 3 (CD 11b/CD 18)-Rezeptor [12;65;82;93]. Er gehört zu den Integrinen, die außer der Adhäsion an Endothelien und der Migration in Gewebe eine Brückenfunktion zwischen extrazellulären Vorgängen und intrazellulären Aktivierungsprozessen besitzen [41]. CR 3 ist beteiligt an der Bindung von C3bi-opsonisierten Partikeln, und seine Aktivierung bedingt eine Stimulation der Phagozytose und des Oxidativen Burst [45]. Auch nicht opsonierte Mikroorganismen wie Stapylococcus aureus oder E.coli können über membranständige Zuckerphosphate an den CR 3-Rezeptor binden. Die Besetzung dieses Rezeptors aktiviert zusätzlich die granulozytäre Chemotaxis und die Aggregation neutrophiler Granulozyten [43]. Der CR 3-Rezeptor findet sich außer auf neutrophilen Granulozyten auch auf der Oberfläche von Monozyten und Natürlichen Killer (NK)-Zellen [41].

Integrine bestehen aus einer α- und einer β-Proteinkette [41]. Der CR 3-Rezeptor gehört zur Gruppe der CD 11b/CD 18- Adhäsionsmoleküle, die eine unterschiedliche α- aber eine gemeinsame β-Proteinkette besitzen [41;123;188]. Zu dieser Gruppe gehören desweiteren der LFA-1 (CD 11a/CD 18)-Rezeptor, sowie der p150,95 (CD 11c/CD 18)-Rezeptor. LFA-1 (CD 11a/CD 18) vermittelt die Adhäsion zytotoxischer T-Zellen an Pathogene und ist an der Vermittlung der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten beteiligt [41]. Der p150,95 (CD 11c/CD 18)-Rezeptor unterstützt die Bindung von Granulozyten und Makrophagen an Endothel, und ist vermutlich auch an der Bindung von C3bi beteiligt [41].

Ein weiterer für die Phagozytose essentieller Oberflächenrezeptor ist der CR 1(CD 35)-Rezeptor [12;110]. Dieses glykosylierte Protein bindet mit hoher Affinität C3b-markierte Mikroorganismen, zum Teil auch das Komplement-Fragment C4b. Der granulozytäre CR 1-Rezeptor bindet dagegen kaum natives C3 und C3bi [44]. Der CR 1(CD 35)-Rezeptor initiiert, ähnlich wie CR 3, die Phagozytose [45]. Er findet sich außer auf Granulozyten auch auf den Oberflächen von Erythrozyten und einigen Lymphozyten [41].

Die Interaktion zwischen Antigen-Antikörper Komplexen mit Zellen des Immunsystems führt u.a. auch zur Initiation der Phagozytose. Diese wird über die Bindung der Fc-Domäne des Antikörper-Moleküls an Rezeptoren der Granulozyten vermittelt [41]. Neutrophile Granulozyten besitzen Rezeptoren für die Fc-Region von IgA und IgG [188;62;128;101]. Auf humanen Granulozyten werden drei Arten von IgG-Rezeptoren

exprimiert: Fcγ-RI, Fcγ-RII und Fcγ-RIII. Der Fcγ-RIII (CD 16)-Rezeptor besteht aus einem Glykoprotein, das IgG-Komplexe mit niedriger Affinität bindet, dafür aber in großer Zahl auf Granulozyten exprimiert wird [41]. Mit einer Größenordnung von 1-2 x 10^5 Rezeptoren/Zelle ist der Fcγ-RIII (CD 16)-Rezeptor der am häufigsten exprimierte Fcγ-Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten [41]. Der Fcγ-RIII (CD 16)-Rezeptor initiiert intrazelluläre Signaltransduktionen, die vor allem Ca^{2+}-abhängig sind, und ebenfalls mit der Aufnahme und Vernichtung des Bakteriums durch den Granulozyten enden [45]. Der CD 16-Rezeptor wird von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie von Makrophagen und NK-Zellen exprimiert [45].

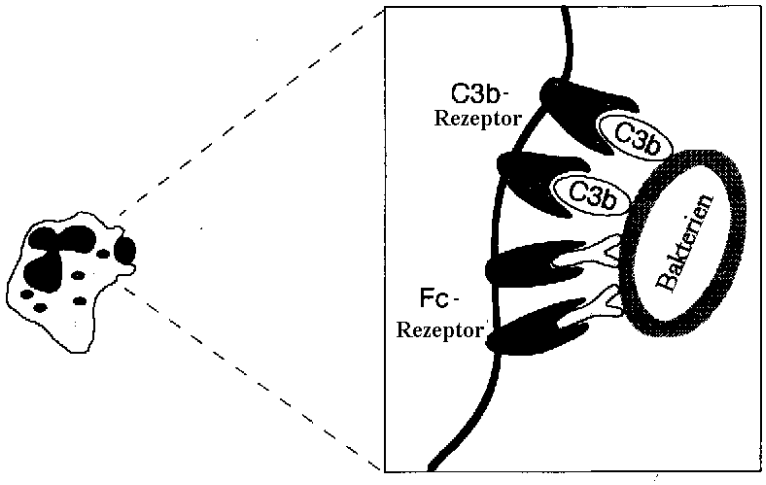

Abbildung 1: Erkennung von Bakterien durch Granulozyten. Das opsonisierte Bakterium wird von Komplement- und Fc-Rezeptoren des Granulozyten erkannt und gebunden. Modifiziert nach [42].

Neutrophile Granulozyten synthetisieren bakteriostatisch und bakterizid wirkende Produkte, um den aufgenommenen Erreger zu vernichten. Zu diesen Produkten zählen vor allem Superoxid-Anionen (O_2-), Wasserstoff-Peroxid (H_2O_2) und freie Radikale ($^{\cdot}OH$) [41]. Die Synthese dieser Stoffe verbraucht im Vergleich zum Ruhezustand des Granulozyten exzessiv viel Sauerstoff, deshalb wird dieser Vorgang auch als Oxidativer Burst bezeichnet [41].

1.1.2 Opiate und Opioidpeptide

Der getrocknete Milchsaft des Schlafmohns (papaver somniferum) wird als Opium bezeichnet. Opium enthält etwa 25 Alkaloide, von denen die Phenanthrenabkömmlinge Morphin und Codein sowie die Isochinoline Papaverin und Narcotin von medizinischer Bedeutung sind [74]. Morphin ist das Hauptalkaloid des Opiums. Die Alkaloide des

Opiums mit morphinartigen Wirkungen werden als Opiate bezeichnet. Opiate vermitteln ihre Wirkung über eine Bindung an spezifische Opioidrezeptoren. Meperidin wurde 1941 erstmalig synthetisiert und war das erste komplett synthetisch hergestellte Opioid, das auch klinisch Verwendung fand. Modifizierungen dieses Moleküls durch die Einführung einer Methylgruppe in cis-Position zum Stickstoff-Atom führten zu einer effizienten Steigerung der analgetischen Potenz [6]. Zu diesen Substanzen zählt das Fentanyl aus der Gruppe der Piperidine, das heute ein Standard-Opioid in der Anästhesiologie darstellt. Fentanyl besitzt eine ca. 100-fach stärkere analgetische Potenz als Morphin [60]. Die komplexe Struktur dieser Moleküle und die speziellen stereochemischen Voraussetzungen für die analgetischen Eigenschaften des Morphins und seiner Derivate führte zur Annahme, dass dessen Wirkung über spezifische Rezeptoren vermittelt wird [102; 146; 169]. Heute werden drei „klassische“ Opioidrezeptoren (μ,δ,κ) unterschieden. Durch die Aktivierung von μ-Rezeptoren entstehen Analgesie überwiegend auf supraspinaler Ebene, Abhängigkeit, Miosis, Atemdepression, Hustendämpfung und Obstipation [60]. δ- und κ-Rezeptoren vermitteln eine Analgesie vorwiegend auf spinaler Ebene [60]. Durch die Aktivierung von κ-Rezeptoren entsteht zudem Sedierung und Dysphorie. Liganden an Opioidrezeptoren wirken entweder als Agonisten, partielle Agonisten oder Antagonisten. Diese Opiatrezeptor vermittelten Effekte beziehen sich auf das ZNS und die spinale Ebene. Die Interaktion zwischen Opiaten und Immunzellen sowie die Existenz von Opiatrezeptoren auf Immunozyten wurde erst in neuerer Zeit beschrieben [74].

Mittels molekularer Klonierung konnte die Struktur der drei Opioidrezeptor-Typen geklärt werden. Sie gehören zu den 7fach Membran-durchspannenden Rezeptoren, sind an inhibitorische G-Proteine (G_i) gekoppelt und hemmen Phosporylierungsreaktionen. Andere Effekte, wie die Öffnung von K^+-Kanälen oder die Schließung von Ca^{2+}-Kanälen, werden ebenfalls durch G-Proteine vermittelt. Die daraus resultierenden Änderungen der Ionenströme vermindern die Erregbarkeit von Neuronen und und die Transmitterfreisetzung aus Nervenendigungen [60].

Endogene Opioide sind Peptide mit 5 bis 39 Aminosäureresten, denen die N-terminale Tetrapeptidsequenz Tyr-Gly-Gly-Phe gemeinsam ist. Die Opioidpeptide werden in drei Gruppen unterteilt, deren typische Vertreter die Endorphine, Enkephaline und Dynorphine sind [6]. Die Endorphine entstehen aus dem Vorläufermolekül Proopiomelanocortin (POMC), das von der Hypophyse sezerniert wird. Immunzellen produzieren aber auch selbst Opioide, wie z.B. Proopiomelanocortin-Peptide [69].

Endorphine wirken im Organismus als Stresshormone, sind beteiligt an der Kontrolle von Schmerz und Emotionen, Bewegung und Bewußtsein, besitzen aber auch neuroendokrine und immunologische Funktionen [74].

Erhöhte endogene Morphinkonzentrationen können im ZNS bei Stress nachgewiesen werden, was ähnlich wie bei den Endorphinen auf eine hormonelle Funktion dieses Opiats deutet [156]. Einen potentiellen Nachteil von Morphin als Analgetikum stellen dessen in der Literatur beschriebenen immunsupressiven Eigenschaften dar, was mit einer möglicherweise erhöhten Anfälligkeit von Patienten für Infektionen z.B. in der postoperativen Phase, im Rahmen einer intensivmedizinischen Behandlung oder einer Schmerztherapie einhergehen könnte [30; 190]. Das bisherige Wissen über die Interaktion zwischen Opiaten und dem Immunsystem basiert auf pharmakologischen Studien. Eine Reihe von *in-vivo* Studien postulieren einen indirekten Einfluß von Opiaten auf die Immunfunktion über das zentrale Nervensystem, während bei *in-vitro* Experimenten auch direkte Effekt auf Immunzellen beobachtet wurden [96; 190]. Naloxon-reversible Opiat- bzw. Opioideffekte führten zu der Annahme, dass sich μ, δ und κ-Rezeptoren auch auf Immunzellen befinden [36; 70]. Morphin führt zur Freisetzung von NO als second Messenger in neutrophilen Granulozyten, Monozyten [96] und Endothelzellen [161]. Das NO-Molekül reguliert zahlreiche Systeme und Regelkreise wie Blutdruck, neuronale Synapsen, zelluläre Adhärenz und besitzt zudem immunoregulatorische Aufgaben [103]. NO relaxiert Blutgefäße, hemmt die Thrombozytenaggregation, vermindert die Leukozytenadhäsion und bremst die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen [103]. Nach Stimulation durch Endotoxine oder Zytokine können Immunzellen NO synthetisieren, das zytotoxische auf pathogene Keime wirkt [103]. Die Effekte endogener Opioide auf die Funktion neutrophiler Granulozyten werden in bisherigen Studien kontrovers diskutiert. Sowohl immunsupressive als auch immunstimulierende Wirkungen werden endogenen Opioidpeptiden zugeschrieben [144;143;177].

Bislang wurden diese Untersuchungen an isolierten Zellsuspensionen durchgeführt, so dass die im Vollblut ablaufenden Vorgänge wie Opsonisierung oder Komplementaktivierung, die die Granulozytenfunktion entscheidend beeinflussen können, nur unzureichend berücksichtigt werden konnten.

1.1.3 Durchflußzytometrisches Verfahren

In der klassischen zellulären Analytik wurden morphologische oder funktionelle Aussagen über Vorgänge im Immunsystem überwiegend mittels der

Fluoreszenzmikroskopie getroffen. Diese Untersuchungen erlauben aber nur Teilaussagen innerhalb eines eng begrenzten Anwendungsbereiches und sind zudem sehr zeitaufwendig. Ein alternatives Verfahren stellt die Durchflußzytometrie dar. Mit dieser Methodik können große Zellzahlen in kurzer Zeit gemessen werden, was einen wesentlichen Vorteil dieses Verfahrens ausmacht.
Das Prinzip der Durchflußzytometrie beruht auf der simultanen Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften einzelner Zellen. Diese werden hintereinander an einem Meßpunkt analysiert. Dazu wird die zu untersuchende Zellsuspension in das Zentrum eines Stroms aus partikelfreier Trägerflüssigkeit geleitet. Diese Probenflüssigkeit wird durch verschiedene Küvetten mit abnehmendem Durchmesser geleitet, so dass der Probenstromdurchmesser von anfangs 200 µm auf etwa 10 µm am Meßpunkt abnimmt.

1.2 Zielsetzung der Studie

Anhand einer Vollblutmethode, bei der die neutrophilen Granulozyten in ihrer physiologischen Umgebung belassen werden, sollten folgende Fragestellungen in dieser Studie an einem gesunden Probandenkollektiv durchflußzytometrisch untersucht werden:

1. Welchen Einfluß besitzen die Opioidpeptide β-Endorphin $_{1\text{-}31}$, Met-Enkephalin und β-Endorphin $_{27\text{-}31}$ *in-vitro* auf die Funktion neutrophiler Granulozyten, insbesondere auf die Phagozytose, den Oxidativen Burst und die Expression phagozytoserelevanter Reptoren auf der Zelloberfläche?

2. Beeinflussen die Opiate Morphin und Fentanyl die Funktion neutrophiler Granulozyten *in-vitro*?

3. Welche Funktion besitzt der Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO) bei den Opiat-induzierten Veränderungen?

4. Werden die beobachteten Effekte durch spezifische Rezeptoren vermittelt? Dazu werden mit DAMGO, DADLE und DPDPE selektive µ- bzw. δ-Rezeptoragonisten eingesetzt.

5. Können etwaige Effekte durch Inkubation mit den Opiatantagonisten Naloxon, Naltrindol und CTOP aufgehoben werden?

2 MATERIAL UND METHODEN

Die Experimente wurden mittels einer Vollblut-Methodik an Granulozyten durchgeführt. Nur die Vitalitätsprüfung der Granulozyten erfolgte an isolierten Zellen. Mittels Durchflußzytometrie wurden Phagozytoseaktivität, Oxidativer Burst und die Expression der Oberflächenrezeptoren CD 11, CD 16 und CD 35 bestimmt.

2.1 Probenmaterial

2.1.1 Probanden

Untersucht wurde Blut gesunder Männer im Alter zwischen 20 und 40 Jahren. Die Probanden wurden über Inhalt, Vorgehensweise und Untersuchungsziel der Studie aufgeklärt und nach mündlicher Einverständniserklärung in die Studie aufgenommen.

2.1.2 Ausschlußkriterien

Als Ausschlußkriterien für diese Studien galten:

- Rauchen
- Allergien
- akute und chronische Infektionen
- immunsupressive Therapie

2.1.3 Probengewinnung und –aufarbeitung

Die Probenentnahme war bei allen Probanden vergleichbar. Sie erfolgte einmalig morgens zwischen 8 und 11 Uhr. Das Blut wurde mittels einer Kanüle aus einer peripheren Vene der Ellenbeuge gewonnen. Das Probenvolumen betrug 10 ml, wobei Lithium-Heparinat als Antikoagulanz diente. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden die Proben sorgfältig durchmischt und bis zur weiteren Verwendung lichtgeschützt auf Eis gelagert.

2.1.4 Isolierung von Granulozyten aus dem Vollblut

Zur Vitalitätsprüfung wurden Granulozyten nach Inkubation mit Morphin aus dem Vollblut isoliert. Dazu wurden 4 ml EDTA-antikoaguliertes Blut auf einen Gradienten aus Percoll 55% bzw.70% aufgelegt und zentrifugiert (4°C, Bremse 0, 20min., 300 x g). Die Erythrozyten werden auf den Boden des Reagenzröhrchens pelletiert, während sich die Granulozyten in einer Bande oberhalb der pelletierten Erythrozyten anreichern. Die Granulozyten wurden mit einer Spritze entnommen, in 7 ml PBS-Puffer dilutiert und anschließend nochmals zentrifugiert (4°C, Bremse 3, 10 min., 300 x g). Zur Lyse der Erythrozyten wurden 4 ml Aqua dest. Zugegeben. Nach 40 s wurde diese Reaktion durch Zugabe von 2 ml NaCl 2,7% abgestoppt und die Proben erneut zentrifugiert (4°C, Bremse 3, 10 min, 300 x g). Der Überstand wurde dekantiert und die Granulozyten in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und mittels PBS-Puffer auf 10^6 Zellen/ml verdünnt. Anschließend wurden die Zellen mit Trypanblau-Lösung angefärbt und erneut ausgezählt, um das Verhältnis von vitalen zu nekrotischen Granulozyten zu bestimmen.

2.1.5 Inkubation mit Opiaten und Opioidpeptiden

Das Vollblut wurde mit diesen Substanzen inkubiert: Morphin (50 nM, 1 µM, 50 µM, 1 mM), Fentanyl (10 ng/ml, 50 ng/ml, 100ng/ml), β-Endorphin$_{1-31}$ (10^{-7} M, 10^{-9} M,10^{-11} M, 10^{-13} M), Met-Enkephalin (10^{-7} M, 10^{-9} M, 10^{-11} M, 10^{-13} M), β-Endorphin$_{27-31}$ (10^{-7} M, 10^{-9} M,10^{-11} M, 10^{-13} M), DADLE (10^{-7} M, 10^{-9} M,10^{-11} M, 10^{-13} M), DAMGO (50 nM, 1 µM, 50 µM, 1 mM) und DPDPE (10^{-7} M, 10^{-9} M, 10^{-11} M, 10^{-13} M). Eine zehnminütige Vorinkubation mit Naloxon (10 µM, 100µM) wurde durchgeführt, um eine Opioidrezeptorbeteiligung an den immunmodulatorischen Effekten der getesteten Substanzen zu untersuchen. Zur Überprüfung der NO-Abhängigkeit der Morphineffekte wurde die NOS-Inhibitoren N_ω-Nitro-L-Arginin-Methylesther (L-NAME) in einer Konzentration von 1 mM und N_ω-Nitro-L-Arginin (NLA) in einer Konzentration von 500 µM sowie der NO-Donor S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamine (SNAP) in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt. Um zwischen sofort und verzögert einsetzenden Effekten zu unterscheiden, wurden als Standard-Inkubationszeiten 10 und 150 Minuten gewählt.

2.2 Bestimmung der Oberflächenantigene CD 11b, CD 16 und CD 35

2.2.1 Testprinzip

Mit diesem in-vitro-Assay wird die quantitative Expression der Oberflächenantigene CR 3 (CD 11b/CD 18), CD 16 und CR 1 (CD 35) auf Leukozyten im Vollblut nachgewiesen. Fluoresceinisothiocyanat-(FITC-) markierte monoklonale Antikörper gegen diese Rezeptoren dienten als Marker, deren Grünfluoreszenz durchflußzytometrisch bestimmt wurde. Als Negativkontrolle wurden unmarkierte Antikörper gegen die Oberflächenantigene verwendet.

2.2.2 Rezeptor-Markierung

Die Markierung der Oberflächenantigene fand bei Zimmertemperatur statt. Jeweils 100 µl heparinisiertes Vollblut wurden in ein Probenröhrchen gegeben. Die Ansätze wurden wie in 2.1.5 beschrieben mit Opioidpeptiden und Opiaten inkubiert. Zu der Probe wurden 10 µl FITC-markierte Antikörper gegeben, in die Negativkontrolle wurden 10 µl nichtmarkierte Antikörper pipettiert. Die Negativkontrolle diente zur optimalen Einstellung des Durchflußzytometers. Um fehlerhafte Messergebnisse durch unspezifische Bindungen auszuschließen, wurde eine Probe jeweils mit unspezifischem IgG Antikörper inkubiert. Hier ergaben sich im Vergleich zur Bindung mit nichtmarkiertem Antikörper keinerlei Differenzen bezüglich der granulozytären Autofluoreszenz. Die Ansätze wurden gemischt und für 15 min lichtgeschützt bei Zimmertemperatur inkubiert. Zu jedem Röhrchen wurden 2 ml FACS-®Brand-Lysing-Solution zur Fixierung und Lyse der Erythrozyten gegeben. Die Probenröhrchen wurden gemischt und für 10 min lichtgeschützt bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (2 min, 300 x g) und der Überstand dekantiert. Zu jedem Röhrchen wurden 3 ml PBS-Puffer gegeben. Die Proben wurden gemischt und zentrifugiert (2 min, 300 x g), der Überstand verworfen. Der beschriebene Arbeitsablauf galt für alle verwendeten Antikörper. Die Fluoreszenzintensität der Ansätze konnte nun durchflußzytometrisch bestimmt werden. Lichtgeschützt und eisgekühlt sind die Proben für 24 h haltbar.

Antikörper	Klon
Anti CD 11b/CD 18	ICRF 44
Anti CD 16	LNK 16
Anti CD 35	E11

Abbildung 2: Antikörper zur Rezeptormarkierung

2.3 Der Phagozytose-Test

2.3.1 Testprinzip

In einem in-vitro-Assay wurde die Phagozytose neutrophiler Granulozyten quantifiziert. Vitale und teilungsfähige Bakterien der Gattung Staphylococcus aureus K 807, die mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gefärbt wurden, dienten als Stimulus für die Phagozyten. Durch Inkubation von Vollblut verbleiben die neutrophilen Granulozyten in ihrem physiologischen Umfeld, und werden nicht aus dem Verband mit Komplementproteinen oder Antikörpern herausgelöst. Zur Kontrolle diente ein identischer Ansatz, der während der Inkubationszeit auf Eis verblieb, während die restlichen Proben bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten der Proben am Durchflußzytometer gemessen, und die Phagozytoserate berechnet.

2.3.2 Bakterien

Als Ingestionspartikel wurde Staphylococcus aureus gewählt. Der standardisierte Subtyp K 807 wurde freundlicherweise vom Institut für Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Prof. Lämmler) zur Verfügung gestellt, und aliquotiert bei -70°C eingefroren.

2.3.3 Fluoreszenzmarkierung der Bakterien

Ein Aliquot wurde aufgetaut und auf Blutagar ausgestrichen. Diese Agarplatte wurdefür 24 h bei 37°C inkubiert. Dies garantiert, dass der Keim makroskopisch keine

Kontamination aufweist. Von dieser Platte wurden Bakterien in 50 ml BHI-Nährlösung überimpft. Der Ansatz wurde für 24 h bei 37°C unter ständiger Bewegung inkubiert. Anschließend wurde Fluoresceinisothicyanat (1 mg/ml) zugegeben. Äthanol 96 % diente als Lösungsvermittler, dem 20 mg FITC pro ml zugegeben wurden. Die entstandene 5 % ige Lösung hat nach unseren Untersuchungen keinerlei negativen Einfluß bezüglich der Vitalität und Teilungsfähigkeit der Bakterien. In drei Waschvorgängen mit PBS wurde das Äthanol, das nichtgebundene FITC und Reste der BHI-Lösung entfernt. Die Bakterien wurden mikroskopisch in einer Neubauer-Kammer ausgezählt, und eine Bakterienlösung mit einer Konzentration von 10^9 Bakterien/ml eingestellt. Den Abschluß bildete eine fluoreszenzmikroskopische Kontrolle der gefärbten Bakterien.

2.3.4 Durchführung

Vor Beginn des Tests wurde das Wasserbad auf 37°C erwärmt, und die Zentrifuge auf 4°C abgekühlt. Alle Reagenzien mit Ausnahme der FACS®-Brand Lysing-Solution wurden vorab für 15 min auf Eis abgekühlt. Der komplette Testansatz verbleibt auf Eis, nur das Lysieren der Erythrozyten fand bei Zimmertemperatur statt. Die Bakterienaliquots wurden unmittelbar vor dem Testbeginn der Tiefkühltruhe entnommen und sofort mit Alufolie umwickelt. Damit war gewährleistet, dass die FITC-Fluoreszenz nicht beeinträchtigt wurde. Jeweils 100 µl gekühltes heparinisiertes Vollblut wurde in ein Probenröhrchen pipettiert. Das Vollblut wurde wie in Kapitel 2.1.5 beschrieben mit Opioidpeptiden und Opiaten inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt. Die aufgetauten Bakterien wurden geschüttelt, und 10 µl zu dem Vollblut pipettiert. Alle Ansätze wurden gemischt, danach inkubierten die Phagozytoseansätze im Wasserbad für 10 min bei 37°C unter starkem Schütteln (80 % Intensität). Die Kontrollansätze verblieben auf Eis, sie dienten später zur optimalen Einstellung des Durchflußzytometers. Exakt zum Ende der Inkubationszeit wurden die Röhrchen aus dem Wasserbad genommen, und zwecks Abstoppen der Phagozytose auf Eis zu den Kontrollen gestellt. Zu jedem Ansatz wurden 100 µl Trypan-Lösung (0,16 mg/ml NaCl 0,9 %) pipettiert und die Proben gemischt. Trypan dient als „Quenching"-Lösung, um Bakterienkonglomerate und andere Anheftungen von der Phagozytenoberfläche zu entfernen, und damit die Fluoreszenz außen liegender, nicht phagozytierter, Bakterien zu unterdrücken. Pro Ansatz wurden 3 ml PBS-Puffer

zugegeben, die Proben gemischt und für 5 min bei 250 x g zentrifugiert. Der sichtbare Überstand wurde abgesaugt und der Waschvorgang wiederholt. 3 ml Lysing-Solution wurde zu den Proben gegeben, die Proben gemischt und für 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lysing-Solution zerstört die Erythrozyten und fixiert die im Aliquot enthaltenen Leukozyten. Nach der Inkubation wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 250 x g), der Überstand abgesaugt und 3 ml PBS-Puffer zugegeben. Die Proben wurden zentrifugiert (5 min, 250 x g) und der Überstand dekantiert. Dieser Waschvorgang wurde ein weiteres Mal durchgeführt, 100 µl Propidiumiodid (PI) zu den Aliquots pipettiert, die Ansätze gemischt und für 10 min lichtgeschützt inkubiert. Die Messung am Durchflußzytometer erfolgte innerhalb von 30 min. Ohne Propidiumiodid sind die Proben für 24 h haltbar, wenn sie auf Eis gelagert werden.

2.4 Der Oxidative-Burst-Test

2.4.1 Testprinzip

Dieser in-vitro-Assay erlaubt die quantitative Bestimmung des Oxidativen Bursts von Leukozyten in heparinisiertem Vollblut. Nichtgefärbte Bakterien der Gattung Staphylococcus aureus K 807 dienten als Stimulus zur Phagozytose und damit zur Stimulation der Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite, die das inkorporierte Bakterium innerhalb des Phagolysosoms zerstören (Oxidativer Burst). Die Bildung dieser Sauerstoffmetabolite kann durch Zugabe und Oxidation von Dihydrorhodamin 123 verfolgt werden. Eine Probe ohne Stimulus diente als Negativkontrolle. Die Konversion von Dihydrorhodamin 123 zu Rhodamin 123 verändert die Fluoreszenzeigenschaften dieses Stoffes. Das entstandene Rhodamin 123 besitzt eine Grünfluoreszenz, die durchflußzytometrisch bestimmt wurde.

2.4.2 Durchführung

Der Ablauf dieses Tests lehnt sich an die Arbeitsanleitung des Phagoburst®-Testkits (Fa. Orpegen Pharma, Heidelberg) an, wurde aber modifiziert, so dass letztlich nur die

Dihydrorhodamin 123-Substratscheiben dieses Kits Verwendung fanden. Vor Beginn des Tests wurde das Wasserbad auf 37°C erwärmt, und die Zentrifuge auf 4°C abgekühlt. Alle Reagenzien mit Ausnahme der FACS®-Brand Lysing-Solution wurden ebenfalls vorab für 15 min auf Eis abgekühlt. Die Dihydrorhodamin 123-Substratscheibe wurde in 1 ml PBS-Puffer für 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Heparinisiertes Vollblut wurde gemischt, und davon jeweils 100 µl in jedes Probenröhrchen aliquotiert. Das Vollblut wurde wie in Kapitel 2.1.5 beschrieben mit Opioidpeptiden und Opiaten inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis gestellt. Nach Mischen der Bakterien wurden 10 µl Bakterienlösung zum Blut gegeben. Die Kontrolle verblieb ohne Stimulus, stattdessen wurden 10 µl PBS zum Vollblut pipettiert. Diese Kontrolle diente später zur optimalen Meßeinstellung des Durchflußzytometers. Alle Probenröhrchen wurden gemischt, und für 10 min bei 37°C unter starkem Schütteln (80 % Intensität) im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze aus dem Bad genommen und auf Eis gestellt. Zu jedem Ansatz wurden 20 µl der frischen Substratlösung pipettiert und die Proben gemischt. Die Ansätze wurden für 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Exakt zum Ende der Inkubationszeit wurden die Röhrchen dem Wasserbad entnommen. Die Vollblutproben wurden bei Raumtemperatur fixiert und lysiert durch die Zugabe von je 2 ml Lysing-Solution. Die lichtgeschützte Inkubation dauerte 10 min. Die Ansätze wurden für 5 min bei 250 x g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Zu den Röhrchen wurden 3 ml PBS-Puffer gegeben und anschließend zentrifugiert (5 min bei 250 x g). Der Überstand wurde verworfen. Pro Ansatz wurden 100 µl Propidiumiodid (PI) zugegeben. Die Proben wurden gemischt und für 10 min lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Das PI färbt leukozytäre DNA, und dient deshalb zum Ausschluß von Bakterienaggregaten, die die Messung am Durchflußzytometer stören können. Die Zellsuspension muß innerhalb von 30 min gemessen werden. Ohne PI sind die Proben für 24 h haltbar, wenn sie auf Eis gelagert werden.

2.5 Die Durchflußzytometrie

2.5.1 Optisches System

Die Probenanalysen wurden an einem FACSCalibur®-Durchflußzytometer (Fa. Becton Dickinson) durchgeführt. Dieses Gerät besitzt einen Argon-Ionenlaser mit einer 488 nm Linie, der mit einer Leistung von 15 mW betrieben wird. Das Durchflußzytometer ist verbunden mit einem Power-Mac®-Computer der Fa. Apple. Die Auswertungen der Messungen erfolgten mit dem Programm Cell Quest® (Fa.Becton Dickinson). Als Trägerflüssigkeit wurde FACS-Flow®-Lösung (Fa. Becton Dickinson) verwand. Die Messungen wurden auf Disketten abgespeichert.

Ein Durchflußzytometer ist ein optisches Meßsystem, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner Partikel analysiert. Die Ergebnisse basieren auf einer gleichzeitigen Messung mehrerer physikalischer und biochemischer Parameter jeweils einer Zelle. Zur durchflußzytometrischen Untersuchung müssen die Zellen als Suspension von Einzelzellen vorliegen. Wird diese Voraussetzung erfüllt, ist prinzipiell jede Art von Zelle geeignet, durchflußzytometrisch untersucht zu werden. Ein Durchflußzytometer mißt im wesentlichen die Fluoreszenz und Lichtstreuung als Signal eines Partikels beim Kontakt mit einem Lichtstrahl. Die Zellen werden dazu im „Gänsemarsch“ zu einem Meßpunkt geleitet, an dem sie von einer Lichtquelle beleuchtet werden. Detektionssysteme quantifizieren dann die Fluoreszenz- und Streulichtemission jeder Zelle. Eine große Summe von Einzellmessungen (über 10^4 Zellen/Minute) stehen danach zur Analyse bereit.

Das optische System besteht aus einem Anregungs- und einem Detektionsteil. Im Anregungsteil wird der Laserstrahl durch prismatische Linsen so verformt, dass er am Meßpunkt einen elliptischen Durchmesser von ca. 20 x 60 µm besitzt. Damit wird ein Kompromiß zwischen hoher räumlicher Auflösung und ausreichender Signalintensität angestrebt. Der Detektionsteil besteht aus zwei Bereichen. In einem Teil wird das Vorwärtsstreulicht (FSC) gemessen, im anderen wird das Seitwärtsstreulicht (SSC) und die Fluoreszenz gemessen. Dieser Teil ist aufgrund der Streuung des Lichts rechtwinklig zum FSC-Detektor angebracht. Die Strahlung trifft in den

Detektionsbereichen auf Fotozellen und Fotodioden, die das Lichtsignal in elektrische Signale umwandeln.

Die Lichtstreuung wird vor allem von Zellgröße, Zellform, der Zelloberfläche und der Granularität beeinflußt. Die Durchflußzytometrie nutzt diese Parameter zur funktionellen und physikalischen Charakterisierung von Zellen. Diese Streuung erfolgt zum größten Teil im Winkelbereich von 0-10° , was nur eine minimale Ablenkung des einfallenden Strahls bedeutet. Dieses Licht wird als Vorwärtsstreulicht oder Forward Angle Light Scatter (FSC) bezeichnet, es korreliert mit der Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht oder Side Scatter (SSC) bezeichnet Licht, das rechtwinklig (90°) aus der Geradeausrichtung abgelenkt wird. Der Side Scatter (SSC) korreliert mit der Dichte bzw. der Granularität der Zelle. Mittels dieser Streulichtparameter lassen sich Leukozytengruppen, wie neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten unterscheiden, die jeweils ihr eigenes, für sie charakteristisches Streulicht aufweisen.

In der Durchflußzytometrie verwendete Lichtquellen müssen mehrere Bedingungen erfüllen:

- hohe Intensität
- Emissionsspektrum im Absorptionsbereich der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe
- konstante Strahlungsleistung

Der von uns verwendete Argon-Ionenlaser erfüllt diese Bedingung und emittiert eine 488-nm-Linie. Die verwendeten Fluorochrome müssen demnach so gewählt werden, dass sie im Exzitationsbereich (Anregungsbereich) des Lasers (488 nm) liegen.

Die Fluoreszenz wird definiert als die Lichtemission von Molekülen nach Absorption energiereicher Strahlung. Fluoreszierende Verbindungen (Fluorochrome) absorbieren Lichtenergie über einen für sie charakteristischen Wellenlängenbereich. Fluorochrome besitzen einen bestimmten Exzitationsbereich, in dem sie von einer Lichtquelle angeregt werden können. Als Fluorochrome wurden in dieser Studie FITC (Fluorescein-Iso-Thiocyanat) und PI (Propidiumjodid) eingesetzt. Beide liegen im Exzitationsbereich des Argon-Ionenlasers, unterscheiden sich aber in ihrer Fluoreszenzfarbe. FITC emittiert eine Grün-Fluoreszenz, während PI eine Rot-Fluoreszenz besitzt. Diese Farbstoffe zeigen einen unterschiedlichen Abstand zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge, den sog. Stokes'schen Shift. Damit ist eine Mehrfarbenfluoreszenzanalyse möglich, die das Anwendungsspektrum der Durchflußzytometrie erheblich erweitert. Die Grünfluoreszenz (Farbstoff: FITC) wird

vom Durchflußzytometer als Fluoreszenz 1 (FL1) gemessen, Fluoreszenz 2 (FL2) steht für die Messung der Rot-Fluoreszenz und erfasst die von PI emittierten Wellenlängen.

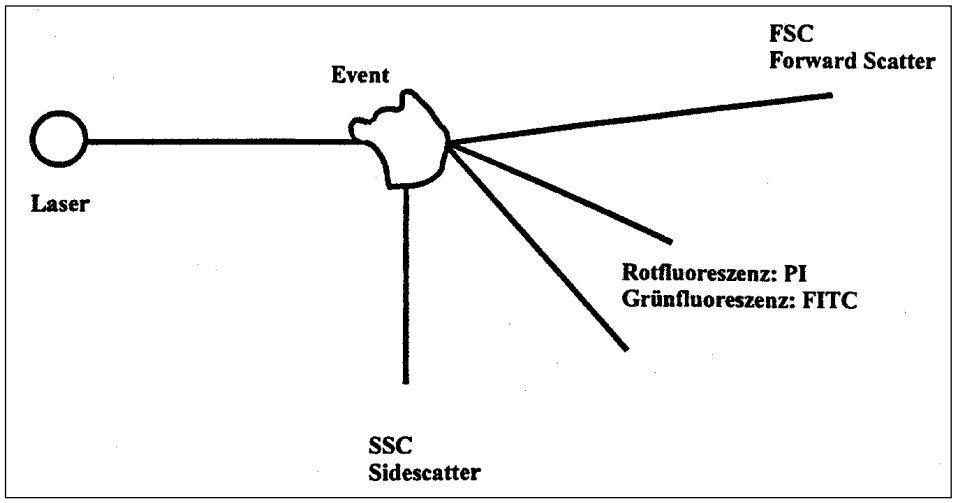

Abbildung 3: Prinzip der Funktionsweise eines Flow-Zytometers
Licht wird durch eine Zelle (oder allgemein einen „Event“) abgelenkt. Modifiziert nach [114].

2.5.2 Flüssigkeitssystem

Zwei Leitungen bilden das Kernstück des Flüssigkeitssystems. Eine Pumpe drückt kontinuierlich die zellfreie Trägerflüssigkeit (FACS-Flow®, Fa. Becton Dickinson) per Zuleitung in die Meßzelle und weiter in den Abfalltank. Über die zweite Leitung wird die Zellsuspension vom Probenröhrchen zur Meßzelle transportiert, dort treffen beide zusammen. Die Zellsuspension wird wird je nach Gerät entweder per Überdruck oder durch ein Ansaugsystem in die Meßzelle, eine Quarzküvette, befördert. Die zweite Leitung besteht aus einer Stahlkapillare, deren Ende auf das Zentrum des Lumens der Meßküvette gerichtet ist. Nachdem die Zellsuspension diese Kapillare verläßt, wird sie von einem laminaren Hüllstrom aus Trägerflüssigkeit umgeben. Dadurch wird der Probenstrom so verengt, dass die Zellen einzeln, hintereinander den Meßpunkt passieren. Durch die Verengung werden die Zellen von einer Geschwindigkeit von einigen Zentimeter/Sekunde auf etwa sieben Meter/Sekunde beschleunigt. Diesen Prozeß bezeichnet man auch als „hydrodynamische Fokussierung“. Diese Fokussierung gewährleistet, dass die Zellen einzeln den Meßpunkt an einer definierten Stelle passieren. Dort trifft dann der Laserstrahl auf die Zelle.

2.5.3 Signalverarbeitung

Die Höhe des elektrischen Signals hängt von der Höhe des Lichtsignals ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC) und die Fluoreszenz sind relativ schwache Signale und bedürfen deshalb besonderer Verstärkung. Dies geschieht mittels einer Photoröhre. Eine Photoröhre emittiert nach dem Auftreffen von Photonen Elektronen. Die freigesetzten Elektronen lösen an benachbart gelagerten Elektroden Sekundärelektronen ab, die wiederum andere Elektronen freisetzen. Diese Kettenreaktion verstärkt das ursprüngliche Signal um ein Vielfaches. Die Wahl der Signalverstärkung hängt vom Meßbereich ab. Bei Fluoreszenzmessungen wie in dem hier vorliegenden Versuchsaufbau bewegt sich die Dynamik zwischen den Bereichen von einer geringen Autofluoreszenz bis hin zu mehreren tausend Fluoreszenzäquivalenten. Deshalb werden zwei Arten der Signalverstärkung verwendet, eine logarithmische und eine lineare. Das Gerät muß ebenfalls unterscheiden können, ob ein „echtes“ Signal oder ein Hintergrundrauschen detektiert wurde. Dies wird durch eine elektronische Schwelle (Treshhold) erreicht, die von einem bestimmten Parameter ausgelöst („getriggert“) wird. In unserem Fall ist dies das Vorwärtsstreulicht (FSC). Die registrierten Signale werden von einem Analog-/Digitalwandler von Volt in eine Klassenzahl konvertiert, die Werte von 0 bis 1024 (1024-Klassenauflösung) annehmen kann. Die digitalisierten Signale werden dann vom Computer auf einem Speichermedium abgelegt.

