



**DIRK PETER REUßNER**

**Der Einfluß verschiedener intravenöser  
Anästhetika auf die Chemotaxis menschlicher  
Monozyten in vitro**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

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

---

**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Der Einfluß verschiedener intravenöser Anästhetika  
auf die Chemotaxis menschlicher Monozyten in vitro**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von     DIRK PETER REUßNER  
                  aus     Groß-Gerau

Giessen 2004

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anaesthesiologie und Urologie  
Abteilung Anaesthesiologie, Operative Intensivmedizin und Schmerztherapie

Leiter: Prof. Dr. Dr. Hempelmann

des Universitätsklinikums Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Krumholz

2. Gutachter: PD Dr. H. Hackstein

Tag der Disputation: 28. Juli 2005

## **Inhaltsverzeichnis**

### **1. Einleitung und Fragestellung**

- 1.1 Einfluß von Anästhetika auf die Immunität
- 1.2 Steuerung und Regulation der Migration mononukleärer Phagozyten
- 1.3 Immunmodulierende Effekte von Anästhetika mit detaillierter Darstellung der einzelnen Substanzen.
  - 1.3.1 Thiopental
  - 1.3.2 Methohexital
  - 1.3.3 Etomidat
  - 1.3.4 Ketamin
  - 1.3.5 Flunitrazepam
  - 1.3.6 Midazolam
  - 1.3.7 Droperidol
  - 1.3.8 Fentanyl
  - 1.3.9 Propofol
- 1.4 Immunmodulierende Effekte von Anästhetika auf Monozyten
- 1.5 Klinische Relevanz immunsuppressiver Anästhetikanebenwirkungen
- 1.6 Fragestellung

### **2. Material**

- 2.1 Verwendete Reagenzien
- 2.2 Anästhetika und deren Zusatzstoffe
- 2.3 Geräte
- 2.4 Lösungen

### **3. Methodik**

- 3.1 Probanden
- 3.2 Blutentnahme
- 3.3 Isolation der Monozyten aus der Blutprobe
- 3.4 Zellreinheit und Vitalität

- 3.5 Herstellung der Lockstofflösung
- 3.6 Getestete Anästhetika und deren Lösungsmittel beziehungsweise Konservierungsstoffe
  - 3.6.1 Aus der Gruppe der Barbiturate
    - 3.6.1.1 Thiopental
    - 3.6.1.2 Methohexital
  - 3.6.2 Aus der Gruppe der Imidazolderivate: Etomidat
  - 3.6.3 Aus der Gruppe der Phenzyklidinderivate: Ketamin
  - 3.6.4 Aus der Gruppe der Benzodiazepine
    - 3.6.4.1 Flunitrazepam
    - 3.6.4.2 Midazolam
  - 3.6.5 Aus der Gruppe der Butyrophenone: Droperidol
  - 3.6.6 Aus der Gruppe der Opioide: Fentanyl
  - 3.6.7 Aus der Gruppe der Alkylphenolderivate: Propofol
  - 3.6.8 Untersuchte Lösungsmittel und Konservierungsstoffe
    - 3.6.8.1 Natriumkarbonat
    - 3.6.8.2 Benzethoniumchlorid
    - 3.6.8.3 Benzylalkohol
    - 3.6.8.4 Äthylalkohol
    - 3.6.8.5 Intralipid
- 3.7 Messung der Chemotaxis von Monozyten in vitro
  - 3.7.1 Prinzip der Chemotaxismessung
  - 3.7.2 Durchführung der Messung der Chemotaxis
    - 3.7.2.1 Beschickung der Chemotaxiskammer
    - 3.7.2.2 Inkubation und Färbung der Mikroporenfilter
    - 3.7.2.3 Auszählen der Mikroporenfilter
- 3.8 Statistische Auswertung

## **4. Ergebnisse**

### 4.1 Aus der Gruppe der Barbiturate

#### 4.1.1 Thiopental

#### 4.1.2 Methohexital

### 4.2 Aus der Gruppe der Imidazolderivate: Etomidat

### 4.3 Aus der Gruppe der Phenzyklidinderivate: Ketamin

### 4.4 Aus der Gruppe der Benzodiazepine

#### 4.4.1 Flunitrazepam

#### 4.4.2 Midazolam

### 4.5 Aus der Gruppe der Butyrophenone: Droperidol

### 4.6 Aus der Gruppe der Opioide: Fentanyl

### 4.7 Aus der Gruppe der Alkylphenolderivate: Propofol

### 4.8 Hilfsstoffe Äthylalkohol, Benzethoniumchlorid, Benzylalkohol, Intralipid und Natriumcarbonat

## **5. Diskussion**

### 5.1. Rolle der Monozyten bei der Abwehr eingedrungener Mikroorganismen

### 5.2. Monozytopoese

### 5.3. Monozytenaktivität

### 5.4. Bedeutung der Chemotaxis für die Funktion der Monozyten

### 5.5. Diskussion der Ergebnisse

## **6. Zusammenfassung**

## **7. Literaturangaben**

## **8. Erläuterung**

## **9. Anhang**

### 9.1 Tabellen

### 9.2 Rohdaten

### 9.3 Danksagung

### 9.4 Lebenslauf

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-Abbildung
bzw.	-beziehungsweise
DMEM	-Dulbecco's-modified-Eagle-Medium
DMEM+BSA	-Dulbecco's-modified-Eagle-Medium + 0,2mg/ml bovines Serum-Albumin
f-MLP	- N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin
I.E.	-Internationale Einheiten
i.v.	-intravenös
IFN	-Interferon
IL	-Interleukin
Konz.	-Konzentration
min	-Minute
NK	-natürliche Killerzelle
PBS	-phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PMN	-polymorphkernige neutrophile Granulozyten (Neutrophile)
sec	-Sekunden
Tab.	-Tabelle
TGF- $\beta$	-transformierender Wachstumsfaktor $\beta$
TNF	-Tumornekrosefaktor
u.	-und

## **1. Einleitung und Fragestellung**

### **1.1 Bedeutung und Funktion mononukleärer Phagozyten bei der natürlichen und antigenspezifischen Immunantwort**

Trotz aller Fortschritte der Medizin stellt das Auftreten von perioperativen Infektionen noch immer ein ernstes Problem dar. Jegliche Immunantwort umfaßt als ersten Schritt, daß das Pathogen oder anderes Fremdmaterial erkannt wird, und als zweiten Schritt, dass es beseitigt wird. Die Immunabwehr kann in zwei verschiedene Bereiche unterteilt werden: das nicht-spezifische und das spezifische Immunsystem.

Das nicht spezifische Immunsystem beinhaltet:

1. Oberflächenbarrieren (Haut, Schleimhaut)
2. Abwehrmechanismen gegen Mikroorganismen (physiologische Flora, antimikrobielle Substanzen, wie Lysozyme, Akut-Phase-Proteine)
3. Mediatoren der Entzündungsreaktion (Komplementfaktoren, Fibronectin, Prostaglandine, Leukotriene, plättchenaktivierender Faktor, Zytokine)
4. Phagozytose und oxidativer Burst (Granulozyten, Makrophagen)

Die spezifische Immunabwehr besteht aus:

1. Zellulärer Abwehr (Makro- und Mikroorganismen, T- und B-Zellen, Natural Killer (NK)-Zellen)
2. antigenspezifischen Antikörpern

(49, 52, 55, 101).

Der entscheidende Unterschied zwischen den beiden ist, daß eine erworbene Immunantwort sehr spezifisch auf ein bestimmtes Pathogen reagiert.

Für die Immunantwort hauptsächlich verantwortlich sind Leukozyten. Wichtige Gruppen von Leukozyten sind die Phagozyten, wozu die Monozyten, Makrophagen und neutrophilen polymorphkernigen Granulozyten zählen. Sie können sich an Mikroorganismen anheften,

diese aufnehmen und zerstören. Da sie einfache unspezifische Erkennungsmechanismen verwenden, durch die sie sich an einer Vielzahl von mikrobiellen Produkten binden können, vermitteln sie die angeborenen Immunantworten. Sie fungieren somit als erste Verteidigungslinie gegen eine Infektion. Die meisten perioperativen Infektionen sind durch Bakterien verursacht, denen mit den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und mononukleären Phagozyten ein antigenunspezifisches Abwehrsystem phagozytierender Zellen gegenübersteht.

Monozyten, welche im roten Knochenmark produziert werden, üben einen wesentlichen Einfluß auf die humorale und die zellvermittelte Immunantwort aus. Sie entwickeln sich aus omnipotenten hämatopoetischen Stammzellen über die Zwischenstufen myelozytopoetische Stammzelle, Monoblast und Promonozyt. Monozyten werden dann in den Blutkreislauf abgegeben, wo sie für 8-10 Stunden verbleiben. Sie verlassen dann das Blut und wandern in das Gewebe ab, wo sie sich in die gewebespezifischen Makrophagen transformieren. Sie sind in großer Zahl im Bindegewebe, in der Submucosa des Gastrointestinaltraktes, in der Lunge (wo sie sowohl im interstiziellen Gewebe als auch in den Alveolen zu finden sind), entlang bestimmter Blutgefäße in der Leber (wo sie Kupffer-Sternzellen genannt werden), als Intraglomeruläres Mesangium in der Niere, in Form von Mikroglia im Gehirn, in den Lymphknoten und in der Milz anzutreffen, wo sie alternde Blutzellen beseitigen (55)

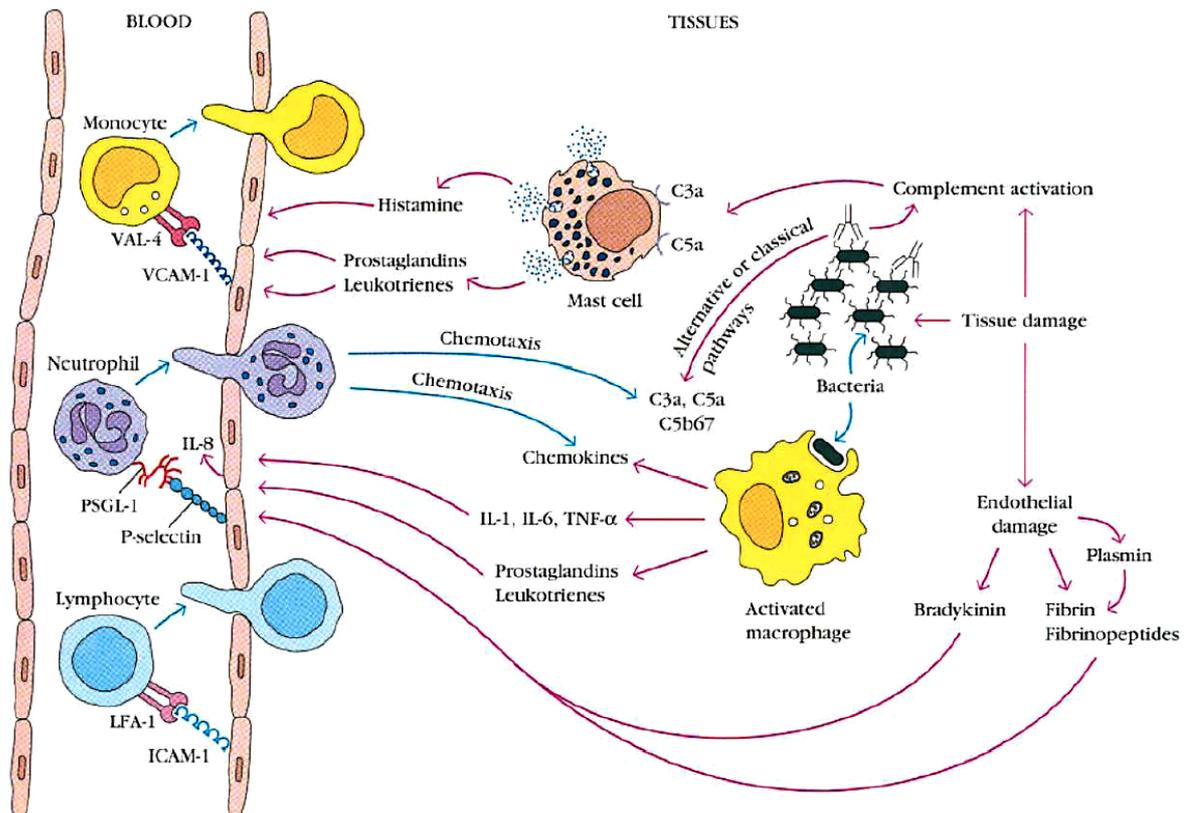
Zusammen mit den Makrophagen bilden die Monozyten das „mononuclear phagocytic system (MPS)“ - auch als retikuloendotheliales System (RES) bezeichnet.

Die Fähigkeit zur Chemotaxis und die Phagozytose von Fremdmaterial sind mit die wichtigsten Eigenschaften von Monozyten. Angezogen durch bestimmte die Chemotaxis auslösende Substanzen (z.B. Lymphokine, Immunkomplexe, kationische Peptide, Komplementfragment C5a, N-formyl-Peptide, Endotoxin und andere bakterielle Faktoren) können Monozyten sich amöboid auf ein Ziel hin fortbewegen. Die Funktion der mononukleären Phagozyten besteht in der Erkennung von in den Organismus eingedrungener Pathogene, deren Phagozytose und Bildung eines intrazellulären Phagosoms. Es schließt sich die Verschmelzung von einem oder mehrerer Lysosomen mit dem Phagosom an. In diesem Phagolysosom erfolgt die Zerstörung des Pathogenes durch die aus den Lysosomen freigesetzten Substanzen wie toxische Peroxidasen, Enzyme, kationische Proteine, Stickstoffmonoxyd und anderer Verbindungen.

Die Antigenpräsentation ist eine andere wichtige Funktion der Monozyten. Nach der Phagozytose der Antigene werden diese in dem Endosom weiter verarbeitet. Immunogene Peptide werden dabei mit MHC-Klasse-II-Molekülen kombiniert an der Zelloberfläche präsentiert. Das ist eine Schlüsselfunktion für die Einleitung einer spezifischen Immunreaktion. Sie führt zur einer Aktivierung und Wachstumsstimulation von T-Zell-Lymphozyten, welche ihrerseits eine Reihe von Mediatoren sezernieren. Monozyten und Makrophagen tragen auch Rezeptoren für Zytokine wie Interleukin-4,  $\text{IFN}\gamma$  und den Migrationshemmfaktor auf der Zelloberfläche. Mit Hilfe dieser Rezeptoren können Zytokine, die von T-Zellen abstammen, die Funktion von Monozyten und Makrophagen verstärken. Solche "aktivierten" Monozyten/Makrophagen bilden auch Zytokine wie Interleukin-1, Interleukin-6, Koloniestimulierender Faktor, Tumornekrosefaktor, Komplementkomponenten, Prostaglandine und andere, die eine Reihe von immunologischen Effekten haben.

Phagozytose, Zytotoxizität, Mediatorproduktion und die Antigenpräsentation zählen also zu den primären Aufgaben des mononucleären Phagozytensystems (101).

## 1.2 Steuerung und Regulation der Migration mononukleärer Phagozyten



**Abbildung 1** Immunabwehr auf einen bakteriellen Reiz (66)

Mononukleäre Phagozyten im Blut wandern in das Gewebe aus, wo sie sich zu Gewebsmakrophagen entwickeln. Somit bildet sich ein Netzwerk aus Gewebsmakrophagen in vielen Organen, durch das an strategisch wichtigen Orten im Körper Krankheitserreger erkannt und bekämpft werden können.

Bei Inflammationen oder der Präsenz von Prokaryoten im Gewebe zeigt sich eine gezielte Migration von zirkulierenden Blutmonozyten, Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten in das Infektionsgebiet. Dabei spielen sich im Wesentlichen drei Vorgänge ab:

- 1) eine erhöhte Blutzufuhr zum Infektionsort,
- 2) eine erhöhte Kapillarpermeabilität durch Retraktion der Endothelzellen. So wird das Endothel von Molekülen passiert, die normalerweise zu groß dafür wären, und dies erlaubt damit auch Antikörpern, Komplement und Molekülen anderer Plasmaenzymssysteme, zum Entzündungsherd vorzudringen.

3) Leukozyten (neutrophile Polymorphkernige, Monozyten und Makrophagen) treten aus den Kapillaren in das umgebende Gewebe aus. Im Gewebe wandern sie durch Chemotaxis auf den Infektionsort zu.

Induziert und geregelt wird diese Reaktion durch verschiedene Mediatoren, die zum Teil vom eingedrungenen Organismus selber stammen oder von bereits vor Ort befindlichen Immunzellen freigesetzt werden:

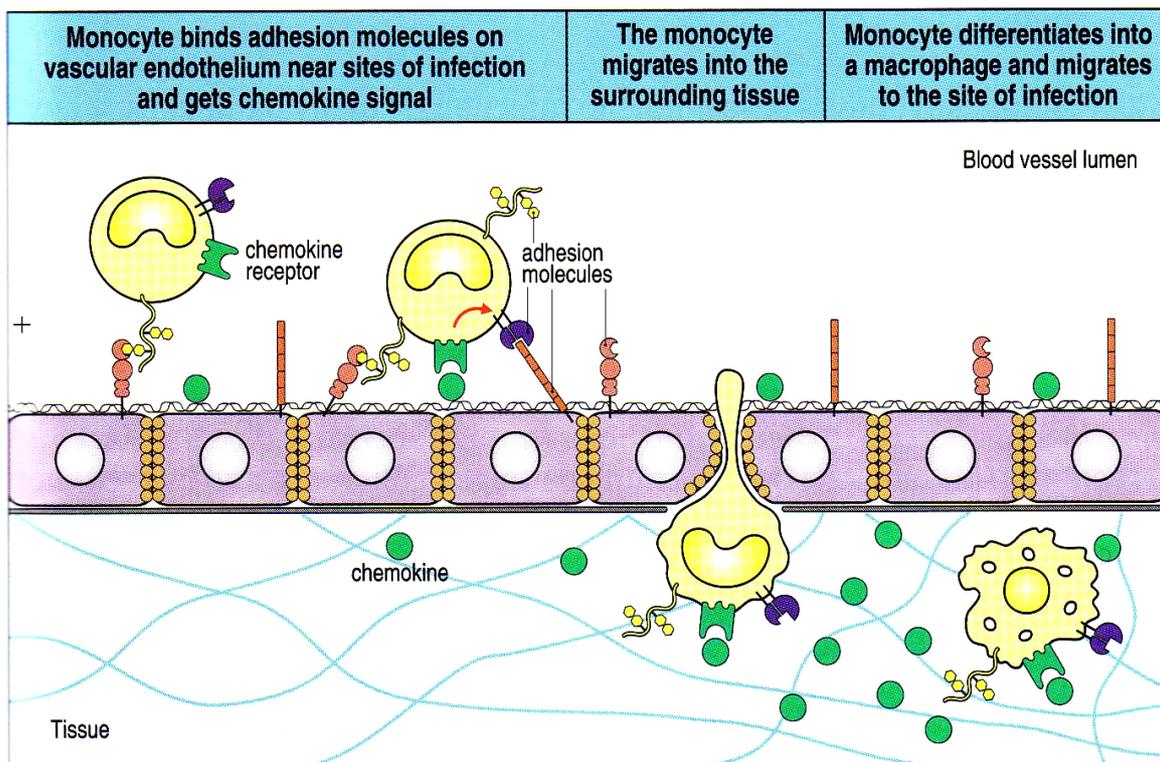
Kürzel	weitere Bezeichnungen	Quelle	Zielzellen	Biologische Aktivität
IL-1	lymphocyte activating factor, endogenous pyrogen, leucocyte endogenous mediator, mononuclear cell factor, catabolin	Monozyten, Makrophagen, dentr. Zellen (DC), Astrozyten, NKZellen, B-Zellen, Endothelzellen (E), Fibroblasten	T-Zellen, B-Zellen, EC, Hepatozyten, Knochenzellen	Proinflammatorische Wirkung Lymphozyten-Aktivierung, Makrophagen-Aktivierung, Erhöhung der Zelladhäsion, Fieber, Gewichtsverlust Hypotonie, Kachexie Akutphase-Reaktion
IL-2	T-cell growth factor (TCGF)	T-Zellen	T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Oligodendrozyten	Autokriner und parakriner Wachstumsfaktor für TZellen, B-Zell-Proliferation und Differenzierung, Monozyten und NK-Zellen Aktivierung, Förderung der Produktion anderer Zytokine, z.B. von IFN- $\gamma$
IL-3	Multi-colony stimulating factor(MCGF), eosinophil-CSF(E-CSF), hematopoietic cell growth factor (HCGF), burst- promoting activity(BPA)	akt. T-Zellen, Mast-Zellen, eosinophile Granulozyten	alle KM-Vorläuferzellen	Wachstumsfaktor für KM-Vorläuferzellen, B-Zellen, Monozyten
IL-4	B-cell stimulating factor 1 (BSF-1)	Mastzellen, T-Zellen, KM-Stromazellen	T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, EC, Fibroblasten	Isotyp-Switch von B-Zellen, Förderung der Sekretion von IgG4 und IgE von BZellen, Förderung der Differenzierung von T-Helferzellen zum TH2-Phänotyp
IL-6	Interferon- $\gamma$ 2, B-cell stimulatory factor 2 (BSF-2), plasmacytoma growth factor, hepatocyte differentiation factor (HSF), monocyte granulocyte inducer type 2 (MGI-2)	T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, KM- Stromazellen, Fibroblasten, EC	B-Zellen, Plasmazellen, T-Zellen, Hepatozyten, KM-Zellen	B-Zell-Wachstum und Differenzierung, T-Zell-Proliferation, Akutphase-Reaktion
IL-8	Neutrophil attractant/ activating protein (NAP-1), neutrophil activating factor(NAF), leucocyte adhesion inhibitor (LAI), Granulocyte chemotatic protein (GCP)	Epithelzellen, EC, Lymphozyten, Monozyten, DC	neutrophile Granulozyten, kapillare EC	Chemotaxis und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten: Rekrutierung von Entzündungszellen an dem Ort einer Entzündung, Angiogenese

Kürzel	weitere Bezeichnungen	Quelle	Zielzellen	Biologische Aktivität
IL-10	Cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF)	TH0- und TH2-Zellen, akt. CD4+ und CD8+ T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, DC	B-Zellen, Thymozyten, TH1-Zellen, Monozyten, NK-Zellen	Aktivierung und Proliferation von B-Zellen, Thymozyten,
IL-13	p600	Aktiviert T-Zellen	B-Zellen, Monozyten	B-Zell-Proliferation und Differenzierung, IgE-Sekretion
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha, Cachektin, Nekrosin, hemorrhagic factor, macrophage cytotoxin	akt. Monozyten und Makrophagen, dendritische Zellen, B-Lymphozyten, T-Zellen, Fibroblasten	nahezu alle Körperzellen	proinflammatorisches Zytokin. Wachstums- und Differenzierungsfaktor für viele Zellen. Fieber, Produktion von Akutphaseprotein, Kachexie Zytotoxisch für viele transformierte Zellen
TNF- $\beta$	Tumor necrosis factor beta, Lymphotoxin, Cytotoxin	aktivierte T-Zellen und B-Zellen	nahezu alle Körperzellen	Wachstumsfaktor und Differenzierungsfaktor für viele Zellen.
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$ , Immuninterferon oder Typ-II Interferon, T-Zellen-Interferon	CD8+ und CD4+ T-Zellen, NK-Zellen	Hämatopoetische Zellen, Epithelzellen und EC, viele Tumorzellen	Aktivierung, Wachstum und Differenzierung von T-zellen, B-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen, EC verstärken antivirale Wirkung von IFN- $\gamma$

**Tab. 1** Übersicht über Zytokine (3, 74, 55, 101)

Leukozyten lagern sich an das Endothel von Blutgefäßen an und verlassen sukzessive den Blutkreislauf durch Transmigration durch die Interzellularspalten der Endothelzellen. Dieser durch Chemoattraktoren bedingte Prozeß wird als Diapedese bezeichnet. Die wieder aufhebbare Adhäsion von Leukozyten am Endothel, der Basalmembran und anderer Oberflächen ist ein essentielles Ereignis bei der Ausbildung von Entzündungsreaktionen und kann inzwischen bereits auf molekularer Basis beschrieben werden. Der erste Schritt ist die reversible Bindung von Leukozyten mit ihren Kohlenwasserstoffliganden an Selektin des vaskulären Endotheliums. Diese Verbindung löst sich bereits durch die beim Blutstrom auftretenden mechanischen Scherkräfte, somit „rollen“ die Leukozyten entlang der Gefäßinnenwand unter ständigem Binden und Lösen dieser Verbindung. Diese Verbindung reicht jedoch aus, um stärkere Interaktionen mit der Endothelmembran zuzulassen. So können auch festere Verbindungen induziert werden, z.B. bei Neutrophilen die Bindung von ICAM-1 des Endothels an LFA-1( $\alpha_L:\beta_2$ ) und bei Monozyten von VCAM-1 an VAL-4. Nach Kontakt von Rezeptoren auf der Leukozytenoberfläche mit Zytokinen wie Interleukin-8 kann die Rollbewegung gestoppt werden, und die Zellen können sich durch die Lücken zwischen den Endothelzellen durch Diapedese hindurchquetschen. Um die Basalmembran

zu durchdringen behilft sich der Leukozyt eines Matix-Metalloprotein-Enzyms, welches an der Zelloberfläche exprimiert wird. Schließlich migriert die Zelle entlang des Konzentrationsgradienten von Chemokinen, welche von anderen Zellen oder Bakterien am Ort der Entzündungsreaktion sezerniert werden.



**Abbildung 2** Monozyten verlassen den Blutkreislauf und migrieren in einem schrittweisen Prozeß durch das Endothel der Gefäße. (55).

Chemotaxis bezeichnet die zielgerichtete Bewegung von Zellen entlang dem Konzentrationsgradienten eines chemotaktischen Moleküls. Zahlreiche Mediatoren, wie z.B. Histamin, können zwar die Gesamtmobilität der Zellen verstärken, lösen aber keine gerichtete Migration aus. Diese Eigenschaft wird als Chemokinese bezeichnet. Um eine gerichtete Migration auszulösen, muß die Zelle auf die Gradienten des chemotaktischen Mediatoren ansprechbar sein. Für die Erkennung reicht dabei ein Konzentrationsunterschied zwischen zwei Polen der Zelle von 0,1% aus. Monozyten besitzen einen f-Met-Leu-Phe (f-MLP) Rezeptor (29). Dieser Rezeptor bindet an Peptide, die am N-Terminus durch

formyliertes Methionin gebunden sind. Da nun Prokaryoten (z.B. Bakterien) im Gegensatz zu Eukaryoten die gesamte Proteintranslation mit dieser Aminosäure initiieren, stellt dies ein einfaches spezifisches Signal für die Anwesenheit von Bakterien dar, in deren Richtung sich die Phagozyten in Bewegung setzen sollen. Sind Monozyten am Ort des Entzündungsgeschehens ankommen, sind sie aktiviert in der Lage durch Freisetzen von Interleukin-8 weitere Zellen (Basophile und Neutrophile) anzulocken. Das Komplementsystem ist neben den Phagozyten ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. Bei der Bildung des Membranangriffkomplexes (C5b-9-Komplex) kommt es zur Freisetzung von chemischen Produkten wie C5a, welches seinerseits eine chemotaktische Wirkung besitzt und Phagozyten anlocken kann.

Faktor	Kennzeichen	Quelle	Zielzelle
C5a	77-As-Peptid	N-Terminus von C5- $\alpha$ -Ketten	Neutrophile, Eosinophile, Makrophagen
f-Met-Leu-Phe	Tripeptide mit blockiertem N-Terminus	Prokaryoten	Neutrophile, Eosinophile, Makrophagen
LTB <sub>4</sub>	Arachidonsäuremetaboliten via Lipoxigenase-Pathway	Mastzellen, Basophile, Makrophagen	Neutrophile, Eosinophile, Makrophagen
IL-8	10-kDa-Protein	Aktivierte Monozyten	Neutrophile, Basophile

**Tab. 2** Chemotaktische Moleküle. Die Darstellung zeigt die wichtigsten chemotaktischen Moleküle für Leukozyten. Sie entfalten ihre Wirkung innerhalb kurzer Distanzen am Ort der Entzündung (101)

Somit leisten die mononukleären Phagozyten durch Unspezifität der Aktivierung, aber auch durch ihre Mobilität und rasche Verfügbarkeit einen wesentlichen Beitrag in der Frühphase der Abwehr eingedrungener Keime und daher auch zur Verhütung perioperativer Infektionen.

Monozyten nehmen in der Immunantwort eine wichtige Stellung ein, nicht zuletzt aufgrund ihrer Multifunktionalität.

### **1.3 Immunmodulierende Effekte von Anästhetika mit detaillierter Darstellung der einzelnen Substanzen.**

Die körpereigene Abwehr gegen Krankheitserreger ist ein sehr komplexer Prozeß, der von vielen Faktoren abhängig ist und auch durch Medikamente beeinflusst werden kann. Daß verschiedene Anästhetika die körpereigene Abwehrkraft gegenüber Bakterien herabzusetzen vermögen, ist seit über hundert Jahren bekannt. Bereits 1889 berichtet Platania (97) von Versuchen, bei denen verschiedene Tierarten, welche von Natur aus für eine Milzbrandinfektion wenig empfänglich waren, unter dem Einfluß von Narkotika wie Curare, Alkohol und Chloralhydrat an Milzbrand erkrankten. Snel (112) beobachteten im Jahre 1903 bei Experimenten mit Meerschweinchen, daß unter Äther-, Chloroform- und Chloralhydrat-Narkose die Mortalität nach Infektion mit Milzbrand anstieg. Klein und Coxwell (58) publizierten die gleichen Ergebnisse nach Narkose durch Äther-Chloroform-Inhalation bei Fröschen.

Die Angeborene und erworbene Immunität spielt die Hauptrolle in der Verteidigungsantwort des Organismus. Schmerzen, Streß, nekrotisches Gewebe und eindringende Mikroorganismen sind bekannte Modulatoren der komplizierten Immunantwort der Patienten, die sich einem chirurgischen Eingriff unterziehen. Die Balance zwischen proinflammatorischen und anti-inflammatorischen Prozessen ist dabei der Schlüssel zur Reaktion des Körpers bei Infektionen, Verletzung und bei chirurgischen Traumata. Medikamente, die in der Anästhesie und Intensivmedizin gebräuchlich sind, können möglicherweise immunologische Reaktionen, durch Veränderung der interzellulären Kommunikation im Sinne einer Modifikation der Zytokinmuster und durch Fluktuation der peripheren Immunzellen, wie natürliche Killerzellen (NK), B-Zellen und T-Lymphozyten bzw. deren Subpopulationen, beeinflussen.

Duncan (27) beschrieb in seiner Arbeit den Einfluß von Anästhetika auf verschiedene Funktionen des Immunsystems und zeigte eine immunsuppressive Wirkung dieser Substanzen. Die Anästhesie selbst oder die perioperativen Medikamentengaben des Anästhesisten können die Immunfunktion mit möglicher Auswirkung auf den postoperativen Verlauf ändern. Zum Beispiel können Transfusion des allogenen Blutes und Gabe von Dopamin oder Metoclopramid die Immunität behindern (3). Streß und Schmerz sind mit der

Immuntoleranz, erhöhten Anfälligkeit für Infektionen und der Metastasierung von Tumoren in den Tiermodellen verbunden. So kann Anästhesie – durch Modulation der neurohumoralen Streßantwort – die Immunität des chirurgischen Patienten indirekt beeinflussen. Insbesondere scheinen die Epiduralanästhesie und Leitungsanästhesie die Streßreaktion, mit vorteilhaften Effekten auf zelluläre und humorale Immunität, zu vermindern. Becker P et al. (4) konnte nachweisen, daß nach Eingriffen mit Allgemeinanästhesie mit Thiopental im Gegensatz zu Narkoseverfahren mit Epiduralanästhesie der Serumspiegel von IgM selbst 7 Tage nach der Operation noch deutlich erhöht war. Zusätzlich können Betäubungsmittel, wie Etomidat, Propofol oder Thiopental und Opioide Funktionen der immun kompetenten Zellen direkt beeinflussen (3). Jedoch können diese negativen Effekte nur mit hohen supraklinischen Konzentrationen und/oder langfristiger Inkubation nachgewiesen werden. Die Erfahrung zeigt, daß Sedierungsverfahren mit Thiopental bei neurochirurgischen Patienten eine erhöhte Anzahl von Komplikationen durch Infektionen begünstigte (3, 62).

### 1.3.1 Thiopental

Viele Studien zeigen, daß Thiopental zu einer Hemmung des Immunsystems fähig ist.

Bei Barbituraten ist bekannt, daß sie die T-Zell-Proliferation, Differenzierung und Zytokinsynthese hemmen können. Thiopental ist in der Lage in T-Lymphozyten das Aktivierungprotein-1 (AP-1), über eine Blockung der Genexpression, zu inhibieren (50). Ichiyama et al. (51) zeigten, daß Thiopental sowohl die Produktion von die TNF- $\alpha$  in A-172 Zellen als auch die Aktivierung der Transkription von NF- $\kappa$ B in menschlichen Glia-Zellen bei Experimenten mit Gehirnentzündungen hemmte und damit einen antiinflammatorischen Effekt zeigte.

Die Untersuchung von mit Thiopental behandelten Lymphozyten zeigte einen deutlich erhöhten oxidativen Status (24).

In Anwesenheit von Thiopental wurde die Expressionsdichte von CD14, die lipopolysaccharid stimulierte Tumornekrosefaktor-Reaktion und die Freisetzung von IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1ra) bei der Untersuchung von inkubierten menschlichen Vollblutproben vermindert, wohingegen die IL-10 Konzentration gleichzeitig anstieg. (68)

Brand et al. (11) konnten bei Narkosen mit Fentanyl, Thiopental, Isofluran und N<sub>2</sub>O eine signifikante Verminderung der zirkulierende natürlichen Killerzellen nachweisen. Ferner zeigte sich eine Erhöhung der Anzahl von B-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Blut, wobei auch der gemessene Spiegel von Interferon- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TNF und IL-2R anstieg.

Eine Untersuchung durch Hole et al. (47) demonstrierte eine dosisabhängige Suppression der monozytenvermittelten Zytolyse und eine Verminderung der Thymidinaufnahme von Lymphozyten durch Thiopentalgaben bei chirurgischen Eingriffen.

Bei Concanavalin A-stimulierten mononucleären Zellen in Anwesenheit von Thiopental konnte das Verhältnis von T-Helferzellen Typ-1 / Typ-2 zugunsten der Typ-2 deutlich erniedrigt werden, was sich durch einen verringerten IFN- $\gamma$  / IL-4 Quotienten äußerte (105).

Bei der Untersuchung der Wirkung von Thiopental auf die Freisetzung von Zytokinen durch menschliche Monozyten zeigte sich ein Anstieg der Produktion von Interleukin-4. (103)

Die Ergebnisse von Salman et al. (104) zeigten, daß die durch das Anästhetikum Thiopental beeinträchtigte Phagozytose von Peritonealmakrophagen, zusammen mit den durch ein chirurgisches Trauma hervorgerufenen Alterationen des Immunsystems, ein Grund für die gesteigerte Anfälligkeit für Infektionen in der postoperativen Zeit sein kann.

Der Vergleich von verschiedenen Anästhetika bezüglich eines inhibitorischen Effekts auf die Polarisation von Neutrophilen *in vitro* wurde von O'Donnell et al. (93) durchgeführt. Hier zeigte Thiopental eine signifikante, dosisabhängige Hemmung der Polarisation dieser Zellen.

Bei einer *In-vivo*-Studie von Allgemeinanästhesien ohne durchgeführten chirurgischen Eingriff konnte Procopio et al. (98) bei der Narkose mit Thiopental und Isofluran keinen signifikanten Einfluß auf die Antigenaufnahme, die antikörperabhängige Zell-Zytotoxizität (ADCC), die Zell-Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen und die phagozytäre Aktivität von Neutrophilen nachweisen. Auch Matilla-Vuori et al. (82) konnten keinen Einfluß auf die Leukozytenproliferation bei *in vivo* Untersuchungen zeigen.

Die Hypothese, daß Thiopental auch Einfluß auf das Wachstum von bösartigen Tumoren haben kann, wird durch Beobachtungen von Lovett et al. (75) gestützt. Es zeigte sich ein beschleunigtes Tumorwachstum von induzierten Fibrosarkomen bei C57B1/6 Mäusen nach einer einmaligen Applikation von Thiopental in einer klinisch zulässigen Wirkkonzentration.

### **1.3.2 Methohexital**

Bezüglich des zum Einflusses von Methohexital auf das Immunsystem existieren nur wenige Literaturstellen.