2.6 Darstellung der Messergebnisse

Die Fluoreszenzintensität des Meßparameters wird in einem Histogramm- oder Häufigkeitsdiagramm dargestellt werden. Hierbei werden die Zellen entsprechend ihrer Fluoreszenzintensität in verschiedene Intensitätskänale, sogenannte Klassen eingeteilt und dabei gegen die absolute Zellzahl aufgetragen. Die unterschiedliche Fluoreszenzintensität innerhalb einer Zellpopulation wird in 256 oder 1024 Klassen verteilt. Dies ist abhängig von der zuvor gewählten Signalverarbeitung und der elektrischen Spannung des Zytometers. Bei der Histogrammanalyse können die verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch das Setzen entsprechender Gates in negative, nicht-fluoreszierende und in positive, fluoreszierende Zellen klassifiziert werden. Vor der Messung der untersuchungsrelevanten Zellsuspensionen werden dadurch mit einer geeigneten Negativkontrolle nicht-fluoreszierende Zellen in der

Histogramm-Darstellung definiert. Diese Abgrenzung negativer Zellen wird bei den anschließenden Messungen der Proben beibehalten und ermöglicht den Ausschluß unspezifischer Fluoreszenz aufgrund von Spontanfluoreszenz der Zellen oder unspezifischer Bindung FITC-markierter Antikörper.

Mittels der Zweiparameterdarstellung kann die Korrelation von FSC und SSC gezeigt werden, ebenso aber auch für die gemeinsame Darstellung von Rot- und Grünfluoreszenz. Durch das gemeinsame Auftragen von zwei Parametern entsteht eine Matrix. Der Schnittpunkt der zwei Meßparameter ist das Ergebnis, das im Punktehistogramm schließlich als ein Punkt dargestellt wird. Jeder Punkt steht also für eine bestimmte Zelle mit ihren Merkmalen. Die graphische Darstellung erfolgt als Punktehistogramm (Dot Plot). Abbildung 2 zeigt die Originalregistrierung einer Probe aus lysiertem Vollblut. Anhand des Vorwärts- bzw. des Seitwärtsstreulichtes weist jede Zellpopulation ein eigenes charakteristisches Muster auf. Dadurch können Subpopulationen wie z.B. Granulozyten von Lymphozyten unterschieden werden.

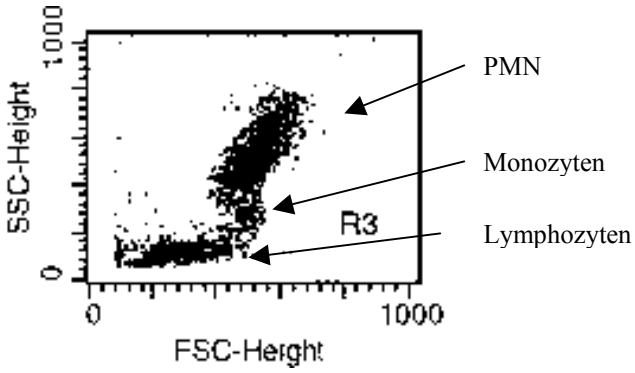

Abbildung 4: FSC/SSC-Diagramm (Originalregistrierung)

Bei jeder Messung werden pro Zelle vier Parameter bestimmt: Vorwärtsstreulicht (FSC), Seitwärtsstreulicht (SSC), Grünfluoreszenz (FL 1) und Rotfluoreszenz (FL 2). Diese Parameter können in jeder Kombination zweidimensional dargestellt werden. Nachdem nun im FSC/SSC - Diagramm die Zellpopulationen ihr charakteristisches

Verteilungsmuster gezeigt haben, können diese gesondert betrachtet werden. Zunächst werden die interessierenden Zellen, in unserem Fall die Granulozyten, von Zelltrümmern und anderen Zellpopulationen abgegrenzt.

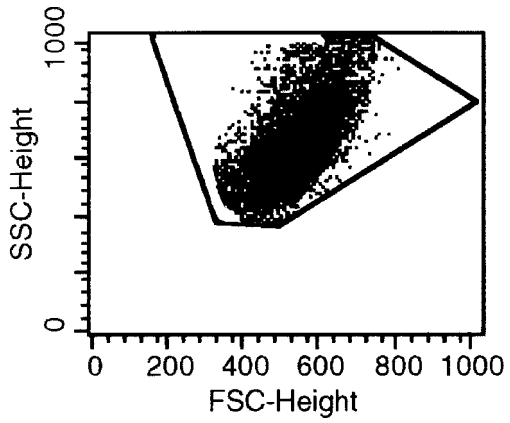

Abbildung 5: Durch Live-Gating können selektiv die neutrophilen Granulozyten ausgewertet werden

Allerdings erfasst man im Auswertefenster nicht nur neutrophile, sondern auch basophile und eosinophile Granulozyten. Aussagen über neutrophile Granulozyten sind also nur aufgrund der quantitativen Überlegenheit dieser Subpopulation möglich [4]. Nach Setzen eines Auswertefensters (Gate) auf die Granulozyten kann man die Fluoreszenzintensitätsverteilung dieser Zellen als Histogramm (Einfachfluoreszenz) oder Punktwolke (Mehrfarbenfluoreszenz) darstellen. Die „negativen“ Zelle umfassen dann den Bereich bis zu einer Klasse, in dem die Autofluoreszenz oder unspezifische Bindung einer Zelle noch fallen kann.

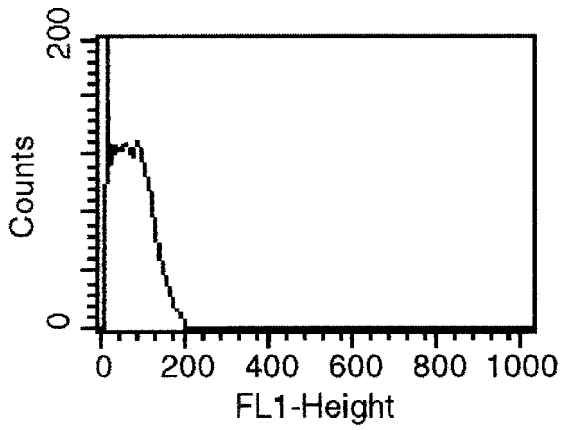

Abbildung 6: Die Negativkontrolle mittels nicht-fluoreszierenderAntikörper repräsentiert die granulozytäre Autofluoreszenz

Dieser Bereich kann durch ein Auswertefenster anschließend von den „positiven“ Zellen, deren Fluoreszenzintensitäten über diesen definierten Bereich hinausgehen abgegrenzt werden. Auf die „positiven“ Zellen wird nun ebenfalls ein Auswertefenster gesetzt, so dass alle gemessenen Zellen innerhalb dieser beiden Gates liegen. Die Verstärkung des Parameters FL 1 wird bei jeder Messung immer so gewählt, dass der Peak der Negativkontrolle vor einer definierten Marke (hier: 10^1) liegt. Diese festgelegte Einstellung der Negativkontrolle ermöglicht erst objektive Vergleiche zwischen unterschiedlichen Proben. Im von uns verwendeten Histogramm wird die gemessene Grünfluoreszenz (FL 1) gegen die Häufigkeit aufgetragen. Granulozyten, die kein Antigen exprimieren, oder nicht phagozytiert haben erscheinen wegen der damit verbundenen niedrigen Fluoreszenzintensität am linken Rand der Darstellung (niedrige FL 1). Phagozytierende Zellen bzw. antigenpositive Zelle erscheinen aufgrund höherer Fluoreszenzintensitäten weiter rechts in der Darstellung (hohe FL 1).

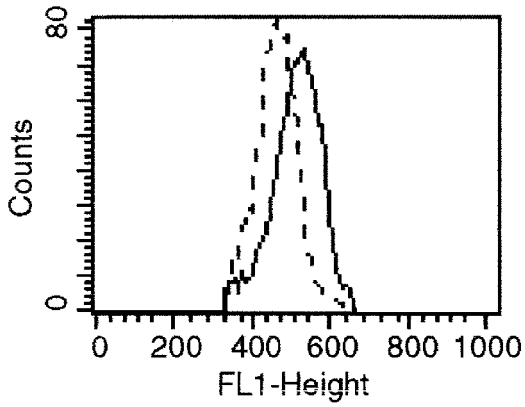

Abbildung 7: Nach Markierung der neutrophilen Granulozyten mit einem FITC-markierten Antikörper gegen den Membranrezeptor CD 11 zeigt sich eine starke Zunahme der Grünfluoreszenz. Die Inkubation mit 1 µM Morphin verringert das Signal (gestrichelte Linie)

Die statistische Auswertung der Messungen erfolgte mittels der Software CellQuest ® (Fa. Becton Dickinson). Sie basiert auf der Auswertung der Histogramm und Zweiparameter-Darstellungen. Gezeigt werden können mehrere Parameter, wie die Anzahl der Ereignisse, die relativen Prozentanteile, der Mittelwert, der Median und der Modus der Signalintensität. Bei jeder Probe wurden exakt 15000 Zellen gemessen, und deren Signalintensität hinsichtlich des Medians (MFI = Median der Fluoreszenzintensität) ausgewertet. Der Median entspricht der Klasse, bei der 50 % der Werteverteilung über diesem Wert, und 50 % der Werte darunter liegen. Er wird von „Ausreißern“ (z.B. Zelltrümmern und Artefakten) wenig beeinflußt, und gibt daher eine gute Aussage über den Signalwert ab. Im Vergleich zum Mittelwert ist der Median allerdings etwas resistenter im Hinblick auf Veränderungen der Fluoreszenzintensität. Bei der Auswertung der Phagozytose wird die mittlere Anzahl phagozytierter Bakterien pro Granulozyt errechnet, die Phagozytoseaktivität. Zu diesem Zweck wird für jede Messreihe die Grünfluoreszenz der Bakterien errechnet. Diese wird dann in Relation zur Grünfluoreszenz der neutrophilen Granulozyten gesetzt. Genau dieses Verhältnis wird durch die Phagozytoserate ausgedrückt:

1. Umrechnung des linear gemessenen Medians der Fluoreszenz in eine logarithmische Form als Phagozytenwert.

   $$\text{Phagozytenwert} = 10 \exp^{(\text{Median der Fluoreszenzintensität Phagozyt/Skalierungsfaktor})}$$

2. Berechnung der bakteriellen Fluoreszenzintensität.

   $$\text{Bakterienwert} = 10 \exp^{(\text{Median der Fluoreszenzintensität Bakterium/Skalierungsfaktor})}$$

3. Der Skalierungsfaktor errechnet sich aus der Anzahl der Fluoreszenzklassen, geteilt durch die logarithmischen Dekaden des Histogramms.
   Skalierungsfaktor = Zahl der Klassen / Anzahl der logarithmischen Dekaden
   = 1024/4 = 256
4. Die Phagozytoseaktivität errechnet sich nun wie folgt:
   Phagozytoseaktivität = Phagozytenwert / Bakterienwert

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der durchflußzytometrischen Meßergebnisse wurde mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS 9.0.1 durchgeführt. Bei Vergleichen von mehreren Gruppen zu einer Kontrollgruppe wurde eine Ranganalyse für verbundene Stichproben mit dem Friedman-Test durchgeführt. Dieses Verfahren prüft die Null-Hypothese: Die verschiedenen Gruppen sind hinsichtlich der Meßergebnisse vergleichbar. Wurde die Null-Hypothese verworfen, so wurde als Anschlußtest der Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur gewählt, um die Unterschiede zwischen den Gruppen zu untersuchen. Für Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurde nach Prüfung auf Normalverteilung der T-Test für verbundene Stichproben angewandt. Das Signifikanzniveau dieser Arbeit wurde mit $p<0,05$ angesetzt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Vitalitätsprüfung

Nach Zugabe von Opioiden und Opiaten mit Inkubationszeiten von 10 bis 300 min und der in Kapitel 2.1.4 beschriebenen Isolation der PMN zeigte die Färbung mit Trypanblau-Lösung mikroskopisch einen Anteil von 95-98 % vitaler Zellen. Dies entsprach dem Prozentsatz vitaler Zellen nach Vorinkubation mit NaCl 0,9%. Nach Anfärbung der Zellen mit PI zeigte die durchflußzytometrische Analyse 3-6% nekrotische Zellen. Somit sind die beobachteten Immunmodulatorischen Effekte der getesteten Substanzen nicht auf eine Vitalitätsstörung der PMN zurückzuführen.

3.2 Morphin

3.2.1 CR 3 (CD 11b/CD 18-Expression)

Zunächst wurde der Einfluß verschiedener Morphin-Konzentrationen auf die CR 3 (CD 11b/CD 18)-Expression neutrophiler Granulozyten untersucht (n=13, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). 50 nM Morphin supprimierte schon nach 10 min signifikant die Expression dieses Komplementrezeptors um ca. 10 %. Die Verlängerung der Inkubation auf 150 min führte bereits in dieser niedrigen Konzentration zur Abnahme der Rezeptorexpression um ca. 30 %. Mit steigender Opiatkonzentration (1 μM, 50 μM) verstärkte sich der inhibitorische Morphin-Effekt bis zur maximalen Abnahme der CR 3-Expression um rund die Hälfte der Ausgangsfluoreszenz. Die Inkubation des Vollbluts mit dem NO-Donor SNAP supprimierte die CR 3-Expression in ähnlicher Weise wie 1 μM Morphin.

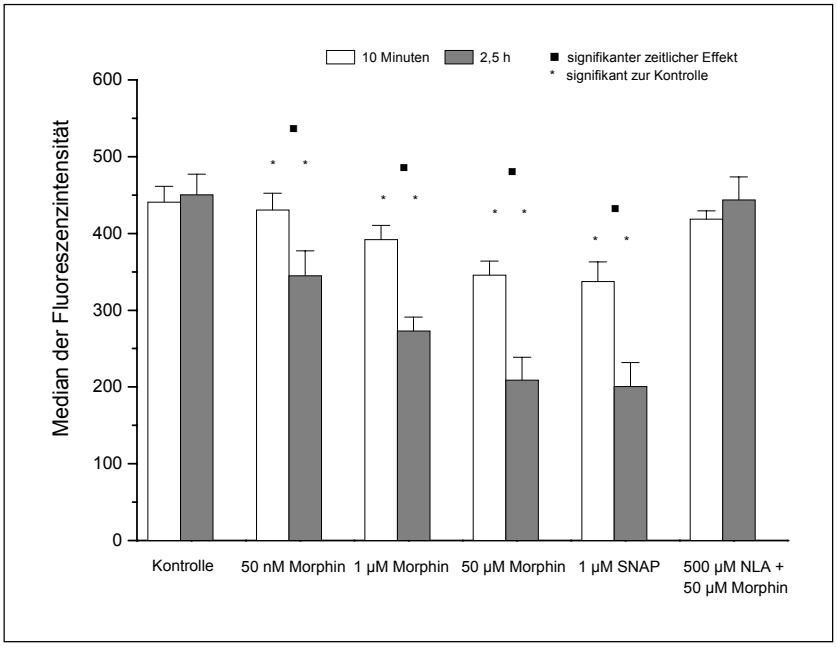

Abbildung 8: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Morphin-Konzentrationen

Die Opiat-induzierte Suppression dieses Komplementrezeptors wurde durch Vorinkubation mit dem unspezifischen Opiatrezeptorantagonisten Naloxon und dem NO-Inhibitor NLA aufgehoben. Die Inkubation mit dem selektiven µ-Antagonisten CTOP führte ebenfalls zum Verlust der CR 3-Suppression.

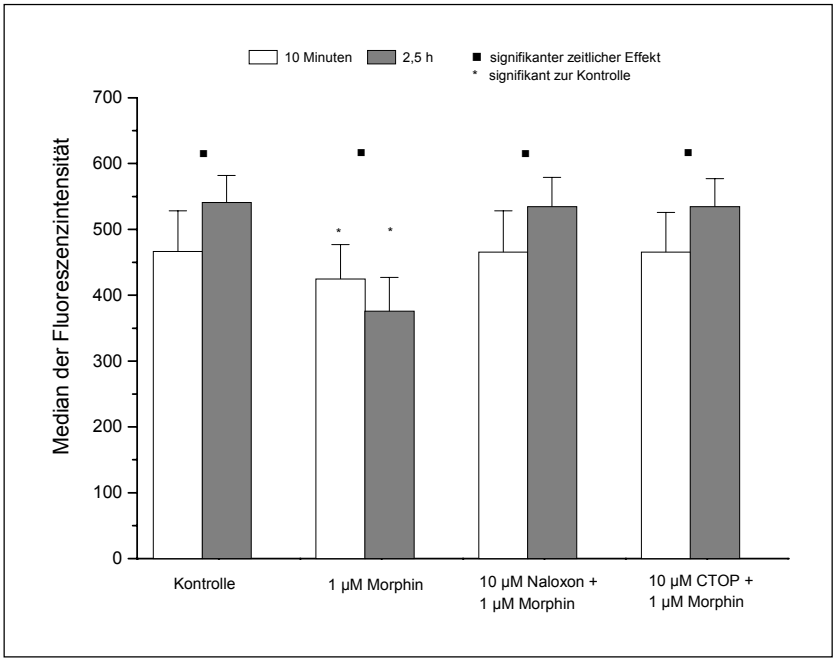

Abbildung 9: Naloxon und CTOP antagonisieren die Morphin-vermittelte Inhibierung der CR 3 (CD 11b/CD 18)-Expression

Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse eine zeit-und konzentrationsabhängige Suppression der CR 3-Expression neutrophiler Granulozyten. Dieser Effekt wurde zumindest teilweise durch NO vermittelt. Die Experimente mit den Opiatrezeptorantagonisten wiesen auf einen μ-Rezeptor gekoppelten Mechanismus der CR 3-Suppression hin.

3.2.2 CD 16-Expression

Der Fcγ-Rezeptor CD 16 wurde durch die Inkubation mit Morphin in ähnlicher Weise wie CR 3 supprimiert (n=13, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Eine 150 min Inkubation mit 50 nM Morphin resultierte in einer Abnahme der CD 16-Expression um ca. 10 %. Morphin in 1 μM Konzentration supprimierte innerhalb von 10 min die Rezeptorexpression um etwa denselben Betrag. Der NO-Donor SNAP inhibierte die gemessene Fluoreszenzintensität nach 150 min Inkubation um etwa 40 %, was quantitativ der Größenordnung von 50 μM Morphin entsprach.

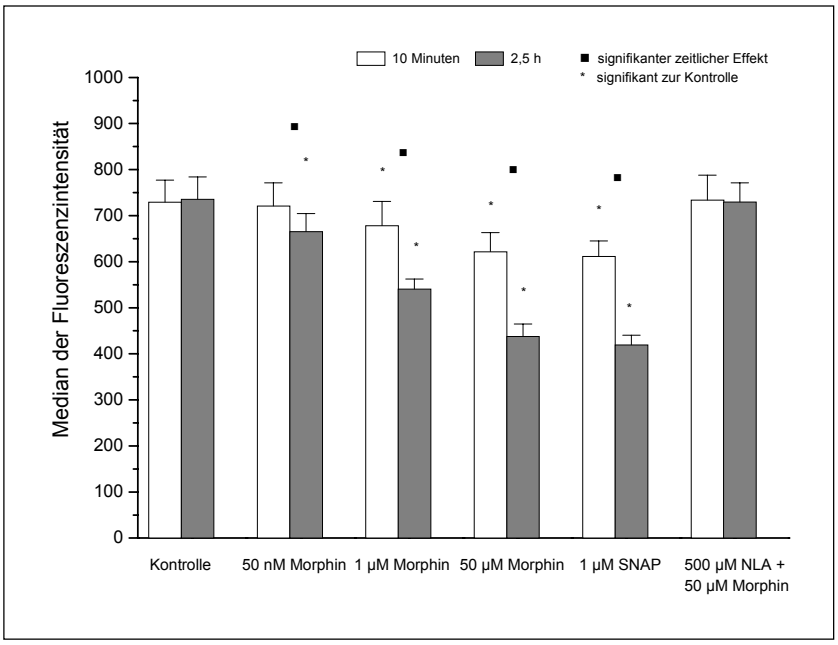

Abbildung 10: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Morphin-Konzentrationen

Die Morphin-induzierte Suppression der CD 16-Expresssion wurde durch Vorinkubation mit den μ-Antagonisten Naloxon und CTOP sowie dem NO-Inhibitor NLA aufgehoben. Auch bei diesem Messparameter deuten die Ergebnisse auf einen μ-

Opiatrezeptor vermittelten Effekt hin, dem zumindest partiell NO als Signalmolekül dient.

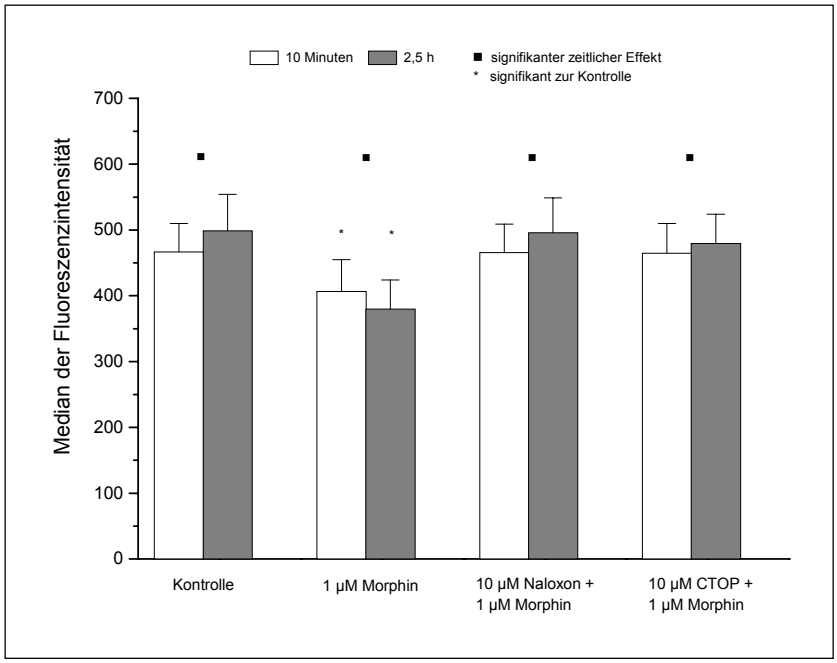

Abbildung 11: Naloxon und CTOP antagonisieren die Morphin-vermittelte Inhibierung der CD 16-Expression

3.2.3 CR 1 (CD 35)-Expression

Morphin supprimierte in dieser Studie zeit- und konzentrationsabhängig die CR 1 (CD 35)-Expression neutrophiler Granulozyten (n=13, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Numerisch ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie bei CD 16- und dem CR 3-Membranrezeptor. 50 nM Morphin induzierte bereits nach 10 min eine signifikante Suppression der Komplementrezeptorexpresssion um ca. 10 %. Dieser Effekt war numerisch gering, jedoch wurde durch die geringe Standardabweichung der Messungen das Signifikanzniveau erreicht.

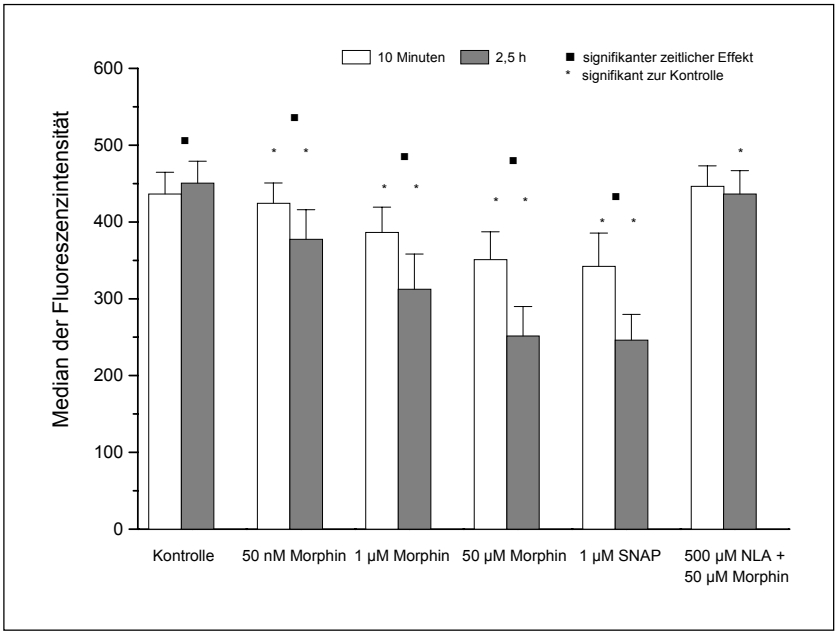

Abbildung 12: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1(CD 35) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Morphin-Konzentrationen

Fraglich bleibt allerdings die klinische Relevanz dieser frühen Morphin-Effekte. Für CR 1 wie auch für die anderen Membranrezeptoren wurden NO- und µ-Opiatrezeptor vermittelte Morphin-Effekte beobachtet.

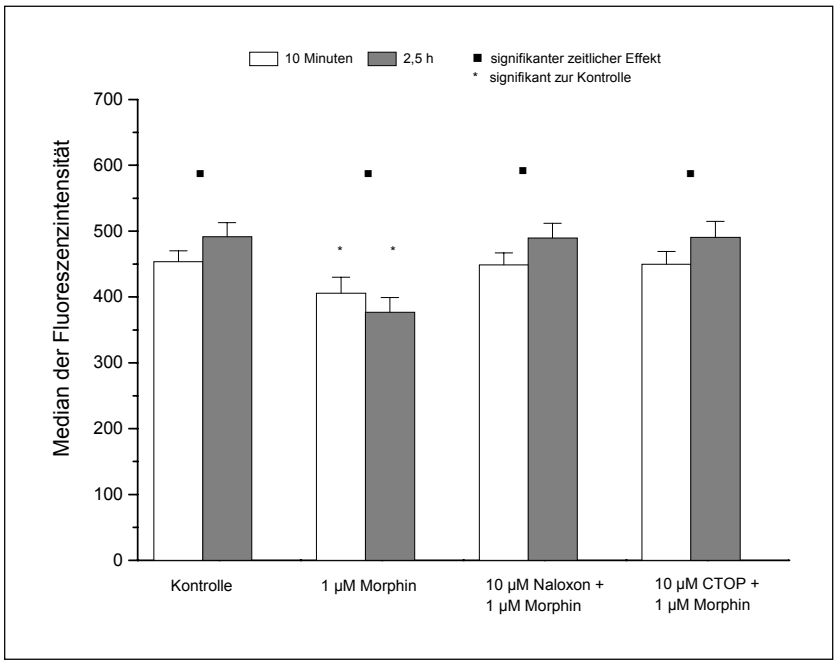

Abbildung 13: Naloxon und CTOP antagonisieren die Morphin-vermittelte Inhibierung der CR 1(CD 35) -Expression

3.2.4 Phagozytoseaktivität

Untersucht wurde in dieser Versuchsreihe der Einfluß verschiedener Morphin-Konzentrationen sowie die Rolle von NO auf die Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten (n=13, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung).

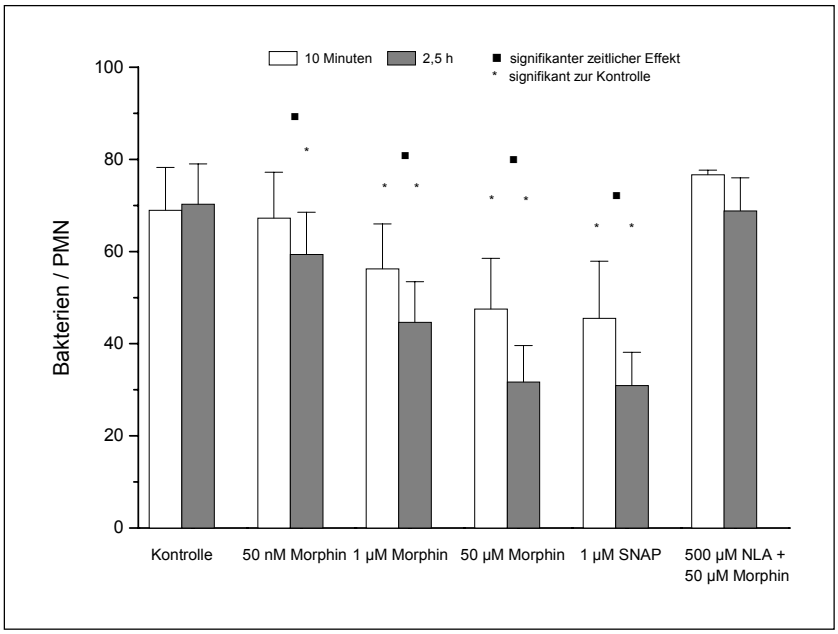

Abbildung 14: Phagozytoseaktivität der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Morphin-Konzentrationen

Wie in den Abbildungen dargestellt, wurde das Vollblut zunächst mit verschiedenen Morphin-Konzentrationen bzw. Opiatantagonisten inkubiert, und anschließend die Phagozytose mit vitalen FITC-markierten Staphylococcus aureus stimuliert. Die Zahl der phagozytierten Bakterien pro Granulozyt wurde bezogen auf die Fluoreszenzintensität berechnet. Morphin induzierte eine Suppression der Phagozytoseaktivität, die sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig war.

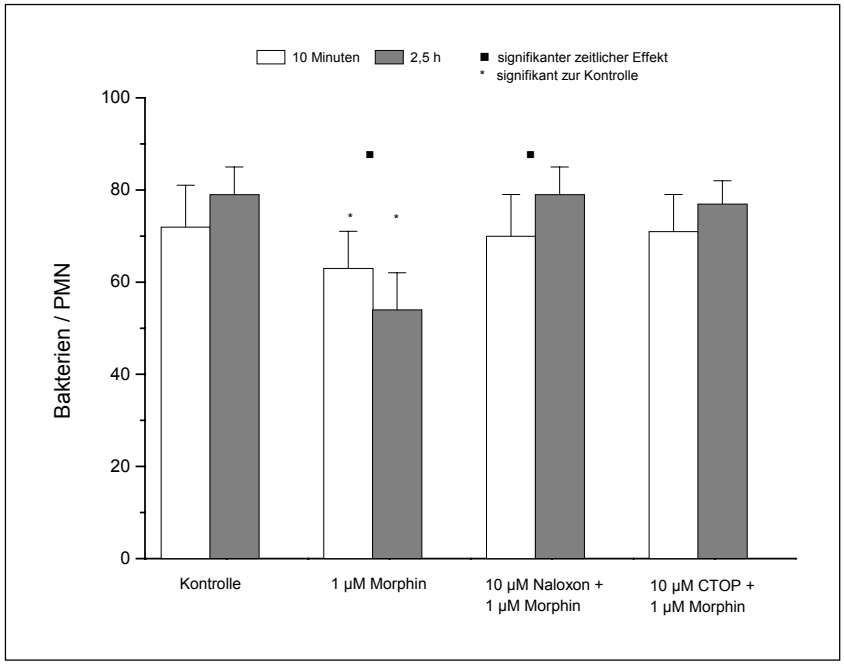

Abbildung 15: Naloxon und CTOP antagonisieren die Morphin-vermittelte Inhibierung der Phagozytoseaktivität

Die Vorinkubation mit dem NOS-Inhibitor NLA antagonisierte diese Effekte, während der NO-Donor SNAP, ähnlich wie 50 µM Morphin, nach 150 min die Phagozytoserate um rund 50 % reduzierte. Naloxon und CTOP antagonisierten die Morphin-Wirkung, was auf einen µ-Opiatrezeptor vermittelten Effekt deutet.

3.2.5 Oxidativer Burst

Um den Einfluß von Morphin auf den Oxidativen Burst neutrophiler Granulozyten zu untersuchen, wurde Vollblut nach Opiatinkubation mit unmarkierten Staphylococcus aureus stimuliert (n=13, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Nach 10 und 150 min Morphin-Inkubation wurde der Oxidative Burst signifikant reduziert. Wie bei der Bestimmung von Phagozytoseaktivität und Expression der Komplementrezeptoren führte die Inkubation mit dem NO-Donor SNAP zu quantitativ ähnlichen Ergebnissen wie die Zugabe von Morphin.

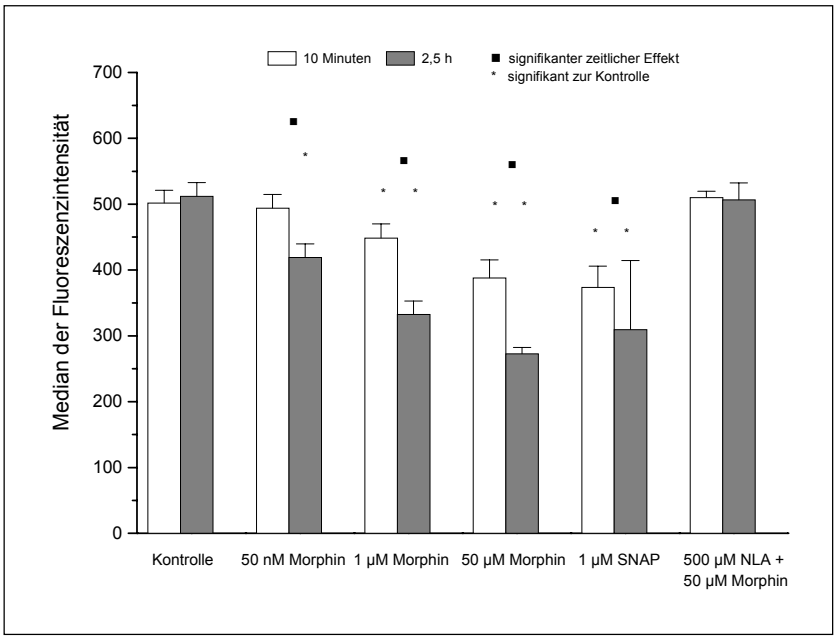

Abbildung 16: Oxidativer Burst der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Morphin-Konzentrationen

Der NO-Antagonist NLA antagonisierte die Morphin-induzierte Inhibierung, ebenso wie die Opiatrezeptor-Antagonisten CTOP und Naloxon.

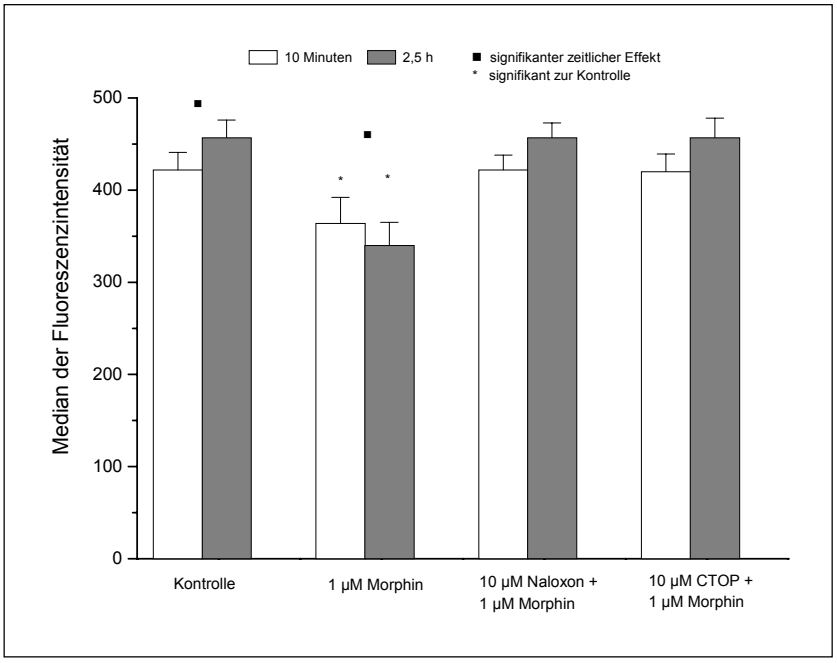

Abbildung 17: Naloxon und CTOP antagonisieren die Morphin-vermittelte Inhibierung des Oxidativen Burst

Zusammengefasst ergab sich auch für den Oxidativen Burst die Vermutung, dass die immunsuppressiven Morphin-Effekte über einen Opiatrezeptor vermittelt wurden, wobei zumindest zum Teil NO als Signalmolekül beteiligt war.

3.3 Fentanyl

3.3.1 CR 3 (CD 11b/CD 18-Expression)

Der synthetische μ-Opiatrezeptoragonist Fentanyl besitzt eine ca. 100 fach höhere analgetische Potenz als Morphin. Wie die Abbildungen 18-22 zeigen, supprimierte Fentanyl im Gegensatz zu Morphin in klinischen und supraklinischen Konzentrationen weder die Expression der Membranrezeptoren, noch die Phagozytoseaktivität oder den Oxidativen Burst (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Sogar in einer Konzentration von 100 ng/ml konnte keinerlei Veränderung der Messparameter registriert werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Fentanyl im Gegensatz zu Morphin nicht an den gleichen granulozytären μ-Rezeptoren bindet und auch kein NO freisetzt.