Die Forschungsgruppe um Humar et al. (50) konnte bei der Untersuchung von durch Barbiturate beeinflusste Effekte auf die Regulation des Transkriptionsfaktor Activator-Protein-1 (AP-1) in T-Lymphozyten zeigen, daß Methohexital die AP-1-abhängige Genexpression und die AP-1-Komplexbildung bereits in klinisch relevanten Konzentrationen inhibierte. Auch konnte eine Inhibition der Initiation der MAP-Kinase-Kaskade, der kleinen G-Proteine RAS und RAC-1, und eine dementsprechend verhinderte Bindung zu deren Partnern RAF-1 und PAK nachgewiesen werden.

Durch den Einfluß von Methohexital kann auch eine Veränderung des dynamischen freien Aminosäurepools in Neutrophilen nachgewiesen werden (89). Dies hatte auch nachweisbare Auswirkungen auf die Funktion dieser Leukozyten, indem die O<sub>2</sub>- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Formation und die Aktivität bzw. Freigabe von Myeloperoxidase (MPO) signifikant vermindert wurden. Die Proliferation von T-Lymphozyten durch das Mitogen Phythämagglutinin konnte bei In-vitro-Untersuchungen von Devlin et al. (25) durch die Zugabe von Methohexital vermindert werden.

### **1.3.3 Etomidat**

Im Jahre 1983 propagierte Watkins (122) das Medikament Etomidat als „immunologisch sicheres Anästhetikum“. Er bezog sich in seinem Artikel auf, im Vergleich zu anderen Anästhetika, nur selten auftretende klinische Reaktionen nach Applikation wie Urtikaria, Erbrechen, kardiovaskuläre Effekte im Sinne einer anaphylaktoiden Reaktion als auch auf die geringe Freisetzung von Plasmahistamin nach i.v.-Gabe.

Tiefergreifende Untersuchungen der immunologischen Effekte erbrachten im Weiteren folgende Erkenntnisse:

Den Effekt von intravenösen Anästhetika auf die Kontraktion von glatten Muskelzellen untersuchte Ouedraogo et al (94). Dabei konnte eine Reduktion der histamininduzierten Kontraktion in Anwesenheit der beiden Anästhetika Etomidat oder Propofol beobachtet werden. Thiopental hingegen zeigte bei den gleichen Versuchen eine

konzentrationsabhängige Kontraktion der isolierten glatten Muskelzellen, was klinischerseits einer Asthmareaktion gleichkommen würde.

Jameson et al (54) wiesen bei der Bestimmung des postoperativen Interleukin-6-Spiegels eine deutliche Erhöhung bei Patienten, welche eine Narkoseeinleitung mit Etomidat bekommen haben, nach. Diese Patienten zeigten auch eine geringere posttraumatische Cortisolproduktion, der in der Vergleichsgruppe ohne Etomidatapplikation durch den chirurgischen Eingriff induziert wurde.

In Anwesenheit von Etomidat, wie auch bereits bei Thiopental beschrieben, wurde die Expressionsdichte von CD14, die lipopolysaccharidstimulierte Tumornekrosefaktor-Reaktion und die Freisetzung von IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1ra) bei der Untersuchung von Vollblutproben vermindert. Parallel wurde ein Anstieg der IL-10 Konzentration beobachtet. (68)

Wie bereits bei Methohexital beschrieben, zeigte sich die Proliferation von T-Lymphozyten durch das Mitogen Phythämagglutinin bei In-vitro-Untersuchungen von Devlin et al. (27) durch die Zugabe von Etomidat deprimiert.

### **1.3.4 Ketamin**

Die Wirkungen von Ketamin auf das Immunsystem wurden in vielerlei Hinsicht im Rahmen von In-vitro-Versuchen und klinischen Studien untersucht.

Bei Ketamin-Gaben in Rahmen einer Langzeit-Analgesedierung fanden Wilson et al. (128) keinerlei Anhalt für eine immunsuppressive Wirkung der Substanz.

Neue Erkenntnisse zur Ketamin-Wirkung an Leukozyten fanden Schmidt et al. (107). In einem Tierversuch zu Sepsisverläufen ergab sich eine auffallende Situation: die mit Ketamin narkotisierten Tiere zeigten, im Gegensatz zu denen unter einer anderen Anaesthetie, nach künstlich herbeigeführter Bakteriämie keinerlei Zeichen eines septischen Zustandsbildes. Als die Untersucher dem Phänomen auf den Grund gingen,

finden sie als Ursache eine Hemmung der Leukozyten-Adhärenz, die sie am Ratten-Mesenterium nachweisen konnten. In der Kaskade der Sepsis beginnen die Leukozyten intravasal zunächst mit einer verstärkten Adhärenz untereinander, dann an der Gefäßwand, bevor sie ins umgebende Gewebe penetrieren. Dort werden Mediatoren ausgeschüttet, die wiederum zur Freisetzung von radikalen Verbindungen führen. Schließlich erfolgt dann der Zelluntergang. Diese fatale Kaskade konnte Ketamin bei den Versuchstieren unterbrechen. Zusätzlich zu dieser protektiven Wirkung auf Leukozytenebene wirkt Ketamin wohl auch als Radikalfänger. Die Produktion von Sauerstoffradikalen stellt einen der Hauptmechanismen dar, mit denen neutrophile Granulozyten Bakterien abtöten. Bei In-vitro-Versuchen mit polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) sahen Weiss et al. (123) eine Hemmung der Produktion von Radikalen unter Ketamin. Diese Wirkung erwies sich als nicht stereoselektiv, trat allerdings in der Studie unter sehr hohen Ketamin-Konzentrationen (weit über dem therapeutischen Bereich) auf.

Die Bildung von Myeloperoxidase in Neutrophilen zur Bakterienabwehr ist ein wichtiger Bestandteil in des Immunsystems. Pekoe et al (95) zeigten die Fähigkeit von Ketamin, diesen Abwehrmechanismus zu unterdrücken, indem die gebildeten zytotoxischen freien Radikale der Myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl-Reaktion abgefangen werden.

In vivo zeigten Thomas et al. (120) eine Depression der zellvermittelten Zytotoxizität von peripheren Blutmonozyten bei Primaten (Rhesusaffen), die eine Narkose mit Ketamin ohne chirurgischen Eingriff erhielten.

Eine Inhibition der Interferon-induzierten natürlichen Killerzellen (NK) Zytotoxizität bei anästhesierten Mäusen zeigten Markovic et al. (76). Sie erklärten dieses Ergebnis damit, daß die Narkose CD8<sup>+</sup> Zellen induziert, welche supprimierend auf die Stimulation der Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen durch Interferon wirken.

Bei Tierversuchen mit Ratten zeigten Bette et al. (7) eine erhöhte Basalexpression von IL-1 $\beta$  und IL6 mRNA in der Milz der Tiere und eine Reduktion des basalen TNF- $\alpha$  mRNA-

Spiegels, was als Hinweis auf einen signifikanten, wenn auch geringen, Effekt auf den basalen Immunstatus gedeutet wurde.

Nach Beigabe von Ketamin in pharmakologischen Konzentrationen zu menschlichen Vollblutproben verminderte sich die lipopolysaccharidstimulierte Tumornekrosefaktor-Reaktion, und es sank die Konzentration von IL-1 $\beta$  (68).

Rossano et al (103) untersuchten die Wirkung von verschiedenen Anästhetika auf die Freisetzung von Zytokinen aus menschlichen Monozyten. Hierbei zeigte sich ein Anstieg der Produktion von Tumornekrosefaktor und Interleukin-6 sowie Interleukin-4 in Anwesenheit von Ketamin.

In einer aktuellen Studie konnten Molina et al. (84) zeigen, daß Ketamin in der Lage ist bei Traumapatienten die TNF-Expression in der Milz deutlich zu erhöhen.

Die Mortalität durch eine bakterielle Infektion nach verschiedenen Narkoseverfahren bei Mäusen untersuchten Hansbrough et al (40). Nach einer zweistündigen Narkose mit Ketamin zeigte sich eine Depression des Quotienten der Helferleukozyten zu Suppressorleukozyten in der Milz, welche bis zu 72h anhielt. In Folge der 24h nach Anästhesie durchgeführten „cecal ligation and puncture“ (CLP), zur Auslösung einer kotigen Peritonitis mit nachfolgender septischer Allgemeinerkrankung, zeigte sich eine erhöhte Mortalitätsrate der mit Ketamin behandelten Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Eine Vollnarkose mit Ketamin bei Schafen zeigte eine Verlangsamung der Lymphozytenflusses durch die primären peripheren Lymphknoten und einen Anstieg des Prostaglandinspiegels in der efferenten Lymphe (85).

In den Studien von Matsuki A et al (81) konnten trotz eines beträchtlichen Patientenkollektivs von 26.079 untersuchten Narkosen mit Ketamin, Propofol und Fentanyl

mit einer postoperativen Beobachtungszeit von bis zu 3 Monaten keine klinisch auffälligen Häufungen von Störungen des Immunsystems durch das Narkoseverfahren belegt werden.

### **1.3.5 Flunitrazepam**

Wie Benzodiazepine eine Wirkung auf das Immunsystem haben, wird kontrovers beschrieben (59, 77). Untersuchungen der Modulation des Immunsystems durch Flunitrazepam sind rar. Eine geringe Freisetzung von Histamin aus Mastzellen unter Einfluß von Flunitrazepam konnte von Marone et al. (77) beobachtet werden. Die übrige derzeitige Literatur weist jedoch bisher auf keinen direkten Effekt einer stimulierenden oder supprimierenden Wirkung auf immunologische Prozesse oder Zellen hin. Lediglich Ansätze über eine sekundäre Wirkung auf das Immunsystem über eine Verminderung der Stressreaktion, speziell die anxiolytische Wirkung dieser Substanzklasse, werden geäußert (19, 3, 62).

### **1.3.6 Midazolam**

Für Midazolam wird, im Gegensatz zu anderen Benzodiazepinen, ein positiver Effekt auf das Immunsystem beschrieben. Bei der Untersuchung von Neutrophilen nach Medikamentengabe zeigte sich eine signifikant niedrigere Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Reaktion wurde auch für Diazepam nachgewiesen. (36)

Midazolam zeigte bei einer Studie von Massoco et al. (80) nach Applikation bei Pferden eine dosisabhängige Reduktion des oxidativen Burst bei peripheren Neutrophilen im Blut und bei Peritonealmakrophagen. Ebenso zeigte sich die Phagozytosekapazität beider Zellarten unter dem Einfluß des Medikamentes verringert.

Untersuchungen bei kritisch kranken Intensivpatienten, die mit Midazolam sediert wurden, ergaben nach 24h und 48h einen signifikanten Abfall der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ . Der Spiegel von IFN- $\gamma$  zeigte sich nicht verändert (44). Auch

Galley et al. (32) versuchten eine Beziehung zwischen Midazolamgaben und Veränderungen des IL-8-Spiegels herzustellen. Hierbei zeigte sich auch eine Verminderung der Freisetzung von Interleukin-8 durch mit Lipopolysacchariden stimulierten menschlichen polymorphkernigen Leukozyten durch die Inkubation mit Midazolam in vitro. Die weitere Untersuchung des intrazellulären IL-8-mRNA-Spiegels ergab jedoch eine normale Erhöhung wie in der Kontrollgruppe ohne Anästhetikum. Die Interpretation war, daß Midazolam den Vorgang der IL-8-Sekretion hemmt.

### **1.3.7 Droperidol**

Es sind nur wenige Erkenntnisse für die Beeinflussung von immunologischen Prozessen durch Droperidol bekannt.

In den Studien von Hashimoto et al. (41, 42) konnte bei der Untersuchung des Immunglobulinspiegels, der Plasmakonzentration von Komplement C3 und C4 und der Aktivität von natürlichen Killerzellen während und nach Anästhesien mit der Kombination Droperidol, Fentanyl und Ketamin keine signifikante Änderung festgestellt werden.

Auch den oxidativen Status von T-Lymphozyten vermochte Droperidol nicht zu beeinflussen (23).

Bei einer vergleichenden Studie von T-Lymphozyten, die von Lungenkarzinompatienten und einer gesunden Kontrollgruppe entnommen wurden, konnten Gadalog et al. (31) bei der Inkubation der Proben der Karzinompatienten mit Droperidol eine Erhöhung der theophyllinsensiblen T-Lymphozyten nachweisen.

### 1.3.8 Fentanyl

Fentanyl gehört zu den am besten untersuchten Anästhetika in Bezug auf eine Wirkung auf das Immunsystem.

Bei frisch isolierten peripheren Blutlymphozyten vermochte Fentanyl eine Erhöhung der Apoptoserate zu induzieren (23). In der Untersuchung zeigte sich nach Veränderung der mitochondrialen Redox-Metabolismen ein gestörtes Membranpotential der Mitochondrien.

Nach Behandlung von Mäusen mit Fentanyl zeigten Martucci et al (79) eine vorübergehende Erniedrigung der Lymphozytenproliferation und der Aktivität von natürlichen Killerzellen. Dieser Effekt zeigte sich jedoch nur kurzfristig nach Applikation, bei Langzeitbehandlungen trat er nicht mehr auf.

Eine Suppression der Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen kann das Risiko der Metastasierung bei malignen Tumoren erhöhen. Shavit et al. (110) wiesen bei Versuchen mit Mäusen eine dosisabhängige Erhöhung der Lungenmetastasenrate, sowie eine Hemmung der Aktivität von natürlichen Killerzellen bei Behandlung der Labortiere mit Fentanyl nach. Dies stützt die Erkenntnis der Studie von Li W et al. (73), in der ebenso eine Reduktion der T-Lymphozytensubpopulation CD3(+) und der natürlichen Killerzellen bei hohen Konzentrationen von Fentanyl beschrieben wurden. Die Forschungsgruppe um Beilin et al. (5) zeigte bei In-vivo-Versuchen nach Fentanylgabe vergleichbare Ergebnisse mit einer bis über 24 Stunden andauernden Hemmung der Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen.

Bei Narkosen mit Fentanyl, Thiopental, Isofluran und N<sub>2</sub>O konnte auch Brand et al. (11, 12) eine signifikante Verminderung der zirkulierenden natürlichen Killerzellen nachweisen. Ferner zeigte sich eine Erhöhung der Anzahl von B-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Blut, wobei auch der gemessene Spiegel von Interferon- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TNF und sIL-2R anstieg. In einer weiteren Studie (10) wies der gleiche Autor auf eine pro-inflammatorische Immunreaktion hin. Bei mit Lipopolysacchariden stimulierten Vollblutproben von Patienten in Narkose mit Fentanylgabe fand sich eine Erniedrigung der Interleukin-10-Konzentration

und eine gleichzeitige Erhöhung der TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Freisetzung. Die Daten belegten im Weiteren die bereits beschriebene Erniedrigung der natürlichen Killerzellen, eine Veränderung des Quotienten der T-Lymphozyten zugunsten der CD4<sup>+</sup>-Zellen und einen Anstieg der B-Lymphozyten. Ähnliche Einflüsse auf die natürlichen Killerzellen beschrieben House et al. (48) in der In-vitro-Evaluation der Immunmodulation von Fentanyl, wobei hier eine Verminderung der B-Lymphozyten registriert wurde.

Gegen die Suppression der natürlichen Killerzellen sprachen sich Yeager et al. aus (130). Es wurden bei der Bestimmung diverser Funktionen von NK und T-Lymphozyten, sowie deren Konzentrationen im Blut nach intravenöser Gabe von Fentanyl bei gesunden Probanden, keine Hinweise auf die vielerorts beschriebenen Immunsuppression durch Opioide gefunden.

Diese Reaktion auf Opioide durch eine direkte Wirkung auf die Zellen kann jedoch möglich sein, da Carr et al. (14) Opioid-Rezeptoren der  $\delta$ - und  $\kappa$ -Klasse auf der Oberfläche von T- und B-Lymphozyten und der Makrophagenlinie P388d1 nachweisen konnten. In Tierversuchen konnten Henderson et al. (45) durch Immunisieren von Hasen mit Carboxyfentanyl-bovinem  $\gamma$ -Globulin die Bildung von hoch spezifischen Antikörpern gegen Fentanyl induzieren.

Anders stellen sich die Ergebnisse der Studie von Jacobs et al. (53) dar. Hier zeigte sich bei der Gabe von Fentanyl, im Gegensatz zu einem Placebo, bei gesunden Versuchspersonen eine Erhöhung der Anzahl im Blut zirkulierender natürlicher Killerzellen. Dagegen konnte bei der In-vitro-Untersuchung von Blutproben der gleichen Individuen, bei denen das Medikament extrakorporal beigefügt wurde, keinerlei signifikante Veränderung der NK-Funktionen festgestellt werden. Dies legt den Schluß nahe, daß durch Fentanyl in vivo vielmehr eine sekundäre zentrale Wirkung auf das Immunsystem als einen direkten Effekt auf die NK hat.

Wie bereits bei dem Medikament Droperidol beschrieben konnte Gadlov et al. (31) bei der Inkubation der Blutproben von Lungenkarzinompatienten mit Fentanyl eine Erhöhung der T-Lymphozyten nachweisen, wies aber auch einen Abfall der Zahl an B-Lymphozyten nach.

### 1.3.9 Propofol

In vielen Studien, vornehmlich im Vergleich mit anderen Anästhetika, konnte kein Nachweis einer Modulation des Immunsystems durch Propofol erbracht werden. (23, 25, 67, 96, 113) Einige Untersuchungen belegen jedoch einen nachweisbaren Effekt auf die Körperabwehr, vornehmlich über Veränderungen der Zytokinmuster:

In der Studie von Brand et al. (10) zeigte sich eine pro-inflammatorische Immunreaktion bei mit Lipopolysacchariden stimulierten Vollblutproben von Patienten in Narkose mit Propofolgabe. Dies äußerte sich durch eine Erniedrigung der Interleukin-10-Konzentration und gleichzeitige Erhöhung der TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Freisetzung, sowie eine Erniedrigung der natürlichen Killerzellen, eine Veränderung des Quotienten der T-Lymphozyten zugunsten der CD4<sup>+</sup>-Zellen und einen Anstieg der B-Lymphozyten.

Mühling et al. (88) untersuchte den Einfluß von Propofol auf den intrazellulären freien Aminosäurepool und die Immunfunktionsmarker von Neutrophilen. Hierbei zeigten sich signifikante Veränderungen der Aminosäureverteilung und eine Hemmung der O<sub>2</sub>- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Formation von Neutrophilen. Interessanterweise konnte dieser Einfluß bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit Taurin ausgeglichen werden.