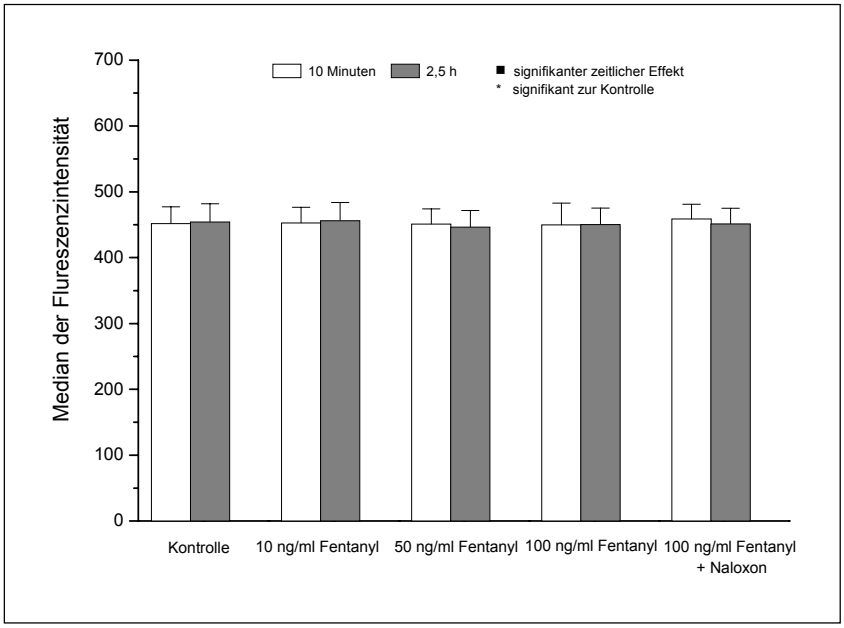

Abbildung 18: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Fentanyl-Konzentrationen

3.3.2 CD 16-Expression

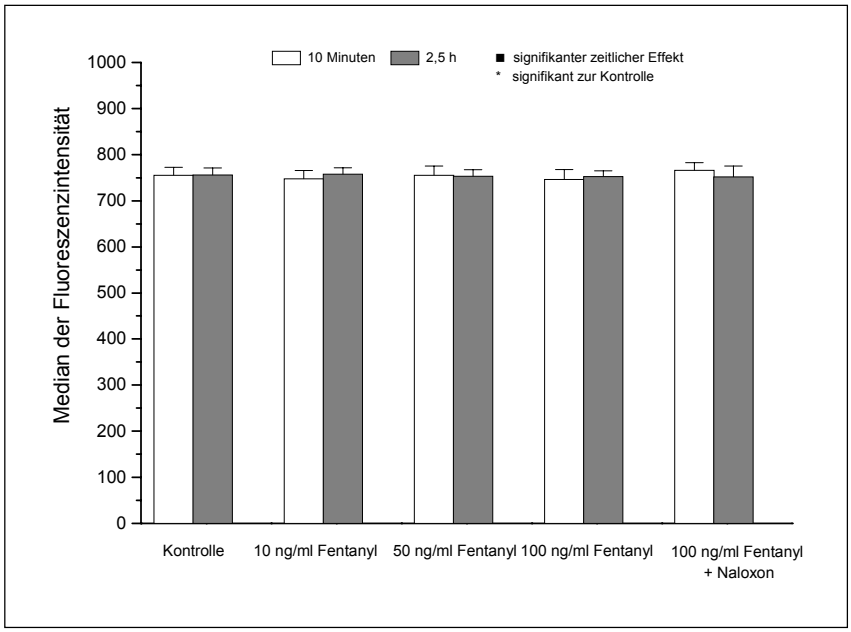

Abbildung 19: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Fentanyl-Konzentrationen

3.3.3 CR 1 (CD 35)-Expression

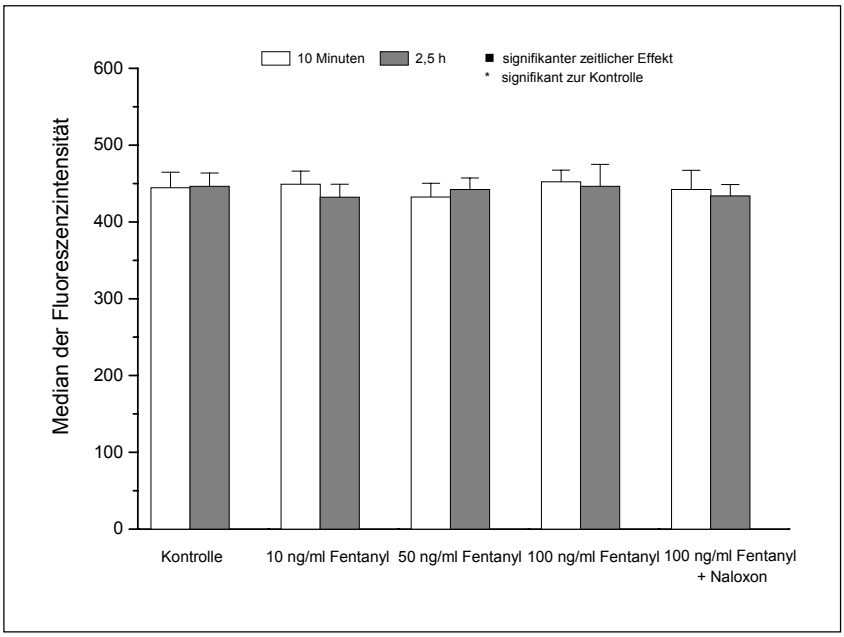

Abbildung 20: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1(CD 35) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Fentanyl-Konzentrationen

3.3.4 Phagozytoseaktivität

Selbst in supraklinischen Dosierungen von 100 ng/ml modulierte Fentanyl die Phagozytoseaktivität in keinster Weise.

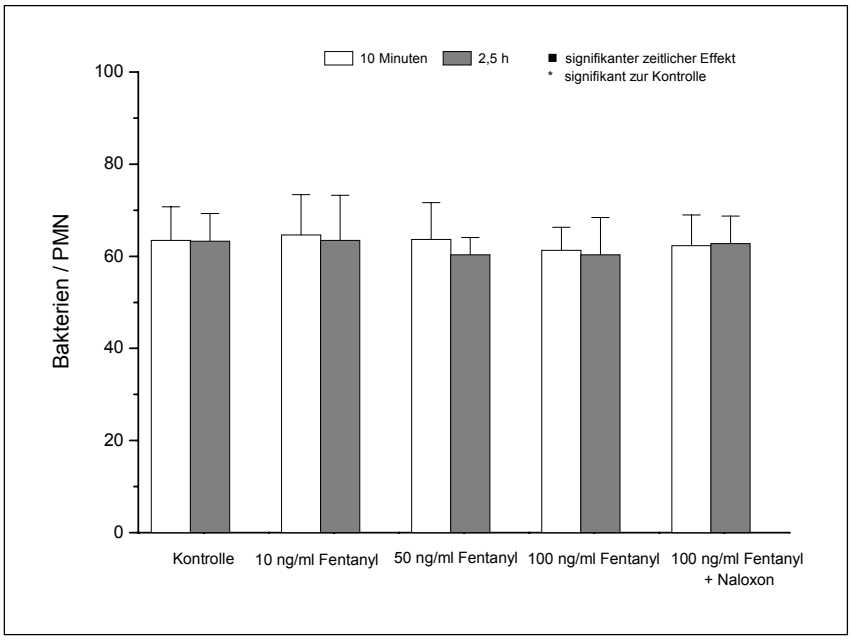

Abbildung 21: Phagozytoserate der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Fentanyl-Konzentrationen

3.3.5 Oxidativer Burst

Parallel zur unveränderten Phagozytoseaktivität konnte keine Beeinflussung des Oxidativen Burst durch Fentanyl beobachtet werden.

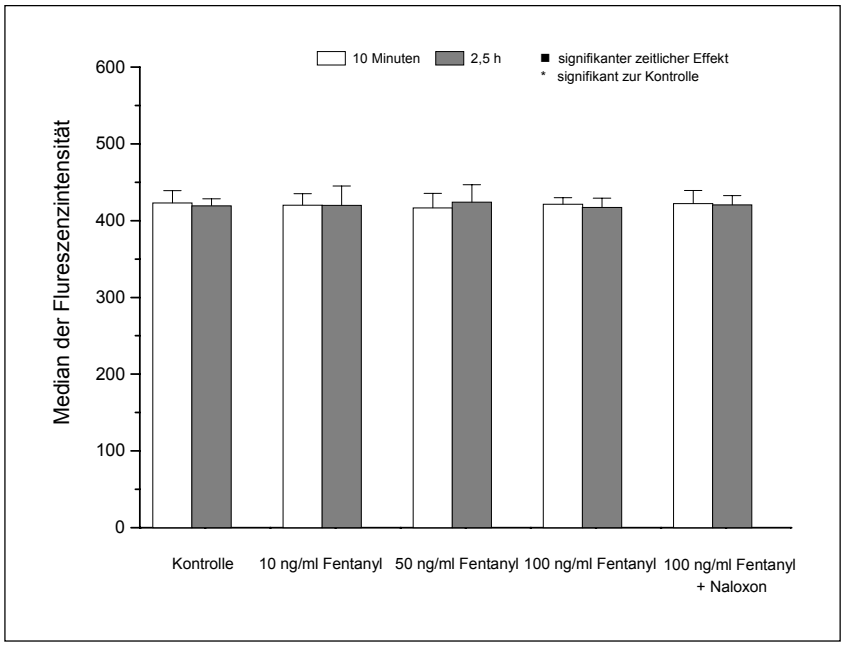

Abbildung 22: Oxidativer Burst der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Fentanyl-Konzentrationen

3.4 DAMGO

3.4.1 CR 3 (CD 11b/CD 18-Expression)

Die oben beschriebenen Ergebnisse der Morphin-Experimente führten zur Vermutung, dass die immunsuppressiven Opiateffekte über einen granulozytären μ-Rezeptor vermittelt wurden. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde der selektive μ-Rezeptoragonist DAMGO verwendet (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Ähnlich wie beim Fentanyl zeigte sich keinerlei Modulation der Komplementrezeptor-Expression. DAMGO beeinflusste ebenfalls in keiner Konzentration die CD 16-Expression, die Phagozytoseaktivität oder den Oxidativen Burst. Diese Ergebnisse weisen auf die Existenz unterschiedlicher μ-Rezeptor Subtypen hin, mit einer unterschiedlichen Affinität gegenüber Morphin und anderen μ-Rezeptoragonisten. Unabhängig davon konnte in diesen Experimenten bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 150 min eine signifikante zeitliche Zunahme der Rezeptorexpression, der Phagozytoseaktivität und des Oxidativen Burst festgestellt werden. Unter Umständen kann der verlängerte Kontakt der Zellen mit der Fremdoberfläche des Probenröhrchens zu diesem Effekt geführt haben. Allerdings liegt die Zunahme der Rezeptorexpression nur bei 2-5% im Vergleich zum 10 min Wert.

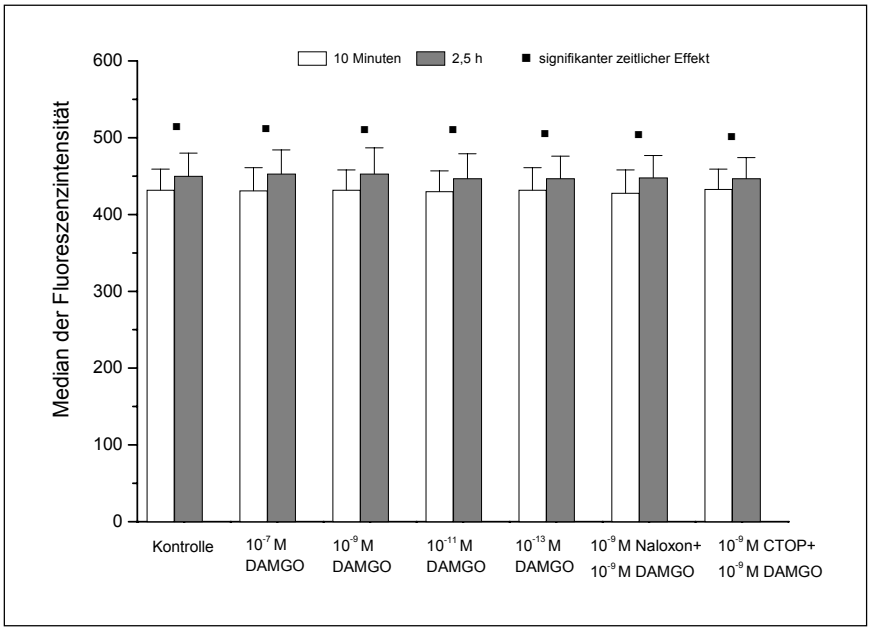

Abbildung 23: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DAMGO-Konzentrationen

3.4.2 CD 16-Expression

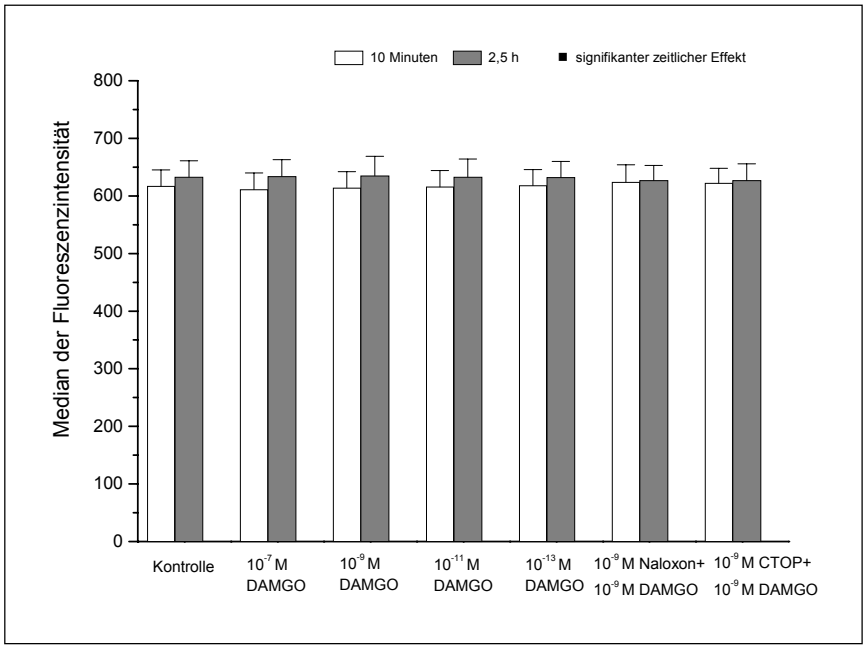

Abbildung 24: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DAMGO-Konzentrationen

3.4.3 CR 1 (CD 35)-Expression

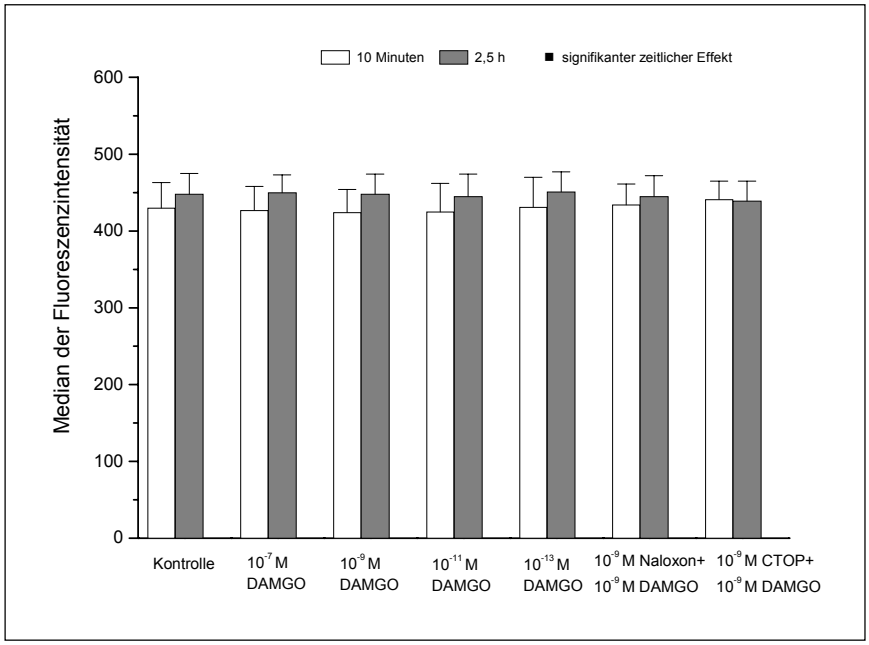

Abbildung 25: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1(CD 35) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DAMGO-Konzentrationen

3.4.4 Phagozytoseaktivität

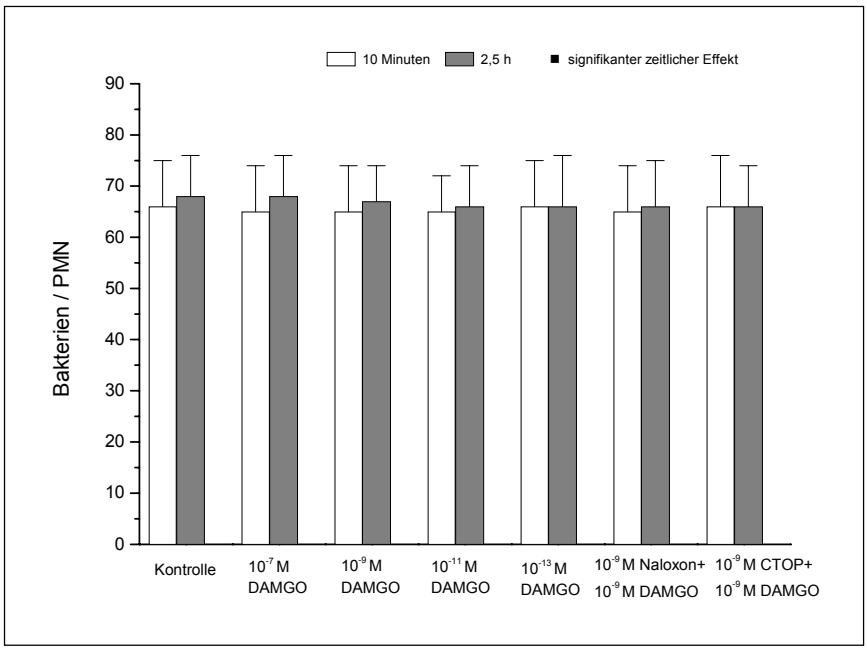

Abbildung 26: Phagozytoserate der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DAMGO-Konzentrationen

3.4.5 Oxidativer Burst

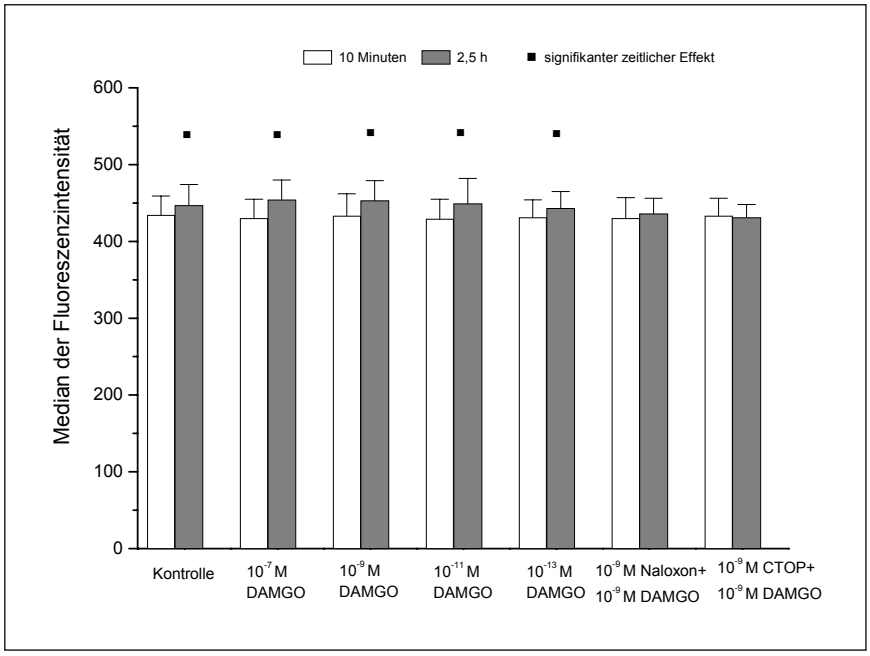

Abbildung 27: Oxidativer Burst der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DAMGO-Konzentrationen

3.5 β-Endorphin $_{1-31}$

3.5.1 CR 3 (CD 11b/CD 18-Expression)

Das Opioidpeptid β-Endorphin$_{1-31}$ stimulierte im Gegensatz zu Morphin konzentrationsabhängig die CR 3 (CD11b/CD18)-Expression neutrophiler Granulozyten (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Ein maximaler Effekt konnte nach 10 min Inkubation mit 10^{-7} M β-Endorphin$_{1-31}$ beobachtet werden.

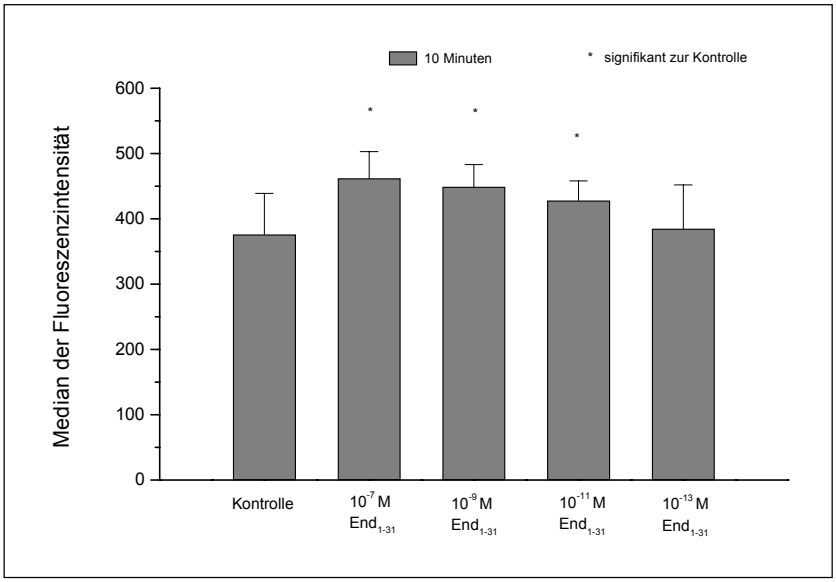

Abbildung 28: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{1-31}$-Konzentrationen

Die Vorinkubation mit Naloxon und dem selektiven δ-Opioidrezeptor-Antagonisten Naltrindol antagonisierte die stimulatorische β-Endorphin$_{1-31}$–Wirkung, während der selektive μ-Antagonist CTOP keinerlei Wirkung zeigte. Dies weist im Gegensatz zu den Morphin-Experimenten auf einen δ-Opioidrezeptor vermittelten Effekt hin. Auf eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 150 min wurde verzichtet, da Opioidpeptide durch Endopeptidasen nach ca. 15 min enzymatisch metabolisiert werden.

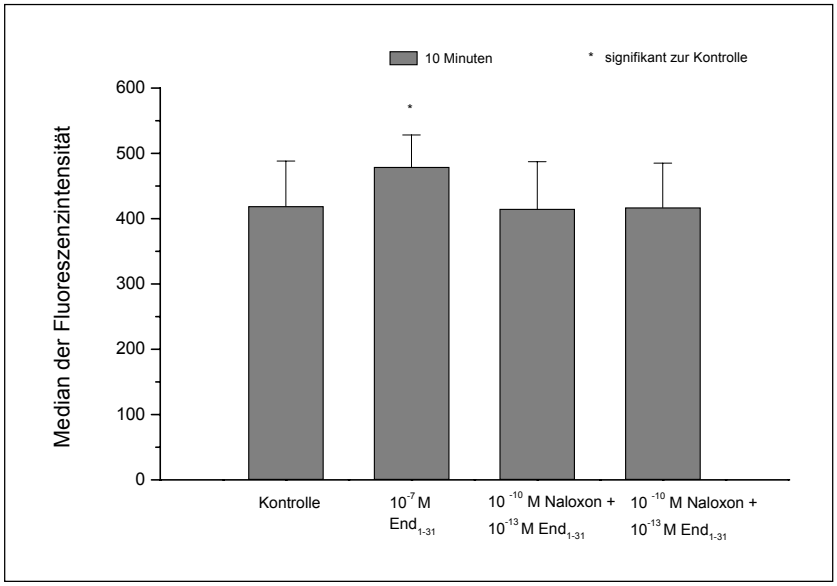

Abbildung 29: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die β-Endorphin $_{1-31}$-vermittelte Stimulation der CR 3 (CD 11b/CD 18)-Expression auf PMN

3.5.2 CD 16 Expression

Die CD 16-Expression neutrophiler Granulozyten wurde im Konzentrationsbereich von 10^{-7} bis 10^{-11} M durch β-Endorphin$_{1-31}$ signifikant gesteigert (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Eine maximale Zunahme der Fluoreszenzintensität um ca. 10 % wurde nach Inkubation mit 10^{-7} M β-Endorphin$_{1-31}$ gemessen. Diese Effekte erreichten aufgrund geringer Standardabweichungen das Signifikanzniveau, fraglich bleibt aber die klinische Relevanz dieser geringen Differenzen.

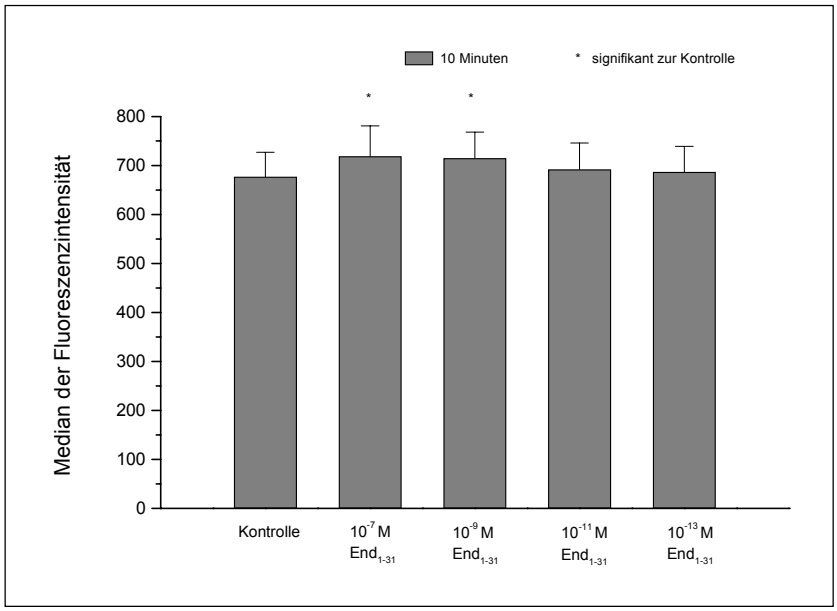

Abbildung 30: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{1-31}$-Konzentrationen

Die Vorinkubation mit Naloxon und dem selektiven δ-Opioidrezeptor-Antagonisten Naltrindol hob die stimulatorische β-Endorphin$_{1-31}$-Wirkung auf, CTOP blieb ebenfalls ohne Wirkung. Im Gegensatz zur Inkubation mit μ-Agonisten scheint die hier beobachtete Aktivitätszunahme der Granulozyten δ-Opioidrezeptor vermittelt zu sein.

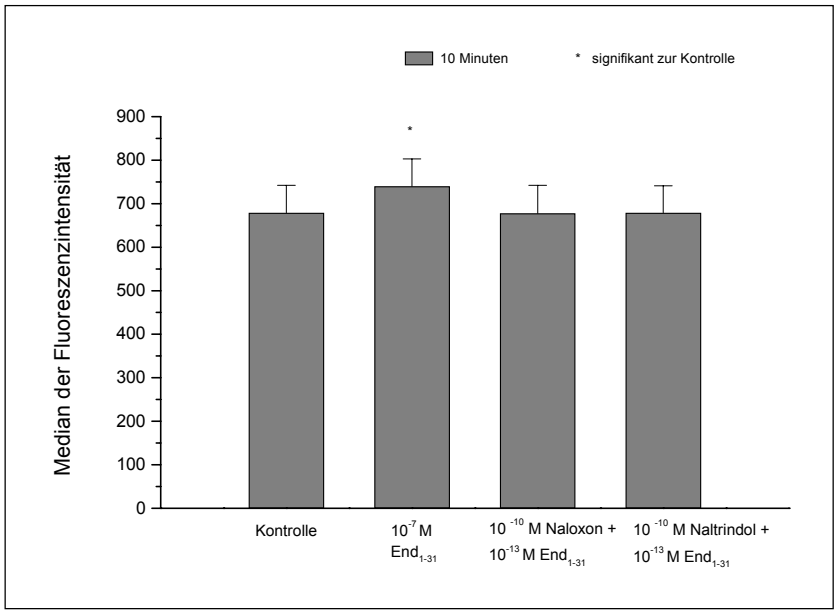

Abbildung 31: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die β-Endorphin $_{1-31}$-vermittelte Stimulation der CD 16-Expression auf PMN

3.5.3 CR 1 (CD 35)-Expression

β-Endorphin$_{1-31}$ erhöhte in dieser Studie signifikant die CR 1-Expression der neutrophilen Granulozyten (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Bereich von 10^{-7} bis 10^{-11} M wurde eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensität in einer Größenordnung von 10 % gemessen.

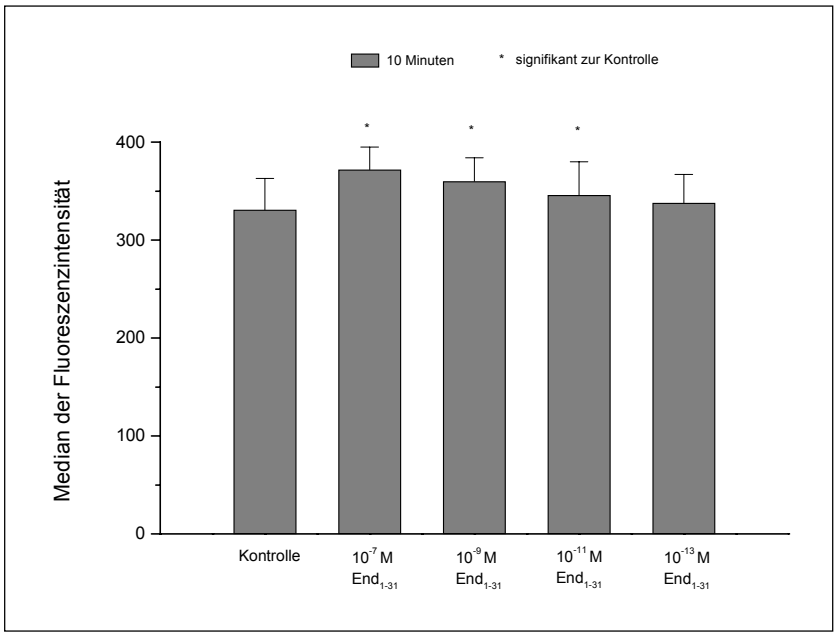

Abbildung 32: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1(CD 35) auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{1-31}$-Konzentrationen

Die stimulatorische β-Endorphin$_{1-31}$-Wirkung wurde durch Vorinkubation mit Naloxon und dem selektiven δ-Opioidrezeptor-Antagonisten Naltrindol antagonisiert, während die Inkubation mit CTOP wirkungslos blieb.

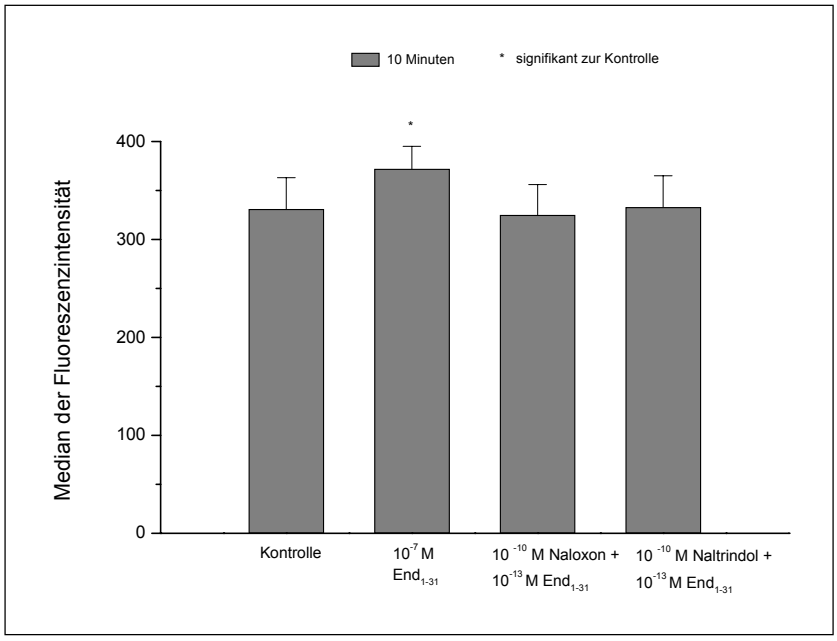

Abbildung 33: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die β-Endorphin $_{1-31}$-vermittelte Stimulation der CR1 (CD 35)-Expression auf PMN

3.5.4 Phagozytoseaktivität

Wie in der Abbildung dargestellt, wurde das Vollblut zunächst mit verschiedenen β-Endorphin$_{1-31}$-Konzentrationen inkubiert, und anschließend die Phagozytose mit vitalen FITC-markierten Staphylococcus aureus stimuliert (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Im Gegensatz zu der stimulatorischen β-Endorphin$_{1-31}$-Wirkung auf die Rezeptorexpression der Granulozyten reduzierte sich in diesem Assay die Phagozytoseaktivität im Konzentrationsbereich von 10^{-7} bis 10^{-9} M um ca. 10 %.

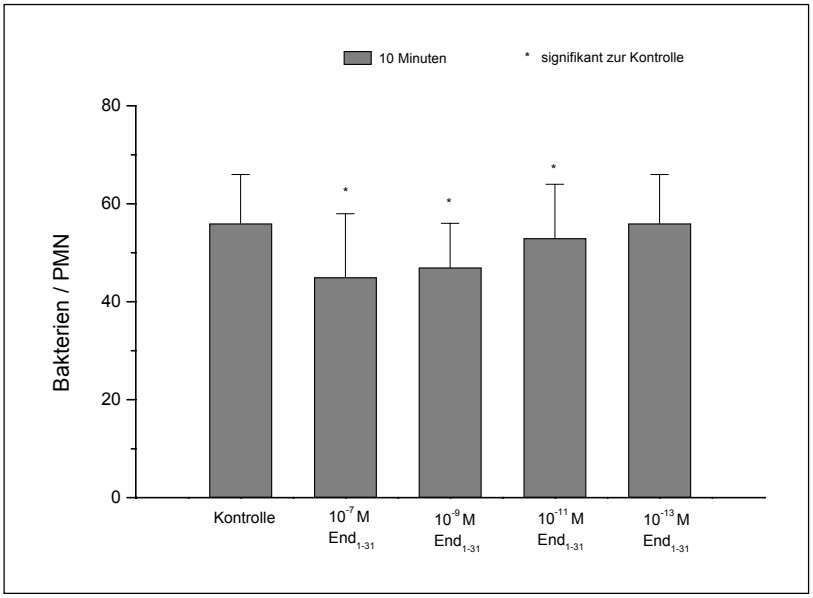

Abbildung 34: Phagozytoserate der PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{1-31}$-Konzentrationen und Phagozytosestimulation durch vitale Bakterien

Naloxon und der δ-Opioidrezeptor-Antagonisten Naltrindol antagonisierten diesen signifikanten Effekt.

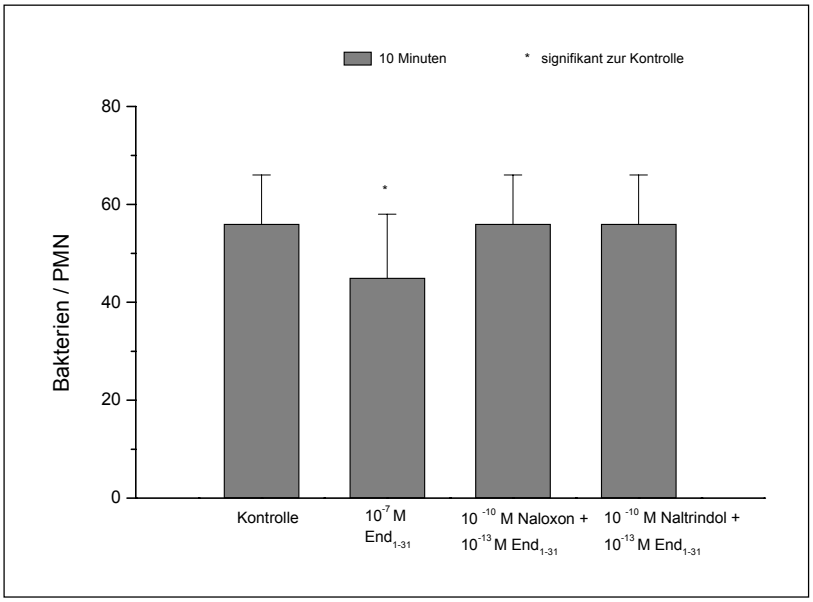

Abbildung 35: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die β-Endorphin $_{1-31}$-vermittelte Inhibierung der Phagozytoseaktivität nach Inkubation mit vitalen Bakterien

Um den Widerspruch zwischen einer Zunahme der Komplement- und Fc-Rezeptorexpression, aber der gleichzeitigen Reduktion der Phagozytoseaktivität zu untersuchen, wurden in einem weiteren Experiment thermisch abgetötete FITC-markierte Staphylococcus aureus zur Phagozytosestimulation eingesetzt (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). In diesen Versuchen ergab sich eine im Vergleich zur Rezeptorexpression quantitativ ähnliche Steigerung der Phagozytoseaktivität um ca. 10 % mit einem maximalen Effekt nach Inkubation mit 10^{-7} M β-Endorphin$_{1-31}$.

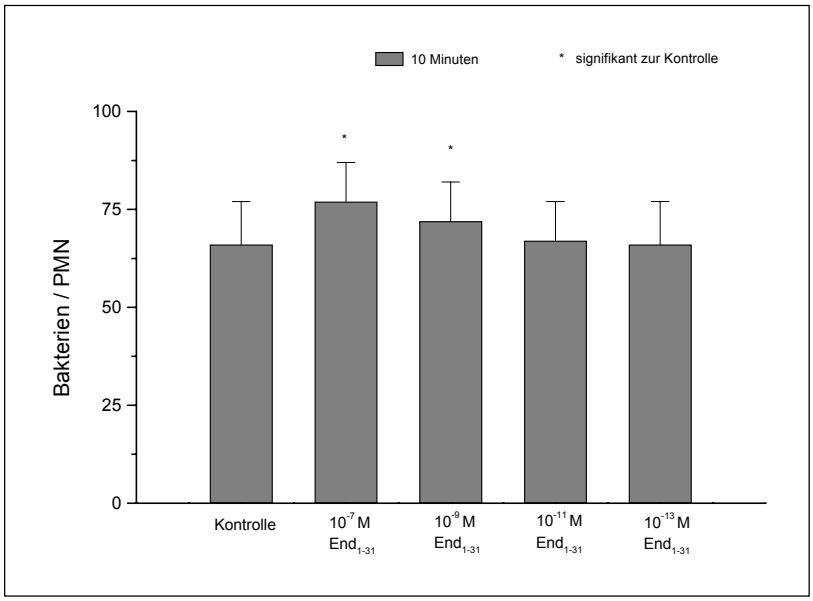

Abbildung 36: Phagozytoserate der PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{1-31}$-Konzentrationen und Phagozytosestimulation durch nicht-vitale Bakterien

Die Opioidwirkung konnte durch Vorinkubation mit Naloxon und Naltrindol antagonisiert werden. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass vitale Staphylococcus aureus über Bindungsstellen für β-Endorphin$_{1-31}$ verfügen. Diese Bindung scheint die Phagozytose des Bakteriums zu erschweren.

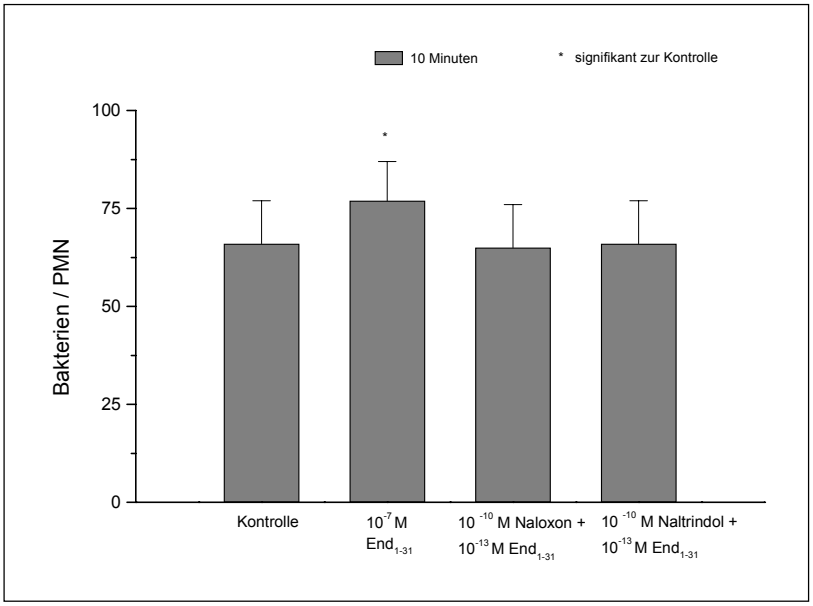

Abbildung 37: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die β-Endorphin $_{1-31}$-vermittelte Stimulation der Phagozytoseaktivität nach Inkubation mit nicht-vitalen Bakterien

3.5.5 Oxidativer Burst

Ähnlich wie bei der Bestimmung der Phgozytoseaktivität zeigte sich bei Messung des Oxidativen Burst ein Unterschied zwischen der Stimulation mit vitalen oder thermisch abgetöteten Bakterien (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Inkubation mit 10^{-7} M β-Endorphin$_{1-31}$ führte bei Stimulation mit vitalen Bakterien zur Reduktion des Oxidativen Burst um ca. 10 %.