Einen Hinweis auf den Einfluß von Propofol auf die Ausbreitung von bösartigen Tumoren konnte Garib et al (33) aufzeigen. Bei der Beobachtung der Migration von Mammakarzinomzellen konnte eine beschleunigte Migrationsgeschwindigkeit und eine dosisabhängige Verlängerung der Migrationsdistanz in Anwesenheit von Propofol belegt werden.

Midazolam und Propofol induzierten bei den Untersuchungen von Marone et al. (77) eine dosisabhängige Histaminfreisetzung im Lungenparenchym (HLMC).

Wie auch bereits bei Thiopental und Etomidat beschrieben, wurde nach Gabe von Propofol die Expressionsdichte von CD14, die lipopolysaccharidstimulierte Tumornekrosefaktor-Reaktion und die Freisetzung von IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1ra) in Vollblutproben

vermindert. Dieser Effekt zeigte sich bereits in geringer Dosierung des Medikamentes. Gleichzeitig zeigte sich auch hier, wie bei Thiopental und Etomidat, ein Anstieg der IL-10 Konzentration. (68). Vergleichbare Effekte konnten Schneemilch et al. (108) in vivo nachweisen, wobei die antiinflammatorisch wirkenden Zytokine IL-10, IL-1RA und TGF- $\beta$  im Vergleich zu Narkoseverfahren mit inhalierten Anästhetika zumindest unverändert oder vermehrt freigesetzt zeigten. Das kann in klinischer Konsequenz eine positive Wirkung im Sinne der Beeinflussung des postoperativen/posttraumatischen inflammatorischen Prozeß haben.

Bei der bereits oben erwähnten Studie von Rossano et al. (103) auf die Modulation der Freisetzung von Zytokinen von menschlichen Monozyten durch Anästhetika führte die Anwesenheit von Propofol zu einem Anstieg der Produktion von Tumornekrosefaktor, IL-1 $\alpha$  sowie Interleukin-4. Auch konnte eine vermehrte Freisetzung von IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden.

Untersuchungen bei kritisch kranken Intensivpatienten, die mit Propofol sediert wurden, ergaben nach 24h und 48h einen signifikanten Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Die Produktion von IL-2 und IL-8 zeigte sich gehemmt. (44) Galley et al. (32) zeigten Hinweise auf eine Hemmung der IL-8-Sekretionsmechanismen bei In-vitro-Versuchen. Die Zugabe von Propofol zu isolierten mit Lipopolysacchariden stimulierten menschlichen polymorphkernigen Leukozyten induzierte eine Verminderung der Freisetzung von Interleukin-8, wobei der intrazelluläre IL-8-mRNA-Spiegel, wie in der Kontrollgruppe ohne Anästhetikum, anstieg.

Der inhibitorische Effekt auf die Polarisation von Neutrophilen in vitro durch Propofol wurde von O'Donnell et al. (93) nachgewiesen. Die Wirkung muß auf dem Wirkstoff selbst beruhen, da die alleinige Untersuchung der Trägersubstanz Intralipid 10% sogar eine unterstützende Funktion auf die Polarisation von Neutrophilen hatte.

Propofol konnte den IFN- $\gamma$  / IL-4 Quotienten bei Concanavalin A-stimulierten mononucleären Zellen erhöhen, zeigte sonst aber bei der Untersuchung der Balance von T-Helferzellen Typ-1/Typ2 keinen bedeutenden Einfluß (105).

Eine In-vivo-Studie bei Patienten mit Propofol-Narkose während kleinen chirurgischen Eingriffen zeigte eine signifikante Erhöhung der Anzahl im Blutkreislauf zirkulierender T-Lymphozyten, T-Helfer-Zellen und B-Lymphozyten (96).

## 1.4 Immunmodulierende Effekte von Anästhetika auf Monozyten

Bisher ist das Wissen über den Einfluß, den narkotische Substanzen auf Monozyten haben, begrenzt.

Eine Hemmung der zellvermittelten Zytotoxizität von peripheren Blutmonozyten bei Primaten (Rhesusaffen), die eine Narkose mit Ketamin ohne chirurgischen Eingriff erhielten, zeigten Thomas et al. (120).

Kerkoff et al. (57) konnten bei Untersuchungen der Regulation des Acyl-CoA-Bindungsproteins (ACBP) und der Cholesterol-Acyltransferase (ACAT) eine kompetitive Hemmung durch Flunitrazepam nachweisen.

Cullen et al. (20) stellten in vitro eine minimal verminderte Phagozytose von Latexpartikeln durch Monozyten, die Menschen während Vollnarkosen mit Thiopental oder Droperidol entnommen wurden, fest.

Heller et al. (43) zeigten in der Studie über die Bakterienelimination nach Beimpfung von Blut mit Escherichia Coli in vitro, daß Thiopental, Midazolam, Ketamin und Propofol einen hemmenden Effekt auf den oxidativen Burst und die Phagozytoseaktivität von Monozyten hatten. Dies war jedoch nur in hohen Konzentrationen, wie sie klinisch nicht verwandt werden, nachweisbar.

Hole et al. (47) demonstrierten in einer In-vitro-Untersuchung eine dosisabhängige Suppression der monozytenvermittelten Zytolyse und eine Verminderung der Thymidinaufnahme von Lymphozyten durch Thiopentalgaben bei chirurgischen Eingriffen.

Für verschiedene Opioide konnten Menzebach et al. (83) einen inhibitorischen Effekt auf die Expression von Komplementrezeptoren CD11b und CD35 auf der Monozytenoberfläche, die Phagozytoseaktivität und den oxidativen Burst bei Monozyten in einer Dosis- und Zeitabhängigkeit nachweisen. Fentanyl wurde in dieser Studie auch untersucht, zeigte aber als einziges Opioid nicht diese hemmenden Wirkungen. Welters et

al. (124) konnten eine Inhibition der lipopolysaccharid-induzierten NF- $\kappa$ B-Bindung bei menschlichen Blutmonozyten belegen.

Fentanyl, Thiopental, Lidocain und Etomidate konnten die durch Phytohämagglutinin P induzierte 3H-Thymidin Inkorporation in Kulturen peripherer mononucleärer Blutzellen von Ratten inhibieren (15).

In der Untersuchung von Chu et al. (16) konnte bei der Messung der durch bakterielles Endotoxin (Lipopolysaccharide von *Escherichia coli* 0111:B4) induzierten Procoagulaseaktivität von menschlichen Blutmonozyten in vitro unter Methohexitaleinfluß und Thiopentaleinfluß eine dosisabhängige Hemmung gezeigt werden.

Bezüglich der Effekte auf die Freisetzung von Zytokinen in Anwesenheit von Anästhetika gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Während Rossano et al. (103) eine Stimulation in der Sekretion dieser Zytokine beschrieben, haben Taupin et al. (118) eine Inhibition der Produktion von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 durch Monozyten unter Midazolameinfluß beobachtet.

Bei der Untersuchung der Wirkung von Thiopental auf die Freisetzung von Zytokinen durch menschlichen Monozyten von Rossano et al. (103) zeigte sich ein Anstieg der Produktion von TNF, IL-6 sowie IL-4 in Anwesenheit von Ketamin, Propofol, Dormicum und Thiopental. Bei Propofoleinfluß konnte weiter eine vermehrte Freisetzung von IFN- $\gamma$  und IL-1 $\alpha$  nachgewiesen werden.

Die Angaben von Brand et al. (11) deuten auf eine vermehrte Freisetzung von Zytokinen (Ausschüttung von Interleukin-1, Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor) bei narkotisierten Menschen, bei denen Thiopental, Propofol oder Fentanyl angewandt wurden, hin. Die Anzahl der im peripheren Blut nachweisbaren Monozyten war reduziert.

Es ist bekannt, daß Propofol einen stimulierenden Effekt auf die Ausschüttung von Zytokinen besitzt (35). Bei Untersuchungen, die den Einfluß verschiedener intravenöser Anästhetika auf die spontane und endotoxinstimulierte Zytokin-Reaktion in Voll-Blut analysierten, konnten Larsen et al. (68) zeigen, daß bei Monozyten Thiopental, Etomidat und Propofol in anästhesiologisch gebräuchlichen Konzentrationen die Freisetzung von IL1-

Rezeptorantagonisten reduzierte, während gleichzeitig die IL-10 Freisetzung stieg. Die Expressionsdichte von CD14-Rezeptoren wurde durch diese Medikamente vermindert. Ketamin zeigte einen negativen Einfluß auf die IL-1 $\beta$ -Sekretion.

Eine Induktion der Ausschüttung von IL-1, IL-6 und TNF bei Monozyten wurde auch bei Ketamin beobachtet (35, 95).

In Kulturen von mononucleären Zellen, denen Lidocain oder Bupivacain zugesetzt wurde, konnte eine dosisabhängige Hemmung der IL-1 Konzentration nach Stimulation mit Lipopolysacchariden nachgewiesen werden (111).

Isofluran zeigte eine reversible, dosisabhängige Inhibition der Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  durch menschliche Blutmonozyten (106).

Bei Concanavalin A-stimulierten mononucleären Zellen konnte in Anwesenheit von Thiopental der sezernierte IFN- $\gamma$  / IL-4 Quotienten verringert werden. Propofol konnte den IFN- $\gamma$  / IL-4 Quotienten bei Concanavalin A-stimulierten mononucleären Zellen erhöhen (105).

In der Arbeit von Stevenson et al. (116) konnte eine signifikante Hemmung der Sekretion von  $\alpha$ -Interferon menschlicher Monozyten unter Einfluß volatiler Anästhetika (Halothan) gezeigt werden.

Bei der Bestimmung der Chemotaxis von menschlichen Blutmonozyten unter dem Einfluß von volatilen Anästhetika zeigten Moudgil et al. (86, 87) eine signifikante Hemmung bei der Behandlung der Zellen mit Enfluran, Halotan, Methoxyfluran und N<sub>2</sub>O.

Makrophagen, die hohen Fentanylkonzentrationen ausgesetzt waren, zeigten eine verminderte Chemokinesis sowie eine bis 4-fach verlangsamte Chemotaxis. Im Bereich klinisch relevanter Konzentrationen war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar (115). Die Zellen wurden hier von Patienten, die sich kurz zuvor einer Coronaren-Bypass-Operation unterzogen hatten, gewonnen. Daher sind die Ergebnisse nicht direkt auf gesunde Menschen übertragbar.

<b>Funktion</b>	<b>hemmend</b>	<b>aktivierend</b>
Freisetzung von IL-1	Midazolam Lidocain Bupivacain Isofluran Ketamin ?	Propofol Thiopental Fentanyl Ketamin ?
Freisetzung von IL-4	<i>Propofol ?</i>	Ketamin Dormicum Thiopental <i>Propofol ?</i>
Freisetzung von IL-6	Midazolam	Ketamin Fentanyl Dormicum Thiopental Propofol
Freisetzung von IL-10		Thiopental Propofol Etomidat
Freisetzung von IFN	Midazolam Halotan	Propofol
Freisetzung von TNF	Isofluran	Thiopental Propofol Ketamin Dormicum Fentanyl
NF-κB Bindung	Morphin	
Komplementexpression	div. Morpinderivate	
Procoagulaseaktivität	Thiopental Methohexital	
Zytotoxizität	Thiopental Ketamin	
Oxidativer Burst	Thiopental Midazolam Ketamin Propofol	
Phagozytose	Thiopental Droperidol	
Chemokinesis	Fentanyl	
Chemotaxis	Fentanyl Halotan Methoxyfluran N <sub>2</sub> O	

**Tab. 3** Übersicht Einfluß von Anästhetika auf Monozytenfunktionen entsprechend den Angaben auf den vorherigen Seiten (Reußner)

## **1.5 Klinische Relevanz immunsuppressiver Anästhetikanebenwirkungen**

Bei langzeitbeatmeten, kritisch kranken Intensivpatienten werden häufig non-volatile Anästhetika über einen langen Zeitraum benutzt und könnten bei negativen Einflüssen auf das Immunsystem einem günstigen Heilungsverlauf entgegenwirken. Entzündungen können durch bestimmte pathophysiologische Prozesse und Krankheitsstadien auch chronisch werden. Postoperative Infektionen sind der Hauptgrund für die Morbidität und Mortalität von intensivmedizinischen Patienten. (46)

Aus diesem Grund liegt es nahe, den Einfluß von zur Narkose verwandten Substanzen auf die Abwehrfunktion der Monozyten zu untersuchen.

## 1.6 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluß intravenöser Anästhetika auf die Chemotaxis menschlicher Blutmonozyten in vitro.

Folgende intravenöse Anästhetika wurden untersucht:

- |                          |                  |
|--------------------------|------------------|
| 1) Barbiturate:          | a) Thiopental    |
|                          | b) Methohexital  |
| 2) Imidazolderivate:     | Etomidat         |
| 3) Phenzyklidinderivate: | Ketamin          |
| 4) Benzodiazepine:       | a) Flunitrazepam |
|                          | b) Midazolam     |
| 5) Butyrophenone:        | Droperidol       |
| 6) Opioide:              | Fentanyl         |
| 7) Alkylphenolderivate:  | Propofol         |

Da die jeweiligen Handelspräparate der intravenösen Anästhetika getestet wurden, die zum Teil Lösungsmittel und Konservierungsstoffe enthalten (Natriumkarbonat, Benzethoniumchlorid, Benzylalkohol, Äthylalkohol und Intralipid), gingen diese durch zusätzliche Experimente in die Studie ein, um einen isolierten Effekt der Hilfsstoffe zu untersuchen.

Ziel der Arbeit war es, solche intravenösen Anästhetika herauszufinden, welche die Chemotaxis der menschlichen Monozyten herabsetzen. Eine solche Hemmung könnte eventuell in vivo zu einer Begünstigung von perioperativen Infektionen führen.

## 2. Material

### 2.1 Verwendete Reagenzien

Lymphoprep <sup>®</sup>	: Nycomed Pharma AS, Oslo, Norwegen
Isotone Na-Cl-Lösung	: Pfrimer und Co. Pharmazeutische Werke, Erlangen
PBS-Puffer	: GIBCO Europe, Karlsruhe
DMEM	: GIBCO Europe, Karlsruhe
Bovines Serum-Albumin	: ICN Biomedicals, Eschwege
FMLP	: Sigma Chemicals, Deisenhofen
Aqua bidest.	: Zentralapotheke des Universitätsklinikums Gießen
Türck'sche Lösung	: Merck, Darmstadt
Trypanblau	: Sigma Chemicals, Deisenhofen
Dade <sup>®</sup> Diff-Quik <sup>®</sup>	: Baxter Diagnostics AG, Duding, Schweiz

## 2.2 Anästhetika und deren Zusatzstoffe

Die folgenden Konzentrationen der Anästhetika und der jeweiligen korrespondierenden Zusatzstoffe wurden getestet:

### **Medikamente:**

Thiopental (Thiopental „Lentia“<sup>®</sup>; Hormonchemie, München):

1,5 – 15 – 150  $\mu\text{g ml}^{-1}$

Methohexital (Brevimytal<sup>®</sup> Natrium; Eli Lilly, Bad Homburg):

1,7 – 17 – 170  $\mu\text{g ml}^{-1}$

Propofol (Disoprivan<sup>®</sup>; Zeneca, Plankstadt):

0,5 – 5 – 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$

Etomidat (Hypnomidate<sup>®</sup>; Janssen, Neuss):

0,032 – 0,32 – 3,2  $\mu\text{g ml}^{-1}$

Ketamin (Ketanest<sup>®</sup>; Parke-Davis, Berlin):

0,236 – 2,36 – 23,6  $\mu\text{g ml}^{-1}$

Midazolam (Dormicum<sup>®</sup>; Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen):

0,0975 – 0,975 – 9,75  $\mu\text{g ml}^{-1}$

Flunitrazepam (Rohypnol<sup>®</sup>; Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen):

0,004 – 0,04 – 0,4  $\mu\text{g ml}^{-1}$

Fentanyl (Fentanyl<sup>®</sup> Janssen; Janssen-Cilag, Neuss):

0,0035 – 0,035 – 0,35  $\mu\text{g ml}^{-1}$

Droperidol (Dehydrobenzperidol<sup>®</sup>; Janssen-Cilag, Neuss):

0,1235 – 1,235 – 12,35  $\mu\text{g ml}^{-1}$

**Zusatzstoffe:**

Natriumkarbonat (Zentralapotheke des Universitätsklinikums Gießen):

0,09 – 0,9 – 9  $\mu\text{g ml}^{-1}$

Intralipid 10% (Pharmacia & Upjohn, Erlangen):

0,0495 – 0,495 – 4,95  $\mu\text{l ml}^{-1}$

Benzethoniumchlorid (Sigma Chemicals, Deisenhofen):

0,00236 – 0,0236 – 0,236  $\mu\text{g ml}^{-1}$

Benzylalkohol (Merck, Darmstadt):

0,06 – 0,6 – 6  $\mu\text{g ml}^{-1}$

Ethylalkohol (Merck, Darmstadt):

0,004 – 0,04 – 0,4  $\mu\text{l ml}^{-1}$

Die mittleren Konzentrationen (Thiopental 15  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Methohexital 17  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Propofol 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Etomidate 0,32  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Ketamin 2,36  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Midazolam 0,975  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Flunitrazepam 0,04  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Fentanyl 0,035  $\mu\text{g ml}^{-1}$  und Droperidol 1,235  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) entsprechen den Serumkonzentrationen, die direkt nach intravenöser Injektion klinisch relevanter Dosen gemessen wurden (3, 6, 17, 26, 30, 39, 70, 117, 125).