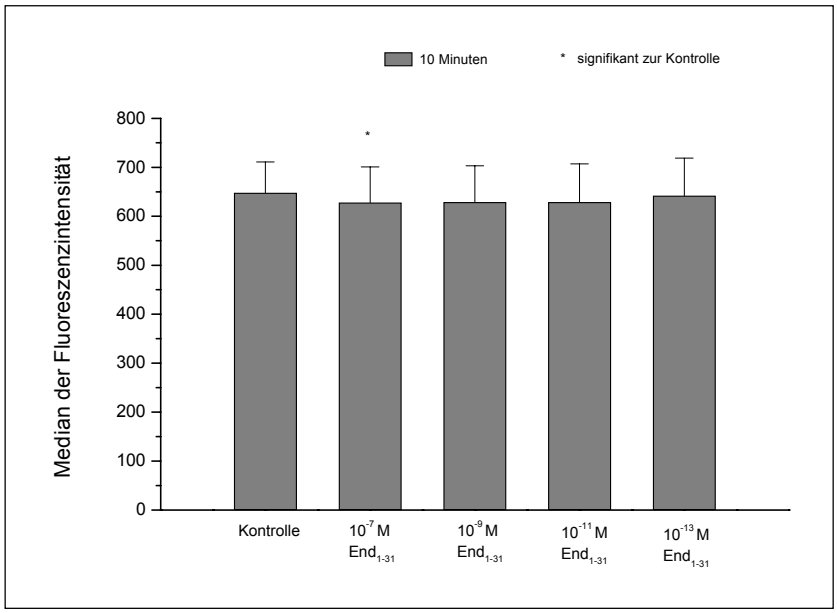

Abbildung 38: Oxidativer Burst der PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{1-31}$-Konzentrationen und Phagozytosestimulation durch vitale Bakterien

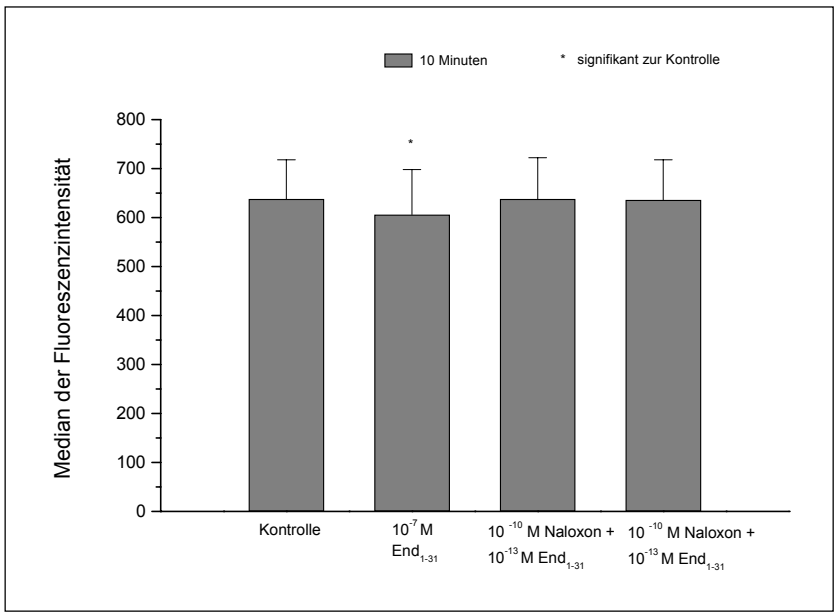

Abbildung 39: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die β-Endorphin $_{1-31}$-vermittelte Inhibierung der Oxidativen Burst nach Inkubation mit vitalen Bakterien

Thermisch abgetötete Staphylococcus aureus verlieren offensichtlich die Bindungsstellen für β-Endorphin$_{1-31}$, denn in Experimenten mit diesen Bakterien zeigte sich eine konzentrationsahhängige signifikante Stimulation des Oxidativen Burst. Die Effekte waren Naloxon- und Naltrindol-reversibel, was auf eine δ-Opioidrezeptor vermittelte Wirkung deutet.

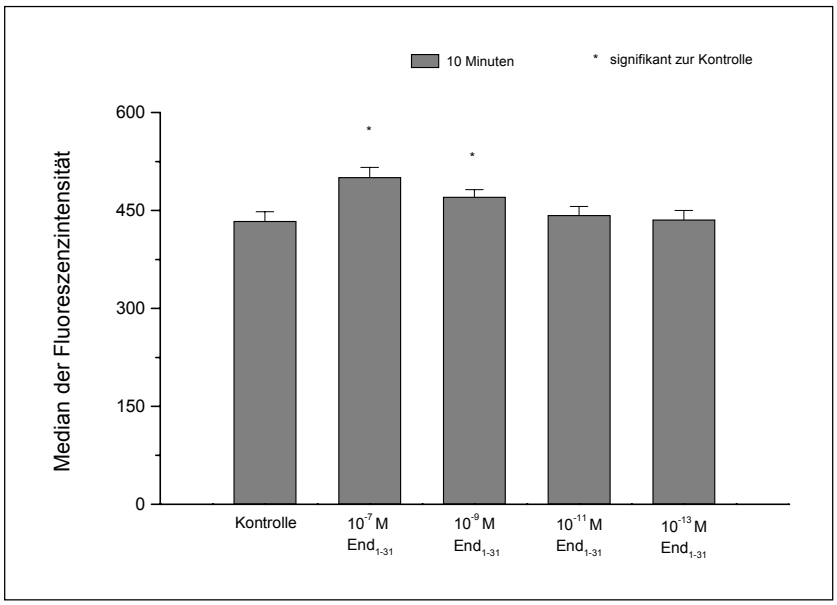

Abbildung 40: Oxidativer Burst der PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{1-31}$-Konzentrationen und Phagozytosestimulation durch nicht-vitale Bakterien

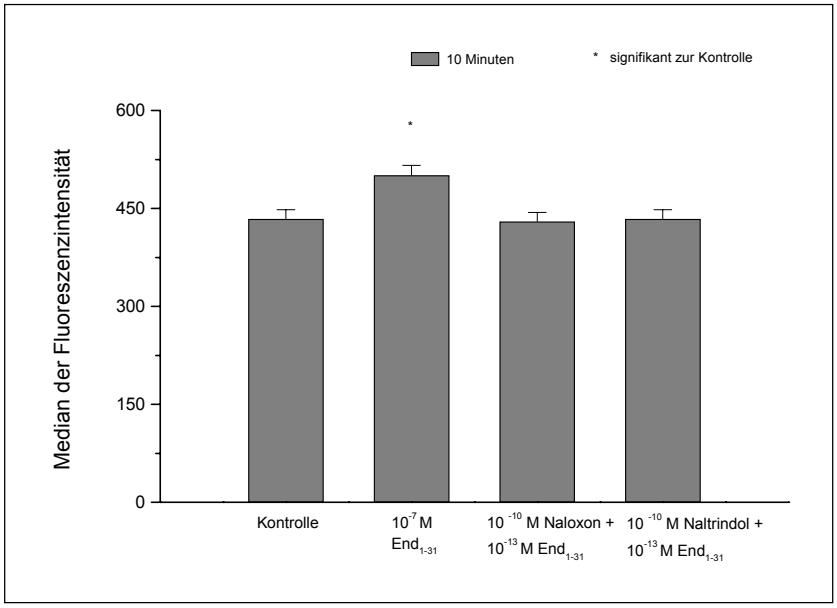

Abbildung 41: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die β-Endorphin $_{1-31}$-vermittelte Inhibierung der Oxidativen Burst nach Inkubation mit nicht-vitalen Bakterien

3.6 β-Endorphin$_{27-31}$

3.6.1 CR 3 (CD 11b/CD 18-Expression)

Wir konnten zeigen, dass β-Endorphin$_{1-31}$ die Funktion neutrophiler Granulozyten moduliert. Unklar blieb aber, welche Seite des Moleküls an die Granulozytenoberfläche bindet, denn granulozytäre Opioidpeptide besitzen einen N- sowie einen C-Terminus. Um dies zu differenzieren, wurde das C-terminale Fragment β-Endorphin$_{27-31}$ im Vollblut inkubiert (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). β-Endorphin$_{27-31}$ veränderte im Konzentrationsbereich von 10^{-7} bis 10^{-13} M weder die Komplement- und Fc-Expression neutrophiler Granulozyten, noch die Phagozytoseaktivität oder den Oxidativen Burst. Dies deutet darauf hin, dass die granulozytäre Bindung des Gesamtpeptids β-Endorphin$_{1-31}$ wahrscheinlich über den N-Terminus vermittelt wird.

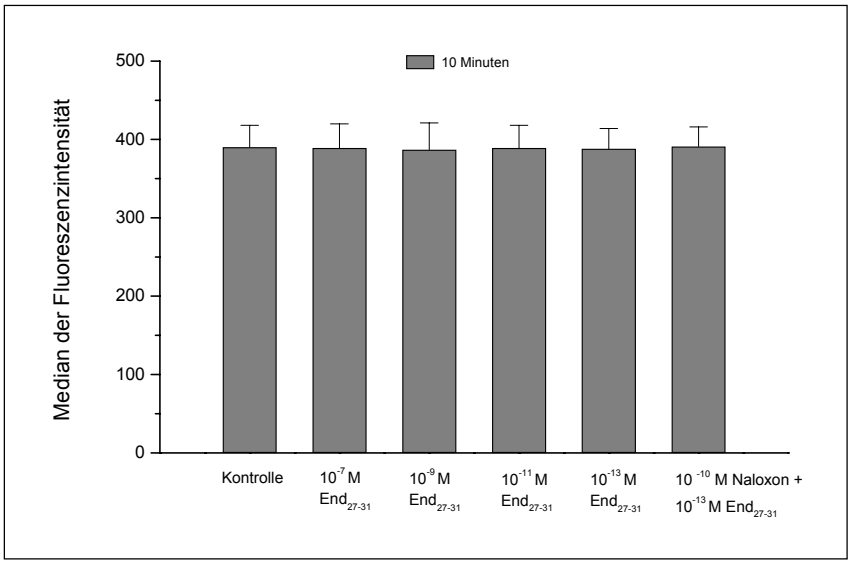

Abbildung 42: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{27-31}$-Konzentrationen

3.6.2 CD-16-Expression

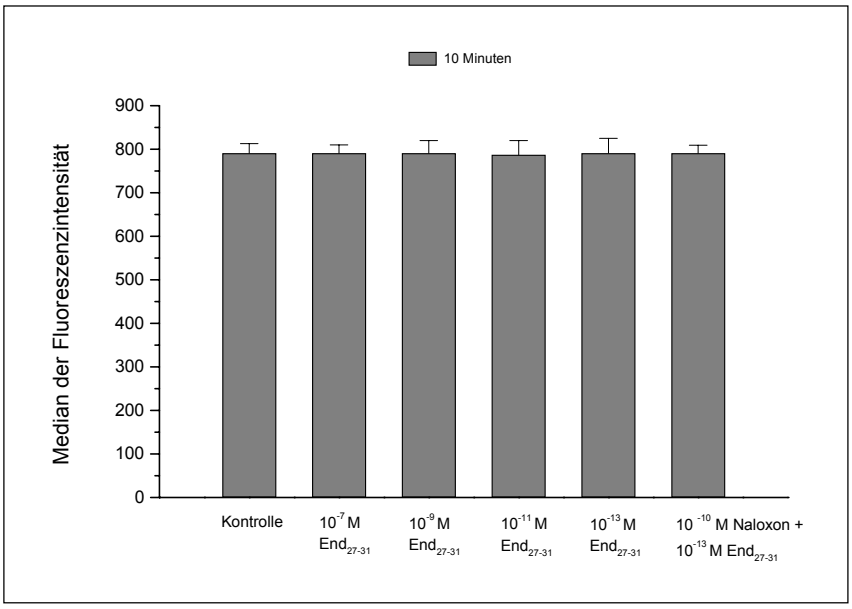

Abbildung 43: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{27\text{-}31}$-Konzentrationen

3.6.3 CR 1 (CD 35)-Expression

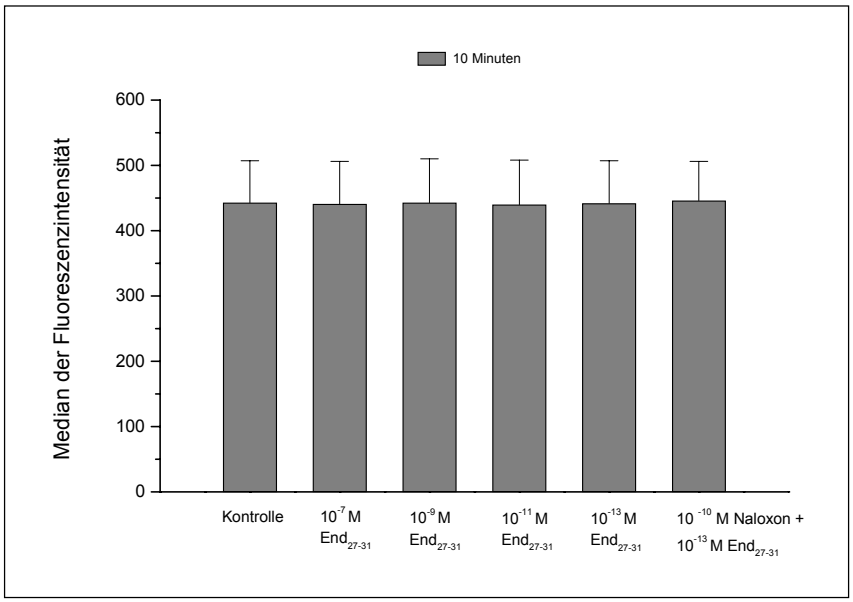

Abbildung 44: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1(CD 35) auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{27\text{-}31}$-Konzentrationen

3.6.4 Phagozytoseaktivität

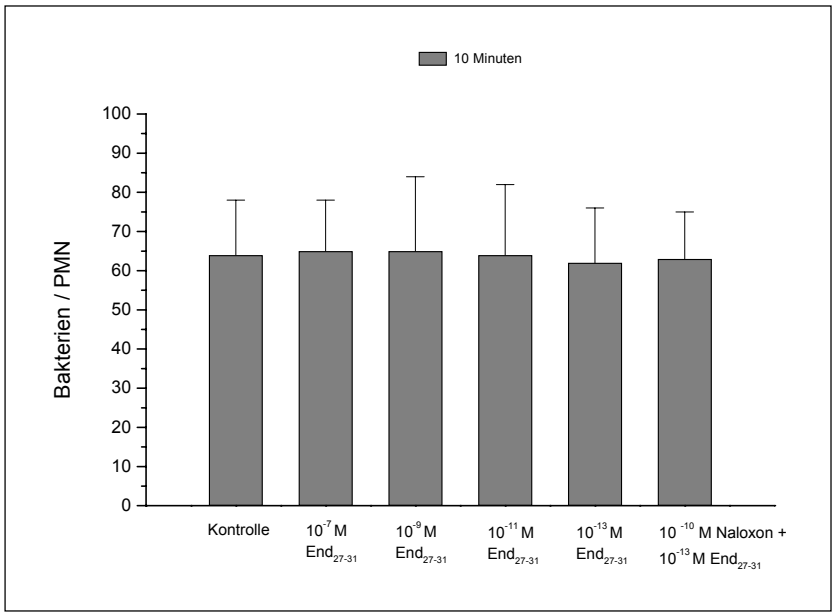

Abbildung 45: Phagozytoserate der PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{27\text{-}31}$-Konzentrationen

3.6.5 Oxidativer Burst

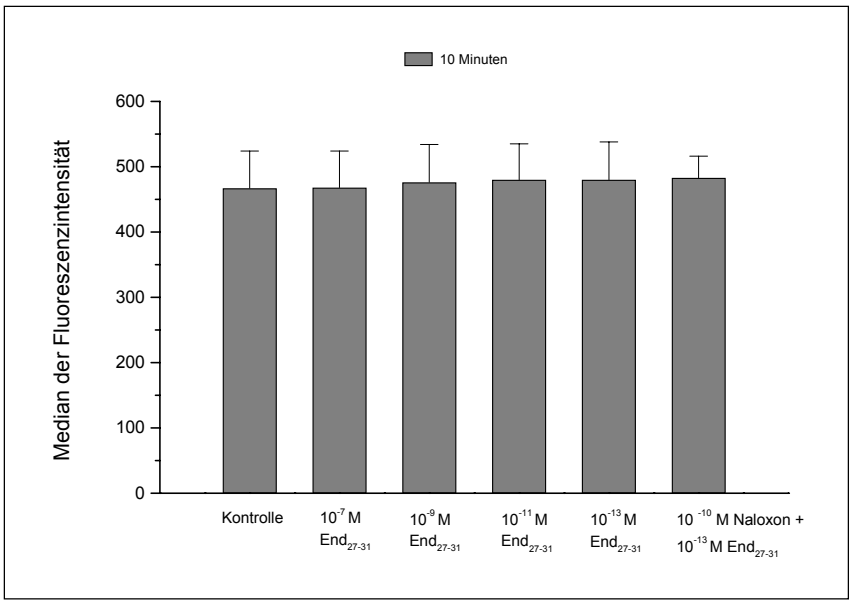

Abbildung 46: Oxidativer Burst der PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{27\text{-}31}$-Konzentrationen

3.7 Met-Enkephalin

3.7.1 CR 3 (CD 11b/CD 18-Expression)

Das C-terminale Fragment β-Endorphin$_{27-31}$ blieb in der vorliegenden Studie ohne Wirkung auf die Funktion neutrophiler Granulozyten. Um die Vermutung zu bestäigen, dass die beobachteten Effekte des Gesamtpeptids β-Endorphin$_{1-31}$ über den N-Terminus vermittelt wurden, inkubierten wir das Vollblut mit dem Opioidpeptid Met-Enkephalin, das dem N-Terminus des Gesamtmoleküls entspricht.

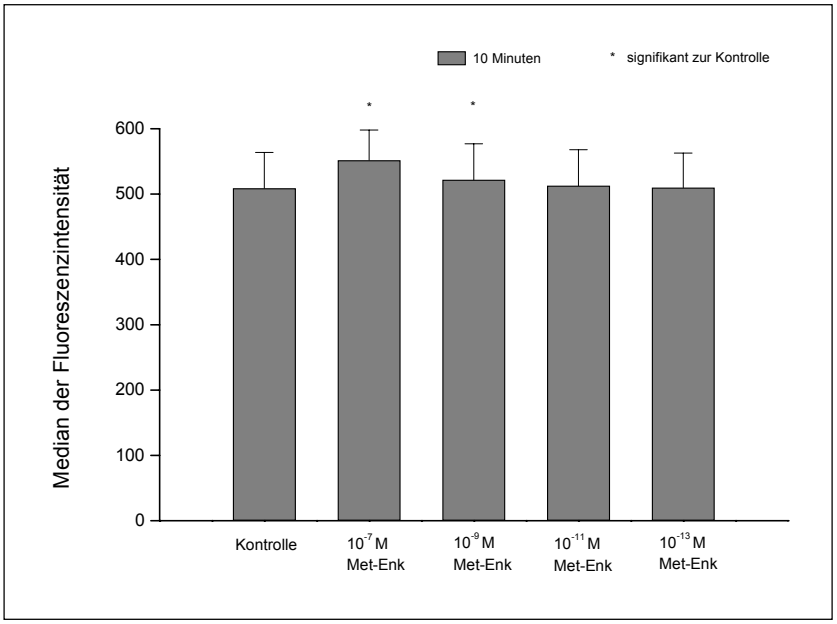

Abbildung 47: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen Met-Enkephalin-Konzentrationen

Met-Enkephalin stimulierte ähnlich wie β-Endorphin$_{1-31}$ konzentrationsabhängig die CR 3 (CD 11b/CD 18)-Expression neutrophiler Granulozyten (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Dieser Effekt war Naloxon und Naltrindol reversibel, was auf eine δ-Opioidrezeptor vermittelte Wirkung hinweist.

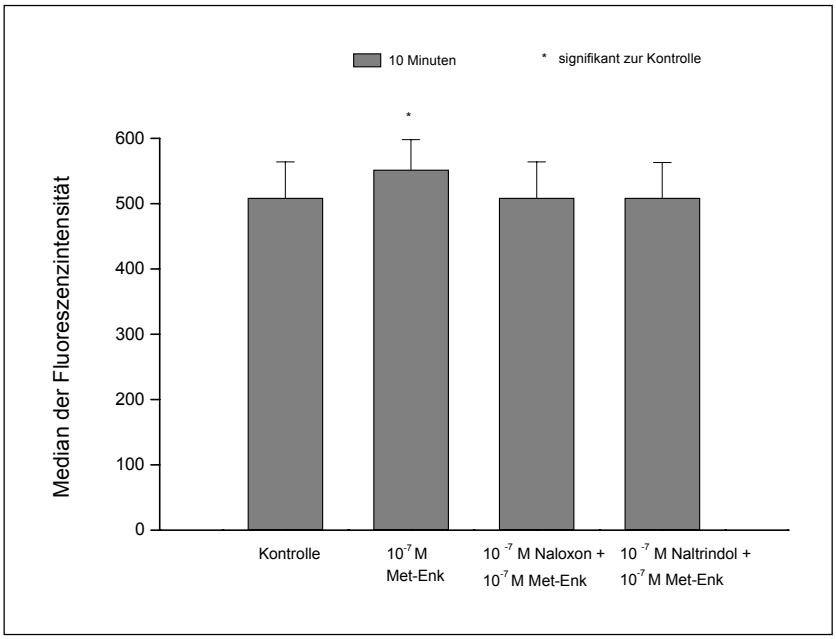

Abbildung 48: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die Met-Enkephalin vermittelte Stimulation der CR 3 (CD 11b/CD 18)-Expression

3.7.2 CD 16-Expression

Die CD 16-Expression neutrophiler Granulozyten wurde durch die Inkubation mit Met-Enkephalin signifikant gesteigert (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Quantitativ lag nach 10 min Inkubation mit 10^{-7} M Met-Enkephalin die maximale Erhöhung der Fluoreszenz bei ca. 10% im Vergleich zur Kontrolle.

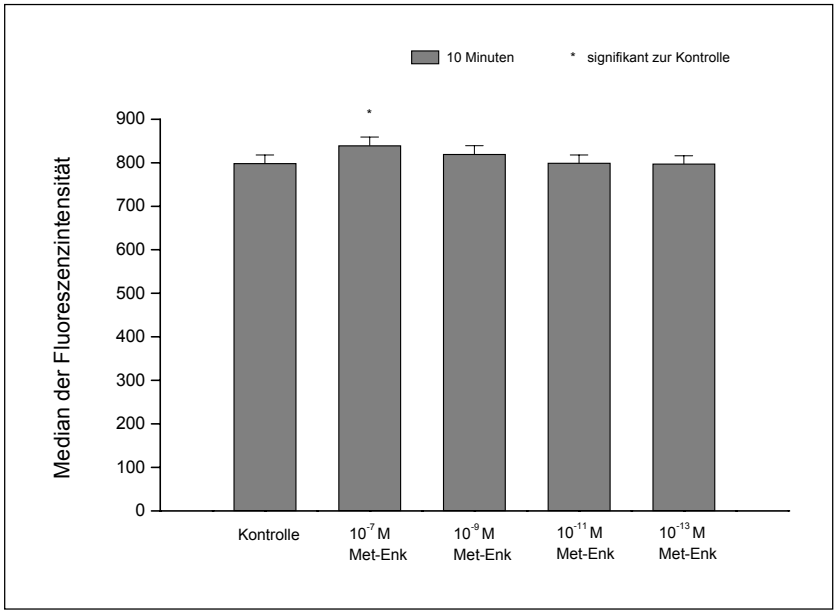

Abbildung 49: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen Met-Enkephalin-Konzentrationen

Die klinische Relevanz dieses Befundes erscheint trotz Signifikanz der Ergebnisse aber fraglich. Auf eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 150 min wurde verzichtet, da Opioidpeptide durch Endopeptidasen nach ca. 15 min enzymatisch metabolisiert werden. Der selektive δ-Opioidrezeptor-Antagonist Naltrindol und das unspezifische Naloxon antagonisierten diesen Effekt, was auf eine δ-Opioidrezeptor vermittelte Wirkung hinweist.

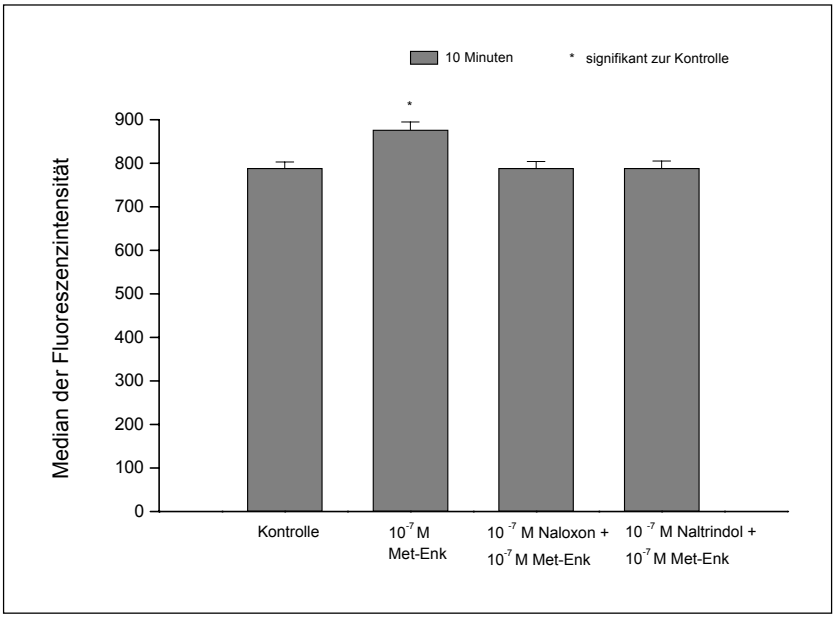

Abbildung 50: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die Met-Enkephalin vermittelte Stimulation der CD 16-Expression

3.7.3 CR 1 (CD 35)-Expression

Die Expression des Komplementrezeptors CR 1(CD 35) wurde ähnlich wie die CR 3 und CD 16 durch Inkubation mit Met-Enkephalin im Konzentrationsbereich von 10^{-7} bis 10^{-11} M signifikant gesteigert (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung).

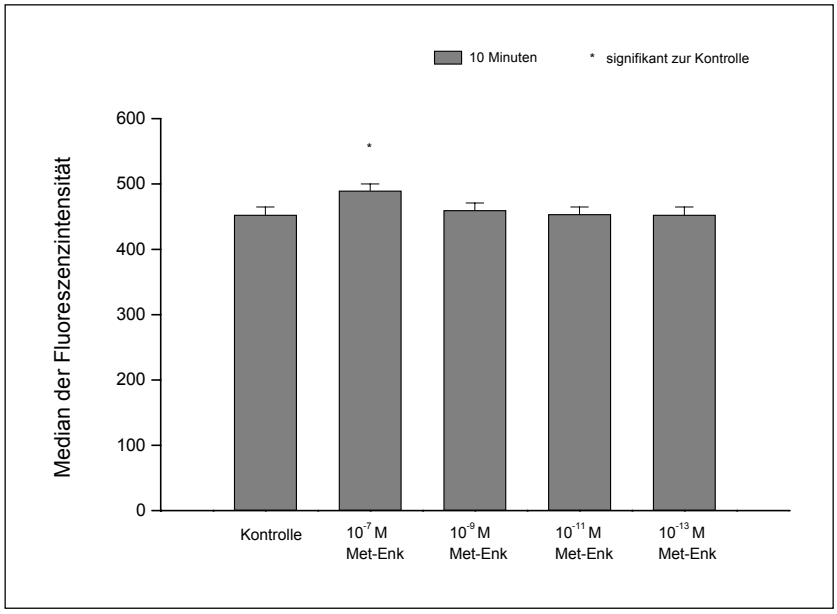

Abbildung 51: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1(CD 35) auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen Met-Enkephalin-Konzentrationen

Allerdings erscheint hier die klinische Relevanz dieses Befundes trotz Signifikanz der Ergebnisse fraglich, da die Steigerung der Fluoreszenzintensität nur ca. 10 % betrug. Die stimulatorischen Effekte waren Naloxon und Naltrindol reversibel, was ähnlich wie bei den anderen Membranrezeptoren auf eine δ-Opioidrezeptor vermittelte Wirkung hinweist.

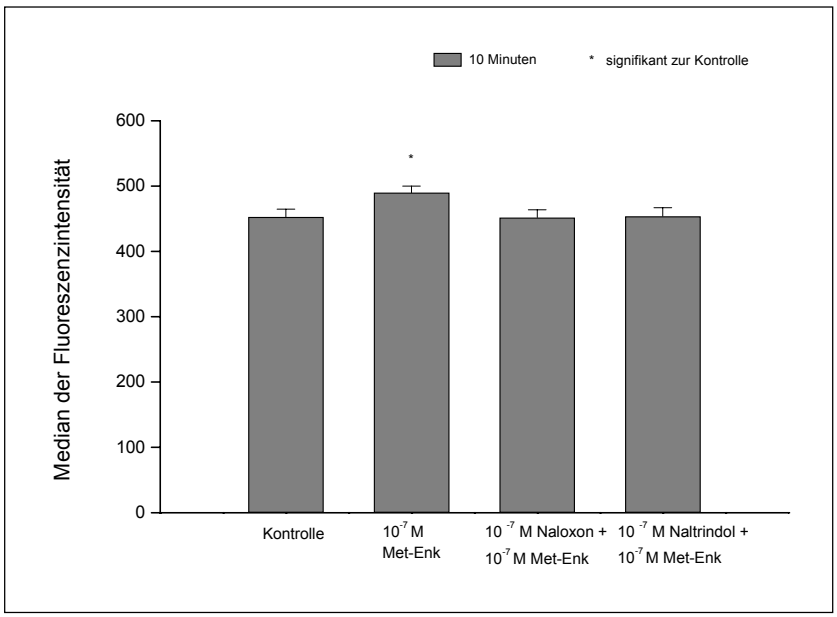

Abbildung 52: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die Met-Enkephalin vermittelte Stimulation der CR 1 (CD 35)-Expression

3.7.4 Phagozytoseaktivität

Im Gegensatz zur Inkubation mit β-Endorphin$_{1-31}$ zeigten sich nach Inkubation mit Met-Enkephalin homogene Ergebnisse (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Met-Enkephalin stimulierte konzentrationsabhängig die Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten, mit einem maximalen Effekt bei 10^{-7} M.

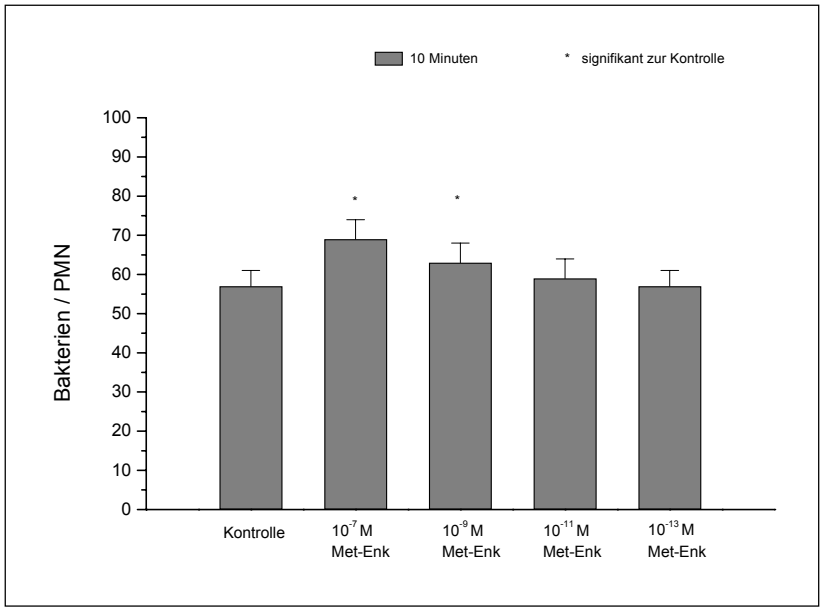

Abbildung 53: Phagozytoserate der PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen Met-Enkephalin-Konzentrationen

Die Stimulation war durch Naloxon und Naltrindol antagonisierbar, was auf eine δ-Opioidrezeptor vermittelte Wirkung hinweist. Vitale Staphylococcus aureus besitzen offensichtlich keine Bindungsstelle für Met-Enkephalin.

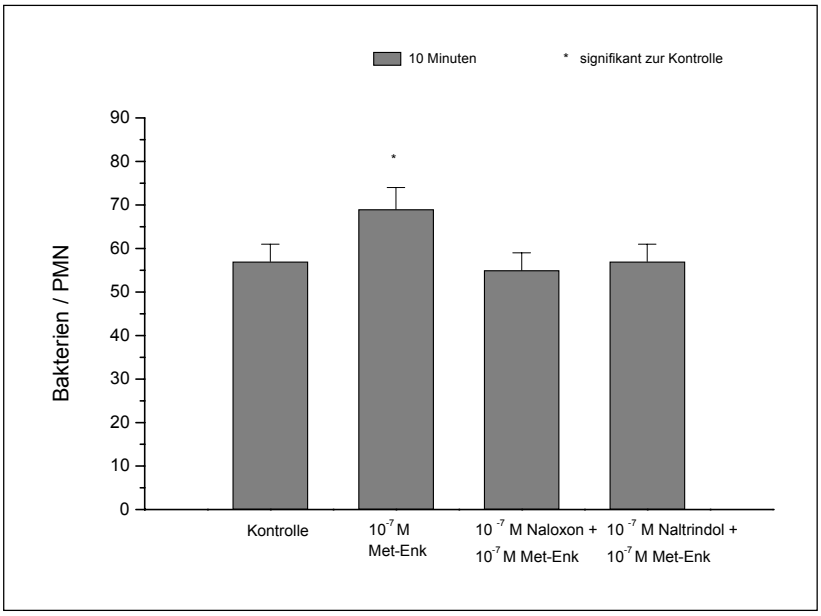

Abbildung 54: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die Met-Enkephalin vermittelte Stimulation der Phagozytoseaktivität

3.7.5 Oxidativer Burst

Der Oxidative Burst wurde durch Inkubation mit Met-Enkephalin konzentrationsabhängig gesteigert, mit einem maximalen Effekt bei 10^{-7} M, was im Einklang mit den Resultaten der Komplementrezeptorexpression und der Phagozytoseaktivität steht.

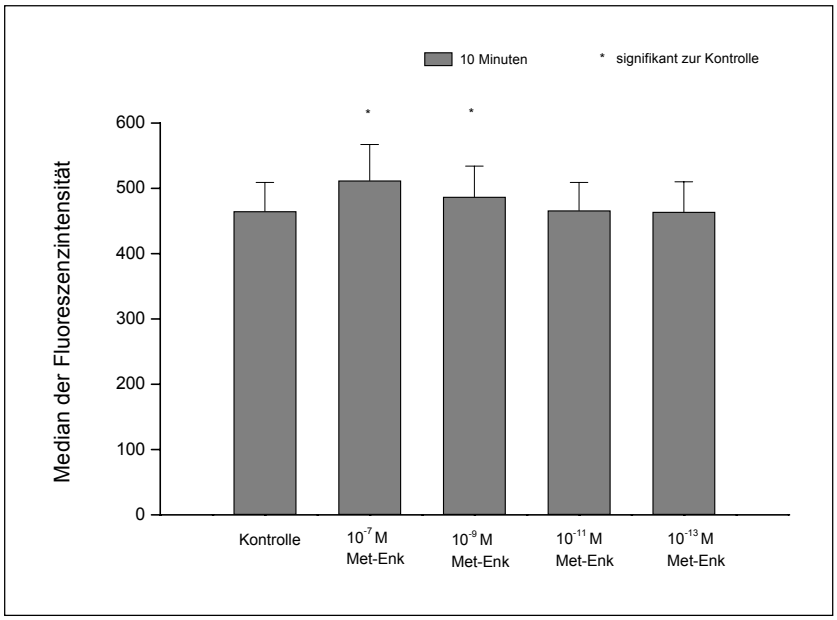

Abbildung 55: Oxidativer Burst der PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen Met-Enkephalin Konzentrationen

Die stimulatorischen Opioideffekte waren durch Naloxon und Naltrindol antagonisierbar, was auf eine δ-Opioidrezeptor vermittelte Wirkung hinweist. Die Ergebnisse der Met-Enkephalin Experimente deuten darauf hin, dass der N-Terminus des Opioidpeptids β-Endorphin$_{1-31}$ für die stimulatorische Wirkung auf neutrophile Granulozyten verantwortlich ist.

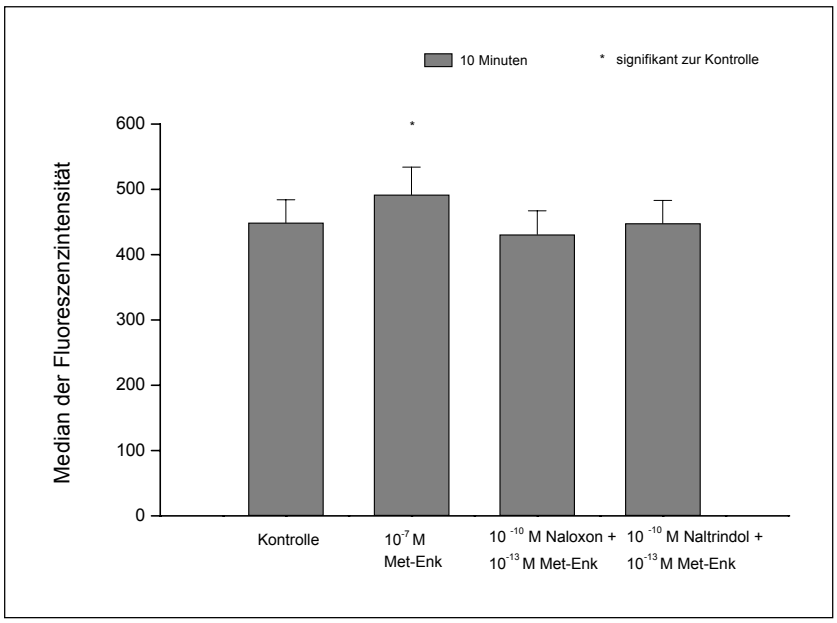

Abbildung 56: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die Met-Enkephalin vermittelte Stimulation des Oxidativen Burst

3.8 DADLE

3.8.1 CR 3 (CD 11b/CD 18-Expression)

Die Experimente der vorliegenden Studie mit β-Endorphin$_{1-31}$ weisen auf eine δ-Rezeptor vermittelte stimulatorische Wirkung dieses Opioidpeptids hin. Zur Klärung dieser Hypothese wurden die selektiven δ-Opioidrezeptoragonisten DADLE und DPDPE im Vollblut inkubiert (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Ausgeprägter als nach Inkubation mit endogenen Opioidpeptiden steigerte DADLE zeit- und konzentrationsabhängig die CR 3 (CD 11b/CD18)-Expression neutrophiler Granulozyten. Bereits nach 10 min steigerte 10^{-7} M DADLE die CR 3-Expression um ca. 25 %, eine maximale Erhöhung wurde in dieser Konzentration nach 150 min erreicht. Hier ergab sich eine Erhöhung der Komplementrezeptorexpression um rund 30 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Verlängerung der Inkubationszeiten auf 150 min erschien bei synthetischen Opioidpeptiden als sinnvoll, da diese im Gegensatz zu endogenen Opioidpeptiden nicht enzymatisch metabolisiert werden.

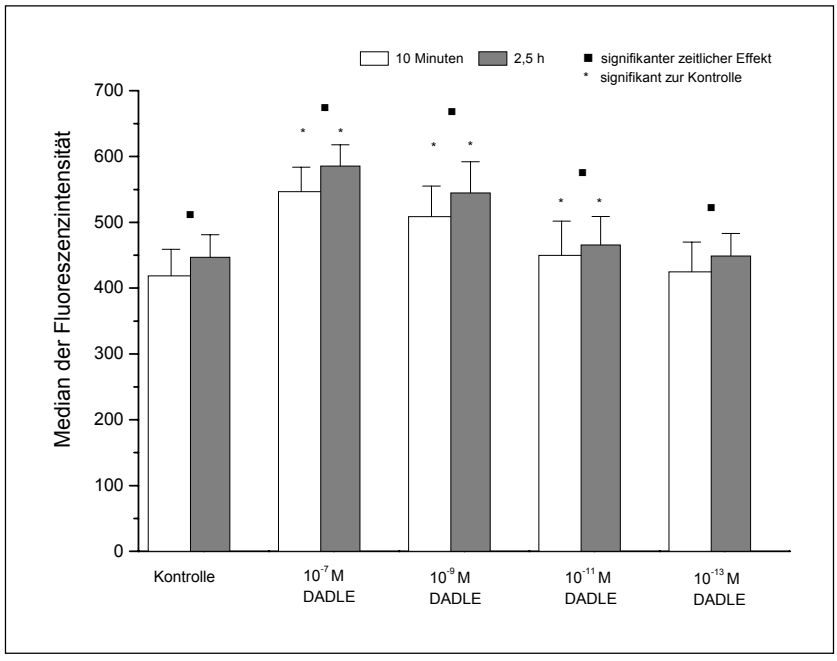

Abbildung 57: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DADLE-Konzentrationen

Die beobachteten deutlichen DADLE-Effekte wurden durch Vorinkubation mit Naloxon und dem selektiven δ-Opioidrezeptorantagonisten Naltrindol aufgehoben. Im Gegensatz dazu beeinflusste der selektive μ-Antagonist CTOP die Stimulation der CR 3-Expression in keiner Weise. Diese Beobachtungen deuten auf die Existenz eines granulozytären δ-Opioidrezeptors hin, über den Opioidpeptide eine stimulatorische Wirkung auf Granulozyten vermitteln.

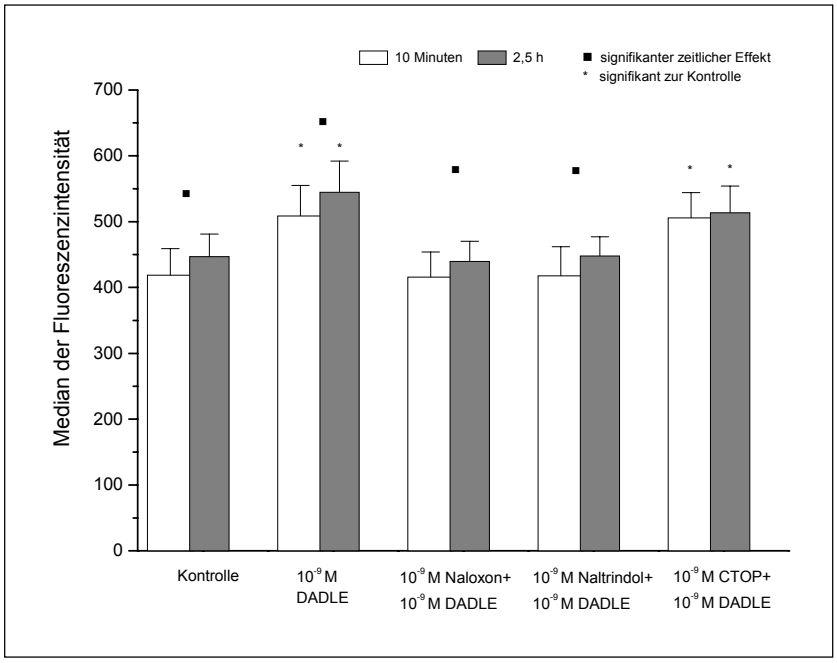

Abbildung 58: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) nach Vorinkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP

3.8.2 CD 16-Expression

Die Expression des Fc-Rezeptors CD 16 wurde durch Inkubation mit DADLE zeit-und konzentrationsabhängig stimuliert (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Im Konzentrationsbereich von 10^{-7} bis 10^{-11} M wurde das Signifikanzniveau ($p < 0,05$) erreicht. Durch Verlängerung der Inkubationszeit auf 150 min zeigte sich eine Steigerung der Rezeptorexpression um ca. 10 %. Sogar in einer Konzentration von 10^{-11} M erhöhte DADLE die granulozytäre CD 16-Expression um 10 %.

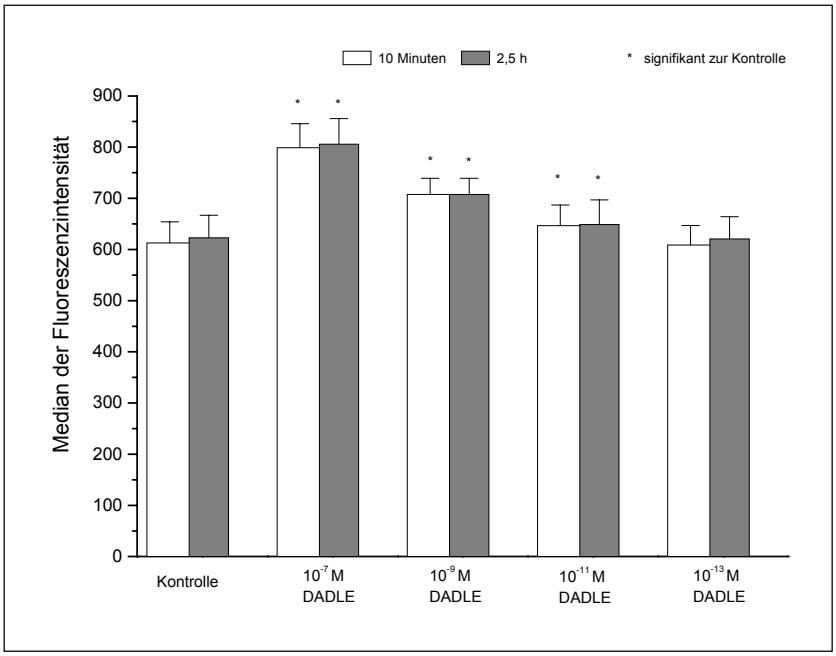

Abbildung 59: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DADLE-Konzentrationen

Die beobachteten DADLE-Effekte wurden durch Vorinkubation mit Naloxon und dem selektiven δ-Opioidrezeptorantagonisten Naltrindol aufgehoben, während CTOP ohne Wirkung blieb.

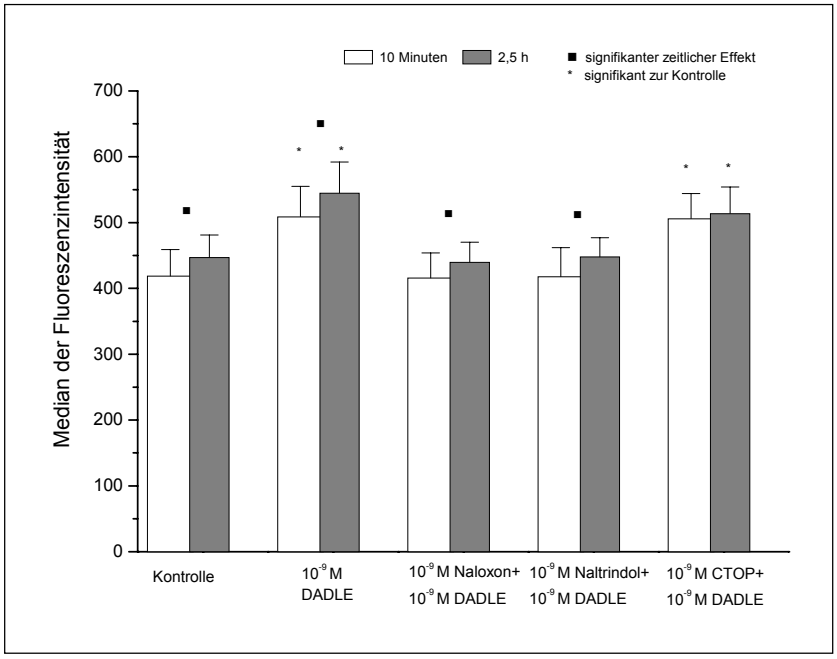

Abbildung 60: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 nach Vorinkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP

3.8.3 CR 1 (CD 35)-Expression

Die granulozytäre CR 1-Expression wurde in ähnlichem Maße wie CR 3 und CD 16 stimuliert (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Die maximale Steigerung der Rezeptorexpression lag bei rund 20 % nach Inkubation mit 10^{-7} M DADLE.

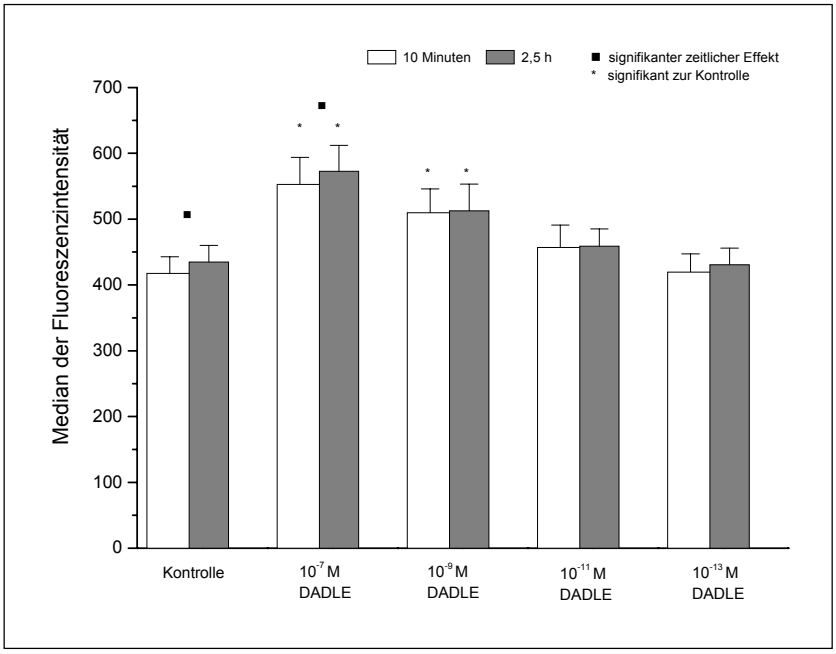

Abbildung 61: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1(CD 35) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DADLE-Konzentrationen

Naloxon und Naltrindol antagonisierten diesen Effekt. Somit ergab sich auch für diesen Parameter die Vermutung, dass die DADLE-Effekte über einen δ-Opioidrezeptor vermittelt werden.

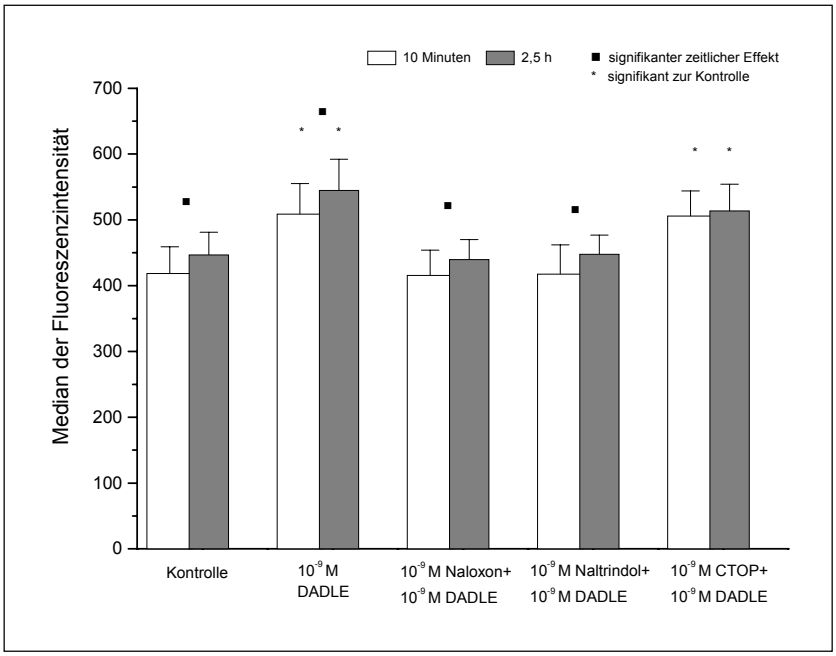

Abbildung 62: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1 (CD 35) nach Vorinkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP

3.8.4 Phagozytoseaktivität

Die Phagozytoseaktivität der Granulozyten wurde durch DADLE zeit- und konzentrationsabhängig gesteigert mit einem Maximum bei 10^{-7} M (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Dabei erhöhte sich die Phagozytoseaktivität von 59 auf 76 Bakterien/Granulozyt, also um ca. 25 %.

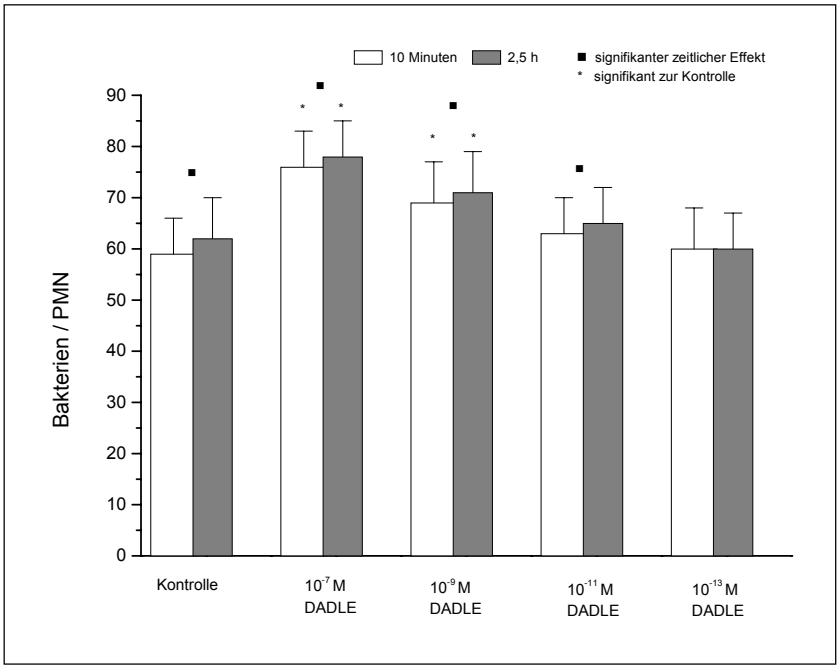

Abbildung 63: Phagozytoserate der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DADLE-Konzentrationen

Die Inkubation mit Naloxon und Naltrindol führte zur Aufhebung der Stimulation, während der selektive μ-Antagonist CTOP wirkungslos blieb.

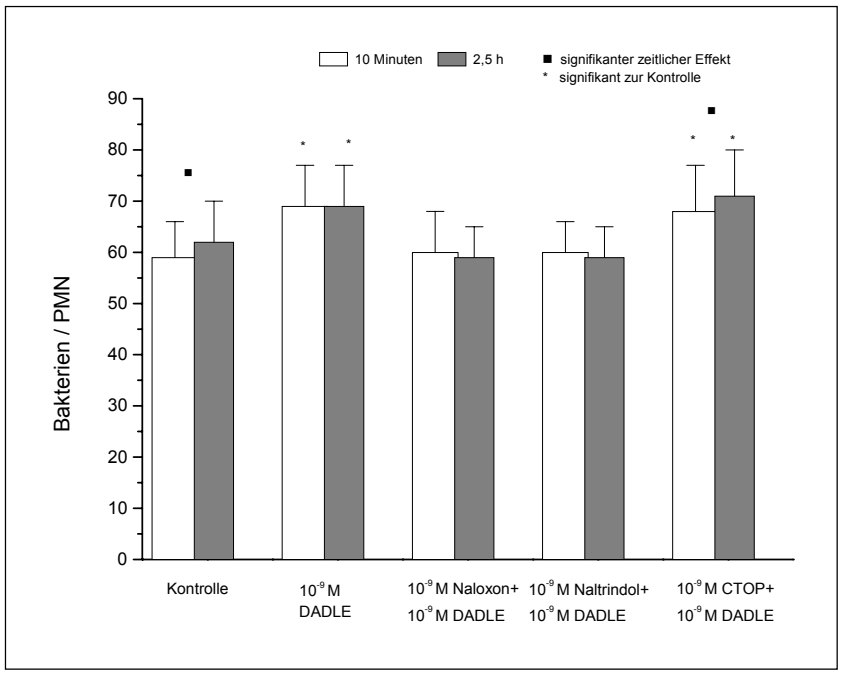

Abbildung 64: Phagozytoserate der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP

3.8.5 Oxidativer Burst

Ähnlich wie die Phagozytoseaktivität wurde auch der Oxidative Burst durch die Inkubation mit dem synthetischen Opioidpeptid DADLE zeit- und konzentrationsabhängig gesteigert (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Das Signifikanzniveau wurde im Konzentrationsbereich von 10^{-7} bis 10^{-11} M erreicht. Die Fluoreszenzintensität wurde um ca. 25 % von 433 auf 620 bei Inkubation mit 10^{-7} M DADLE erhöht.

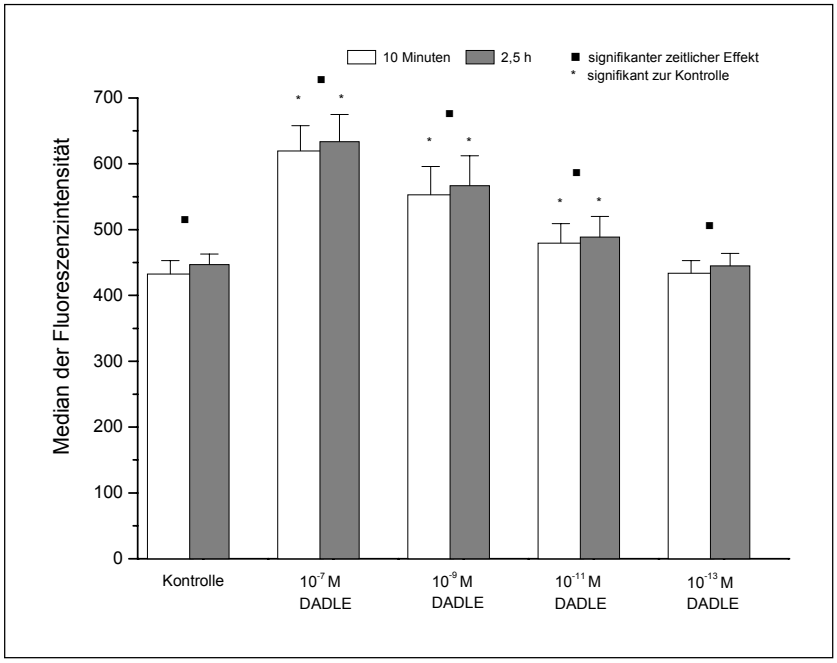

Abbildung 65: Oxidativer Burst der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DADLE-Konzentrationen

Die Vorinkubation mit Naloxon und Naltrindol antagonisierte diesen Effekt, was auf eine δ-Opioidrezeptor vermittelte Wirkung deutet.

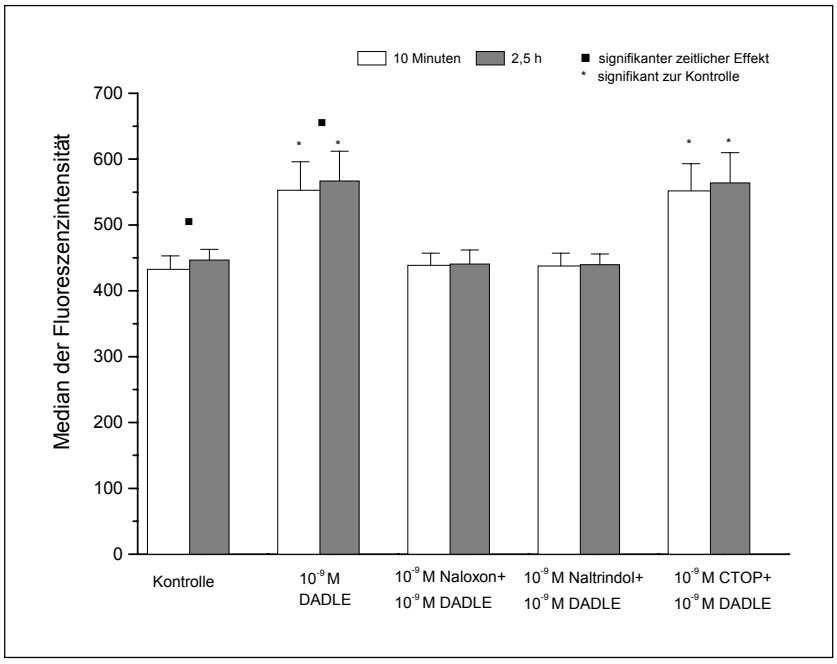

Abbildung 66: Oxidativer Burst der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP

3.9 DPDPE

3.9.1 CR 3 (CD 11b/CD 18-Expression)

DPDPE und DADLE sind selektive δ-Opioidrezeptoragonisten. Ähnlich wie beim oben erwähnten DADLE, steigerte DPDPE zeit- und konzentrationsabhängig die Expression des Komplementrezeptors CR 3 (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Die Effekte waren quantitativ ähnlich wie bei der Inkubation mit DADLE. So steigerte die Inkubation mit 10^{-7} M DPDPE die Rezeptorexpression nach 150 min Inkubation maximal um ca. 22 %. Eine signifikante Stimulation wurde bis zu einer Konzentration von 10^{-11} M DPDPE gemessen.

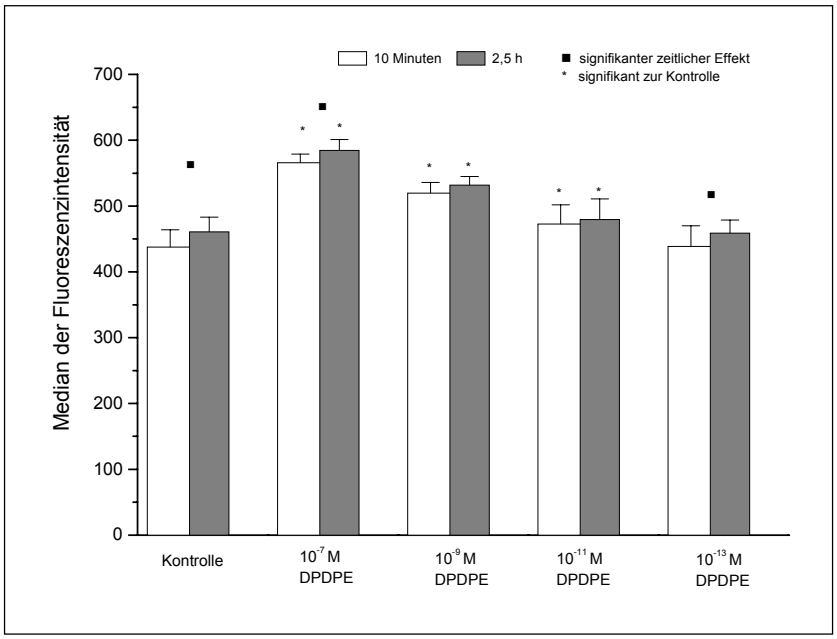

Abbildung 67: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DPDPE-Konzentrationen

Die Vorinkubation mit Naloxon und dem δ-selektiven Naltrindol antagonisierte die vermehrte Rezeptorexpression, während CTOP wirkungslos blieb.

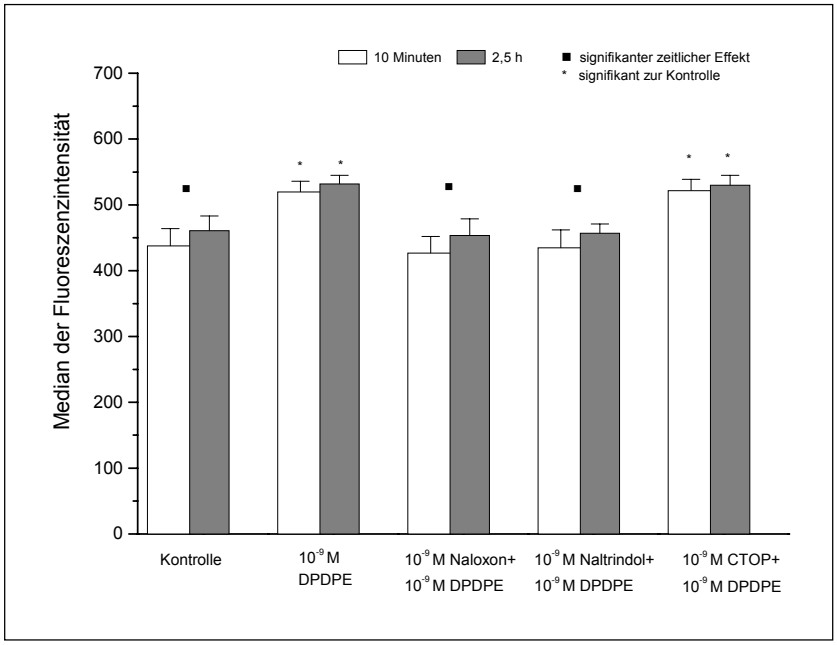

Abbildung 68: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) nach Vorinkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP

3.9.2 CD 16-Expression

Die Inkubation mit dem synthetischen Opioidpeptid DPDPE steigerte signifikant die CD 16-Expression neutrophiler Granulozyten (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Im Gegensatz zur Inkubation mit endogenen Opioidpeptiden war die Verlängerung der Inkubationszeit auf 150 min sinnvoll, da DPDPE resistent gegen die Metabolisierung durch Endopeptidasen ist.

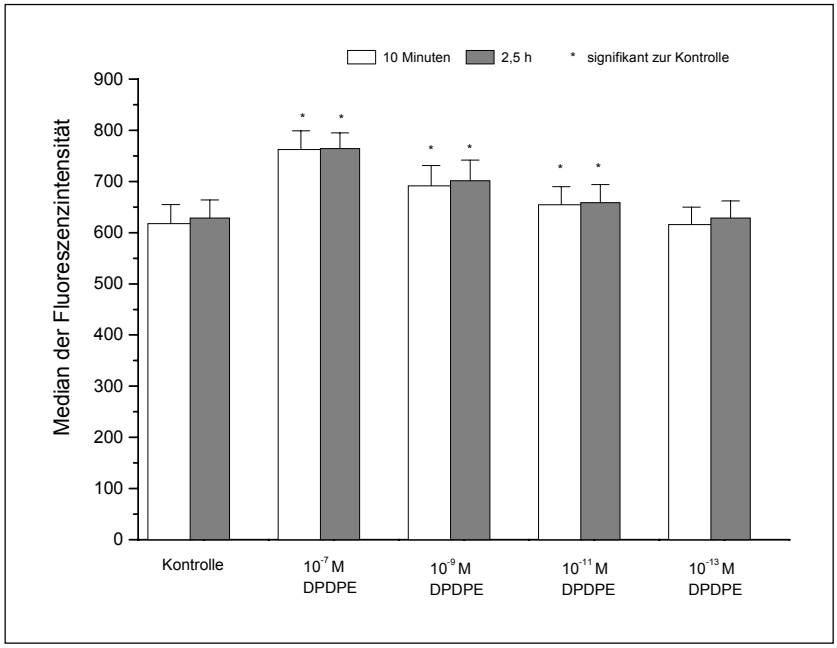

Abbildung 69: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DPDPE-Konzentrationen

Die Inkubation mit 10^{-7} M DPDPE führte nach 10 min Inkubation zur Steigerung der CD 16-Expression um rund 15 %, allerdings konnte eine Verlängerung der Inkubationsdauer auf 150 min diesen Wert kaum steigern. Bis zu einer Konzentration von 10^{-11} M DPDPE wurde eine signifikante Fluoreszenzerhöhung gemessen. Die Vorinkubation mit Naloxon und Naltrindol antagonisierten die vermehrte Rezeptorexpression, während CTOP wirkungslos blieb.

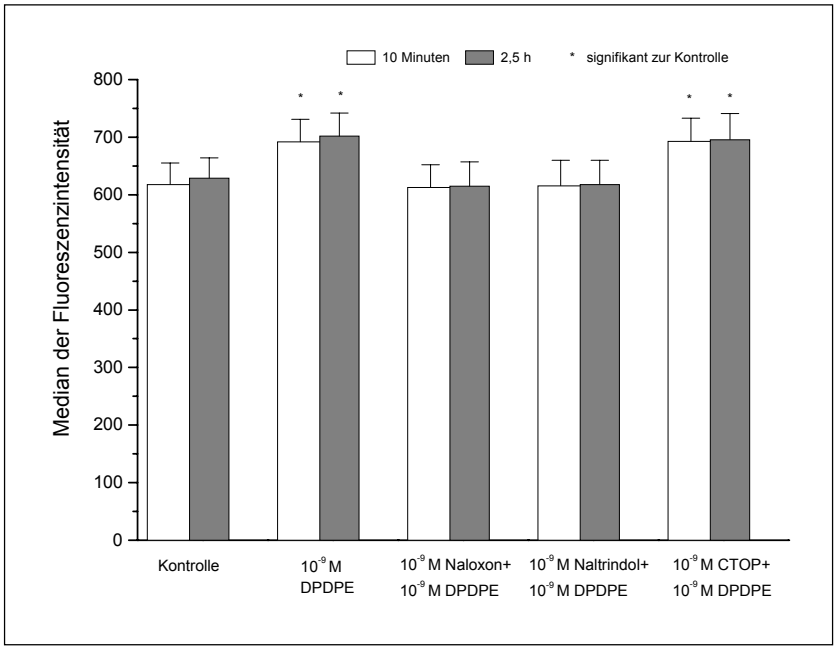

Abbildung 70: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 nach Vorinkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP

3.9.3 CR 1 (CD 35)-Expression

In der vorliegenden Studie wurde die CR 1 (CD 35)-Expression neutrophiler Granulozyten durch Inkubation mit DPDPE signifikant gesteigert (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Die Zunahme der Fluoreszenzintensität war hier im Vergleich zu CR 3 und CD 16 am deutlichsten und lag bei Inkubation mit 10^{-7} M DPDPE bei etwa 30 % im Vergleich zur Kontrolle. Bis zu einer DPDPE-Konzentration von 10^{-11} M wurde das Signifikanzniveau erreicht.

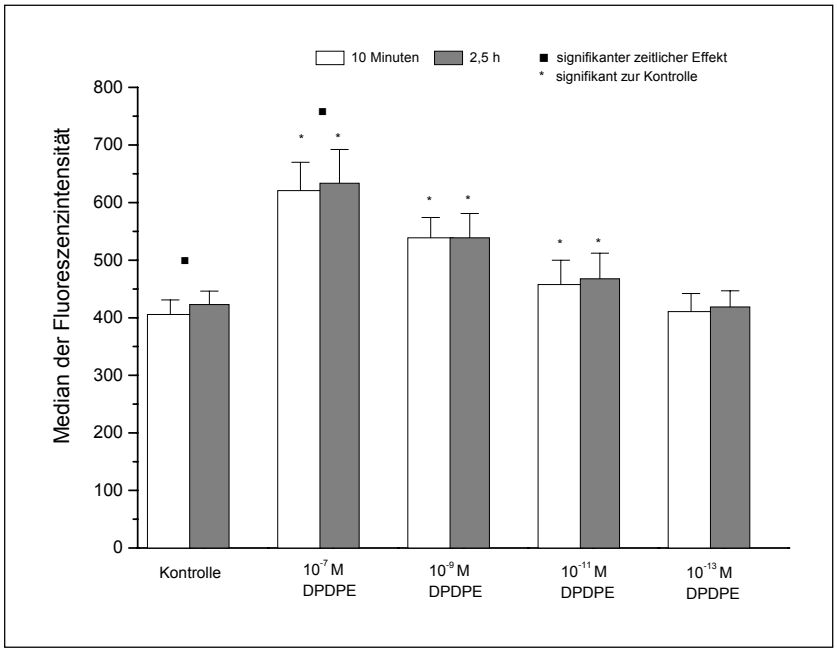

Abbildung 71: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1(CD 35) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DPDPE-Konzentrationen

Die Vorinkubation mit Naloxon und Naltrindol antagonisierten die vermehrte Rezeptorexpression, während CTOP wirkungslos blieb. Dies deutet wie oben bereits beschrieben auf eine δ-Opioidrezeptor vermittelte Wirkung hin.

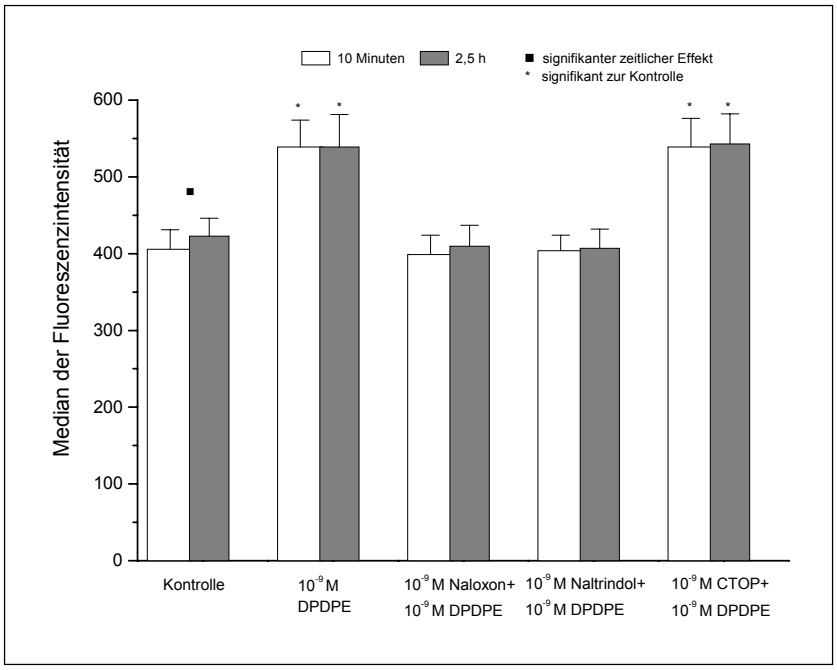

Abbildung 72: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1 (CD 35) nach Vorinkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP

3.9.4 Phagozytoseaktivität

In ähnlichem Maße wie die Rezeptorexpression der Granulozyten wurde durch Inkubation mit DPDPE auch die Phagozytoseaktivität stimuliert (n=12, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung). Am ausgeprägtesten war der Effekt nach 150 min Inkubation mit 10^{-7} M DPDPE, hier erhöhte sich die Phagozytoseaktivität um etwa 25 %.

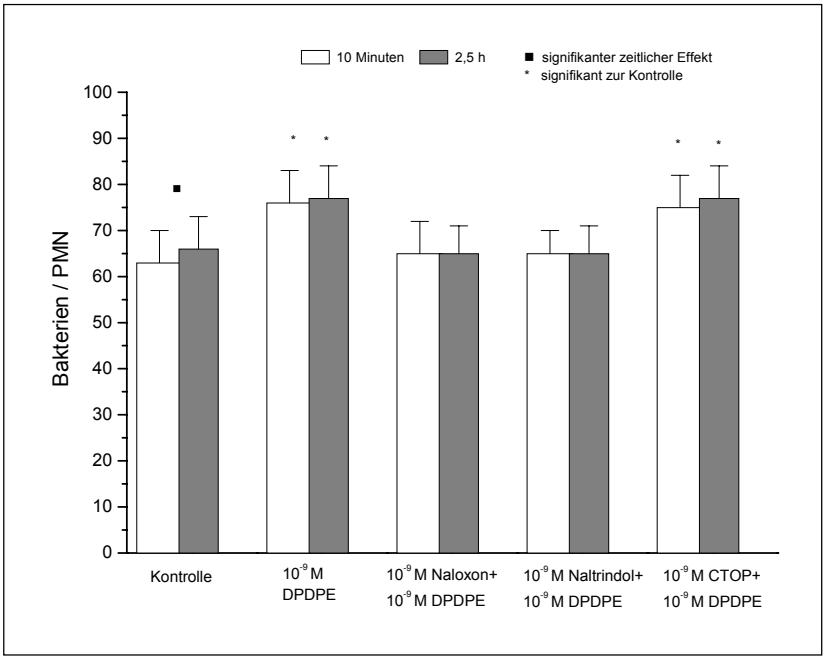

Abbildung 73: Phagozytoseaktivität der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DPDPE-Konzentrationen

Die Naloxon und Naltrindol reversiblen Ergebnisse waren bis zur Konzentration von 10^{-11} M DPDPE noch signifikant. Der μ-Rezeptorantagonist CTOP blieb wirkungslos.

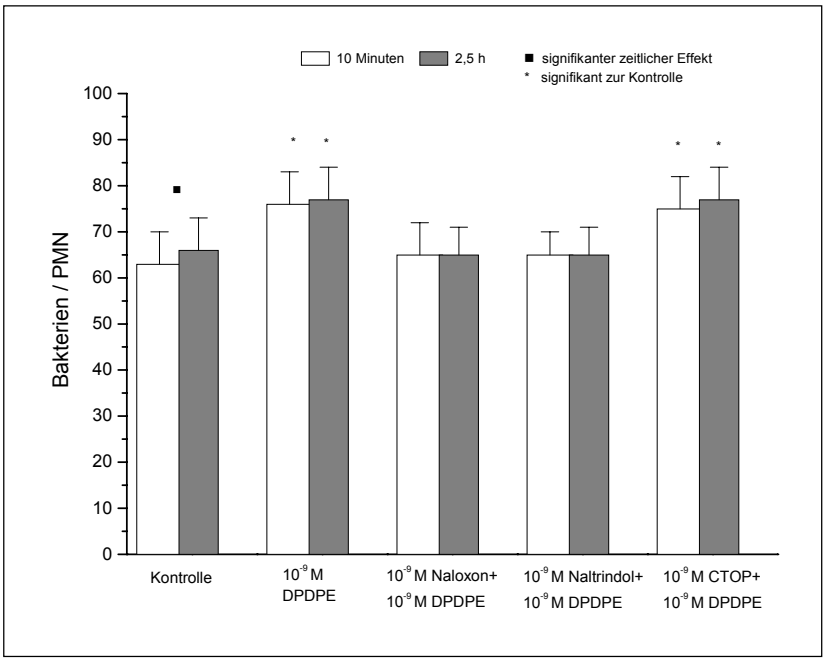

Abbildung 74: Phagozytoseaktivität der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP

3.9.5 Oxidativer Burst

Der Oxidative Burst stellt nach Erkennung durch Membranrezeptoren und Phagozytose den terminalen Schritt in der Vernichtung eines pathogenen Keims dar. So war zu erwarten, dass nach der oben beschriebenen Stimulation von Rezeptorexpression und Phagozytoseaktivität auch der Oxidative Burst durch DPDPE gesteigert wird.