## 2.3 Geräte

Präzisionswaage BP 211 D	: Sartorius, Göttingen
Bakterienfilter FP 030/3 0,2µm	: Schleicher & Schuell, Dassel
Flügelkanülen (Butterfly)	: Braun, Melsungen
Spinalkanülen Spinocan 25 Gauge	: Braun, Melsungen
Kanülen Microlance 3 Gr. 1	: Becton Dickson, Heidelberg
Microlance 3 18 Gauge	
PP Zentrifugenröhrchen (50ml, steril)	: Greiner, Flacht (Limburg / Lahn)
Geweberöhrchen TC (14ml, steril)	: Greiner, Flacht
PE-Pasteur-Pipetten	: Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml-Käppchen)	: Eppendorf, Hamburg
Reagenzglasschüttler	: Heidolph, Schwabach
Zentrifuge Rotixa / KS	: Hettich, Tuttlingen
Inkubator B 5060 / CO <sub>2</sub>	: Heraeus, Hanau
Mikroskop Typ 3472	: Eschenbach, Nürnberg
Pipetten - silber 0,5 - 10 µl	: Eppendorf Varipetten mit Bedienknopf
- gelb 10 - 100 µl	
- blau 100 - 1000 µl	
Pipettenspitzen - weiß < 10 µl	: Sarstedt, Nümbrecht
- gelb < 100 µl	
- blau < 1000 µl	
Polycarbonatfilter 5,0µm	: Millipore GmbH, Eschborn
Cat. TMTP 09030	
Filtertype TMTP 5,0µm	
48 Well-Chemotaxis-Chamber	: Neuro Probe Inc., Cabin John, MD, USA
Stock Number AC48	
mit Zubehör: Wiperblade, Pinzetten, Filterklammern	
Petrischalen	
Färbetröge	
Objektträger	: Menzel-Gläser, Braunschweig
Sterile Kompressen	: Lohmann, Neuwied

Sterile Einmalhandschuhe	: Johnson&Johnson, Norderstedt
Sterile Einmalspritzen (20, 10, 5 und 2 ml)	: Braun, Melsungen

## 2.4 Lösungen

- Phosphatgepufferte-Kochsalzlösung: Vor Versuchsbeginn wurden 50ml PBS-Fertiglösung im Inkubator auf 37°C temperiert.
- DMEM: Ein Zentrifugenröhrchen mit 50ml DMEM-Fertiglösung wurde auf 37°C vorinkubiert.
- DMEM+BSA: Es wurden 10,0 mg bovines Serumalbumin mit der Präzisionswaage abgewogen und in 50 ml DMEM-Fertiglösung gelöst. Auch hier wurde das Gefäß vor den Versuchen auf 37°C gebracht.
- N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin<sup>90</sup>-Lösung (f-MLP):  
f-MLP- Trockensubstanz in einer 10<sup>-8</sup> molaren Lösung in DMEM

Alle Lösungen wurden nach der Herstellung bzw. vor der Bereitstellung mit Hilfe von 0,2µm Bakterienfiltern filtriert.

### 3. Methodik

#### 3.1 Probanden

Die Erlaubnis zur Durchführung der Studie wurde durch die Ethik-Kommission des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen erteilt.

Das Blut für die Versuche wurde von zehn freiwilligen, gesunden Probanden gewonnen. Dabei wurden bei jeder Person alle intravenösen Anästhetika einschließlich Konservierungs- und Lösungsmittel getestet, um die interindividuellen Schwankungen möglichst gering zu halten.

Alle Versuchspersonen nahmen während der gesamten Dauer der Studie keine Medikamente ein. Sie waren alle männlich, im Alter von 24 bis 27 Jahren ( $\bar{x}=25,5 \pm 0,8$ ), bei einer Körpergröße von 175 bis 188 cm ( $\bar{x}=181 \pm 4,5$ ) und einem Körpergewicht von 62 bis 85 kg ( $\bar{x}=77,3 \pm 7,8$ ).

Proband	Alter (J)	Größe (cm)	Gewicht (kg)
1 BK	27	175	81
2 CF	25	185	68
3 AR	25	177	62
4 ME	26	183	83
5 SK	26	188	85
6 KR	26	180	72
7 AM	24	178	82
8 DR	25	179	75
9 CN	25	180	80
10 TW	26	188	85

### **3.2 Blutentnahme**

Zur Blutentnahme wurden 10 ml Einwegspritzen mit 1 ml Vetren<sup>®</sup> (= 100 I.E. Heparin) gefüllt. Anschließend erfolgte die Venenpunktion mittels einer Flügelkanüle (Butterfly) mit einem Innendurchmesser von 0,8 mm (19 Gauge). Es wurde ein Blutvolumen von 10 ml in die vorbereitete Spritze entnommen. Sogleich wurde die Spritze einige Male gewendet, um eine gute Vermischung des Blutes mit dem Heparin zu gewährleisten, so daß die Blutprobe letztlich mit 10 I.E. Heparin-Natrium / ml Blut antikoaguliert war (91).

### **3.3 Isolation der Monozyten aus der Blutprobe**

Menschliche Blutmonozyten wurden nach der gängigen von Bøyum (9) beschriebenen Methodik isoliert. Die Blutprobe wurde in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und bei Zimmertemperatur mit 5 ml einer bei 37°C vortemperierter Phosphat-Puffer-Lösung vermischt. Zwei sterile Falcon Geweberöhrchen (13 ml Zentrifugenröhrchen) füllte man mit je 2 ml Lymphoprep<sup>®</sup>, ohne daß die Innenwand oberhalb des Mediums benetzt wurde. Jeweils 8 ml Blutgemisch wurden nun mit einer sterilen 10 ml Einwegspritze und einer sterilen Injektionsnadel (18 G) vorsichtig über das Lymphoprep<sup>®</sup> geschichtet. Die sich ausbildenden Phasen durften sich dabei nicht mischen, da sich sonst der erforderliche Dichtegradient beim Zentrifugieren nicht ausgebildet hätte. Beide Röhrchen wurden bei 400g (entsprechend 1600 U/min) bei +20°C für 30 Minuten zentrifugiert. Bei der Zentrifugation sammelten sich die Mononukleären Zellen (Monozyten und Lymphozyten) entsprechend dem entstandenen Dichtegradienten in einer Bande ca. einen Zentimeter über dem Sediment aus Erythrozyten an. Dieser Ring wurde mit einer Einweg-Pasteurpipette aus Kunststoff vorsichtig abgesaugt, ohne die benachbarten Phasen mitzuaspirieren. Das Zellgemisch wurde in ein vorbereitetes steriles Geweberöhrchen mit 6 ml Phosphat-Puffer-Lösung gegeben.

Zum Waschen der Zellen wurde dieses Röhrchen mit 400g bei +20°C für 6 Minuten zentrifugiert. Der Überstand über dem Pellet wurde dekantiert und verworfen. Es wurden erneut 6 ml Phosphat-Puffer-Lösung über das Pellet gegeben und die Zellen mit einer Einweg-Kunststoffpipette behutsam resuspendiert. Zum zweiten Waschvorgang wurde

erneut mit 400g bei +20°C für 6 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 2 ml Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium + bovines Serum-Albumin (DMEM+BSA) resuspendiert. Nun erfolgte die Bestimmung der Konzentration der Zellen pro Milliliter in der gewonnenen Suspension. Dazu füllte man ein kleines Eppendorfkäppchen mit 200µl Türck'scher Lösung. Nach Zugabe von 50µl der Zellsuspension erfolgte eine gute Durchmischung mit einem Mischgerät. Nach 5-6 Minuten erfolgte die Zellzählung unter dem Mikroskop mit einer Zählkammer nach Neubauer. Es wurden jeweils 5 kleine Quadrate (=1/32 µl) in den vier großen Eckquadraten ausgezählt und die Summe durch vier geteilt. Das Ergebnis wurde in die folgende Formel eingesetzt:

Zellkonzentration der gewonnenen Suspension:

$$\text{Zellen pro ml} = \frac{n(\text{Zellen in 5 kleinen Quadraten}) \times 14 (\text{Verdünnung})}{0,03125 \times 10^{-3} \text{ml}(5 \text{ kleine Quadrate})}$$

Aus dieser Berechnungsgrundlage wurde die Zellzahl auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml durch hinzufügen der entsprechenden Menge DMEM+BSA eingestellt. Dies entsprach der bei Chemotaxisversuchen gängigen Konzentration von  $1 - 3 \times 10^6$  Zellen/ml (119).

### 3.4 Zellreinheit und Vitalität

Die Zellvitalität wurde durch Anfärben der defekten Zellen mit Trypanblau bestimmt. Dazu füllte man ein kleines Eppendorfkäppchen mit 20µl Trypanblau. In das Gefäß gab man 50µl der Zellsuspension vor der Verdünnung. Nach Mischen und 5-6 Minuten Färbezeit erfolgte ebenfalls die Zellzählung unter dem Mikroskop mit einer Zählkammer nach Neubauer. Es wurden wie bereits oben beschrieben jeweils 5 kleine Quadrate (=1/32 µl) in den vier großen Eckquadraten ausgezählt und die Summe durch vier geteilt. Zur Bestimmung der Vitalität diente folgende Formel:

$$\begin{aligned} \text{defekte Zellen pro ml} &= \frac{n \text{ (gefärbte Zellen in 5 kleinen Quadraten)} \times 5 \text{ (Verdünnung)}}{0,03125 \times 10^{-3} \text{ ml (5 kleine Quadrate)}} \\ &= n \times 160000 \end{aligned}$$

$$\text{Vitalität in \%} = \frac{\text{defekte Zellen pro ml} \times 100}{\text{Zellen pro ml}}$$

Die Vitalität mußte für die Versuche >95% erreichen. Die Zellreinheit wurde durch Pappenheimfärbung im Ausstrich der Zellsuspension bestimmt. Dabei betrug der Anteil an Monozyten 25-30%.

### 3.5 Herstellung der Lockstofflösung

Zur Herstellung der Lockstofflösung wurden 10 mg N-Formyl-MET-LEU-PHE in 22,85 ml DMEM mit einem Magnetrührer gelöst. Aus dieser  $10^{-3}$  molaren Stammlösung wurden vor dem Versuch durch eine Verdünnungskaskade mit DMEM (zweimal im Verhältnis 1:100 und einmal 1:10) 5 ml einer  $10^{-8}$  molaren N-Formyl-MET-LEU-PHE-Lösung hergestellt. Diese wurde durch einen 0,2µm Bakterienfilter gegeben und bei 37° temperiert.

### **3.6 Getestete Anästhetika und deren Lösungsmittel beziehungsweise**

#### **Konservierungsstoffe**

Die neun oben genannten, in der Klinik häufig eingesetzten intravenösen Anästhetika einschließlich ihrer Lösungsmittel und Konservierungsstoffe wurden in je drei verschiedenen Konzentrationen untersucht. Dabei wurde die Konzentration, welche unmittelbar nach intravenöser Gabe des Anästhetikums in anästhesiologisch üblicher Dosis im Serum auftritt, als mittlere zu testende Konzentration zugrunde gelegt. Die niedrigste Konzentration lag um eine Zehnerpotenz unter der mittleren Konzentration, die höchste getestete Konzentration war um den Faktor zehn größer als die mittlere Konzentration und spiegelte eine Situation wieder, die durch verzögerte Ausscheidung oder Metabolisation entstehen kann.

Die Herstellung der entsprechenden Anästhetikakonzentrationen erfolgte in sterilen Reagenzröhrchen. Es wurde die Anästhetikastammlösung hergestellt und zwar genau in einer solchen Verdünnung, daß 5 µl der Lösung zu 45 µl Zellsuspension zugegeben die jeweils höchste Testkonzentration ergab.

Die mittlere und niedrige Anästhetika-Konzentration wurden jeweils durch Verdünnungsreihen aus der höchsten Konzentration hergestellt.

Von folgenden Medikamenten wurden jeweils die Handelspräparate untersucht:

### **3.6.1 Aus der Gruppe der Barbiturate**

#### **3.6.1.1 Thiopental (Trapanal<sup>®</sup>)**

Die getesteten Anästhetika-Konzentrationen gehen auf die Ergebnisse von Doenicke et al. (26) zurück.

Getestete Konzentrationen: 150,0 µg Thiopental /ml Ansatz  
15,0 µg Thiopental /ml Ansatz  
1,5 µg Thiopental /ml Ansatz

Herstellung der Anästhetikastammlösung: 500 mg Thiopental-Trockensubstanz wurden mit 33,33 ml Aqua bidestillata verdünnt. Diese Lösung wurde mit isotoner Kochsalzlösung einmal 1:10 verdünnt.

Lösungsmittel / Konservierungsstoffe: 1 g Trapanal<sup>®</sup> enthält 60 mg Natriumkarbonat als Lösungsmittel.

### 3.6.1.2 Methohexital (Brevimytal<sup>®</sup> Natrium)

Die verwendeten Methohexital-Konzentrationen stützen sich auf die Angaben von Sunshine et al. (117).

Getestete Konzentrationen: 170,0 µg Methohexital /ml Ansatz

17,0 µg Methohexital /ml Ansatz

1,7 µg Methohexital /ml Ansatz

Herstellung der Anästhetikastammlösung: 100mg Brevimytal<sup>®</sup> Natrium wurden in 5,882 ml sterilem Aqua bidestilata gelöst. Diese Lösung wurde mit isotoner Kochsalzlösung einmal 1:10 verdünnt.

Lösungsmittel / Konservierungsstoffe: 1 g Brevimytal<sup>®</sup> Natrium enthält wie Trapanal<sup>®</sup> 60 mg Natriumkarbonat als Lösungsmittel.

### 3.6.2 Aus der Gruppe der Imidazolderivate:

#### Etomidat (Hypnomidate<sup>®</sup>)

Hier basieren die getesteten Anästhetika-Konzentrationen auf den Ergebnissen von van Hamme et al. (39).

Getestete Konzentrationen: 3,2 µg Etomidat /ml Ansatz

0,32 µg Etomidat /ml Ansatz

0,032 µg Etomidat /ml Ansatz

Herstellung der Anästhetikastammlösung: 1ml Handelspräparat Hypnomidate<sup>®</sup> enthält 2 mg Etomidat; so wurden 600 µl Hypnomidate<sup>®</sup> mit 8,400 ml isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Diese Lösung wurde mit isotoner Kochsalzlösung einmal 1:10 verdünnt.



### 3.6.4 Aus der Gruppe der Benzodiazepine

#### 3.6.4.1 Flunitrazepam (Rohypnol<sup>®</sup>)

Die Dosierung erfolgte nach Angaben von Lauven et al. (70)

Getestete Konzentrationen: 0,4     μg Flunitrazepam /ml Ansatz  
                                  0,04     μg Flunitrazepam /ml Ansatz  
                                  0,004    μg Flunitrazepam /ml Ansatz

Herstellung der Anästhetikastammlösung: 1 ml Rohypnol<sup>®</sup> enthalten 2 mg Flunitrazepam. Daher wurden 200 μl Rohypnol<sup>®</sup> mit 9,800 ml isotoner Kochsalzlösung gemischt. Diese Lösung wurde mit isotoner Kochsalzlösung noch einmal 1:10 verdünnt.

Lösungsmittel / Konservierungsstoffe: 1 ml Rohypnol<sup>®</sup> enthält als antimikrobielles Konservierungsmittel 30 mg Benzylalkohol sowie 20 Vol.% Äthylalkohol.

#### 3.6.4.2 Midazolam (Dormicum<sup>®</sup> 5)

Bei Midazolam entstammen die getesteten Konzentrationen den Angaben von Amrein et al. (2).

Getestete Konzentrationen: 9,75     μg Midazolam /ml Ansatz  
                                  0,975    μg Midazolam /ml Ansatz  
                                  0,0975 μg Midazolam /ml Ansatz

Herstellung der Anästhetikastammlösung: 1 ml Dormicum<sup>®</sup> 5 enthalten 5 mg Midazolam. Es wurden 975 μl Handelspräparat mit 4,024 ml isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Diese Lösung wurde mit isotoner Kochsalzlösung abermals 1:10 verdünnt.

Lösungsmittel / Konservierungsstoffe: Dormicum<sup>®</sup> 5 ist seit 1988 frei von Zusatzstoffen.

### 3.6.5 Aus der Gruppe der Butyrophenone:

#### **Droperidol (Dehydrobenzperidol<sup>®</sup>)**

Die untersuchten Konzentrationen basieren auf den Angaben von Fischer et al. (30).

Getestete Konzentrationen: 12,35 µg Droperidol /ml Ansatz  
1,235 µg Droperidol /ml Ansatz  
0,123 µg Droperidol /ml Ansatz

Herstellung der Anästhetikastammlösung: 1 ml Dehydrobenzperidol<sup>®</sup> enthält 2,5 mg Droperidol. Es wurden 98 µl Dehydrobenzperidol<sup>®</sup> mit 1,016 ml isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Diese Lösung wurde mit isotoner Kochsalzlösung einmal 1:10 verdünnt.

Lösungsmittel / Konservierungsstoffe: Das Droperidol-Handelspräparat Dehydrobenzperidol<sup>®</sup> enthält keine Zusatzstoffe.

### **3.6.6 Aus der Gruppe der Opiode:**

#### **Fentanyl ( Fentanyl<sup>®</sup>-Janssen)**

Die von Bentley et al. (6) stammenden Angaben dienten als Grundlage für die untersuchten Konzentrationen.

Getestete Konzentrationen: 0,35 µg Fentanyl /ml Ansatz

0,035 µg Fentanyl /ml Ansatz

0,0035 µg Fentanyl /ml Ansatz

Herstellung der Anästhetikastammlösung: 1 ml Fentanyl<sup>®</sup>-Janssen enthalten 0,05 mg Fentanyl. Es wurden daher 700 µl Fentanyl<sup>®</sup>-Janssen mit 300 µl isotoner Kochsalzlösung gemischt. Diese Lösung wurde mit isotoner Kochsalzlösung einmal 1:10 verdünnt.

Lösungsmittel / Konservierungsstoffe: Auch Fentanyl<sup>®</sup>-Janssen ist frei von Lösungs- und Konservierungsmitteln.

### 3.6.7 Aus der Gruppe der Alkylphenolderivate:

#### Propofol (Disoprivan<sup>®</sup>)

Die hier verwendeten Propofol-Konzentrationen stützen sich auf die Angaben von Cockshott et al. (17)

Getestete Konzentrationen:	50,0	µg Propofol /ml Ansatz
	5,0	µg Propofol /ml Ansatz
	0,5	µg Propofol /ml Ansatz

Herstellung der Anästhetikastammlösung: 1 ml Disoprivan<sup>®</sup> enthält 10 mg Propofol. Es wurden 1000 µl Handelspräparat mit 1000 µl isotoner Kochsalzlösung gut gemischt. Diese Lösung wurde mit isotoner Kochsalzlösung einmal 1:10 verdünnt.

Lösungsmittel / Konservierungsstoffe: 1 ml Disoprivan<sup>®</sup> enthalten 10 Vol.% Intralipid als Lösungsmittel.

### **3.6.8 Untersuchte Lösungsmittel und Konservierungsstoffe**

#### **3.6.8.1 Natriumkarbonat**

Natriumkarbonat ist in den Barbituraten Thiopental und Methohexital als Lösungsmittel enthalten. Die Konzentration in den Handelspräparaten ist identisch, und die zu untersuchenden Serumkonzentrationen differieren nur gering. Daher reichte es unseres Erachtens aus, drei statt sechs verschiedene Konzentrationen zu untersuchen.