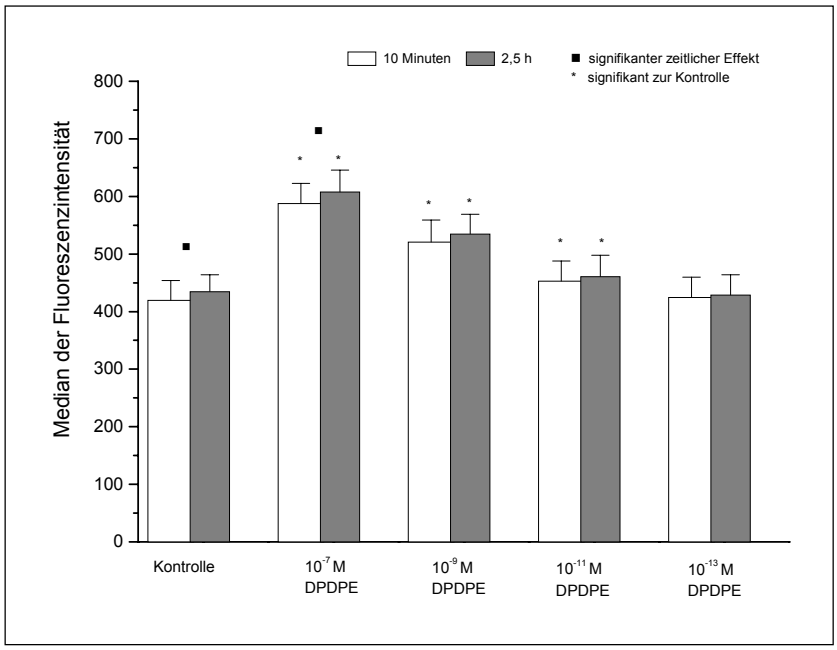

Abbildung 75: Oxidativer Burst der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DPDPE-Konzentrationen

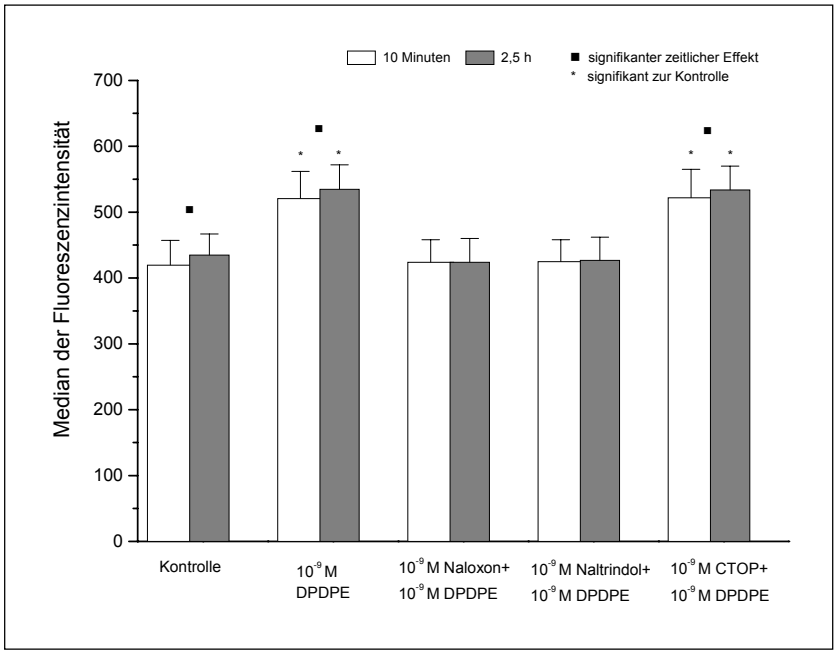

Abbildung 76: Oxidativer Burst der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP

DPDPE steigerte zeit und konzentrationsabhängig den Oxidativen Burst der Granulozyten mit maximal 30 % Fluoreszenzzunahme bei Inkubation mit 10^{-7} M DPDPE und noch rund 10 % bei Inkubation mit 10^{-11} M DPDPE. Die Vorinkubation mit Naloxon und Naltrindol antagonisierte die vermehrte Rezeptorexpression, während CTOP wirkungslos blieb.

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Probenaufbereitung

Studien an isolierten Leukozytenpopulationen liegen in großer Zahl vor. Standardisierte Verfahren zur Separation und Fixierung neutrophiler Granulozyten sind etabliert und werden meist über Zentrifugation in Percoll- oder Ficoll-Gradienten durchgeführt [12; 40]. Diese Methodik hat den Vorteil, dass bei der Funktionsanalyse Störfaktoren durch andere Zellpopulationen oder Debris nahezu vollständig wegfallen. Durch die Isolation insbesondere von neutrophilen Granulozyten wird deren Funktion und Morphologie jedoch beeinflußt [31; 34; 40; 147; 193]. Um diese Problematik zu vermeiden, wurde in unserer Untersuchung eine Vollblutmethode verwendet [3; 9; 21; 24; 31; 61; 71; 75; 115; 171]. Dieser Vollblut-Assay besitzt den Vorteil, dass die neutrophilen Granulozyten weitgehend in ihrer physiologischen Umgebung belassen werden, und somit immunologische Interaktionen zwischen zellulären und humoralen Faktoren bei dieser Meßmethodik miterfaßt werden können. Mehrere Gruppen weisen auf eine durch Zellisolierung hervorgerufene „Up-Regulation“, im Sinne einer verstärkten Expression von Rezeptoren auf der Granulozyten-Oberfläche hin [183; 192]. Einen erhöhten Oxidative Burst sowie eine vermehrte Oberflächenrezeptorexpression bei unbeeinflußter Phagozytoseaktivität werden für Zellisolationsverfahren gegenüber einer Vollblut-Methodik beschrieben [171]. Berger et al. konnten keinerlei funktionelle Veränderungen der Granulozyten bei einer Percoll-Isolierung feststellen [12]. Antikoagulantien können eine Voraktivierung der Granulozyten zu induzieren [31], die in einer gesteigerten CR 3-Expression nach Antikoagulation des Blutes mit EDTA zum Ausdruck kommt [124; 151]. Heparin erhöhte im Vergleich zur EDTA-Antikoagulation die CR 3-Expression kaum, so dass wir Lithium-Heparinat-Röhrchen zur Blutentnahme auswählten [124].

Die Lyse des Vollbluts erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch FACS-Lysing-Solution ® (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg), einem weit verbreitetes Verfahren, das in Studien von Romeu et al. zu keinem quantitativ signifikanten Verlust an neutrophilen

Granulozyten führte [131]. Die Reduktion von Debris und eine sehr gute Fixierung der Leukozytenpopulationen ermöglichen eine genauere Detektion der neutrophilen Granulozyten im Durchflußzytometer. Zwar wird das Streulichtsignal der Zellen durch Lyse verändert, das Fluoreszenzsignal aber bleibt konstant[131]. Repo deutete eine erhöhte Hintergrundfluoreszenz ausgelöst durch die Lyse des Vollbluts als erhöhte unspezifische Antikörper-Bindung im Blut [124]. Deshalb wurde in dieser Studie zuerst das Vollblut mit dem Antikörper inkubiert und danach erst lysiert.

Der granulozytäre Stoffwechsel ist temperaturabhängig [47; 65; 79; 94; 186; 192]. Forsyth und Watson zeigten in ihren Arbeiten sowohl die Temperaturabhängigkeit der Expression von Integrinen auf neutrophilen Granulozyten als auch eine temperaturabhängige Modulation ihrer Oxidaseaktivität [59; 182]. Forsyth et al. untersuchten die CD 35-Expression auf Granulozyten bei 4 bzw 22°C. Bei Raumtemperatur fand er eine signifikant höhere Antigen-Expression [59]. Das Aufwärmen der Zell-Assays von 4 auf 37°C bewirkt ebenfalls einen deutlichen Anstieg von Oberflächenrezeptoren und Adhäsionsmolekülen auf neutrophilen Granulozyten [59]. Der CR 3 (CD 11b/CD 18)-Rezeptor unterliegt ebenfalls dieser Temperaturabhängigkeit [53]. Fearon beschreibt eine quantitativ erhöhte CR 3-Expression, ausgelöst sowohl durch mechanische Stimuli als auch durch eine Temperaturerhöhung der Proben. Bikoue bestätigte diese Beobachtungen bei einer Erwärmung der Zellsuspension von 0 auf 37°C [17]. Aus diesen Gründen wurde die Rezeptorexpression in der vorliegenden Studie bei Zimmertemperatur bestimmt.

Die Vollblutproben wurden für 10 min bei 37°C im Wasserbad mit der Bakteriensuspension inkubiert, um die Phagozytose der Granulozyten zu stimulieren. Diese Zeitspanne lehnt sich an vorhergehende Studien an, in denen maximale Ergebnisse bei Phagozytose und Oxidative Burst durch Inkubationszeiten zwischen 5 und 15 Minuten bei 37°C beschrieben wurden [115; 116; 126; 171]. Im Vollblut-Assay nimmt die Expression der Oberflächenrezeptoren bei Verlängerung der Inkubationszeit zu [17]. Diese Beobachtung wird durch die vorliegende Arbeit bestätigt, bei der nach 2,5 h Inkubation sowohl eine Zunahme der Rezeptorexpression, als auch eine Steigerung von Phagozytoseaktivität und Oxidative Burst in einer Größenordnung von 10 % beobachtet wurde. Zum selben Ergebnis kamen Muirhead et al., die eine Komplementrezeptorzunahme auf neutrophilen Granulozyten bei Verlängerung der Inkubation beschrieben [105]. Eine maximale Expression von CR 3 auf neutrophilen Granulozyten wurde von Jones bereits nach einer Inkubationszeit von 8 Minuten bei 37

°C beobachtet [78]. Nach fMLP- Aktivierung konnte eine verstärkte Expression von Oberflächenrezeptoren etwa 4 bis 10 Minuten nach Stimulation registriert werden [41]. Dieser rasche Effekt wird durch die Mobilisierung bereits präformierter Rezeptoren aus intrazellulären Pools erklärt, eine *de-novo* Synthese entfällt [41]. Bei gesunden Probanden wurde die maximale Expression von CR1 (CD35) und CR3 (CD11b/CD18) nach 10 bis 15 Minuten gemessen [72]. Im Gegensatz zur Rezeptoraktivierung aus präformierten Pools, deutet die von uns nach 2,5 h Inkubation beobachtete Zunahme der Fluoreszenzintensität auf eine Neusynthese der Rezeptoren hin. Dabei könnte auch die verlängerte Kontaktzeit der Granulozyten mit einer Fremdoberfläche, hier dem Probenröhrchen, zu einer der verstärkten Rezeptorexpression beitragen.

Die Absolutwerte der granulozytär-phagozytierten Bakterien unterliegen von Autor zu Autor extrem starken Schwankungen[114]. Wir fanden granulozytäre Phagozytoseraten im Bereich von ca. 50-100 Bakterien/Granulozyt. Dieser Wert liegt über dem von Perschel et al. beschriebenen 3 bis 65 Bakterien/Phagozyt[114]. Diese Differenzen erklären sich zum Teil aufgrund unterschiedlicher Probandenkollektive. So definierten Perschel et al. keine speziellen Ausschlußkriterien. In die vorliegende Studie wurden ausschließlich Probanden aufgenommen, bei denen anamnestisch kein Hinweis auf eine Modulation der Phagozytoseaktivität durch Nikotin, Allergien, akute Infektionen oder eine immunsuppressive Therapie gegeben war. Bei guter Korrelation zwischen durchflußzytometrisch bestimmter Phagozytoseaktivität und fluoreszenz-mikroskopischer Kontrolle deuten die beobachteten numerischen Schwankungen auf erhebliche interindividuelle Unterschiede der Phagozytoseaktivität des Probandenkollektivs hin [114]. Nicht phagozytierte, aber an der PMN-Oberfläche adhärente Bakterien führen bei der Bestimmung der Phagozytoseaktivität zu Meßartefakten und falschen Ergebnissen. Deshalb wurde als ”Quenching-Lösung” Trypanblau-Lösung verwendet, um die an der äußeren Phagozytenmembran anliegenden fluoreszierenden Bakterien zu entfernen [175]. Strukturveränderungen der Membran führen zu einer Entfernung von gebundenen fluoreszenten Bakterien auf der Zelloberfläche und ermöglichen damit die Differenzierung zwischen extrazellulär adhärenten und intrazellulär ingestierten Bakterien [116]. Trypanblau-Lösung entfernt bei ca. 90 % der Granulozyten im Assay die Oberflächenfluoreszenz, während die intrazelluläre Fluoreszenz nicht beeinflußt wird. Im Vergleich verschiedener Quenching-Lösungen erwies sich Trypanblau als inert und zuverlässig [175].

Zur Kernfärbung wurde Propidiumiodid verwendet. Das rot fluoreszierende Propidiumiodid bindet an zelluläre DNA [167]. Im Zusammenhang mit der Größe des Meßevents kann somit zwischen Zelltrümmern und vollständigen Zellen diskriminiert werden.

Die durchflußzytometrisch gemessene Fluoreszenz resultiert aus der Bindung der verwendeten Fluorochrome an spezifische Bindungsstellen auf der Zellmembranoberfläche sowie aus der Eigenfluoreszenz der Zelle [35]. Zusätzlich kann auch die unspezifische Bindung von Antikörpern zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal führen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch jeweils einen Kontrollansatz mit FITC-markierten anti-IgG-Antikörpern ausgeschlossen. Um einen Kontrollwert zu etablieren, wurden in einem weiteren Kontrollansatz Zellen mit unmarkiertem Antikörper inkubiert und die so ermittelte Fluoreszenzintensität als Eigenfluoreszenz von den in den weiteren Proben ermittelten Werten abgezogen. Die zelluläre Autofluoreszenz wird von Flavoproteinen im Zellstoffwechsel emittiert [108].

4.1.2 Auswahl der Meßparameter

Komplementproteine unterstützen die Adhärenz neutrophiler Granulozyten an die zu phagozytierenden Mikroorganismen und agieren synergistisch mit Immunglobulinen bei der Opsonisierung von Bakterien [180]. Ein zentraler Mediator der Komplementkaskade ist der Faktor C3, und dessen aktivierte Formen C3b sowie C3bi [11]. Bereits geringe Mengen des instabilen C3b-Moleküls aktivieren neutrophile Ganulozyten [121]. Als Folge wird die Expression der Komplementrezeptoren durch Verlagerung bereits präformierter Rezeptorproteine aus intrazellulären Granula an die Zelloberfläche erhöht[87; 107; 187; 194]. Sowohl der Komplementrezeptor CR 1 (CD35) als Bindungsstelle für C3bi, als auch CR 3 (CD11b/CD18) als Bindungsstelle für C3b werden in dieser Aktivierungsphase vermehrt auf der Granulozytenmembran exprimiert [63; 170]. Durch einen positiven Feedback-Mechanismus kommt es zur weiteren Komplementaktivierung, mit gesteigerter Opsonierung und C3-Freisetzung [118]. Die Bindung von Komplementfragmenten an CR 1 bzw. CR 3 fördert die Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten, der Oxidative Burst als direkt folgender Schritt in der Kaskade zur Vernichtung des Pathogens wird jedoch durch die bloße Gabe von C3b/C3bi kaum aktiviert [52]. So korrelierte eine Zunahme der CD 11b-Expression nicht mit einer Aktivierung der NADPH-Oxidase, respektive einer Zunahme des Oxidativen Burst [14; 179]. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Studie der

Oxidative Burst durch Inkubation mit Bakterien stimuliert. Die Komplementrezeptoren CD 11 und CD 35 werden auf der granulozytären Membran etwa im Verhältnis 1 zu 3 exprimiert [12; 17], wobei die Bindungskapazität der Rezeptoren mittels fluoreszierender Antikörper quantifiziert wurde. In unserer Studie erwies sich die Komplementrezeptorexpression als relativ konstant, mit numerisch stabilen Standardabweichungen. Neben der Bindung opsonisierter Partikel während der Phagozytose vermitteln Adhäsionsmoleküle die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen. Gemeinsam mit dem endothelialen interzellulären Adhäsionsmolekül ICAM-1 ist der Komplementfaktor CR3 (CD11b/CD18) ein wichtiger Mediator für die Anlagerung an das Gefäßendothel. Die Adhäsionsmoleküle der Immunzellen werden in Selektine, Integrine und die Immunoglobulin-Gensuperfamilie unterteilt. Der in der vorliegenden Studie untersuchte Komplementrezeptor CR3 (CD11b/CD18) gehört zur Gruppe der Integrine und besteht als heterodimeres Molekül aus zwei nicht kovalent miteinander verbundenen Polypeptiden. Diese Polypeptide werden aus einer gemeinsamen β-Kette (CD18) sowie einer unterschiedlichen α-Kette (CD11a, CD11b, CD11c) gebildet. Neutrophile Granulozyten besitzen den Fcγ-RIII-Rezeptor (CD 16), mit dem die Fc-Domäne eines Antigen-Antikörper-Komplexes gebunden werden kann [25; 46; 125]. Der CD 16-Rezeptor initiiert intrazelluläre Stoffwechselwege, die vor allem Ca^{2+}-abhängig sind, und ebenfalls mit der Aufnahme und Vernichtung des Bakteriums durch den Granulozyten enden [33; 62]. CD 16 wird von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie von Makrophagen und NK-Zellen exprimiert [48; 57; 58].

Phagozytose und Oxidativer Burst leisten im Organismus einen wichtigen Beitrag zur Bekämpfung pathogener Keime. Deshalb wurde für diese Studie Staphylococcus aureus als klinisch relevanter Keim zur Phagozytosestimulation ausgewählt. Während in bisherigen Studien fast ausschließlich abgetötete Mikroorganismen oder synthetische Partikel als Phagozytoseobjekt eingesetzt wurden, setzten wir vitale, teilungsfähige Bakterien ein, um der physiologischen Situation im Organismus näherzukommen [114]. Nur für die Testreihe mit β-Endorphin$_{1-31}$ nutzten wir sowohl vitale als auch thermisch abgetöte St. aureus-Bakterien. In Übereinstimmung mit vorherigen Untersuchungen fanden wir eine maximale Phagozytose nach 10 minütiger Inkubation [115]. An die Phagozytose schließt sich der Oxidative Burst als terminaler Schritt zur Vernichtung des Pathogens an. Nach Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase werden hochreaktive Sauerstoffmetabolite produziert [10; 116]. Initial werden O_2-Moleküle in

Perhydroxyl-Radikale $HO_2^{\bullet}$ und Superoxid-Anionen O_2^- umgewandelt [41]. Wasserstoffperoxid wird im Phagosom durch Umwandlung von O_2^- Anionen erzeugt [129]. Diese Reaktion wird nach granulozytärer Stimulation durch einen NADPH-Oxidase-Komplex katalysiert, der sich aus membranständigen und zytosolischen Kompenenten des neutrophilen Granulozyten zusammensetzt [23]. Das Enzym Myeloperoxidase wird aus den azurophilen Granula freigesetzt und katalysiert bakterizide Verbindungen aus Wasserstoffperoxid und Chlorid-Anionen [104]. In dieser Studie wurde der Oxidative Burst mittels Konversion des nicht-fluoreszierenden Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) in das fluoreszierende Rhodamin 123 bestimmt [90; 132]. Dabei wird DHR 123 durch Wasserstoffperoxid unter Katalyse der Myeloperoxidase zu Rhodamin oxidiert [178]. Allerdings kann mittels des hier vorgestellten Assays nur eine Interpretation der Wasserstoffperoxid-Produktion erfolgen, weitere Reaktionsschritte werden nicht erfasst [133; 178]. Bisher wurde mit der Luminol-abhängigen Chemilumineszenz in der Mehrzahl der Studien ein semiquantitatives Meßverfahren zur Bestimmung des Oxidativen Burst eingesetzt [126]. Das in dieser Studie beschriebene Burst-Assay besitzt eine hohe Sensivität [49], somit können auch diskrete Stimuli quantifiziert werden [132]. DHR 123 passiert ungehindert die neutral geladene Granulozytenmembran, kann aber den Intrazellulärraum nach Oxidation nicht mehr verlassen [133]. Die Konversion zum fluoreszierenden Rhodamin geschieht in den azurophilen Granula des Granulozyten, da nur dort die zur Katalyse benötigte Myeloperoxidase lokalisiert ist [73; 178]. In der vorliegenden Studie registrierten wir geringe interindividuelle Schwankungen des Oxidativen Burst, mit Standardabweichungen vom Mittelwert zwischen 10 und 20%. Dies steht im Gegensatz zu zwei vorherigen Studien, die hohe interindividuelle Schwankungen beschreiben [150; 178]. Diese Untersuchungen wurden allerdings an isolierten Granulozyten durchgeführt, die mit PMA, Zymosan oder FMLP stimuliert wurden [150; 178]. Van Pelt et al. und Emmendörffer et al. weisen auf eine Modulation der Phagozytoseaktivität durch DHR 123 hin [49; 178]. Die DHR-Konzentration und die Leukoytenzahl beinflussten in diesen Studien die Aufnahme des Farbstoffes in den Phagozyten [130; 181], jedoch wurde die Phagozytose erst nach Zugabe von DHR 123 zu der Leukozytensuspension initiiert. Andere Untersuchungen konnten dies nicht bestätigen [91], trotzdem schlossen wir jegliche Beeinflussung durch DHR 123 aus, da das Substrat erst nach Induktion der Phagozytose zugegeben wurde.

4.1.3 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie stellt prinzipiell eine Weiterentwicklung der Fluoreszenzmikroskopie dar. Beide Methoden weisen in Bezug auf die quantitative Auswertung der verschiedenen Zellpopulationen eine hohe Korrelation auf [108; 114]. Sucic et al. zeigten, dass bei verschiedenen Testmethoden die Relation der Leukozytenpopulationen zueinander unterschiedlich sein kann [168]. Beim Vergleich der Probenmessung mittels Durchflußzytometrie, Fluoreszenzmikroskopie oder automatischer Zellzählung ließen sich signifikante Veränderungen der Ergebnisse aufzeigen. Susic erklärt diese Differenzen mit einer häufig unpräzisen Abgrenzung der verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen innerhalb der graphischen Histogrammdarstellung der Durchflußzytometrie. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) dient bei der durchflußzytometrischen Analyse von Zellpopulationen als Parameter zur Veränderung der Zelloberfläche. Im FSC/SSC-Diagramm konnten wir nach der Phagozytose deutlich eine zunehmende Inhomogenität der Neutrophilenpopulation im Vergleich zur unstimulierten Probe festzustellen, was mit einer Zunahme des Vorwärtstreulichts einhergeht. Keller und Donebedian beschreiben eine nur eingeschränkte Korrelation des FSC und der zellulären Größe [81]. Die Differenzierung zwischen neutrophilen Granulozyten und Monozyten im FSC/SSC-Diagramm kann durch Ähnlichkeiten beider Zellpopulationen in Größe und Granularität erschwert werden [104]. Es gilt aber als gesichert, dass die fehlerhaft mitanalysierten Monozyten allein schon aufgrund ihrer geringen Quantität einen zu vernachlässigenden Meßfehler produzieren [168].

Die gemessenen Fluoreszenzsignale sind innerhalb des Häufigkeitsdiagramms um einen Mittelwert gestreut [114]. Der Median der Fluoreszenzintensität beschreibt die durchschnittliche Fluoreszenz der Zellpopulation und ist als Fluoreszenzsignal der Zahl der durch die neutrophilen Granulozyten phagozytierten Bakterien direkt proportional [120]. Gegenüber dem Mittelwert einer Normalverteilung besitzt der Median bei der statistischen Auswertung methodische Vorteile. Der Median ist relativ stabil gegenüber „Ausreißern“ mit starker Streuung in einer Meßreihe. Somit ergibt sich bei Auswertung des Medians eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie eine höhere Präzision der Probenanalyse [137]. Aufgrund der geringen Standardabweichungen bei den Meßergebnissen wurde in dieser Studie trotz einer Differenz von nur ca. 10% gegenüber den Kontrollwerten das Signifikanzniveau erreicht. Die Vergleichbarkeit der

Standardabweichungen erhöhte dabei die Reproduzierbarkeit und damit die Validität der Ergebnisse [137].

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Morphin-Effekte

In unserer Studie testeten wir sowohl klinisch-relevante als auch supraklinische Morphin-Konzentrationen von 50 nM, 1 µM, and 50 µM [189]. Wir fanden nach Inkubation des Blutes mit 50 nM Morphin eine signifikante Abnahme sowohl der Expression von Komplementrezeptor CR1 (CD 35)- als auch vom CR3 (CD 11b/CD 18) -Rezeptor. In arteriellen und venösen Gefäßen konnte eine signifikante Abnahme der Adhäsion von Granulozyten und Monozyten an den Gefäßwänden nach Zugabe von Morphin beobachtet werden, die durch eine verminderte Expression von CR3 erklärt werden könnte [19]. Die Expression des Immunglobulinrezeptors CD 16 (Fcγ Rezeptor III) wurde schon durch eine Morphin-Konzentration von 50 nM signifikant reduziert. Dieser Rezeptor sowie die Komplementrezeptoren besitzen eine spezielle Bedeutung im Hinblick auf Opsonisierung und Phagozytose von Mikroorganismen [141]. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine reduzierte Expression dieser Rezeptoren auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten in kausalem Zusammenhang mit der Morphin-induzierten Suppression von Phagozytose und Oxidativem Burst stehen könnte. Nach Zugabe von Morphin zeigte sich eine zeit- und konzentrationsabhängige Abnahme sowohl der Komplement- als auch der Immunglobulinrezeptor-Expression auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten. Die funktionelle Aktivität der Granulozyten, speziell die Phagozytoseleistung und der Oxidative Burst, wurden ebenfalls signifikant reduziert. Nach Inkubation mit 50 nM Morphin reduzierte sich die Rezeptor-Expression um 20%. Die stärksten Effekte wurden nach 150 minütiger Inkubation mit 50 µM Morphin beobachtet, dabei kam es zur Abnahme der Oberflächenzezeptor-Expression um 40-50%. Parallel dazu reduzierten sich zeit- und konzentrationsabhängig die Phagozytoseaktivität und der Oxidative Burst um ca. 50%. Die Vorinkubation mit 10 µM Naloxon antagonisierte die Inhibierung aller gemessenen Parameter, was auf einen Opiatrezeptor-vermittelten Effekt hinweist. In Voruntersuchungen konnten wir nach alleiniger Inkubation der Proben mit Naloxon keine signifikanten Veränderungen von Rezeptorexpression, Phagozytoseaktivität oder Oxidativem Burst feststellen. Unsere

Resultate bestätigen frühere Ergebnisse, die auf eine verminderte Superoxid-Produktion nach Inkubation von neutrophilen Granulozyten mit Morphin hinweisen [149; 174]. In Monozyten wurde von Peterson eine signifikante Abnahme der PMA-induzierten O_2-Freisetzung nach Langzeitinkubation mit Morphin gemessen [117]. Dieser Effekt war nach einer Inkubationszeit von 48 h sogar bis zu einer Konzentration von 10^{-12} M signifikant nachweisbar [117]. Einige Studien konnten keine Veränderungen der Granulozyten-Adhärenz [86; 172] und der Chemilumineszenz als Maß des Oxidative Burst [189] nach Morphin-Inkubation feststellen. Gründe für diese Ergebnisse können im Versuchsaufbau der Studien liegen. Die Chemilumineszenz gilt als semiquantitatives Verfahren zur Bestimmung des Oxidativen Burst [5], das über eine geringe Sensitivität verfügt. Bei Experimenten von White et al. führte nach Inkubation mit Thiopental erst eine Reduktion der Chemilumineszenz um 29 % zum Erreichen des Signifikanzniveaus, Morphin-Effekte konnten nicht nachgewiesen werden [189]. Die in der vorliegenden Arbeit zum Teil geringen Morphin-Effekte mit Differenzen von ca. 10 % zur Kontrolle werden also möglicherweise durch die Chemilumineszenz-Methodik nicht erfasst. Krumholz fand nach 30 min Inkubation keinerlei Modulation der Granulozyten-Adhärenz durch Morphin, wobei die Adhärenz der isolierten Granulozyten mittels Nylon beschichteter Säulen quantifiziert wurde [86]. Die kurze Opiatinkubationszeit sowie eine potentielle Aktivierung der Granulozyten durch den Fremdflächenkontakt könnten in diesem Versuchsaufbau mögliche inhibitorische Morphineffekte überlagern. Experimente an Mäusen zeigten, dass Morphin bei den Versuchstieren den Ausbruch von Infektionen begünstigte, was vor allem auf eine Verminderung der Phagozytose und des Oxidativen Burst der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zurückgeführt wurde [173]. Chronische Morphin-Exposition scheint diese immunologisch-inhibitorischen Effekte abzuschwächen [32], hebt sie aber nicht auf. Dies wird gestützt durch Beobachtungen an morphinabhängigen Patienten, bei denen nach initial starker Inhibierung des Immunsystems mit zunehmender Dauer des Opiatabusus die Immunsuppression geringer wird [172]. Die Inkubationszeiten in unserer Studie wurden mit 10 min relativ kurz gewählt, um eine möglichst klinisch relevante Situation zu simulieren. Die daraus resultierenden numerisch geringen, aber deutlich signifikanten und vollständig reproduzierbaren inhibitorischen Effekte des Morphins belegen zum ersten Mal einen wirklich frühen Effekt auf die Funktion der Granulozyten. Andere Gruppen konnten opiatinduzierte Effekte an PMN bisher nur nach sehr langen Inkubationszeiten nachweisen. Die klinische Bedeutung dieser frühen Morphineffekte

ist allerdings fraglich, da die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Veränderungen in einer Größenordnung von 10 % im Vergleich zur Kontrolle lagen. Die frühe inhibitorische Morphin-Wirkung kann als Beginn eines erst nach Stunden voll ausgeprägten Effektes interpretiert werden. Die beobachtete deutliche Progredienz der Morphin-Wirkung nach 2,5 h Inkubation unterstützt diese Vermutung. Obwohl die Oberflächenrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten essentielle Bedeutung für die Phagozytose von opsonierten Mikroorganismen besitzen, wurde der Einfluß von Opiaten auf die Expression von Komplement- und Immunglobulinrezeptoren bisher nicht umfassend erforscht. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen berichtete Marcoli, dass Morphin in 0,2 μM Konzentration keinerlei Einfluß auf die Expression von Komplementrezeptoren und Adhäsionsmolekül LFA-1 bei neutrophilen Granulozyten besitzt [99]. Doch auch diese Studie konnte eine Morphin-induzierte und Naloxon-reversible Abnahme der Mobilität und Aggregation von Granulozyten zeigen, die auf eine Opiatrezeptor vermittelte Wirkung hindeuten [99]. Marcoli et al. inkubierte die isolierten Granulozyten für 20 min mit 10^{-7} M Morphin und bestimmte anschließend durchflußzytometrisch die CD 18-Expression [99]. Die Opiatzugabe erfolgte allerdings erst nach Isolation der Zellen, so dass mögliche Interaktionen mit Bestandteilen des Vollblutes entfielen [99]. Die Granulozyten inkubierten mit dem CD 18-Antikörper auf Eis [99]. Das Wiedererwärmen der Proben zur Messung kann zur Steigerung der Komplementrezeptor-Expression geführt haben [88]. Geringe Morphin-Effekte könnten durch diesen Effekt somit wieder revidiert worden sein. In der vorliegenden Studie untersuchten wir die granulozytäre CR 3 (CD 11b/CD 18)-Expression. Marcoli et al. untersuchten die LFA-1 (CD 11a/CD 18)-Expression, ein Subtyp der CD11/CD18-Rezeptoren, der sich aber in der Proteinstruktur der β-Kette vom CR 3 (CD 11b/CD 18)-Rezeptor unterscheidet. Denkbar wäre somit auch eine Abnahme der CD 11b/CD 18- und CD 11c/CD 18-Expression, bei gleichbleibender LFA-1 (CD 11a/CD 18)-Expression. Marcoli et al. fanden eine Abnahme der Granulozytenmigration durch Morphin. Nach 20 min Morphin-Inkubation wurden die Zellen für weitere 45 min in einer Boyden-Kammer gelagert. Die nun resultierende Gesamtinkubationszeit von 65 min führte zu einer signifikanten Reduktion der Granulozyten-Migration. Diese Verlängerung der Inkubationszeit könnte für den Widerspruch zwischen Abnahme der Migration und unveränderter CD 18-Expression verantwortlich sein.

4.2.1.1 Bedeutung des μ-Rezeptors

Wir konnten zeigen, dass die Morphin-induzierten immunsuppressiven Effekte durch Naloxon vollständig reversibel waren. Diese Beobachtung führt uns zu der Annahme, dass die Morphinwirkungen in unserem Assay über einen klassischen Opiatrezeptor-Mechanismus vermittelt wurden. Diese These wird durch Ergebnisse von Stefano und Mitarbeitern, die die Existenz eines Morphin-sensitiven, aber Opioid-peptid-insensitiven μ-Rezeptor-Subtyps sowohl auf Immunozyten [98; 155], als auch auf Endothelzellen beschreiben, gestützt [157]. Dieser Rezeptor wird als μ_3-Rezeptor klassifiziert. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei neutrophilen Granulozyten nicht nur eine eingeschränkte Migration und Adhäsion an Endothel, sondern auch eine reduzierte Expression von Komplement- und Immunglobulinrezeptoren über diesen μ_3 –Rezeptor vermittelt wird. Neutrophile Granulozyten exprimieren einen Morphin-sensitiven, aber Opioidpeptid-insensitiven μ_3-Rezeptor [157]. Die molekulare Struktur des μ_3-Rezeptor bleibt unklar, jedoch zeigten Cadet et al. an humanen Endothelpräparaten, dass es sich wahrscheinlich um eine Splice-Variante des μ_1-Rezeptors handelt [29]. Endothelien setzen via μ_3-Rezeptor nach Morphin-Stimulation NO frei, während Fentanyl und Opioide keinerlei Wirkung zeigten [96; 157]. In Granulozyten konnte ebenfalls ein μ-Rezeptor Transkript nachgewiesen werden [55; 191]. An Karzinomzellen zeigten Fimiani et al., dass der μ-Rezeptor einem alternativen Splicing unterzogen wird, um danach als μ_3-Rezeptor in Granulozyten und Lunge exprimiert zu werden [55]. Die μ-Opioidpeptide Endomorphin-1 und –2 binden nicht an μ_3-Rezeptoren, und setzen kein NO frei, was die offensichtlich hohe Selektivität des μ_3-Rezeptors für Morphin belegt [127]. Die Affinitätskonstante der Opiatalkaloide für den μ_3-Rezeptor liegt im Bereich von 10^{-8} M [155]. Die Ergebnisse unserer Studie nach Inkubation mit 50 nM Morphin liegen also im Bereich dieser Konstante. Die minimale analgetische Morphin-Plasmakonzentration liegt bei 15-30 nM, somit repräsentieren unsere Ergebnisse bei Inkubation mit 50 nM Morphin eine klinisch relevante Situation. Die lokale analgetische Gewebekonzentration von Morphin ist aber noch unklar [13]. Um unsere Ergebnisse mit vorhergehenden Studien zu vergleichen, inkubierten wir das Vollblut auch mit supraklinischen Morphin-Konzentrationen [134].

4.2.1.2 Bedeutung von NO

NO repräsentiert im Organismus einen wichtigen intra- und extrazellulären Botenstoff, der von verschiedenen Geweben, u.a. Endothel, Neuronen und Makrophagen produziert wird [2; 76; 103]. Das NO-Molekül reguliert zahlreiche Systeme und Regelkreise wie Blutdruck, neuronale Synapsen, zelluläre Adhärenz und besitzt zudem immunoregulatorische Aufgaben. Das freie Radikal NO entsteht aus dem terminalen Guanidin-Stickstoffatom der Aminosäure L-Arginin nach stöchiometrischer Produktion von Citrullin [103; 140]. Der NO-Donor SNAP und der NO-Synthase-Inhibitor NLA wurden eingesetzt, um die Rolle von NO in diesem Morphin sensitiven Prozess zu untersuchen. Die Inkubation der Vollblut-Assays mit NLA führte zu keiner Veränderung eines Messparameters. Die Zugabe von 1 µM SNAP inhibierte sowohl Rezeptor-Expression als auch Phagozytoseaktivität und Oxidativen Burst. Die Reduktion der Parameter entsprach den Effekten nach Inkubation mit 50 µM Morphin. SNAP in 1 µM Konzentration entspricht etwa 80 nM NO in Lösung (mündliche Information Prof. Stefano). Nach Vorinkubation mit dem NO-Antagonisten NLA (100 µM) ergab sich keinerlei Suppression der Parameter durch Zugabe von Morphin. Dies deutet auf eine wichtige Rolle von NO in dem Prozeß der Morphin-induzierten Immunsuppresion hin. Die Immobilisation von vorher aktivierten Granulozyten und Monozyten durch Morphin wird zumindest zum Teil durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt [96; 139; 157; 185]. Die Morphin-induzierte NO-Freisetzung bewirkt offensichtlich nicht eine unmittelbare Internalisierung oder ein Abwerfen („Shedding“) der Oberflächenrezeptoren, da der Morphin-Effekt nach 2,5 h Inkubation stärker ausgeprägt ist. Die „späten“ inhibitorischen Morphin-Effekte werden zumindest partiell über die Regulation inflammatorischer Transkriptionsfaktoren vermittelt [185]. Der Transkriptionsfaktor NF-κB besitzt eine zentrale Rolle bei der Lipopolysaccharid (LPS) induzierten Aktivierung zahlreicher inflammatorischer Mediatoren wie Tumornekrosefaktor (TNF)-α, Interferon (IFN)-β, Interleukin (IL)-8, IL-1β, IL-2, und IL-6 [1; 39]. Welters et al. zeigten, dass Morphin Naloxon-reversibel, zeit- und konzentrationsabhängig die LPS-induzierte NF-κB Aktivierung in neutrophilen Granulozyten und Monozyten inhibiert[185]. Vergleichbare Effekte erzeugte der NO-Donor SNAP [185]. Die NO-Synthase Inhibitoren L-NAME und NLA antagonisierten die Morphin-induzierte NF-κB Reduktion [185]. Morphin vermittelt seine immunsuppressiven Effekte somit zumindest partiell über die NO-vermittelte Hemmung des

Transkriptionsfaktors NF-κB [185]. Alle in der vorliegenden Studie beobachteten Morphin-Effekte konnten durch den NO-Antagonisten N-Nitro-L-Arginin (NLA) komplett aufgehoben werden, so dass davon auszugehen ist, dass das per Morphin-Inkubation freigesetzte NO nicht nur die Mobilität, sondern auch die funktionelle Aktivität neutrophiler Granulozyten hemmt. Patienten im manifesten septischen Schock weisen signifikant höhere NO-Spiegel auf, als septische Patienten ohne eine Schocksymptomatik [50]. Bei beiden Patientenkollektiven konnte eine signifikante Korrelation zwischen NO-Plasmaspiegeln und denen von Endotoxin, TNF-α und Interleukin-8 beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass NO ebenfalls an der Entstehung eines septischen Schocks beteiligt sein könnte [50]. Diese Beobachtung zeigt einen Bezug zu der von uns beobachteten NO vermittelten Immunsuppression durch Morphin dar [184; 185]. Die bereits von anderen Gruppen beschriebene Abnahme der Granulozyten-Adhärenz an Endothelien durch Morphin-Einwirkung könnte mit der von uns beobachteten Suppression der CD 11b/CD 18-Rezeptor Expression zusammenhängen [92], da dieser Komplementrezeptor essentiell für die Adhärenz neutrophiler Granulozyten an Endothel ist. Morphin-Analgesie bedingt einen Anstieg intrazellulärer cGMP-Spiegel, und ist assoziiert mit Anti-Nozizeption, sowie Morphin-Abhängigkeit [163]. Zusätzlich konnte eine Morphin-induzierte und NO-gekoppelte Suppression der lymphozytären Proliferation in der Milz beobachtet werden [54]. Basierend auf dem bekannt hypotensiven Effekt von Morphin wurde in mehreren Studien nachgewiesen, dass Endothelien Opiat-Bindungsstellen besitzen, die Naloxon-reversibel Morphineffekte vermitteln [29; 100]. *In-vitro* Experimente an Endothelien und Aortenpräparaten von Ratten zeigen, dass Morphin per NO-Aktivierung eine Vasodilatation auslöst, die komplett Naloxon-reversibel ist [157]. Im Gegensatz dazu konnte die Zugabe von Opioidpeptiden keine NO-Produktion an endothelialem Gewebe induzieren [157]. Dies deutet darauf hin, dass an Endothelzellen der μ_3-Rezeptor an eine NO-Freisetzung mit konsekutiver Vasodilatation gekoppelt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde u.a. die Expression der auf neutrophilen Granulozyten vorhandenen Oberflächenrezeptoren CD 11b/CD 18 bestimmt. Außerhalb der klassischen therapeutischen Anwendung von Morphin konnte dieses Opiat auch aus neuronalen Gewebe wie Gehirn und Nebenniere isoliert werden [15;64;156]. Dies weist auf eine endogene Synthese von Morphin und verwandten Stoffen hin. Zusammen mit antiinflammatorischen Mediatoren, wie z.B. Interleukin-10 [154], könnte endogenem Morphin eine Rolle in der Regulation des aktivierten Immunsystems zukommen [161; 162].

In unseren Experimenten wurden die Immunozyten vor der Inkubation mit Morphin nicht stimuliert. Bei Traumen und chirurgischen Stimuli wurde eine Morphin-induzierte Immunsuppression trotz Voraktivierung durch proinflammatorische Substanzen wie Interleukin-6 und TNF-α beobachtet [164].

4.2.2 Effekte von Fentanyl und DAMGO

Wir konnten in unserer Studie keinen Einfluß von Fentanyl auf die Funktion neutrophiler Granulozyten beobachten. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früheren Studien. Weder der Oxidative Burst [84], noch die Phagozytose wurden beeinflußt [85]. Fentanyl teilt zwar mit Morphin seine analgetische Wirkung, jedoch offensichtlich nicht dessen Bindung an endotheliale μ_3-Rezeptoren und die Fähigkeit zur NO-Freisetzung [18]. Eine Studie an einem kardiochirurgischen Patientenkollektiv beschreibt nach i.v. Gabe von 50 µg/kg Fentanyl eine signifikant reduzierte Expression von CR 3 und Vimantin-Filamenten auf Monozyten, mit einer ebenfalls reduzierten phagozytischen Aktivität dieser Zellen [119]. Andererseits besaßen verschiedene Anästhesie-Verfahren mit unterschiedlicher Fentanyl-Dosierung an einem kardiochirurgischen Patientenkollektiv keinerlei Einfluß auf Zytokin-Spiegel oder die Akut-Phase-Reaktion [27]. Nassiri et al. untersuchten an Zellkulturen die Zytotoxizität verschiedener Narkotika [106]. Fentanyl und Sufentanil inhibierten in dieser Studie das Wachstum der Zellen sowie die Protein-Synthese, während Morphin kaum zytotoxische Effekte zeigte [106]. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie gehen wir allerdings davon aus, dass Fentanyl aufgrund einer fehlenden Affinität für den μ_3-Rezeptor keinen Einfluß auf neutrophile Granulozyten besitzt, während Morphin gerade über diesen Rezeptor seine immunmodulatorische Funktion vermittelt. Vor diesem Hintergrund verzichteten wir auf weitere Experimente mit Fentanyl-Derivaten wie z.B. Sufentanil.

Der µ-Rezeptor Agonist DAMGO zeigte in der vorliegenden Studie keinerlei Effekt sowohl auf die Expression der Oberflächenrezeptoren, als auch auf die Phagozytoseaktivität oder den Oxidativen Burst. Dies steht in Einklang mit einer Studie von Haberstock, in der die granulozytäre Superoxid-Anionen-Produktion nach DAMGO-Inkubation gemessen wurde [67]. Bindungsstudien zeigten eine fehlende Affinität von DAMGO für die Morphin-Bindungsstellen auf neutrophilen Granulozyten [97].

4.2.3 Effekte von δ-Rezeptor Agonisten

Endogene Opioidpeptide und ihre Rezeptoren bilden ein neuromodulatorisches System, das eine Reihe physiologischer Prozesse kontrolliert. Dazu gehören die Kontrolle von Schmerz und Emotionen, Reaktionen auf Stress, Bewegung und Bewußtsein, aber auch neuroendokrine und immunologische Funktionen [38; 56; 74]. Immunsystem und Neuroendokrine Systeme kommunizieren über gemeinsame Signalmoleküle, besonders über ACTH und Endorphine [68]. Opioidpeptide werden nicht nur im ZNS, sondern auch von Immunozyten nach Stimulation mit LPS, viraler Infektion oder CRH synthetisiert [68]. An Mäusen konnte gezeigt werden, dass nach LPS-Induktion produziertes Endorphin Veränderungen in der Körpertemperatur und der Atemfrequenz auslöst [68]. Endorphine und Enkephaline besitzen regulatorische Aufgaben in der Sepsis mit einer Aktivation von Mediatoren wie TNF-α oder Interleukinen [7; 22]. Bei Entzündungen und Schmerzzuständen agieren endogene Opioide als Mediatoren [28; 77]. Im lokal entzündeten Gewebe kann eine Akkumulation von lympozytär synthetisiertem β-Endorphin und Met-Enkephalin beobachtet werden [28; 70]. Damit verbunden ist im Tiermodell eine deutliche Abnahme der Antwort auf einen definierten Schmerzreiz [37; 89; 166]. CRH und IL-1 erhöhen in Lymphozyten signifikant die Expression von Proopiomelanocortin-mRNA, dem Vorläufermolekül endogener Opioide [28]. Endorphin-produzierende Lymphozyten migrieren in entzündetes Gewebe, sekretieren β-Endorphin und wandern dann zurück in lokale Lymphknoten [28]. Die Applikation von Naloxon antagonisiert die Endorphin-initierten Effekte [37], was auf die Beteiligung von Opioidrezeptoren deutet. Chirurgische Stimuli erhöhen die Plasmakonzentrationen von β-Endorphin [83]. Die Akupunktur besitzt heute im Rahmen der Schmerztherapie eine wichtige Rolle. Nach Akupunkturbehandlung finden sich in Monozyten und T-Zellen erhöhte β-Endorphin-Konzentrationen [16]. Diese Ergebnisse untermauern den engen Zusammenhang zwischen Schmerz, Inflammation und endogenen Opioiden. Die endogenen Liganden der Opioidrezeptoren entstehen hauptsächlich aus den Vorläufermolekülen Pro-Opiomelanocortin, Pro-Enkephalin, Pro-Dynorphin und Pro-Nociceptin/Orphanin [74]. Bis auf das Nociceptin besitzen alle anderen Opiodpeptide die N-terminale Pentapeptidsequenz Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu. Sie variieren in ihrer Affinität für die μ-, δ- und κ-Rezeptoren, aber kein endogenes Opioidpeptid bindet ausschließlich an einen Rezeptortyp. β-Endorphin wirkt im ZNS etwa mit gleicher Affinität am μ- und δ-Rezeptor und wesentlich geringer am κ-Rezeptor [74]. Die vorliegende Studie zeigt, dass

dies für das Immunsystem nicht gilt, hier besitzt β-Endorphin offensichtlich eine Präferenz für δ-Opioidrezeptoren. Met-Enkephalin besitzt eine hohe Affinität zum δ-Rezeptor, eine 10-fach geringere Affinität für den μ-Rezeptor und zeigt kaum Wirkung am κ-Rezeptor [74].

Die natürlich vorkommenden Enkephaline zeigen eine Präferenz für δ-Rezeptoren gegenüber den μ-Rezeptoren [74]. Die Gruppe der synthetischen linearen Opioidpeptide mit einer hohen Selektivität für δ-Rezeptoren umfasst vor allem verschiedene Enkephalin-Analoga. Ein früher Vertreter der Enkephalin-Analoga ist das H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu-OH (DADLE), das seit 1977 bekannt ist [138]. Es fungiert seitdem als ein viel verwendeter δ-selektiver Ligand. Zyklische Enkephalin-Analoga wurden 1979 von Sarantakis et al. zum ersten Mal synthetisiert [138]. Die synthetischen Enkephalin-Analoga waren zunächst relativ unspezifische Liganden, jedoch konnte ihre δ-Rezeptor-Selektivität durch die Einführung von Penicillamin in die Molekülstruktur deutlich erhöht werden. Es zeigte sich, dass H-Tyr-D-Pen-Gly-Phe-D-Pen-OH (DPDPE) einer der selektivsten δ-Rezeptor-Agonisten dieser Gruppe ist. Der bekannteste Vertreter der selektiven μ-Rezeptor-Agonisten ist das Pentapeptid H-Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Gly-ol (DAMGO) [8].

Die numerischen Veränderungen der Fluoreszenzintensität der Endorphin- und Met-Enkephalin-Assays sind nach 10 minütiger Inkubationszeit trotz Signifikanz der Ergebnisse relativ gering. Eine Verlängerung der Inkubationszeiten erscheint aber wegen der Existenz der Neural Endopeptidase 24.11 (NEP) als wenig sinnvoll [145; 160]. Diese Zink-Metalloprotease wird von neutrophilen Granulozyten exprimiert und hydrolysiert einige biologisch aktive Peptide wie Met-Enkephalin, β-Endorphin, FMLP oder Substanz P innerhalb von 15 min [145; 160; 165]. Eine Blockade von NEP reduziert die zur granulozytären Stimulation benötigten Opioidpeptid-Konzentrationen [145]. Morphin erhöht Naloxon-sensitiv die granulozytäre NEP-Expression auf neutrophilen Granulozyten, was zur Downregulation stimulatorischer Peptide führt [158]. Es konnte gezeigt werden, dass β-Endorphin bei 37°C bereits innerhalb von 2 min nach Bindung an die granulozytäre Membran internalisiert wird, mit zunehmender Inkubationszeit verstärkt sich dieser Effekt [51]. Um mangelnde Effekte aufgrund zu kurzer Inkubationszeiten ausschließen zu können, inkubierten wir mit den gegenüber der Hydrolyse inerten Substanzen DADLE, DAMGO und DPDPE für 2,5 h.

4.2.3.1 Effekte von β-Endorphin$_{1-31,}$ β-Endorphin$_{1-27}$ und β-Endorphin$_{27-31}$

Frühere Studien zeigten bereits, dass die granulozytäre Chemotaxis und Phagozytose durch endogene Opioide beeinflußt wird [113; 143; 184]. Wir beobachteten, dass β-Endorphin und Met-Enkephalin konzentrationsabhängig die Expression aller untersuchten Antikörper stimulierte, wohingegen die Phagozytose und der Oxidative Burst bei den Versuchen mit vitalen Bakterien signifikant reduziert wurde. Wir konnten eine Naloxonreversibilität dieser Effekte beobachten, was im Einklang mit Vorergebnissen anderer Gruppen steht [143; 148]. In weiteren Experimenten verwendeten wir nicht-vitale Bakterien des selben Stammes. Interessanterweise zeigte sich unter gleichem Versuchsaufbau nun eine signifikante opioidinduzierte Stimulation aller bestimmten Parameter. Diese Effekte wurden nach Vorinkubation mit 10^{-9} M Naloxon aufgehoben, was auf einen Opiatrezeptor-vermittelten Mechanismus deutet. An der monozytären Zellinie U 937 konnten Bindungsstudien eine Affinitätskonstante von 10^{-8} M für β-Endorphin$_{1-31}$ zeigen [142]. Die in der vorliegenden Studie beobachteten β-Endorphin$_{1-31}$ -Effekte liegen konzentrationsabhängig bei 10^{-7} bis 10^{-11} M und damit im Bereich dieser Affinitätskonstante. β-Endorphin$_{27-31}$, das C-terminale Fragment des Gesamtpeptids, war in kompetitiven Bindungsstudien um den Faktor 5-100 weniger potent als β-Endorphin$_{1-31}$ [142]. Dies steht nur zum Teil mit den Ergebnissen unserer Studie im Einklang. β-Endorphin$_{27-31}$ zeigte keinen immunomodulatorischen Effekt, jedoch fanden wir Naloxon-reversible Effekte des Gesamtpeptids β-Endorphin$_{1-31}$. White beschreibt eine Stimulation der lymphozytären Proliferation durch das terminale Tetrapeptid Lys-Lys-Gly-Glu des Endorphin-Moleküls, vermittelt durch einen selektiven non-Opiat-Rezeptor [112]. Unsere Ergebnisse deuten im Gegensatz darauf hin, dass β-Endorphin$_{1-31}$ seine Wirkung auf neutrophile Granulozyten per N-terminalem Fragment und einem Opiat-Rezeptor gekoppeltem Mechanismus vermittelt. β-Endorphin$_{1-31}$ stimulierte in der vorliegenden Studie konzentrationsabhängig die Expression der granulozytären Membranrezeptoren mit einem maximalen Effekt bei 10^{-7} M. CD 11 und CD 35 besitzen chemotaktische Eigenschaften, sie vermitteln die Migration der neutrophilen Granulozyten bei inflammatorischen Prozessen. Dies steht in Einklang mit vorherigen Ergebnissen, bei denen die FMLP-stimulierte granulozytäre Chemotaxis durch Inkubation mit 10^{-9} M β-Endorphin$_{1-31}$ maximal gesteigert wurde [148]. Der Opiat-Antagonist Naloxon inhibierte diese Wirkung [148; 176]. Van Epps et al. fanden ähnliche Ergebnisse bezüglich der Chemotaxis, jedoch zeigten sich bimodale

Stimulationsmaxima bei Inkubation mit 10^{-8} M respektive 10^{-12} M β-Endorphin [148]. Gemessen wurde in diesen Studien die Chemotaxis an Serum-beschichteten Glasoberflächen und Gelplatten [148; 176]. Bimodale Ergebnisse konnten im Vollblut-Assay nicht bestätigt werden. Wir konnten demonstrieren, dass die Phagozytoseaktivität und der Oxidative Burst im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-12} M konzentrationsabhängig stimuliert werden, was im Einklang mit bisherigen Studien steht [143; 144]. Hazum et al. wiesen eine spezielle Naloxon-insensitive β-Endorphin-Bindungsstelle auf Immunozyten nach [109]. Die Naloxon-sensible Bindungsstelle des β-Endorphins auf Leukozyten ist dagegen bisher weitgehend unerforscht. Die Opioidpeptide β-Endorphin und Met-Enkephalin vermitteln ihre Wirkung zumindest zum Teil über δ-Opioidrezeptoren [80; 153]. Stefano et al. beschrieben die Existenz eines δ-Opioidrezeptor-Subtyps auf Granulozyten, der als δ_2-Rezeptor klassifiziert wurde [159]. Über diesen Opioidpeptid-sensitiven Rezeptor werden stimulatorische Effekte auf Granulozyten vermittelt [152; 159]. Stefano et al. inkubierten humane Granulozyten mit 10^{-11} M Met-Enkephalin und DAMA [159]. Dies führte zur Adhärenz und zur Konformationsänderung der Immunozyten, als Zeichen einer gesteigerten Aktivität [159]. Die Effekte waren Naloxon und Naltrexon reversibel [159]. Stefano et al. zeigten in weiteren Bindungsstudien eine hoch spezifische Affinät des δ_2-Rezeptors für Enkephaline und Endorphine, während μ- und κ-Agonisten wirkungslos blieben [159]. Die verschiedenen Opioidpeptide besitzen eine unterschiedliche Bindungsaffinität für den granulozytären δ_2-Rezeptor: DAMA > Met-Enkephalin > DADLE > DPDPE [159]. In der vorliegenden Studie wurden für DADLE und DPDPE quantitativ ähnliche Ergebnisse gefunden, wie nach Inkubation mit Met-Enkephalin oder Endorphin. Stefano et al. inkubierten Met-Enkephalin allerdings für 90 min zusammen mit dem NEP-Inhibitor Phosphoramidon [159]. In der vorliegenden Studie wurde Met-Enkephalin für 10 min ohne einen NEP-Inhibitor inkubiert. Dies kann Grund für die fehlenden quantitativen Differenzen zwischen DADLE, DPDPE und Met-Enkephalin sein, da wegen der enzymatischen Enkephalin-Metabolisierung auf eine Verlängerung der Inkubationszeit verzichtet wurde. Met-Enkephalin zeigte in der vorliegenden Arbeit eine konzentrationsabhängige Stimulation aller gemessenen Parameter. Die Vorinkubation mit Naloxon antagonisierte diese Effekte, was auf eine Opioidrezeptor vermittelte Wirkung deutet. Die in der vorliegenden Studie beobachteten stimulatorischen Endorphin- und Enkephalin-Effekte auf die Funktion neutrophiler Granulozyten deuten darauf hin, dass diese über einen granulozytären Opioidpeptid-sensitiven, Opiat-insensitiven δ_2-Rezeptor vermittelt

werden. Met-Enkephalin repräsentiert das N-terminale β-Endorphin-Fragment. Wir fanden beim Met-Enkephalin keinerlei differente Effekte zwischen der Inkubation mit vitalen oder inaktiven Bakterien. Dies deutet darauf hin, dass die bakterielle Bindung von β-Endorphin tatsächlich über den C-Terminus abläuft. Dieses Peptid-Fragment selbst besitzt aber keinerlei immunmodulatorische Wirkung. Wir konnten in der vorliegenden Studie keine Veränderungen eines Meßparameters durch β-Endorphin$_{27-31}$ beobachten. Sacerdote et al. untersuchten an Monozyten die Wirkungen verschiedener β-Endorphin-Fragmente [136]. Nur die Fragmente mit intaktem N-Terminus wiesen Naloxon-reversible Effekte auf, während das C-terminale Fragment allein wirkungslos blieb [136].

Bei Inkubation mit vitalen St. aureus zeigten sich divergierende Effekte. Zwar wird konzentrationsabhängig die Expression der Membranrezeptoren stimuliert, parallel dazu findet sich aber eine Abnahme von Phagozytoseaktivität und Oxidativem Burst. Bei Inkubation mit thermisch abgetöteten Bakterien wurde eine dagegen eine gleichgerichtete Stimulation aller Parameter beobachtet. Eine mögliche Erklärung liegt in der Tatsache, dass vitale St.aureus und E.coli eine spezifische Non-Opioid-Bindungsstelle für β-Endorphin$_{1-31}$ besitzen. Nach Kontakt des Bakteriums mit Serumproteinen bindet β-Endorphin$_{1-31}$ mit seinem C-Terminus (β-Endorphin$_{27-31}$) an die bakterielle Bindungsstelle. Der N-Terminus des Peptids bildet dann eine Brücke zum granulozytären Opioidrezeptor. Ob diese Peptidbindung an das Bakterium verantwortlich für die Inhibition der Phagozytoseaktivität ist, bleibt fraglich. Möglich wäre eine Konformationsänderung der bakteriellen Oberfläche. Der Bindungseffekt tritt aber nur bei Inkubation mit Humanserum auf. Möglicherweise zerstört die thermische Behandlung der Bakterien diese Bindungsstellen, so dass die Phagozytose des Mikroorganismus nicht beeinträchtigt wird.

4.2.3.2 Effekte von DADLE und DPDPE

Im Gegensatz zum Morphin stimulierten die δ-Rezeptor Agonisten DADLE und DPDPE in der vorliegenden Studie konzentrationsabhängig die Expression der Oberflächenrezeptoren, die Phagozytoseaktivität und den Oxidativen Burst. Grimm et al. demonstrierten die Rolle von δ-Rezeptoren in der Opioid-vermittelten Immunmodulation [66], jedoch besitzen diese Agonisten offenbar keine Affinität zum granulozytären μ_3-Rezeptor [97], was mit unseren Ergebnissen übereinstimmt. Stefano et al. fanden in Bindungsstudien an Invertebraten Hinweise für die Existenz von δ-

Rezeptoren auf Immunozyten [153]. Die selektiven δ-Opioidrezeptoragonisten DAMA, DADLE und DPDPE stimulierten die Aktivität der Immunozyten [153]. Diese Effekte konnten durch Vorinkubation mit dem selektiven δ-Rezeptorantagonisten Naltrindol aufgehoben werden, während Naloxon in 10^{-11} M Konzentration wirkungslos blieb [153]. Stefano et al. verglichen die stimulatorischen Effekte von Met-Enkephalin mit synthetischen Opioidpeptiden und fanden quantitativ ähnliche Ergebnisse [159]. Dies steht im Einklang mit unseren Resultaten, bei denen die stimulatorischen DADLE- und DPDPE-Effekte etwa die selbe Größenordnung besaßen wie die Ergebnisse nach Inkubation mit endogenen Opioidpeptiden. Die vorliegende Studie deutet darauf hin, dass Granulozyten nicht nur über μ-Rezeptoren verfügen, die inhibitorische Opiateffekte vermitteln, sondern auch δ-Rezeptoren besitzen, über die Opioidpeptide stimulatorische Effekte ausüben [153]. Die selektiven δ-Rezeptoragonisten DADLE und DPDPE stimulierten in der vorliegenden Studie konzentrationsabhängig die Expression von Komplementrezeptoren, Phagozytose und Oxidativem Burst. Diese Effekte waren maximal im Bereich von 10^{-7} M und waren sowohl durch Inkubation mit Naloxon als auch durch das δ-Rezeptor selektivere Naltrindol antagonisierbar. Die Verlängerung der Inkubationszeiten auf 150 min erbrachte ähnliche Ergebnisse, eine NEP enzymatische Metabolisierung von DADLE und DAMGO konnte nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse unserer Studie deuten darauf hin, dass die synthetischen Opioidpeptide, ähnlich wie Met-Enkephalin und β-Endorphin$_{1\text{-}31}$, ihre Wirkung auf neutrophile Granulozyten via eines δ_2-Rezeptor gekoppelten Mechanismus vermitteln.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass Opiate und Opioide differente immunoregulatorische Eigenschaften besitzen. Wir konnten nachweisen, dass die immunsuppressiven Effekte von Morphin zumindest zum Teil über einen NO-gekoppelten Mechanismus vermittelt werden. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse dieser Studie sollte die Funktion von Opiaten und Opioidpeptiden in klinischen Studien hinsichtlich ihrer *in-vivo* Bedeutung untersucht werden.

4.2.4 Klinische Bedeutung

Die vorliegende Studie zeigt, dass Opiate und Opioidpeptide neben ihren analgetischen Eigenschaften auch immunoregulatorische Funktionen besitzen. So stellen Infektionen, generalisierte Entzündungssyndrome wie Sepsis oder Systemic Inflammatory Syndrome (SIRS) und auch Störungen der Organfunktionen eine häufige Komplikation von

schweren Traumata oder ausgedehnten chirurgischen Eingriffen dar. Unter pathophysiologischen Bedingungen ist die immunologische Homöostase des Organismus häufig gestört [22]. Zu den multiplen Mechanismen dieser Entzündungsreaktionen gehören u.a. auch die Kaskaden des Komplementsystems, die Aktivierung von Granulozyten, die Produktion endogener Opioidpeptide und die Interaktion von Botenstoffen wie NO mit Endothelien [22]. Diese Mediatoren sind eng verzahnt, und die immunoregulatorischen Mechanismen nicht ausreichend geklärt, so dass therapeutische Ansätze mit Modulation der Immunkaskaden bislang erfolglos verliefen [122]. Okur et al. zeigten, dass im Tiermodell Naloxon die erhöhten β-Endorphin-Plasmaspiegel in der Sepsis senken kann [111].

Morphin und seine Derivate dienen als potentes Schmerzmittel in der Behandlung akuter postoperativer Schmerzen, sowie in der Therapie des chronischen Schmerzes [135]. Schmerzpatienten und Heroinabhängige besitzen eine erhöhte Infektionsneigung, was zumindest zum Teil über die immunsuppressiven Opiateffekte vermittelt wird.

Offensichtlich übt Morphin bei chronischer Anwendung einen Trigger-Effekt auf die Entstehung systemischer Entzündungsreaktionen aus. Neben direkten immunsuppressiven Effekten senkte Morphin im Tiermodell die zur Sepsis-Induktion benötigte LPS-Dosis [135]. In der vorliegenden Studie inhibierte Morphin u.a. die Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten. Damit wird ein wesentlicher systemischer Abwehrmechanismus geschwächt, was auch zur Letalität in der Sepsis oder zur Entstehung generalisierter Entzündungsreaktionen beitragen kann. Allerdings ist es durchaus denkbar, dass Morphin im Rahmen von Therapieschemata mit Einbeziehung sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Komponenten Verwendung finden könnte.

Kardiochirurgische Eingriffe können eine Hyperinflammation induzieren, die durch eine präoperative Morphin-Gabe reduziert wurde [20]. Bei kardiopulmonalen Bypass-Operationen fanden Brix-Christensen et al. erhöhte endogene Morphin-Spiegel, was auf eine Autoregulation antiinflammatorischer Prozesse deutet [26].

Fentanyl dagegen erwies sich in unseren Untersuchungen als immunologisch inertes Opiat. Als Komponente einer Analgosedierung in der Intensivtherapie oder zur Supplementierung von Narkosen stellt Fentanyl aus immunologischer Sicht somit ein bedenkenlos einsetzbares Medikament dar.

Sowohl endogene als auch synthetische Opioidpeptide stimulierten in der vorliegenden Untersuchung die Funktion neutrophiler Granulozyten. Denkbar wäre langfristig die

Nutzung synthetischer Opioidpeptide zur Immunstimulation als Komponente einer differenzierten Sepsistherapie.

Diese Beispiele zeigen den engen Zusammenhang zwischen der Untersuchung immunologischer Prozesse *in-vitro* und den weitreichenden klinischen Konsequenzen die diese Fragestellungen besitzen können. Eine nähere Untersuchung und das Verständnis zellulärer Mechanismen der Immunoregulation kann auf lange Sicht dazu beitragen, effektivere Therapieoptionen für kritisch kranke Patienten zu entwickeln und postoperativ immunologische Komplikationen zu verringern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Vollblut untersuchten wir mittels Durchflußzytometrie die Effekte von Opioden und Opiaten auf die Funktion neutrophiler Granulozyten. Wir konnten an einem Kollektiv gesunder Probanden zeigen, dass Morphin, Fentanyl und Opioide differente Effekte auf die Expression der Komplementrezeptoren CR 3 (CD 11b/CD 18), CD 16, CR 1 (CD 35), sowie auf die Phagozytoseaktivität und den Oxidativen Burst der Granulozyten ausüben.

Morphin inhibiert zeit- und konzentrationsabhängig alle gemessenen Parameter mittels NO-Freisetzung. Diese Effekte können durch Naloxon und NO-Synthaseinhibitoren aufgehoben werden, was auf eine durch Opioidrezeptoren vermittelte NO-Wirkung deutet.

Diese These wird durch Ergebnisse von Stefano et al., die die Existenz eines Morphin-sensitiven, aber Opioid-peptid-insensitiven μ-Rezeptor-Subtyps sowohl auf Immunozyten [98; 155], als auch auf Endothelzellen beschreiben, gestützt [157]. Dieser Rezeptor wird als μ_3-Rezeptor klassifiziert. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei neutrophilen Granulozyten nicht nur eine eingeschränkte Migration und Adhäsion an Endothel, sondern auch eine reduzierte Expression von Komplement- und Immunglobulinrezeptoren über diesen μ_3 –Rezeptor vermittelt wird. Im Gegensatz dazu zeigt der selektive μ-Rezeptoragonist DAMGO keinerlei immunoregulatorische Wirkung. Die fehlende Wirkung anderer klassischer μ-Agonisten weist auf die hohe Spezifität des μ_3-Rezeptors für Morphin hin.

Fentanyl teilt zwar die analgetischen Eigenschaften Morphins, beeinflusst aber selbst in supraklinischen Konzentrationen weder die Rezeptorexpression, noch den Oxidativen Burst oder die Phagozytoseaktivität.

β-Endorphin$_{1-31}$ und Met-Enkephalin stimulieren konzentrationsabhängig und Naloxon-reversibel die Expression aller untersuchten Antikörper. Bei Inkubation mit vitalen Bakterien reduziert β-Endorphin$_{1-31}$ signifikant die Phagozytoseaktivität und den Oxidativen Burst. Bei Inkubation mit Hitze-inaktivierten Bakterien, werden Phagozytose und Oxidativer Burst signifikant gesteigert. Diese Differenzen entstehen möglicherweise durch β-Endorphin -Bindungsstellen auf St. aureus-Bakterien.

Der C-Terminus des β-Endorphins (β-Endorphin$_{27-31}$) ist an der Wirkung der Opioidpeptide auf die gemessenen Parameter nicht beteiligt.

Die synthetischen δ-Opioidrezeptoragonisten DADLE und DPDPE erhöhen signifikant die Expression von CD 11, CD 16 und CD 35, sowie die Phagozytoseaktivität und den Oxidativen Burst. Eine Vorinkubation mit Naloxon und Naltrindol antagonisiert diese Effekte, was auf einen δ_2-Opioidrezeptor gekoppelten Mechanismus deutet. Dieser Opioidpeptid-sensitive, aber Opiat-insensitive δ_2-Opioidrezeptor vermittelt stimulatorische Opioidpeptid-Effekte auf neutrophile Granulozyten [159]. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse dieser Studie sollte die Funktion von Opiaten und Opioidpeptiden in klinischen Studien hinsichtlich ihrer *in-vivo* Bedeutung untersucht werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Andrew PJ, Harant H, Lindley IJ: Nitric oxide regulates IL-8 expression in melanoma cells at the transcriptional level. Biochem Biophys Res Commun 214:949-956, 1995

2. Anggard E: Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine Lancet 343:1199-1206, 1994

3. Antal P, Sipka S, Suranyi P, Csipo I, Seres T, Marodi L, Szegedi G: Flow cytometric assay of phagocytic activity of human neutrophils and monocytes in whole blood by neutral red uptake. Ann Hematol 70:259-265, 1995

4. Bach FH, Ferran C, Candinas D, Miyatake T, Koyamada N, Mark W, Hechenleitner P, Hancock WW: Accommodation of xenografts: expression of "protective genes" in endothelial and smooth muscle cells. Transplant Proc 29:56-58, 1997

5. Barger SW, Harmon AD: Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. Nature 388:878-881, 1997

6. Barker DP, Rutter N: Stress, severity of illness, and outcome in ventilated preterm infants. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 75:F187-F1901996

7. Barron RL: Pathophysiology of septic shock and implications for therapy. Clin Pharm 12:829-845, 1993

8. Baxter MG, Follenfant RL, Miller AA, Sethna DM: Some morphine-like properties of a potent antinociceptive synthetic pentapeptide in relation to physical dependence in rodents. Br J Pharmacol 59:523P1977

9. Bednar MM, Balazy M, Murphy M, Booth C, Fuller SP, Barton A, Bingham J, Golding L, Gross CE: Peroxynitrite augments fMLP-stimulated chemiluminescence by neutrophils in human whole blood. J Leukoc Biol 60:619-624, 1996

10. Bellavite P: The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. Free Radic Biol Med 4:225-261, 1988

11. Berger M, Birx DL, Wetzler EM, O'Shea JJ, Brown EJ, Cross AS: Calcium requirements for increased complement receptor expression during neutrophil activation. J Immunol 135:1342-1348, 1985

12. Berger M, O'Shea J, Cross AS, Folks TM, Chused TM, Brown EJ, Frank MM: Human neutrophils increase expression of C3bi as well as C3b receptors upon activation. J Clin Invest 74:1566-1571, 1984

13. Berkenstadt H, Segal E, Mayan H, Almog S, Rotenberg M, Perel A, Ezra D: The pharmacokinetics of morphine and lidocaine in critically ill patients. Intensive Care Med 25:110-112, 1999

14. Berton, G., Laudanna, C., Sorio, C., and Rossi, F. Generation of signals activating neutrophil functions by leukocyte integrins: LFA-1 and gp150, but not CR3 are able to stimulate the respiratory burst of human neutrophils. J Cell Biol 116:1007, 1992

15. Bianchi E, Guarna M, Tagliamonte A: Immunocytochemical localization of endogenous codeine and morphine. Adv Neuroimmunol 4:83-92, 1994

16. Bianchi M, Jotti E, Sacerdote P, Panerai AE: Traditional acupuncture increases the content of beta-endorphin in immune cells and influences mitogen induced proliferation. Am J Chin Med 19:101-104, 1991

17. Bikoue A, George F, Poncelet P, Mutin M, Janossy G, Sampol J: Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression: normal adult values. Cytometry 26:137-147, 1996

18. Bilfinger TV, Fimiani C, Stefano GB: Morphines immunoregulatory actions are not shared by fentanyl. Int J Cardiol, 1998

19. Bilfinger TV, Hartman AR, Liu Y, Magazine HI, Stefano GB: Cryopreserved veins in myocardial revascularization: possible mechanism for their increased failure. Ann Thorac Surg 63:1063-1069, 1997

20. Bilfinger TV, Kushnerik V, Bundz S, Liu Y, Stefano GB: Evidence for morphine downregulating immunocytes during cardiopulmonary bypass in a porcine model. Int J Cardiol 53 Suppl:S39-46, 1996

21. Blix IJ, Helgeland K, Kahler H, Lyberg T: LPS from Actinobacillus actinomycetemcomitans and the expression of beta2 integrins and L-selectin in an ex vivo human whole blood system. Eur J Oral Sci 107:14-20, 1999

22. Bone RC: The pathogenesis of sepsis. Ann Intern.Med 115:457-469, 1991

23. Borregaard, N. and Tauber, A. I. Subcellular localization of the human neutrophil NADPH oxidase. J Biol Chem 259, 47-52. 1984

24. Bossuyt, X., Marti, G. E., and Fleisher, T. A. Comparative analysis of whole blood lysis methods for flow cytometry. Cytometry 30, 124-133. 1997

25. Bredius RG, Fijen CA, de Haas M, Kuijper EJ, Weening RS, van de Winkel JG, Out TA: Role of neutrophil Fc gamma RIIa (CD32) and Fc gamma RIIIb (CD16) polymorphic forms in phagocytosis of human IgG1- and IgG3-opsonized bacteria and erythrocytes. Immunology 83:624-630, 1994

26. Brix-Christensen V, Tonnesen E, Sanchez RG, Bilfinger TV, Stefano GB: Endogenous morphine levels increase following cardiac surgery as part of the antiinflammatory response? Int J Cardiol 62:191-197, 1997

27. Brix-Christensen V, Tonnesen E, Sorensen J, Bilfinger TV, Sanchez RG, Stefano GB: Effects of anaesthesia based on high versus low doses of opioids on the cytokine and acute-phase protein responses in patients undergoing cardiac surgery. Acta Anaesthesiol Scand 42:63-70, 1998

28. Cabot PJ, Carter L, Gaiddon C, Zhang Q, Schafer M, Loeffler JP, Stein C: Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats. J Clin Invest 100:142-148, 1997

29. Cadet P, Bilfinger TV, Fimiani C, Peter D, Stefano GB: Human vascular and cardiac endothelia express mu opiate receptor transcripts. Endothelium 2000

30. Carr DJJ, Serou M: Exogenous and endogenous opioids as biological response modifiers. Immunopharmacology 31:59-71, 1995

31. Carter, P. H., Resto-Ruiz, S., and Washington, G. C. Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants and five cell preparations. Cytometry 13, 68-74. 1992

32. Casellas, A. M., Guardiola, H., and Renaud, F. L. Inhibition by opioids of phagocytosis in peritoneal macrophages. Neuropeptides 18, 35-40. 1991

33. Cassatella MA, Anegon I, Cuturi MC, Griskey P, Trinchieri G, Perussia B: Fc gamma R(CD16) interaction with ligand induces Ca2+ mobilization and phosphoinositide turnover in human natural killer cells. Role of Ca2+ in Fc gamma R(CD16)-

induced transcription and expression of lymphokine genes. J Exp Med 169:549-567, 1989

34. Chen WY, Lei HY, Wang JY, Lu CC: Direct measurement of neutrophil F-actin content in microvolume whole blood samples. Int Arch Allergy Immunol 110:325-331, 1996

35. Cheung, K., Archibald, A. C., and Robinson, M. F. The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. J Immunol 130, 2324-2329. 1984

36. Chuang TK, Killam KFJ, Chuang LF, Kung HF, Sheng WS, Chao CC, Yu L, Chuang RY: Mu opioid receptor gene expression in immune cells. Biochem Biophys Res Commun 216:922-930, 1995

37. Czlonkowski A, Stein C, Herz A: Peripheral mechanisms of opioid antinociception in inflammation: involvement of cytokines. Eur J Pharmacol 242:229-235, 1993

38. Dalayeun JF, Nores JM, Bergal S: Physiology of beta-endorphins. A close-up view and a review of the literature. Biomed.Pharmacother. 47:311-320, 1993

39. Dokter WHA, Koopmans SB, Vellenga E: Effects of IL-10 and IL-4 on LPS-induced transcription factors (AP-1, NF-IL6 and NF-kappa B) which are involved in IL-6 regulation. Leukemia 10:1308-1316, 1996

40. Dooley DC, Simpson JF, Meryman HT: Isolation of large numbers of fully viable human neutrophils: A preparative technique using Percoll density gradient centrifugation. Exp Hematol 10:597-599, 1982

41. Edwards SW: Biochemistry and physiology of the neutrophil. Edited by Edwards SW. Cambridge, Cambridge University Press, 1994, pp 77-125

42. Edwards SW: Neutrophils and host defense, Biochemistry and physiology of the neutrophil. Edited by Edwards SW. Cambridge, Cambridge University Press, 1994, pp -32

43. Edwards SW: The generation and recognition of neutrophil-activating factors: Structure and function of neutrophil receptors, Biochemistry and physiology of the neutrophil. Edited by Edwards SW. Cambridge, Cambridge University Press, 1994, pp 77-127

44. Edwards SW: Cell signalling by integrins and immunoglobulin receptors in primed neutrophils. Trends Biochem Sci 20:362-367, 1995

45. Edwards, S. W. and Watson, F. The cell biology of phagocytes. Immunology today 16, 508-510. 1995

46. Edwards SW, Watson F, MacLeod R, Davies J: Receptor expression and oxidase activity in human neutrophils: regulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and dependence upon protein biosynthesis. Biosci Rep 10:393-401, 1990

47. el Habbal MH, Carter H, Smith LJ, Elliott MJ, Strobel S: Neutrophil activation in paediatric extracorporeal circuits: effect of circulation and temperature variation. Cardiovascular Research 29:102-107, 1995

48. Elsner J, Kaever V, Emmendorffer A, Breidenbach T, Lohmann Matthes ML, Roesler J: Heterogeneity in the mobilization of cytoplasmic calcium by human polymorphonuclear leukocytes in response to fMLP, C5a and IL-8/NAP-1. J Leukoc.Biol. 51:77-83, 1992

49. Emmendörffer, A., Hecht, M., Lohmann-Matthes, M.-L., and Roesler, J. A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. J Immunol Meth. 131, 269-275. 1990

50. Endo S, Inada K, Nakae H, Arakawa N, Takakuwa T, Yamada Y, Shimamura T, Suzuki T, Taniguchi S, Yoshida M: Nitrite/nitrate oxide (NOx) and cytokine levels in patients with septic shock. Research Communications in Molecular Pathology & Pharmacology 91:347-356, 1996

51. Falke NE, Fischer EG: Opiate receptor mediated internalization of 125I-beta-endorphin in human polymorphonuclear leucocytes. Cell Biol Int Rep 10:429-435, 1986

52. Fällmann, M., Andersson, R., and Andersson, T. Signaling properties of CR3 (CD11b/CD18) and CR1 (CD35) in relation to phagocytosis of complement-opsonized particles. J Immunol 151, 338. 1993

53. Fearon, D. T. and Collins, L. A. Increased expression of C3b receptors on polymorphonuclear leukocytes induced by chemotactic factors and by purification procedures. J Immunol 130, 370-375. 1983

54. Fecho K, Lysle DT: Phenotypic analysis of splenocyte subsets following acute morphine treatment in the rat. Cell Immunol 195:137-146, 1999