Getestete Konzentrationen: 10,0 µg Natriumkarbonat /ml Ansatz

1,0 µg Natriumkarbonat /ml Ansatz

0,1 µg Natriumkarbonat /ml Ansatz

Herstellung der Lösungsmittelstammlösung: 10 mg Natriumkarbonat wurden auf der Präzisionswaage abgewogen und mit 10 ml isotoner Kochsalzlösung gelöst. Diese Lösung wurde mit isotoner Kochsalzlösung einmal 1:10 verdünnt.

#### **3.6.8.2 Benzethoniumchlorid**

Im Handelspräparat Ketanest<sup>®</sup> dienen 0,1 mg Benzethoniumchlorid /ml Anästhetikum als Konservierungsmittel.

Getestete Konzentrationen: 236,0 ng Benzethoniumchlorid /ml Ansatz

23,6 ng Benzethoniumchlorid /ml Ansatz

2,36 ng Benzethoniumchlorid /ml Ansatz

Herstellung der Konservierungsmittelstammlösung: Mit der Präzisionswaage wurden 23,6 mg Benzethoniumchlorid abgewogen und in 10 ml isotoner Kochsalzlösung gelöst. Diese Lösung wurde mit isotoner Kochsalzlösung dreimal 1:10 verdünnt.

### 3.6.8.3 Benzylalkohol

Das Benzodiazepin-Handelspräparat Rohypnol<sup>®</sup> enthält pro ml Injektionslösung 30 mg Benzylalkohol als Stabilisator.

Getestete Konzentrationen: 6 µg Benzylalkohol /ml Ansatz  
0,6 µg Benzylalkohol /ml Ansatz  
0,06 µg Benzylalkohol /ml Ansatz

Herstellung der Konservierungsmittelstammlösung: Bei dem spezifischem Gewicht von 1,05 kg/l von Benzylalkohol entsprechen 6 µg Flüssigkeit 0,0057µl. So wurden 57 µl Benzylalkohol in 9,943 ml isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Diese Lösung wurde mit isotoner Kochsalzlösung zweimal 1:10 verdünnt.

### 3.6.8.4 Äthylalkohol

Rohypnol<sup>®</sup> enthält außer Benzylalkohol auch noch 20 Vol.% Äthanol.

Getestete Konzentrationen: 0,04 µl Äthanol /ml Ansatz  
0,004 µl Äthanol /ml Ansatz  
0,0004µl Äthanol /ml Ansatz

Herstellung der Konservierungsmittelstammlösung: 40 µl Äthanol wurden in 9,960 ml isotoner Kochsalzlösung pipettiert und vermischt. Diese Lösung wurde mit isotoner Kochsalzlösung einmal 1:10 verdünnt.

### 3.6.8.5 Intralipid

In Propofol<sup>®</sup> dienen 10 Vol.% Intralipid / ml Lösung als Fettbasis der Medikamentenemulsion.

Getestete Konzentrationen:	0,495	µl Intralipid /ml Ansatz
	0,0495	µl Intralipid /ml Ansatz
	0,00495	µl Intralipid /ml Ansatz

Herstellung der Lösungsmittelstammlösung: 990 µl Intralipid 10 % wurden mit 1010 µl isotoner Kochsalzlösung gut gemischt. Diese Lösung wurde mit isotoner Kochsalzlösung einmal 1:10 verdünnt.

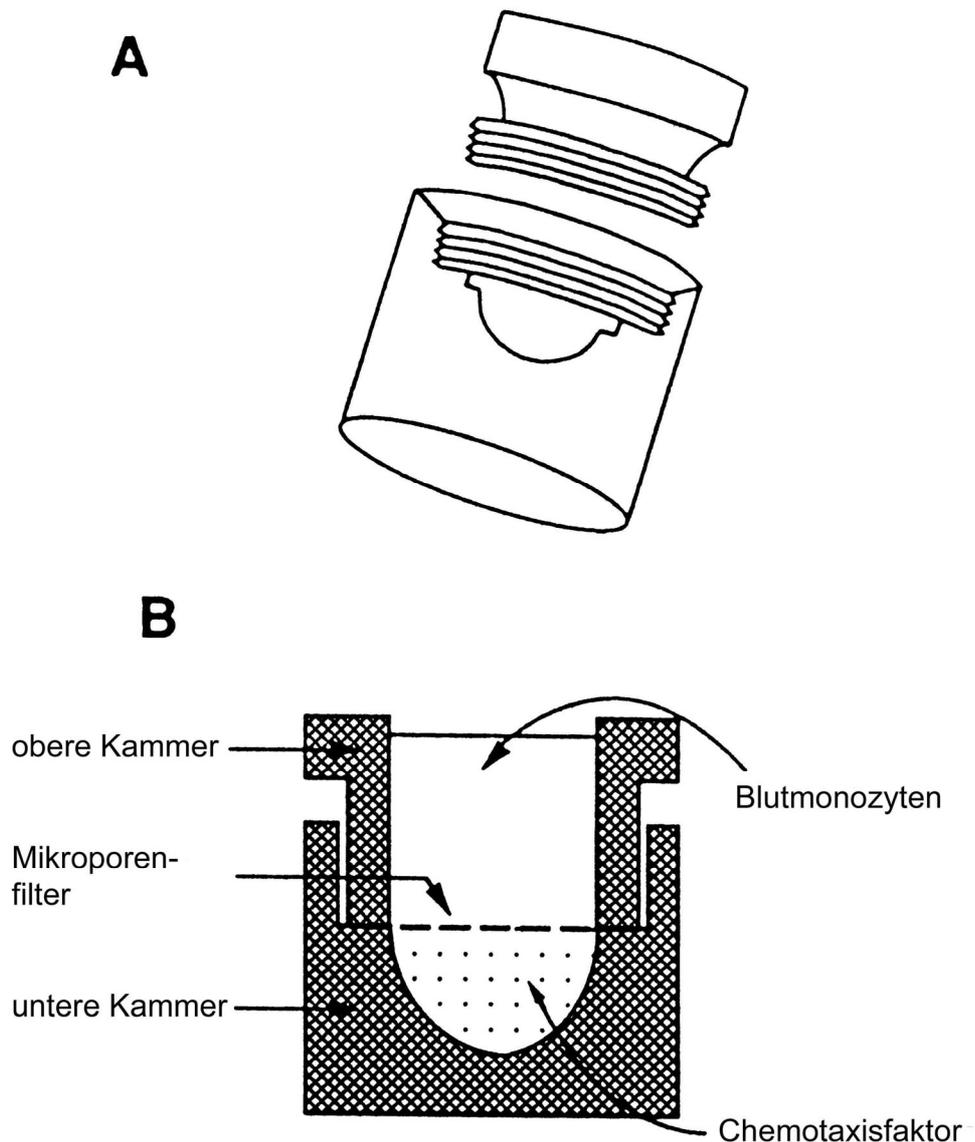
### **3.7 Messung der Chemotaxis von Monozyten in vitro**

Das Prinzip der Bestimmung der Chemotaxis von menschlichen Blutmonozyten in vitro geht auf eine Arbeit von Boyden (8) zurück. Es wurde im Wesentlichen die modifizierte Methode von Martinet et al.(78, 127) durchgeführt.

#### **3.7.1 Prinzip der Chemotaxismessung**

Es wurde die Migration menschlicher Blutmonozyten durch ein Mikroporenfilter in einer modifizierten Boyden-Chemotaxis-Kammer bestimmt. Eine typische Chemotaxiskammer besteht aus zwei durch einen Filter getrennte kleine Kammern. In der unteren befindet sich ein Lockstoff mit bekannter chemotaktischer Wirkung und in der oberen die auf Chemotaxis zu untersuchenden Zellen.

Als chemotaktischer Lockstoff diente dabei das Protein *N*-Formyl-metionyl-leucyl-phenylalanin (*N*-Formyl-MET-LEU-PHE oder *f*-MLP), das bei Monozyten eine gerichtete Fortbewegung durch den Filter mit einer Porengröße von 5µm in die untere Kammer induziert. Nach 90 Minuten Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte die Entfernung des Filters und die Färbung der darauf befindlichen Zellen. Anschließend wurde der Filter auf einen Objektträger aufgebracht. Die durch die Filterporen gewanderten Monozyten wurden lichtmikroskopisch ausgezählt. Hier wurde eine Chemotaxiskammer mit insgesamt 48 Einzelkammern (28) verwendet, um verschiedene Testansätze gleichzeitig unter denselben Testbedingungen durchzuführen.



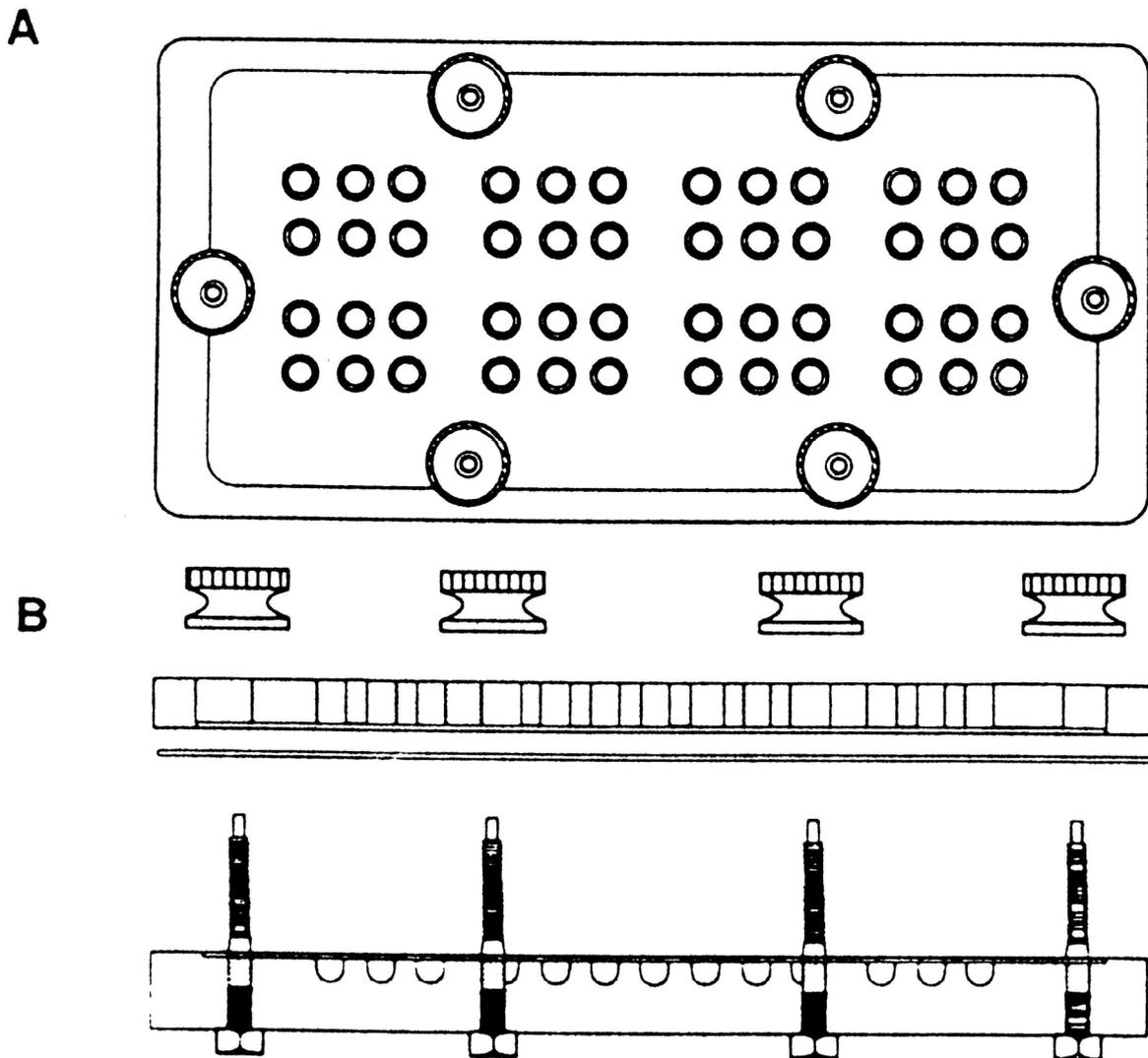
**Abbildung 3:**

Modifizierte Boyden Chemotaxiskammer. Eine typische Chemotaxiskammer ist aus zwei Kammern, die durch einen Filter voneinander getrennt sind, konstruiert. Die untere Kammer ist mit dem auf chemotaktische Aktivität zu prüfenden Reagenz gefüllt, darauf wird der Filter gelegt und die obere Kammer durch Aufschrauben des oberen Teils gebildet. Die obere Kammer wird nun mit den chemotaktisch aktiven Zellen befüllt. Nach der Inkubation wird der obere Teil wieder abgeschraubt, um den Filter wieder freizugeben; die nicht migrierten Zellen auf der Oberseite des Filters werden entfernt und die Zellen, welche durch den Filter gewandert sind, ausgezählt.

A: Geöffnete Boyden Chemotaxiskammer.

B: Schematische Zeichnung der geschlossenen modifizierten Boyden Chemotaxiskammer

(8)



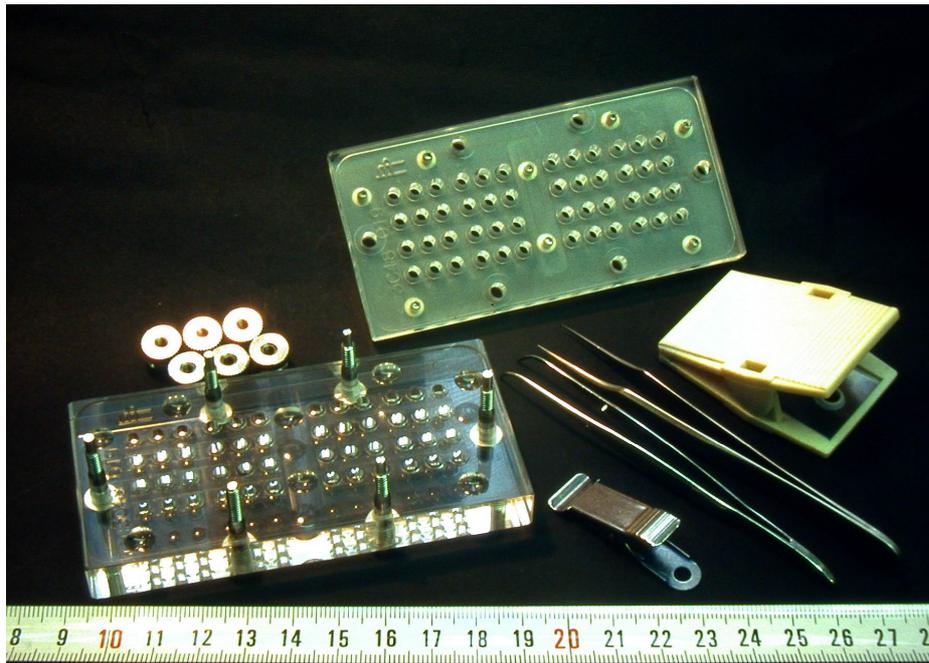
**Abbildung 4:**

Schematische Zeichnung der 48-Well-Micro-Chemotaxiskammer. Der untere Teil der Kammer enthält 48 Vertiefungen. Jede einzelne dieser Vertiefungen kann mit einer Probe gefüllt werden. Dann wird ein Filter aufgelegt, welcher alle 48 Vertiefungen bedeckt, gefolgt von der Auflage einer Silikonabdichtung. Nun wird der obere Teil der Chemotaxiskammer aufgesetzt und damit die oberen 48 Einzelkammern gebildet. Alle Teile werden durch Anziehen der sechs Rändelschrauben zusammengehalten. Nach der Inkubation werden diese Rändelschrauben wieder gelöst und der obere Teil der Kammer und die Silikonabdichtung entfernt. Jetzt kann der Filter entnommen werden. Die nicht migrierten Zellen auf der Oberseite des Filters werden entfernt und die Zellen, welche durch den Filter gewandert sind, ausgezählt.