55. Fimiani C, Arcuri E, Santoni A, Rialas C, Bilfinger TV, Peter D, Salzet B, Stefano GB: The 3 opiate receptor expression in lung and lung carcinoma:ligand binding and coupling to nitric oxide release. Cancer Lett 146:45-51, 1999

56. Fischer EG, Falke NE: Beta-endorphin modulates immune functions. A review. Psychother Psychosom 42:195-204, 1984

57. Fleit HB: Monoclonal antibodies to human neutrophil Fc gamma RIII (CD16) identify polypeptide epitopes. Clin Immunol Immunopathol 59:222-235, 1991

58. Fleit HB, Kobasiuk CD, Peress NS, Fleit SA: A common epitope is recognized by monoclonal antibodies prepared against purified human neutrophil Fc gamma RIII (CD16). Clin Immunol Immunopathol 62:16-24, 1992

59. Forsyth, K. D. and Levinsky, R. J. Preparative procedures of cooling and re-warming increase leucocyte integrin expression and function on neutrophils. J Immunol Meth 128, 159-163. 1990

60. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., and Starke, K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 1996

61. Francis, C. and Connelly, M. C. Rapid single-step method for flow cytometry detection of surface and intracellular antigens using whole blood. Cytometry 25(58), 70. 1996

62. Galon J, Gauchat JF, Mazieres N, Spagnoli R, Storkus W, Lotze M, Bonnefoy JY, Fridman WH, Sautes C: Soluble Fcgamma receptor type III (FcgammaRIII, CD16) triggers cell activation through interaction with complement receptors. J Immunol 157:1184-1192, 1996

63. Gordon DL, Rice JL, McDonald PJ: Regulation of human neutrophil type 3 complement receptor (iC3b receptor) expression during phagocytosis of Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Immunology 67:460-465, 1989

64. Goumon Y, Zhu W, Weeks BS, Casares F, Cadet P, Bougaeva M, Brownawell B, Stefano GB: Identification of morphine in the adrenal medullary chromaffin PC-12 cell line. Brain Res Mol Brain Res 81:177-180, 2000

65. Graves V, Gabig T, McCarthy L, Strour EF, Leemhuis T, English D: Simultaneous mobilization of Mac-1 (CD11b/CD18) and formyl peptide chemoattractant receptors in human neutrophils. Blood 80:776-787, 1992

66. Grimm MC, Ben Baruch A, Taub DD, Howard OM, Resau JH, Wang JM, Ali H, Richardson R, Snyderman R, Oppenheim JJ: Opiates transdeactivate chemokine receptors: delta and mu opiate receptor-mediated heterologous desensitization. J Exp Med 188:317-325, 1998

67. Haberstock H, Marotti T: The relevance of intact enkephalin molecule in predominantly delta opioid receptor mediated superoxide anion release. Neuropeptides 29:357-365, 1995

68. Harbour DV, Galin FS, Hughes TK, Smith EM, Blalock JE: Role of leukocyte-derived pro-opiomelanocortin peptides in endotoxic shock. Circ Shock 35:181-191, 1991

69. Harbour DV, Smith EM, Blalock JE: Splenic lymphocyte production of an endorphin during endotoxic shock. Brain Behav Immun 1:123-133, 1987

70. Hassan AH, Pzewlocki R, Herz A, Stein C: Dynorphin, a preferential ligand for kappa-opioid receptors, is present innerve fibers and immune cells within inflamed tissue of the rat. Neurosci Lett 140:85-88, 1992

71. Hasui, M., Hirabayashi, Y., and Kobayashi, Y. Simultaneous measuring by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. J Immunol Meth 117, 53-58. 1989

72. Hed, J., Berg, O., Forslid, J., Hallden, G., and Larka-Rafner, G. The expression of CR1 and CR3 on non-modulated granulocytes of healthy blood donors as measured by flow cytofluorometry. Scand J Immunol 28, 339-344. 1988

73. Henderson, L. M. and Chappell, J. B. Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? Eur J Biochem 217, 973-980. 1993

74. Herz, A. Opioids. Hdb.Exp.Pharmac. 104/1/2. 2000

75. Himmelfarb, J., Hakim, R. M., Holbrook, D. G., Leeber, D. A., and Ault, K. A. Detection of granulocytes reactive oxygen species formation in whole blood using flow cytometry. Cytometry 13, 83-89. 1992

76. Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH, Fishman MC: Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. Cell 75:1273-1286, 1993

77. Jessop DS: Beta-endorphin in the immune system--mediator of pain and stress? Lancet 351:1828-1829, 1998

78. Jones DH, Anderson DC, Burr BL, Rudloff HE, Smith CW, Krater SS, Schmalstieg FC: Quantitation of intracellular Mac-1 (CD11b/CD18) pools in human neutrophils. J Leukoc Biol 44:535-544, 1988

79. Kappelmayer J, Bernabei A, Gikakis N, Edmunds LH, Jr., Colman RW: Upregulation of Mac-1 surface expression on neutrophils during simulated extracorporeal circulation. J Lab Clin Med 121:118-126, 1993

80. Kazmi SM, Mishra RK: Opioid receptors in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: evidence for distinct morphine (mu) and enkephalin (delta) binding sites. Biochem Biophys Res Commun 137:813-820, 1986

81. Keller HU, Fedier A, Rohner R: Relationship between light scattering in flow cytometry and changes in shape, volume, and actin polymerization in human polymorphonuclear leukocytes. J Leukoc Biol 58:519-525, 1995

82. Kim FJ, Moore EE, Moore FA, Koike K, Carl VS, Banerjee A: Disparate signal transduction in neutrophil CD18 adhesion receptor expression versus superoxide generation. Surgery 116:262-266, 1994

83. Kokubu M, Shimada M, Suzuki N, Kubota Y, Shinya N: General anesthesia and surgical stress increase plasma immunoreactive beta-endorphin-like substances. Bull Tokyo Med Dent.Univ. 32:49-55, 1985

84. Krumholz W, Demel C, Jung S, Meuthen G, Hempelmann G: The influence of fentanyl and alfentanil on functions of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. Acta Anaesthesiol Scand 37:386-389, 1993

85. Krumholz W, Endrass J, Knecht J, Hempelmann G: The effects of midazolam, droperidol, fentanyl, and alfentanil on phagocytosis and killing of bacteria by polymorphonuclear leukocytes in vitro. Acta Anaesthesiol Scand 39:624-627, 1995

86. Krumholz W, Weber C, Kabisch S, Hempelmann G: Effect of opioids on granulocyte adherence. Anasth Intensivther Notfallmed 23:313-315, 1988

87. Larson, R. S. and Springer, T. A. Structure and function of leucocyte integrins. Immunol Rev 114, 181-217. 1990

88. Leeson MC, Morrison DC: Induction of proinflammatory responses in human monocytes by particulate and soluble forms of lipopolysaccharide. Shock 2:235-245, 1994

89. Leu SJ, Singh VK: Suppression of in vitro antibody production by corticotropin-releasingfactor neurohormone. J Neuroimmunol 45:23-29, 1993

90. Lieberman MM, Sachanandani DM, Pinney CA: Comparative study of neutrophil activation by chemiluminescence and flow cytometry. Clin Diagn Lab Immunol. 3:654-662, 1996

91. Lund-Johansen, F. and Olweus, J. Signal transduction in monocytes and granulocytes measured by multiparameter flow cytometry. Cytometry 13, 693-702. 1992

92. Luza J, Kvapilova I: Morphine-induced changes of leukocyte functional properties in vitro. Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med 126:23-30, 1990

93. Lynn WA, Raetz CR, Qureshi N, Golenbock DT: Lipopolysaccharide-induced stimulation of CD11b/CD18 expression on neutrophils. Evidence of specific receptor-based response and inhibition by lipid A-based antagonists. J Immunol 147:3072-3079, 1991

94. Macey MG, Jiang XP, Veys P, McCarthy D, Newland AC: Expression of functional antigens on neutrophils. Effects of preparation. J Immunol Methods 149:37-42, 1992

95. Madara, J. L. Migration of neutrophils through epithelial monolayers. Trends Cell.Biol. 4, 4-7. 1994

96. Magazine HI, Liu Y, Bilfinger TV, Fricchione GL, Stefano GB: Morphine-induced conformational changes in human monocytes, granulocytes, and endothelial cells and in invertebrate immunocytes and microglia are mediated by nitric oxide. J Immunol 156:4845-4850, 1996

97. Makman MH, Bilfinger TV, Stefano GB: Human granulocytes contain an opiate alkaloid-selective receptor mediating inhibition of cytokine-induced activation and chemotaxis. J Immunol 154:1323-1330, 1995

98. Makman MH, Dvorkin B, Stefano GB: Murine macrophage cell lines contain mu 3-opiate receptors. European Journal of Pharmacology 273:R5-R61995

99. Marcoli M, Ricevuti G, Mazzone A, Bekkering M, Lecchini S, Frigo GM: Opioid-induced modification of granulocyte function. Int J Immunopharmacol 10:425-433, 1988

100. Marcoli M, Ricevuti G, Mazzone A, Pasotti D, Lecchini S, Frigo GM: A stereoselective blockade by naloxone of opioid and non-opioid- induced granulocyte activation. Int J Immunopharmacol 11:57-61, 1989

101. Masuda K, Kinoshita Y, Hasui M, Kobayashi Y: Polymorphonuclear leukocyte heterogeneity of Fc receptor expression and membrane potential in human neonates. Biol Neonate 60:168-175, 1991

102. McArdle P: Intravenous analgesia. Crit Care Clin 15:89-104, 1999

103. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol.Rev. 43:109-142, 1991

104. Morel, F., Doussière, J., and Vignais, P. V. The superoxide-generation oxidase of phagocytic cells: physiological, molecular and pathological aspects. Eur.J.Biochem. 201, 523-546. 1991

105. Muirhead, K. A., Schmitt, T. C., and Muirhead, A. R. Determination of linear fluorescence intensities from flow cytometric data accumulated with logarithmic amplifiers. Cytometry 3, 251-256. 1983

106. Nassiri MR, Flynn GL, Shipman CJ: Inhibition of cell growth and DNA, RNA, and protein synthesis in vitro by fentanyl, sufentanil, and opiate analgesics. Pharmacol Toxicol 69:17-21, 1991

107. Nathan, C., Srimal, S., Farber, C., and et al. Cytokine induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11b/CD18 integrins. J Cell Biol 109, 1341-1349. 1989

108. Nebe, C. T. Durchflußzytometrische Meßtechnik und Datenauswertung. Infusionstherapie und Transfusionsmedizin 23, 111-113. 1996

109. Nielsen TH, Nielsen HK, Husted SE, Hansen SL, Olsen KH, Fjeldborg N: Stress response and platelet function in minor surgery during epidural bupivacaine and general anaesthesia: effect of epidural morphine addition. Eur J Anaesthesiol 6:409-417, 1989

110. O'Shea JJ, Brown EJ, Seligmann BE, Metcalf JA, Frank MM, Gallin JI: Evidence for distinct intracellular pools of receptors for C3b and C3bi in human neutrophils. J Immunol 134:2580-2587, 1985

111. Okur H, Bozkurt A, Kucukaydin M, Muhtaroglu S: Effects of naloxone on beta-endorphin and cortisol release in sepsis. Res Exp Med (Berl) 196:247-250, 1996

112. Owen DL, Morley JS, Ensor DM, Miles JB: The C-terminal tetrapeptide of beta-endorphin (MPF) enhances lymphocyte proliferative responses. Neuropeptides 32:131-139, 1998

113. Pasnik J, Tchorzewski H, Baj Z, Luciak M, Tchorzewski M: Priming effect of met-enkephalin and beta-endorphin on chemiluminescence, chemotaxis and CD11b molecule expression on human neutrophils in vitro. Immunol Lett 67:77-83, 1999

114. Perschel, W. T., Langefeld, T., and Yildiz, M. Beschreibung einer Methode zur Quantifizierung der granulozytären Phagozytose von Staphylococcus aureus K 807 mittels Flow-Zytometrie. medwelt 45, 100-105. 1994

115. Perticarari S, Presani G, Banfi E: A new flow cytometric assay for the evaluation of phagocytosis and the oxidative burst in whole blood. J Immunol Methods 170:117-124, 1994

116. Perticarari S, Presani G, Mangiarotti MA, Banfi E: Simultaneous flow cytometric method to measure phagocytosis and oxidative products by neutrophils. Cytometry 12:687-693, 1991

117. Peterson PK, Gekker G, Brummitt C, Pentel P, Bullock M, Simpson M, Hitt J, Sharp B: Suppression of human peripheral blood mononuclear cell function by methadone and morphine. J Infect Dis 159:480-487, 1989

118. Petty HR, Francis JW, Todd RF3, Petrequin P, Boxer LA: Neutrophil C3bi receptors: formation of membrane clusters during cell triggering requires intracellular granules. J Cell Physiol 133:235-42,256, 1987

119. Prieto J, Subira ML, Castilla A, Arroyo JL, Serrano M: Opioid peptides modulate the organization of vimentin filaments, phagocytic activity, and expression of surface molecules in monocytes. Scand J Immunol 29:391-398, 1989

120. Raffael A, Nebe CT, Valet G: Grundlagen der Durchflußzytometrie., Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Edited by G.Schmitz und G.Rothe (Hrsg.). Stuttgart, Schattauer-Verlag, 1994, pp 3-49

121. Rajkovic, I. A. and Williams, R. Inhibition of neutrophil function by hydrogen peroxide. Biochem Pharmacol 34, 2083-2090. 1985

122. Remick DG: Applied molecular biology of sepsis. J Crit Care 10:198-212, 1995

123. Repo H, Jansson SE, Leirisalo Repo M: Flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo. J Immunol Methods 164:193-202, 1993

124. Repo H, Jansson SE, Leirisalo Repo M: Anticoagulant selection influences flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo and ex vivo. J Immunol Methods 185:65-79, 1995

125. Repp R, Valerius T, Sendler A, Gramatzki M, Iro H, Kalden JR, Platzer E: Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Blood 78:885-889, 1991

126. Rest RF: Measurement of human neutrophil respiratory burst activity during phagocytosis of bacteria. Methods Enzymol 236:119-136, 1994

127. Rialas C, Bilfinger TV, Salzet M, Stefano GB: Endomorphin 1 and 2 Do Not Interact with the μ_3 Opiate Receptor Subtype. Acta Pharmacol Sin 19:403-407, 1998

128. Richard S, Shaw AS, Showell HJ, Connelly PA: The role of individual Fc gamma receptors in aggregated IgG- stimulated protein tyrosine phosphorylation in the human neutrophil. Biochem Biophys Res Commun 199:653-661, 1994

129. Robinson, J. M. and Badwey, J. A. The NADPH oxidase complex of phagocytic leucocytes: a biochemical and cytochemical view. Histochemistry 103, 163-180. 1995

130. Romano MF, Lamberti A, Petrella A, Bisogni R, Tassone PF, Formisano S, Venuta S, Turco MC: IL-10 inhibits nuclear factor-kappa B/Rel nuclear activity in CD3-stimulated human peripheral T lymphocytes. J Immunol 156:2119-2123, 1996

131. Romeu, M. A., Mestre, M., Gonzalez, L., Valls, A., Verdaguer, J., Corominas, M., and et al. Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults.

Comparison of fresh blood lysis technique, Ficoll-Paque separation and cryopreservation. J.Immunol.Meth. 154, 7-10. 1992

132. Rothe G, Oser A, Valet G: Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. Naturwissenschaften. 75:354-355, 1988

133. Rothe, G. and Valet, G. Flow cytometric assays of oxidative burst activity in phagocytes. Methods Enzymol 233, 539-548. 1994

134. Roy S, Cain KJ, Chapin RB, Charboneau RG, Barke RA: Morphine modulates NFkappaB activation in macrophages. Biochem Biophys Res Commun 245:392-396, 1998

135. Roy S, Charboneau RG, Barke RA: Morphine synergizes with lipopolysaccharide in a chronic endotoxemia model. J Neuroimmunol 95:107-114, 1999

136. Sacerdote P, Panerai AE: Analysis of the beta-endorphin structure-related activity on human monocyte chemotaxis: importance of the N- and C-terminal. Peptides 10:565-569, 1989

137. Sachs L: Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden. Edited by Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York, 1997, pp 380-393

138. Sarantakis D, Teichman J, Fenichel R, Lien E: [des-Ala1, Gly2]-His4,5D-Trp8-somatostatin: a glucagon-specific and long-acting somatostatin analog. FEBS Lett 92:153-155, 1978

139. Scharrer B, Paemen L, Smith EM, Hughes TK, Lui Y, Pope M, Stefano GB: The presence and effects of mammalian signal molecules in immunocytes of the insect Leucophaea maderae. Cell Tissue Res 283:93-97, 1996

140. Schmidt HH, Walter U: NO at work. Cell 78:919-925, 1994

141. Schutze GE, Hall MA, Baker CJ, Edwards MS: Role of neutrophil receptors in opsonophagocytosis of coagulase- negative staphylococci. Infect Immun 59:2573-2578, 1991

142. Shahabi NA, Peterson PK, Sharp B: Beta-endorphin binding to naloxone-insensitive sites on a human mononuclear cell line (U937): effects of cations and guanosine triphosphate. Endocrinology 126:3006-3015, 1990

143. Sharp BM, Keane WF, Suh HJ, Gekker G, Tsukayama D, Peterson PK: Opioid peptides rapidly stimulate superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and macrophages. Endocrinology 117:793-795, 1985

144. Sharp BM, Tsukayama DT, Gekker G, Keane WF, Peterson PK: Beta-endorphin stimulates human polymorphonuclear leukocyte superoxide production via a stereoselective opiate receptor. J Pharmacol Exp Ther 242:579-582, 1987

145. Shipp MA, Stefano GB, Switzer SN, Griffin JD, Reinherz EL: CD10 (CALLA)/neutral endopeptidase 24.11 modulates inflammatory peptide-induced changes in neutrophil morphology, migration, and adhesion proteins and is itself regulated by neutrophil activation. Blood 78:1834-1841, 1991

146. Simon EJ, Hiller JM, Edelman I: Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. Proc Natl Acad Sci USA 70:1947-1949, 1973

147. Simon SI, Chambers JD, Butcher E, Sklar LA: Neutrophil aggregation is beta 2-integrin- and L-selectin- dependent in blood and isolated cells. J Immunol 149:2765-2771, 1992

148. Simpkins CO, Dickey CA, Fink MP: Human neutrophil migration is enhanced by beta-endorphin. Life Sci 34:2251-2255, 1984

149. Simpkins CO, Ives N, Tate E, Johnson M: Naloxone inhibits superoxide release from human neutrophils. Life Sci 37:1381-1386, 1985

150. Smith JA, Weidemann MJ: Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. J Immunol Methods 162:261-268, 1993

151. Spink J, Cohen J, Evans TJ: The cytokine responsive vascular smooth muscle cell enhancer of inducible nitric oxide synthase. Activation by nuclear factor- kappa B. J Biol Chem 270:29541-29547, 1995

152. Stefano GB, Cadet P, Scharrer B: Stimulatory effects of opioid neuropeptides on locomotory activity and conformational changes in invertebrate and human immunocytes: evidence for a subtype of delta receptor. Proc Natl Acad Sci USA 86:6307-6311, 1989

153. Stefano GB, Casares F, Liu U: Naltrindole sensitive delta 2 opioid receptor mediates invertebrate immunocyte activation. Acta Biol Hung 46:321-327, 1995

154. Stefano GB, Christensen VB, Tonnesen E, Liu Y, Hughes TK, Jr., Bilfinger TV: Interleukin-10 stimulation of endogenous nitric oxide release from human saphenous veins diminishes immunocyte adherence. J Cardiovasc Pharmacol 30:90-95, 1997

155. Stefano GB, Digenis A, Spector S, Leung MK, Bilfinger TV, Makman MH, Scharrer B, Abumrad NN: Opiate-like substances in an invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression. Proc Natl Acad Sci USA 90:11099-11103, 1993

156. Stefano GB, Goumon Y, Casares F, Cadet P, Fricchione GL, Rialas C, Peter D, Sonetti D, Guarna M, Welters ID, Bianchi E: Endogenous morphine. Trends Neurosci 23:436-442, 2000

157. Stefano GB, Hartman A, Bilfinger TV, Magazine HI, Liu Y, Casares F, Goligorsky MS: Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation. J Biol Chem 270:30290-30293, 1995

158. Stefano GB, Kushnerik V, Rodriquez M, Bilfinger TV: Inhibitory effect of morphine on granulocyte stimulation by tumor necrosis factor and substance P. Int J Immunopharmacol 16:329-334, 1993

159. Stefano GB, Melchiorri P, Negri L, Hughes TK, Jr., Scharrer B: [D-Ala2]deltorphin I binding and pharmacological evidence for a special subtype of delta opioid receptor on human and invertebrate immune cells. Proc Natl Acad Sci USA 89:9316-9320, 1992

160. Stefano GB, Paemen LR, Hughes TK, Jr.: Autoimmunoregulation: differential modulation of CD10/neutral endopeptidase 24.11 by tumor necrosis factor and neuropeptides. J Neuroimmunol 41:9-14, 1992

161. Stefano GB, Scharrer B: Endogenous morphine and related opiates, a new class of chemical messengers. Adv Neuroimmunol 4:57-67, 1994

162. Stefano GB, Scharrer B: The presence of the mu3 opiate receptor in invertebrate neural tissues. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 113:369-373, 1996

163. Stefano GB, Scharrer B, Bilfinger TV, Salzet M, Fricchione GL: A novel view of opiate tolerance. Adv Neuroimmunol 6:265-277, 1996

164. Stefano GB, Scharrer B, Smith EM, Hughes TK, Jr., Magazine HI, Bilfinger TV, Hartman AR, Fricchione GL, Liu Y, Makman MH: Opioid and opiate immunoregulatory processes. Crit Rev Immunol 16:109-144, 1996

165. Stefano GB, Shipp MA, Scharrer B: A possible immunoregulatory function for [Met]-enkephalin-Arg6- Phe7 involving human and invertebrate granulocytes. J Neuroimmunol 31:97-103, 1991

166. Stein C: Neuro-immune interactions in pain. Crit Care Med 21:S357-S3581993

167. Stewart CC: Multiparameter analysis of leukocytes by flow cytometry. Methods Cell Biol 33:427-450, 1990

168. Sucic, M., Kolevska, T., Kopjar, B., Kosanovic, M., Drobnjak, M., Zalud, I., and Marusic, M. Accuracy of routine flow-cytometric bitmap selection for three leucocyte populations. Cytometry 10, 442-447. 1989

169. Terenius L: Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasm a membrane fraction of rat cerebral cortex. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) 32:317-320, 1973

170. Tetteroo, P. A. T., Bos, M. J. E., and Visser, F. J. Neutrophil activation detected by monoclonal antibodies. J Immunol 136, 3427-3432. 1986

171. Trinkle LS, Wellhausen SR, McLeish KR: A simultaneous flow cytometric measurement of neutrophil phagocytosis and oxidative burst in whole blood. Diagn Clin Immunol 5:62-68, 1987

172. Tubaro E, Avico U, Santiangeli C, Zuccaro P, Cavallo G, Pacifici R, Croce C, Borelli G: Morphine and methadone impact on human phagocytic physiology. Int J Immunopharmacol 7:865-874, 1985

173. Tubaro E, Borelli G, Croce C, Cavallo G, Santiangeli C: Effect of morphine on resistance to infection. J Infect Dis 148:656-666, 1983

174. Tubaro E, Santiangeli C, Belogi L, Borelli G, Cavallo G, Croce C, Avico U: Methadone vs morphine: comparison of their effect on phagocytic functions. Int J Immunopharmacol 9:79-88, 1987

175. van Amersfoort, E. S. and van Strijp, J. A. G. Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leococytes. Cytometry 17, 294-301. 1994

176. Van Epps DE, Kutvirt SL: Modulation of human neutrophil adherence by beta-endorphin and met-enkephalin. J Neuroimmunol 15:219-228, 1987

177. Van Epps DE, Saland l, Taylor C, Williams RC, Jr.: In vitro and in vivo effects of beta-endorphin and met- enkephalin on leukocyte locomotion. Prog Brain Res 59:361-374, 1983

178. van Pelt LJ, van Zwieten R, Weening RS, Roos D, Verhoeven AJ, Bolscher BG: Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst. J Immunol Methods 191:187-196, 1996

179. Vandenbroucke Grauls CM, Thijssen HM, Tetteroo PA, Rozemuller E, Verhoef J: Increased expression of leucocyte adherence-related glycoproteins by polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis of staphylococci on an endothelial surface. Scand J Immunol 30:91-98, 1989

180. Walport M: Complement, Immunology. Edited by Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Stuttgart; New York, Thieme-Verlag, 1995, pp 158-273

181. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS, Jr.: TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. Science 274:784-787, 1996

182. Watson, F., Robinson, J. J., and Edwards, S. W. Neutrophil function in whole blood and after purification: changes in receptor expression, oxidase activity and responsiveness to cytokines. Bioscience Reports 12, 123-133. 1992

183. Wehlin L, Gustavsson K, Hallden G, Emilson A, Svensson A, Hild M, Lundahl J: Complement activation during blood sampling procedures alters the expression of CD11b/CD18 on human neutrophils. Vox Sang 74:21-26, 1998

184. Welters I, Menzebach A, Menges T, Langefeld T, Teschemacher H, Hempelmann G: Opiates and opioid peptides can affect granulocyte function. Anesth Intensivmed Notfallmed Schmerzth 33:S378-S3791998

185. Welters ID, Menzebach A, Goumon Y, Cadet P, Menges T, Hughes TK, Hempelmann G, Stefano GB: Morphine inhibits NF-κB nuclear binding in human neutrophils and monocytes by a nitric oxide dependent mechanism. Anesthesiology 92:1677-1684, 2000

186. Wenisch C, Narzt E, Sessler DI, Parschalk B, Lenhardt R, Kurz A, Graninger W: Mild intraoperative hypothermia reduces production of reactive oxygen intermediates by polymorphonuclear leukocytes. Anesth Analg 82:810-816, 1996

187. Werfel, T., Witter, W., and Götze, O. CD11b and CD11c antigens are rapidly increased on human natural killer cells upon activation. J.Immunol. 147, 2423-2427. 1991

188. White Owen C, Alexander JW, Babcock GF: Reduced expression of neutrophil CD11b and CD16 after severe traumatic injury. J Surg Res 52:22-26, 1992

189. White IW, Gelb AW, Wexler HR, Stiller CR, Keown PA: The effects of intravenous anaesthetic agents on human neutrophil chemiluminescence. Can Anaesth Soc J 30:506-511, 1983

190. Yeager MP, Yu CT, Campbell AS, Moschella M, Guyre PM: Effect of morphine and beta-endorphin on human Fc receptor- dependent and natural killer cell functions. Clin Immunol Immunopathol 62:336-343, 1992

191. Yoshimura T, Usami E, Kurita C, Watanabe S, Nakao T, Kobayashi J, Yamazaki F, Nagai H: Effect of theophylline on the production of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-8 by human peripheral blood mononuclear cells. Biological & Pharmaceutical Bulletin 18:1405-1408, 1995

192. Youssef PP, Mantzioris BX, Roberts Thomson PJ, Ahern MJ, Smith MD: Effects of ex vivo manipulation on the expression of cell adhesion molecules on neutrophils. J Immunol Methods 186:217-224, 1995

193. Zahler S, Kowalski C, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, Gerlach E: The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. J Immunol Methods 200:173-179, 1997

194. Zhang J, Kaupke CJ, Yousefi S, Cesario TC, Vaziri ND: Flow cytometric investigation of neutrophil activation pathways by n-formyl-Met-Leu-Phe and phorbol myristate acetate. Biol Cell 84:147-153, 1995

7 ANHANG

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Erkennung von Bakterien durch Granulozyten. Das opsonisierte Bakterium wird von Komplement- und Fc-Rezeptoren des Granulozyten erkannt und gebunden. Modifiziert nach [42]. .. 10
Abbildung 2: Antikörper zur Rezeptormarkierung ... 18
Abbildung 3: Prinzip der Funktionsweise eines Flow-Zytometers ... 24
Abbildung 4: FSC/SSC-Diagramm (Originalregistrierung) ... 26
Abbildung 5: Durch Live-Gating können selektiv die neutrophilen Granulozyten ausgewertet werden ... 27
Abbildung 6: Die Negativkontrolle mittels nicht-fluoreszierenderAntikörper repräsentiert die granulozytäre Autofluoreszenz ... 28
Abbildung 7: Nach Markierung der neutrophilen Granulozyten mit einem FITC-markierten Antikörper gegen den Membranrezeptor CD 11 zeigt sich eine starke Zunahme der Grünfluoreszenz. Die Inkubation mit 1 µM Morphin verringert das Signal (gestrichelte Linie) ... 29
Abbildung 8: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Morphin-Konzentrationen ... 32
Abbildung 9: Naloxon und CTOP antagonisieren die Morphin-vermittelte Inhibierung der CR 3 (CD 11b/CD 18)-Expression ... 32
Abbildung 10: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Morphin-Konzentrationen ... 33
Abbildung 11: Naloxon und CTOP antagonisieren die Morphin-vermittelte Inhibierung der CD 16-Expression ... 34
Abbildung 12: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1(CD 35) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Morphin-Konzentrationen ... 35
Abbildung 13: Naloxon und CTOP antagonisieren die Morphin-vermittelte Inhibierung der CR 1(CD 35) -Expression ... 35
Abbildung 14: Phagozytoseaktivität der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Morphin-Konzentrationen ... 36
Abbildung 15: Naloxon und CTOP antagonisieren die Morphin-vermittelte Inhibierung der Phagozytoseaktivität ... 37
Abbildung 16: Oxidativer Burst der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Morphin-Konzentrationen ... 38
Abbildung 17: Naloxon und CTOP antagonisieren die Morphin-vermittelte Inhibierung des Oxidativen Burst ... 38
Abbildung 18: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Fentanyl-Konzentrationen ... 40
Abbildung 19: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Fentanyl-Konzentrationen ... 41

Abbildung 20: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1(CD 35) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Fentanyl-Konzentrationen 41
Abbildung 21: Phagozytoserate der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Fentanyl-Konzentrationen 42
Abbildung 22: Oxidativer Burst der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen Fentanyl-Konzentrationen 43
Abbildung 23: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DAMGO-Konzentrationen 45
Abbildung 24: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DAMGO-Konzentrationen 45
Abbildung 25: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1(CD 35) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DAMGO-Konzentrationen 46
Abbildung 26: Phagozytoserate der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DAMGO-Konzentrationen 46
Abbildung 27: Oxidativer Burst der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DAMGO-Konzentrationen 47
Abbildung 28: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{1-31}$-Konzentrationen 48
Abbildung 29: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die β-Endorphin $_{1-31}$-vermittelte Stimulation der CR 3 (CD 11b/CD 18)-Expression auf PMN 49
Abbildung 30: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{1-31}$-Konzentrationen 50
Abbildung 31: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die β-Endorphin $_{1-31}$-vermittelte Stimulation der CD 16-Expression auf PMN 50
Abbildung 32: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1(CD 35) auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{1-31}$-Konzentrationen 51
Abbildung 33: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die β-Endorphin $_{1-31}$-vermittelte Stimulation der CR1 (CD 35)-Expression auf PMN 52
Abbildung 34: Phagozytoserate der PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{1-31}$-Konzentrationen und Phagozytosestimulation durch vitale Bakterien 53
Abbildung 35: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die β-Endorphin $_{1-31}$-vermittelte Inhibierung der Phagozytoseaktivität nach Inkubation mit vitalen Bakterien 53
Abbildung 36: Phagozytoserate der PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{1-31}$-Konzentrationen und Phagozytosestimulation durch nicht-vitale Bakterien 54
Abbildung 37: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die β-Endorphin $_{1-31}$-vermittelte Stimulation der Phagozytoseaktivität nach Inkubation mit nicht-vitalen Bakterien 55
Abbildung 38: Oxidativer Burst der PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{1-31}$-Konzentrationen und Phagozytosestimulation durch vitale Bakterien 56
Abbildung 39: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die β-Endorphin $_{1-31}$-vermittelte Inhibierung der Oxidativen Burst nach Inkubation mit vitalen Bakterien 56

Abbildung 40: Oxidativer Burst der PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{1-31}$-Konzentrationen und Phagozytosestimulation durch nicht-vitale Bakterien 57
Abbildung 41: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die β-Endorphin $_{1-31}$-vermittelte Inhibierung der Oxidativen Burst nach Inkubation mit nicht-vitalen Bakterien 57
Abbildung 42: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{27-31}$-Konzentrationen 58
Abbildung 43: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{27-31}$-Konzentrationen 59
Abbildung 44: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1(CD 35) auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{27-31}$-Konzentrationen 59
Abbildung 45: Phagozytoserate der PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{27-31}$-Konzentrationen 60
Abbildung 46: Oxidativer Burst der PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen β-Endorphin $_{27-31}$-Konzentrationen 60
Abbildung 47: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen Met-Enkephalin-Konzentrationen 61
Abbildung 48: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die Met-Enkephalin vermittelte Stimulation der CR 3 (CD 11b/CD 18)-Expression 62
Abbildung 49: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen Met-Enkephalin-Konzentrationen 63
Abbildung 50: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die Met-Enkephalin vermittelte Stimulation der CD 16-Expression 63
Abbildung 51: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1(CD 35) auf PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen Met-Enkephalin-Konzentrationen 64
Abbildung 52: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die Met-Enkephalin vermittelte Stimulation der CR 1 (CD 35)-Expression 65
Abbildung 53: Phagozytoserate der PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen Met-Enkephalin-Konzentrationen 65
Abbildung 54: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die Met-Enkephalin vermittelte Stimulation der Phagozytoseaktivität 66
Abbildung 55: Oxidativer Burst der PMN nach 10 minütiger Inkubation mit verschiedenen Met-Enkephalin Konzentrationen 67
Abbildung 56: Naloxon und Naltrindol antagonisieren die Met-Enkephalin vermittelte Stimulation des Oxidativen Burst 67
Abbildung 57: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DADLE-Konzentrationen 68
Abbildung 58: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) nach Vorinkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP 69
Abbildung 59: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DADLE-Konzentrationen 70

Abbildung 60: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 nach Vorinkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP 71
Abbildung 61: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1(CD 35) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DADLE-Konzentrationen 72
Abbildung 62: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1 (CD 35) nach Vorinkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP 72
Abbildung 63: Phagozytoserate der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DADLE-Konzentrationen 73
Abbildung 64: Phagozytoserate der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP 74
Abbildung 65: Oxidativer Burst der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DADLE-Konzentrationen 75
Abbildung 66: Oxidativer Burst der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP 75
Abbildung 67: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DPDPE-Konzentrationen..... 76
Abbildung 68: Expression des Oberflächenrezeptors CR 3 (CD 11b/CD 18) nach Vorinkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP 77
Abbildung 69: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DPDPE-Konzentrationen 78
Abbildung 70: Expression des Oberflächenrezeptors CD 16 nach Vorinkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP 78
Abbildung 71: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1(CD 35) auf PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DPDPE-Konzentrationen 79
Abbildung 72: Expression des Oberflächenrezeptors CR 1 (CD 35) nach Vorinkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP 80
Abbildung 73: Phagozytoseaktivität der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DPDPE-Konzentrationen 81
Abbildung 74: Phagozytoseaktivität der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP 81
Abbildung 75: Oxidativer Burst der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit verschiedenen DPDPE-Konzentrationen 82
Abbildung 76: Oxidativer Burst der PMN nach 10 und 150 minütiger Inkubation mit den Rezeptorantagonisten Naltrindol, Naloxon und CTOP 83

7.2 Abkürzungen

PMN	Polymorphkerniger Neutrophiler
CD ……	Cluster of Differentiation
CR ……	Komplementrezeptor
CTOP	Phe-Cys-Tyr-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr Amid
DADLE	D-Ala^2, D-Ala^5-Enkephalin
DAMGO	D-Ala^2,N-Me-Phe^4,Gly^5-(ol)enkephalin]
DPDPE	D-Pen^{2,5}-Enkephalin
DHR ……..…….…….	Dihydrorhodamin
DNA …….……...	Desoxyribonukleinsäure
FACS ……..……..	Fluorescence Activated Cell Sorter
FITC ……	Fluoresceinisothiocyanat
FMLP ……..…….……	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC ……..……..…	Forward Scatter
ICAM ……	Intercellular adhesion molecule
Ig ……..…….	Immunglobulin
IL …….…….	Interleukin
LASER …….……...……..…	Light Amplification by stimulated emission of radiation
LPS ……..……..……..	Lipopolysaccharide
MPS ……..……..…….	Mononukleäres-Phagozytäres-System
NADPH …….……..	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Diphosphat
NEP	Neural Endopeptidase
NLA	N-nitro-l-arginin
NO	Stickstoffmonoxid
PBS …….…….	Phosphat buffered saline
PI ……..	Propiumjodid
SSC ……..	Sideward scatter
SNAP	S-nitroso-N-acetyl-pencillamin
St. aureus	Staphylococcus aureus

7.3 Verwendete Materialien und Reagenzien

Substanz bzw. Material	Hersteller
Anti-CD11b-Antikörper	Serotec-Biozol, Eching, Deutschland, Klon ICRF 44
Anti-CD16-Antikörper	Serotec-Biozol, Eching, Deutschland, Klon, LNK 16
Anti-CD35-Antikörper	Serotec-Biozol, Eching, Deutschland, Klon E11
B-Endorphin $_{1-31}$	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
B-Endorphin $_{27-31}$	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
CTOP	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DADLE	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DAMGO	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DPDPE	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
FACS-Brand-Lysing®-Lösung	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACScan®-Reagenzröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS-Flow®	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Fentanyl	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
FITC	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Met-Enkephalin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Morphinsulfat	Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland
Naloxon	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
NLA	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
PBS	BAG, Lich, Deutschland
Phagoburst®-Testkit	Orpegen, Heidelberg, Deutschland
SNAP	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trypanblau-Lösung	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

8 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Gunter Hempelmann für die Überlassung dieses Themas und für die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Mitarbeit in der Abteilung Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin

Dr. med. Ingeborg Welters für Ihre außergewöhnlich kompetente und freundschaftliche Betreuung. Sie war und ist stets die unermüdliche Antreiberin, immer ansprechbar, wissenschaftlich hochkompetent und mittlerweile zähle ich sie zu meinen besten Freunden.

Der **leitenden MTA Birgit Weber und dem Team der Lungenfunktion** für ihre große Hilfsbereitschaft

Dipl.-Math. Martin Mogk (Büro für Statistik Mogk & Reitze GbR) für die statistische Auswertung dieser Studie

Prof. Dr. Hansjörg Teschemacher für seine Hilfsbereitschaft bei der Bereitstellung der Opioidpeptide und für fachliche Ratschläge rund ums Thema „Opiate/Opioidpeptide“

Ursula Wunder für ihre Geduld, Hilfe und eine Freundschaft, die in dieser Zeit einige Höhen und Tiefen überstanden hat

Allen Probanden für ihre Bereitschaft zur Teilnahme an dieser Studie

9 LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN:

- Name: Axel Menzebach
- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geboren: 18.7.1973
- Geburtsort: Soest

AUSBILDUNG

- 1979 - 1983 St. Pankratius-Grundschule Möhnesee
- 1983 - 1992 Aldegrever-Gymnasium Soest
- **Juni 1992 Allgemeine Hochschulreife**
- 1992 - 1993 Zivildienst beim Rettungsdienst des Kreises Soest, Ausbildung zum Rettungssanitäter
- 1994 - 2000 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität, Gießen
- **April 1996 Physikum**
- **April 1997 Erstes Staatsexamen**
- **April 1999 Zweites Staatsexamen**
- **April 2000 Drittes Staatsexamen**

BERUF

- **Seit Mai 2000 Arzt im Praktikum (AIP)**
  Abtlg. Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin
  Klinikum der JLU Gießen