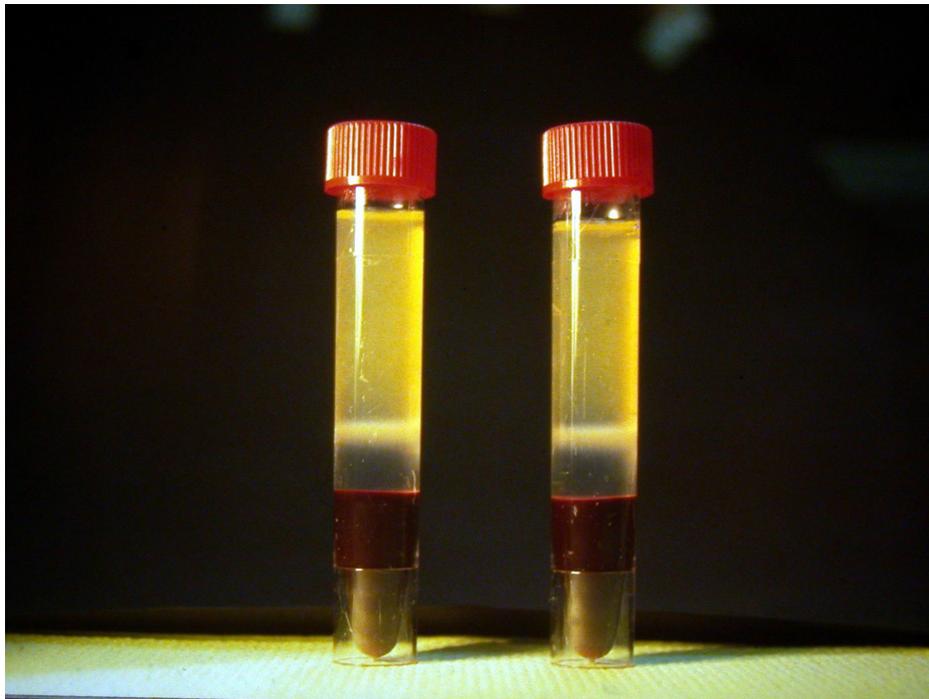
A: Obere Ansicht der 48-Well-Micro-Chemotaxiskammer

B: Seitliche Ansicht der 48-Well-Micro-Chemotaxiskammer

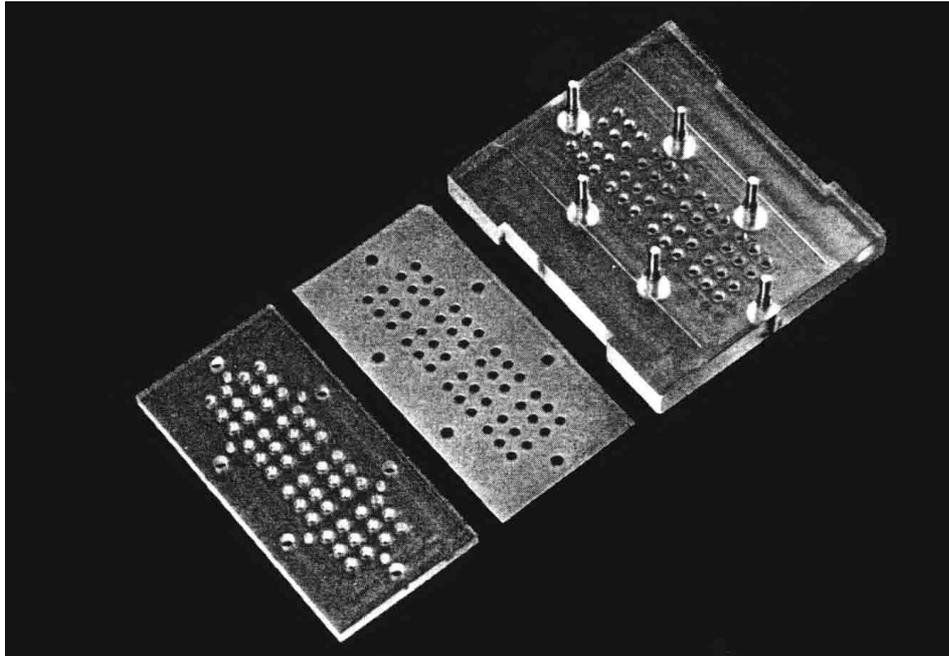
(8,78)



**Abbildung 5:**  
Foto der zerlegten Chemotaxiskammer mit speziellem Zubehör wie Pinzetten und Klammern für die Filterfärbung. (Reußner D.)

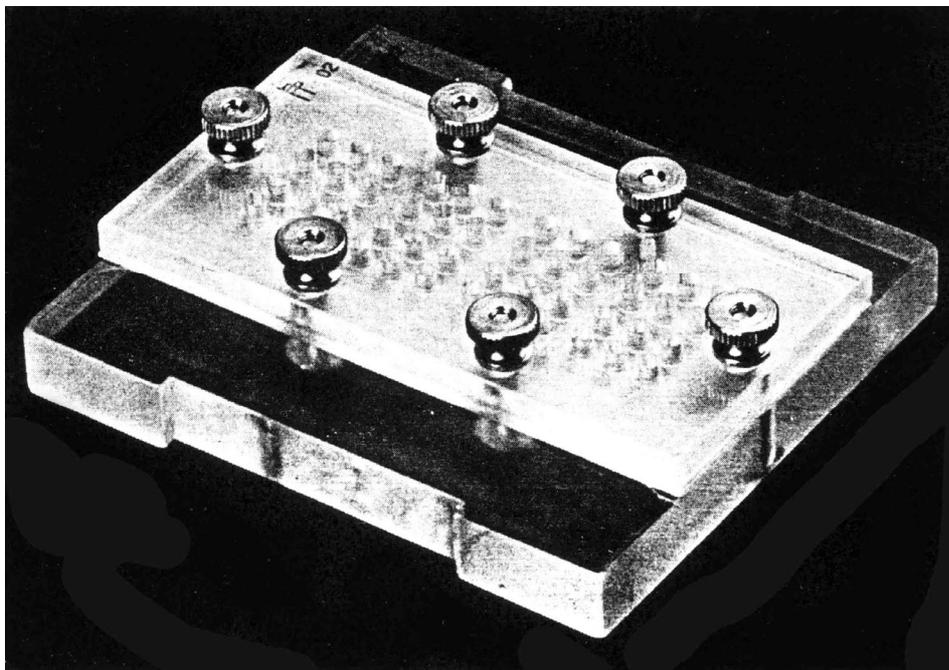


**Abbildung 6:**  
Zentrifugierte Blutproben vor Entnahme der isolierten Zellen. Unten das Sediment der Erythrozyten, darüber die Banden mit Lymphoprep®, der Schicht mit den mononukleären Zellen und darüber die übrigen Blutzellen im Serum. (Reußner D.)



**Abbildung 7:**

Foto der zerlegten 48-Well-Micro-Chemotaxiskammer (Original Prototyp von Neuro Probe INC., Cabin John, USA)



**Abbildung 8:**

Foto der zusammengefügt 48-Well-Micro-Chemotaxiskammer (Original Prototyp von Neuro Probe INC., Cabin John, USA)

## **3.7.2 Durchführung der Messung der Chemotaxis**

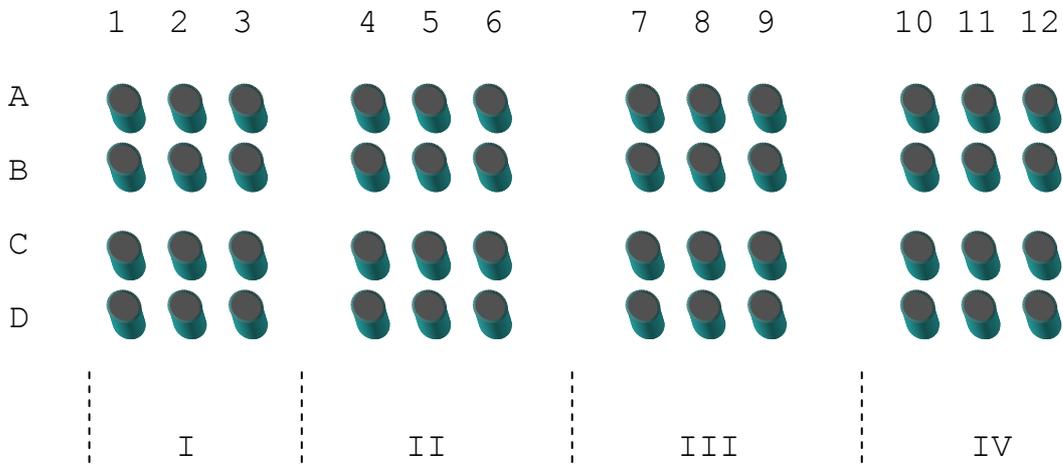
### **3.7.2.1 Vorbereitung**

Vor Versuchsbeginn wurden alle verwendeten Reagenzien und Gerätschaften bei 37°C temperiert. Die Flüssigkeiten wurden ferner durch ein 0,2 µm Bakterienfilter gegeben. Dies diente zum Ausschluß etwaiger Störfaktoren durch Keimbesiedelung

### **3.7.2.2 Beschickung der Chemotaxiskammer**

Um die verschiedenen Medikamente in ihrer die Chemotaxis beeinflussenden Wirkung vergleichen zu können, wurden bei jedem Versuch mehrere Anästhetika gleichzeitig untersucht. Zuerst wurden in die unteren Kammern 25 µl Lockstofflösung pipettiert (bei Versuch 2 in die Kammern D9 und D10 als Leerwert ohne Lockstoff 25µl DMEM+BSA). Die vorher zurechtgeschnittenen Polycarbonatfilter mit 5 µm Porengröße (Millipore GmbH, Eschborn) wurden mit der glänzenden Seite nach unten vorsichtig über den befüllten Kammern positioniert, so daß sich keine Luftblasen bildeten und der Filter von unten benetzt war. Das Oberteil der Chemotaxiskammer wurde nun auf das Unterteil aufgesetzt und die Rändelschrauben unter stetigem Druck von oben handfest angezogen. Es erfolgte eine weitere Kontrolle auf eventuelle Lufteinschlüsse und Dichtigkeit der nun durch den Polycarbonatfilter verschlossenen unteren Kammern. Die 48 oberen Kammern der Neuroprobe-Microchemotaxis-Kammer wurden nun mit jeweils 5 µl der bei 37°C vortemperierten Medikamentenstammlösungen nach folgenden Beschickungsplänen befüllt:

### Aufteilung der Kammern:



**Abb. 9:** Die römischen Zahlen entsprechen den Zuschnitten für die Objektträger zur mikroskopischen Auswertung. Die Bereiche I und II sowie III und IV wurden von je einem Filter erfasst.

**Tab. 4:** Beschickungspläne für die Versuche:

Versuch 1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Thiopental Hoch		Natriumcarbonat Hoch		Methohexital Hoch		Midazolam Hoch		Droperidol Hoch		Ketamin Hoch	
B	Thiopental Mittel		Natriumcarbonat Mittel		Methohexital Mittel		Midazolam Mittel		Droperidol Mittel		Ketamin Mittel	
C	Thiopental Niedrig		Natriumcarbonat Niedrig		Methohexital Niedrig		Midazolam Niedrig		Droperidol Niedrig		Ketamin Niedrig	
D	Nullprobe		----		Benzethoniumchlorid Hoch		Benzethoniumchlorid Mittel		Benzethoniumchlorid Niedrig		Nullprobe	
	I			II			III			IV		

Versuch 2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Flunitrazepam Hoch		Benzylalkohol Hoch		Ethanol Hoch		Etomidate Hoch		Fentanyl Hoch		Propofol Hoch	
B	Flunitrazepam Mittel		Benzylalkohol Mittel		Ethanol Mittel		Etomidate Mittel		Fentanyl Mittel		Propofol Mittel	
C	Flunitrazepam Niedrig		Benzylalkohol Niedrig		Ethanol Niedrig		Etomidate Niedrig		Fentanyl Niedrig		Propofol Niedrig	
D	Nullprobe		Intralipid Hoch		Intralipid Mittel		Intralipid Niedrig		-- Ø fMLP		Nullprobe	
	I			II			III			IV		

Beim Pipettieren dieser kleinen Mengen wurde darauf geachtet, daß sich keine Lösung an der Außenwand der Pipettenspitze befand. Beim Ausdrücken wurde der Tropfen an der Seitenwand der oberen Kammer platziert, ohne schon den Filter zu benetzen. Anschließend wurde in alle oberen Kammern jeweils 45µl der isolierten Zellsuspension gegeben. Dies erfolgte recht zügig, um die Chemotaxis in allen Kammern möglichst gleichzeitig zu starten, dennoch mußte genau darauf geachtet werden, daß sich keine Luftblasen bildeten und den Kontakt mit der Filteroberfläche behinderten. Die beschickte Chemotaxiskammer wurde nun bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 90 Minuten inkubiert.

### **3.7.2.3 Inkubation und Färbung der Mikroporenfilter**

Während der Inkubation der Testkammer wurde die weitere Verarbeitung der Mikroporenfilter vorbereitet. Eine Petrischale wurde zur Benetzung der Filter mit PBS gefüllt. Das Abstreifwerkzeug von Neuroprobe® („Wiperblade“) wurde vorbereitet, ebenso wurden die vier Färbetröge mit den drei Fixier- und Färbelösungen des DiffQuik®-Färbekits und PBS zur anschließenden Färbung gefüllt.

Nach Ende der Inkubationszeit von 90 Minuten wurde die Chemotaxiskammer aus dem Inkubatorschrank entnommen und der Mikroporenfilter zur weiteren Verarbeitung vorbereitet. Zur Entnahme des Filters wurden die Rändelschrauben der Chemotaxiskammer gleichmäßig gelöst und die Kammer auf eine saugfähige, saubere Unterlage gestürzt. Der obere Teil der Kammer konnte vorsichtig vom unteren Teil gelöst werden und der Mikroporenfilter entnommen werden. Der Filter konnte nun vorsichtig mit den Neuroprobe®-Filterklemmen abgehoben werden, wobei auf die richtige Orientierung des Filters geachtet wurde. Die Oberseite, welche mit der Zellsuspension und den noch nicht durchwanderten Zellen benetzt war, wurde vorsichtig mit dem bereitgestellten Phosphatpuffer befeuchtet. Sodann wurde nur diese Seite über die Abstreifvorrichtung gezogen, um die Zellen, die nicht durch Diapedese durch die Filterporen auf die Unterseite des Filters gelangt waren, zu entfernen. Diese Prozedur wurde ein zweites Mal wiederholt. Es wurde darauf geachtet, die Unterseite des Filters weder zu berühren noch mit anderen Flüssigkeiten zu benetzen, um ein Ablösen der durchgewanderten Monozyten zu verhindern.

Nun wurde der Filter gefärbt. Dies geschah, um mechanischen Streß zu vermeiden, in hohen Färbetrögen, in denen der Filter mit Klammern eingehängt beziehungsweise eingetaucht werden konnte.

Die zerlegte Chemotaxiskammer wurde sogleich in destilliertem Wasser gründlich gewaschen, um ein Antrocknen der Lösungen und damit Verunreinigung der Kammer zu vermeiden. Die Gerätschaften wurden anschließend luftgetrocknet.

Als Färbung benutzten wir das gebrauchsfertige Färbekitt Diff Quik® (Baxter, Düringen, Schweiz), ein Färbeset zur Schnelfärbung von Differentialblutbildern. Die Färbetechnik entspricht in den Ergebnissen der Pappenheim-Methode (Giemsa-May-Grünwald). Die Methodik wurde aus der Arbeit von Martinet et al. übernommen (78).

Zunächst wurde der Filter in die Fixierlösung, entsprechend „Färbelösung I“, für 60 Sekunden eingelassen. Die Zusammensetzung enthält FastGreen in Methanol bei einem Methanolanteil von >50 Volumenprozent.

Der Fixation folgte die erste Färbung in der „Färbelösung II“ für erneute 60 Sekunden. Diese Flüssigkeit enthält 1,22 g/l Eosin G in Phosphatpuffer bei einem pH von 6,6. Die letzte Färbung erfolgte mit der „Färbelösung III“ auch für die Dauer von 60 Sekunden. Der Hersteller gibt die Zusammensetzung mit 1,1 g/l Thiazin-Farbstoff in Phosphatpuffer bei pH 6,6 an. Der Filter wurde mit der Unterseite nach unten auf zwei nebeneinander liegende Glas-Objektträger gelegt, so daß jede Gruppe (bei Versuch 1 die Gruppen I u. II und bei Versuch 2 die Gruppen III u. IV) auf jeweils einem Objektträger zu liegen kam. Ein Verrutschen, Abtupfen oder andere Irritationen der Filter wurden vermieden, um ein Vermischen möglicherweise sich ablösender Monozyten in andere Spots zu vermeiden. Die Objektträger wurden luftgetrocknet und anschließend der Filter an der Kante der beiden Objektträger mit einem sterilen Skalpell Größe 11 durchtrennt. Nun erfolgte die Beschriftung und Archivierung der Präparate zur weiteren Auswertung durch Auszählen der migrierten Monozyten.

#### **3.7.2.4 Auszählen der Mikroporenfilter**

Die Auswertung der Polycarbonat-Mikroporenfilter geschah in üblicher lichtmikroskopischer Weise. Hierzu wurden in jedem Spot jeweils fünf randomisierte High-power-fields ausgezählt und addiert. Ein High-power-field entsprach dabei einem ganzen Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung.

Es wurden alle erkennbaren Zellen in der Fokusebene zwischen der Glasoberfläche des Objektträgers und dem Polycarbonatfilter ausgezählt. Des Weiteren wurden Poren, die durch in Diapedese befindlichen Zellen verlegt waren, addiert. Zelltrümmer oder einzelne Zellen oberhalb dieser Fokusebene, also auf der Oberseite des Filters, wurden ignoriert. Hierbei handelte es sich um nicht-migrierte Zellen, die durch den Abstreifvorgang vor der Färbung nicht erfaßt wurden.

### 3.7.3 Statistische Auswertung

Für jedes in der Studie untersuchte Anästhetikum und die dazugehörigen Zusatzstoffe wurden pro getestete Konzentration 10 Versuche durchgeführt. Wie bereits unter 3.1 beschrieben, wurden alle 15 Substanzen mit den Monozyten der jeweils selben 10 Blutspender getestet, um den Einfluß interindividueller Unterschiede zu minimieren.

Von allen ermittelten Werten wurden die Mediane, Standardfehler der Mediane und Standardabweichungen bestimmt (Tabellen im Anhang).

Nach Überprüfung auf Normalverteilung der Ergebnisse mit dem Pearson-Stephens-Test folgte die Überprüfung der Varianzgleichheit mittels Bartlett-Test. Wenn beide Bedingungen erfüllt waren, wurde eine zweifache Varianzanalyse durchgeführt. Als Folgetest diente der Scheffé-Test.

Für den Fall, daß die Bedingungen für Normalverteilung oder Varianzgleichheit nicht erfüllt waren, wurde als Alternativtest der Friedman-Test verwandt, bei signifikanten Ergebnissen wurde als Folgetest der Miller-Test durchgeführt.

Statistische Signifikanz wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% und darunter angenommen.

Als Referenzwert der Nullprobe wurden jeweils die Werte der Nullprobe aus dem untersuchten Cluster der Chemotaxiskammer im jeweiligen Versuch verwandt:

Versuch	Cluster	Nullprobe
1	A1 – D6	D1+D2
1	A7 – D12	D11 + D12
2	A1 – D6	D1+D2
2	A7 – D12	D11 + D12

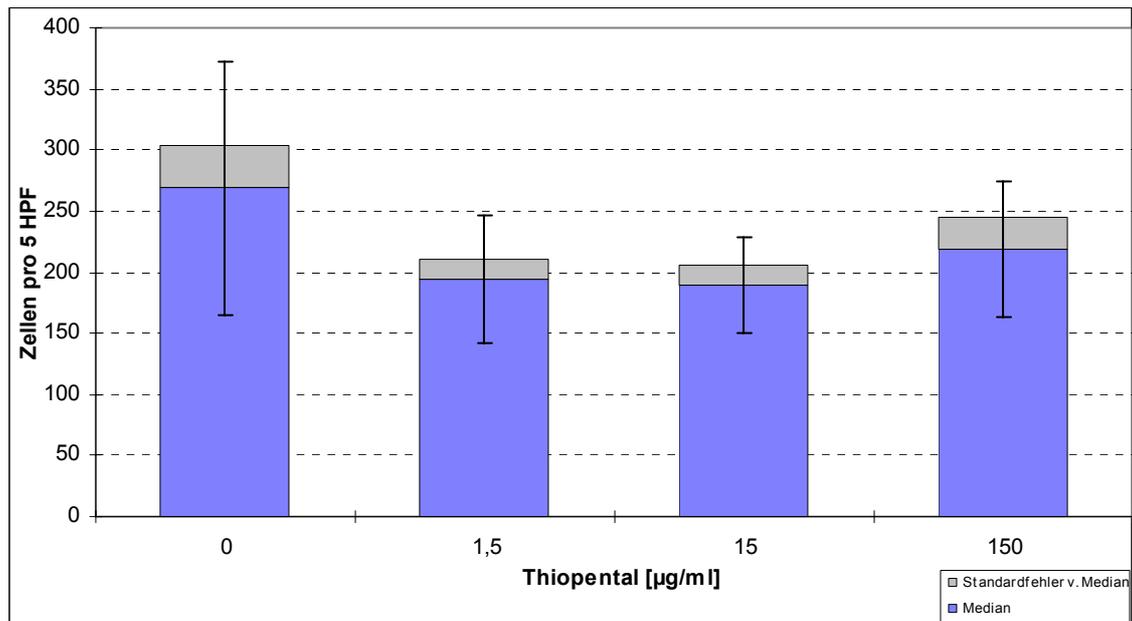
Die Auswertung erfolgte auf einem IBM-PC mit dem BIOMED-PLUS-Programmsystem der Jungjohann Verlagsgesellschaft (60).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Aus der Gruppe der Barbiturate

#### 4.1.1 Thiopental

##### Chemotaxis



n=10

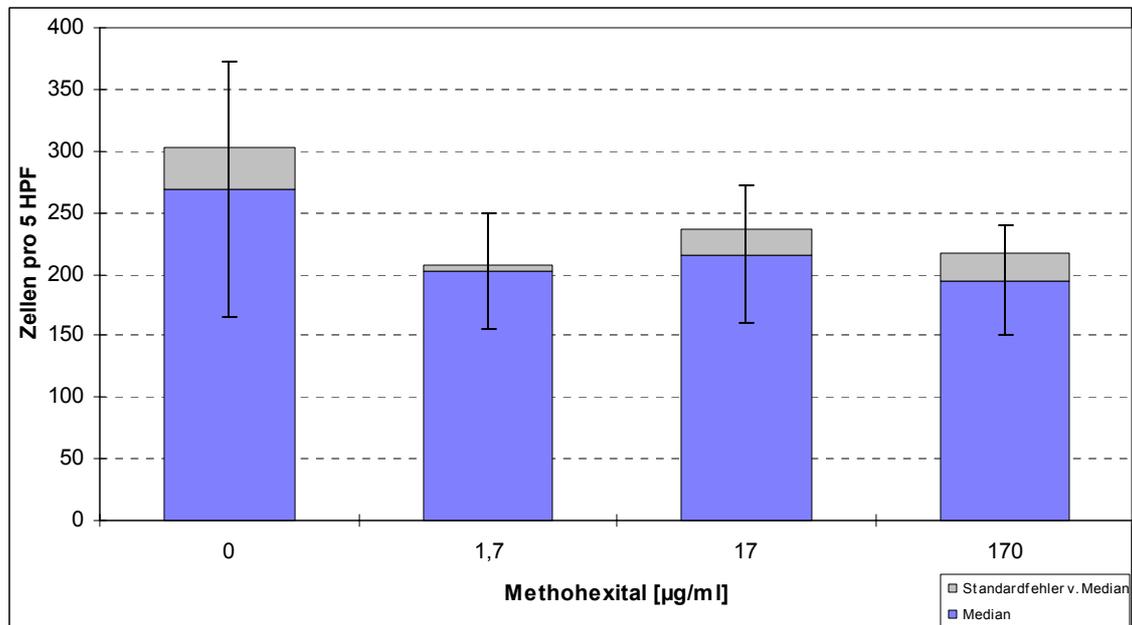
Abbildung :

Mediane, Standardfehler der Mediane und Standardabweichungen der Chemotaxis von Monozyten in vitro aus 10 Messungen in Zellen pro 5 High-Power Fields (HPF) unter Einfluß dreier verschiedener Thiopental-Konzentrationen.

Thiopental zeigte keinen signifikanten Einfluß auf die Chemotaxis von Monozyten.

### 4.1.2 Methohexital

#### Chemotaxis



n=10

Abbildung :

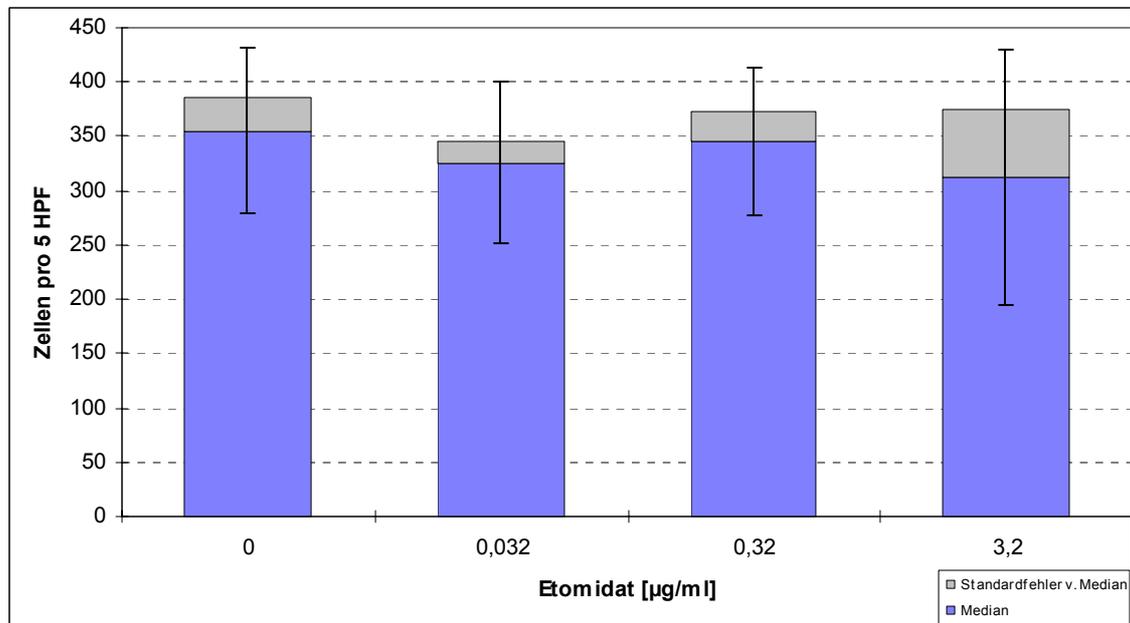
Mediane, Standardfehler der Mediane und Standardabweichungen der Chemotaxis von Monozyten in vitro aus 10 Messungen in Zellen pro 5 High-Power Fields (HPF) unter Einfluß dreier verschiedener Methohexital-Konzentrationen.

Die Chemotaxis von Monozyten wurde durch Methohexital nicht signifikant beeinflusst.

## 4.2 Aus der Gruppe der Imidazolderivate

### Etomidat

#### Chemotaxis



n=10

Abbildung :

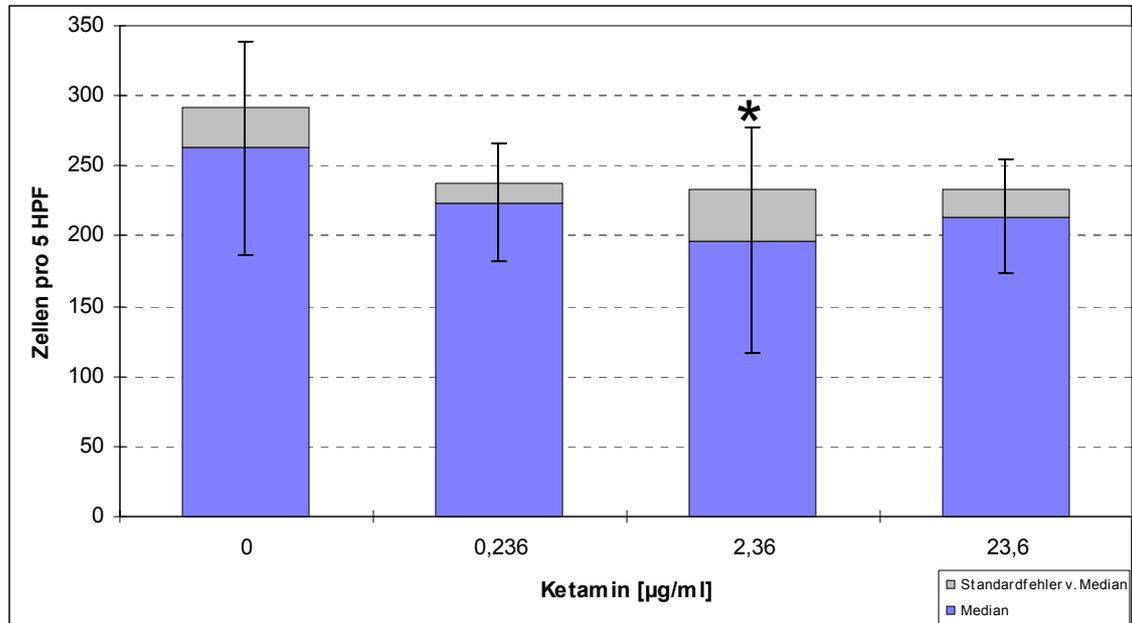
Mediane, Standardfehler der Mediane und Standardabweichungen der Chemotaxis von Monozyten in vitro aus 10 Messungen in Zellen pro 5 High-Power Fields (HPF) unter Einfluß dreier verschiedener Etomidat-Konzentrationen.

Es zeigten sich keine relevanten Beeinflussungen der Chemotaxis von Monozyten durch Etomidat.

#### 4.3 Aus der Gruppe der Phencyclidinderivate:

##### Ketamin

##### Chemotaxis



n=10

Abbildung :

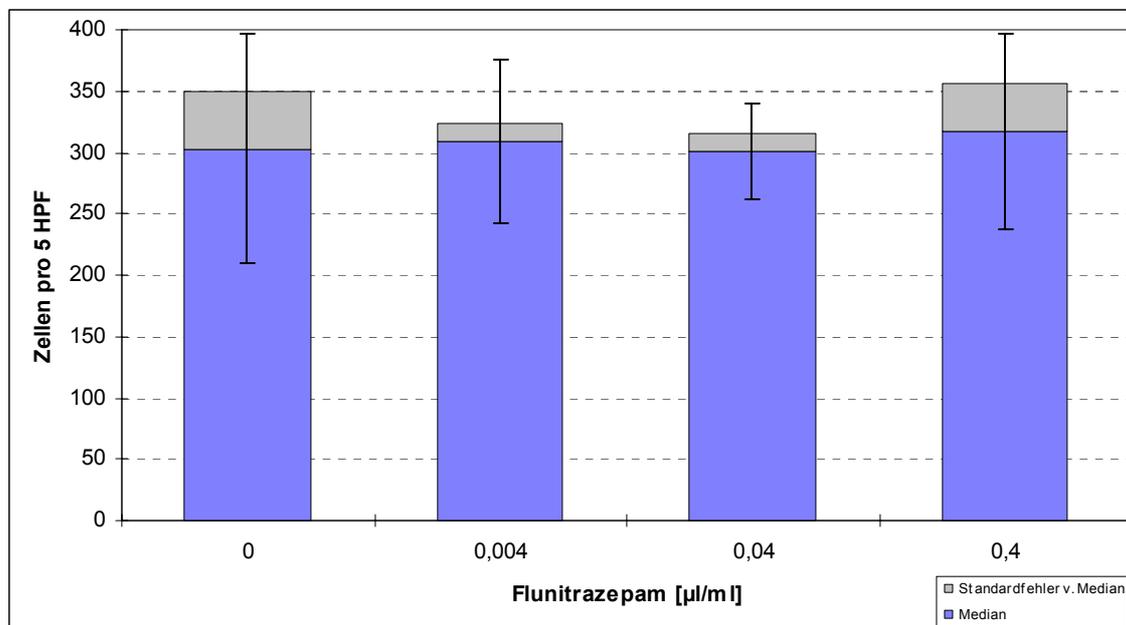
Mediane, Standardfehler der Mediane und Standardabweichungen der Chemotaxis von Monozyten in vitro aus 10 Messungen in Zellen pro 5 High-Power Fields (HPF) unter Einfluß dreier verschiedener Ketamin-Konzentrationen.

Bei der mittleren Konzentration von Ketamin zeigte sich eine signifikante Hemmung der Chemotaxis von Monozyten. (Friedman-Test / Miller-Test,  $p \leq 0,05$ )

Aus der Gruppe der Benzodiazepine

#### 4.4.1 Flunitrazepam

##### Chemotaxis



n=10

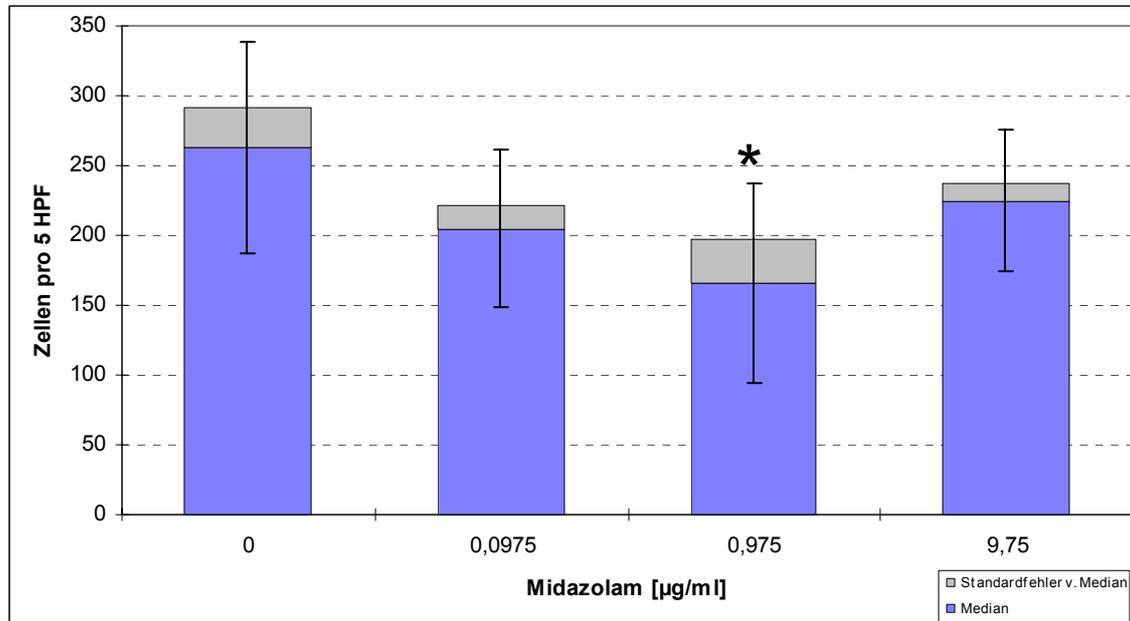
Abbildung :

Mediane, Standardfehler der Mediane und Standardabweichungen der Chemotaxis von Monozyten in vitro aus 10 Messungen in Zellen pro 5 High-Power Fields (HPF) unter Einfluß dreier verschiedener Flunitrazepam-Konzentrationen.

Es konnte kein signifikanter Einfluß von Flunitrazepam auf die Monozytenchemotaxis nachgewiesen werden.

#### 4.4.2 Midazolam

##### Chemotaxis



n=10

Abbildung :

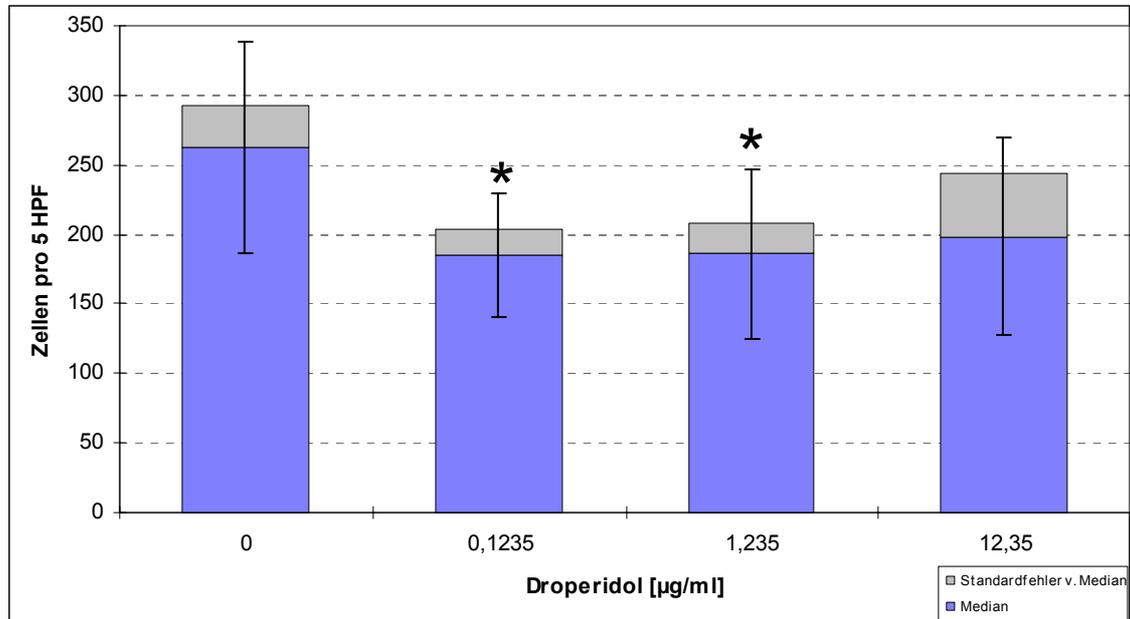
Mediane, Standardfehler der Mediane und Standardabweichungen der Chemotaxis von Monozyten in vitro aus 10 Messungen in Zellen pro 5 High-Power Fields (HPF) unter Einfluß dreier verschiedener Midazolam –Konzentrationen.

Die mittlere Konzentration von Midazolam supprimierte die Chemotaxis von Monozyten signifikant. (Friedman-Test / Miller-Test,  $p \leq 0,05$ )

#### 4.5 Aus der Gruppe der Butyrophenone:

### Droperidol

#### Chemotaxis



n=10

Abbildung :

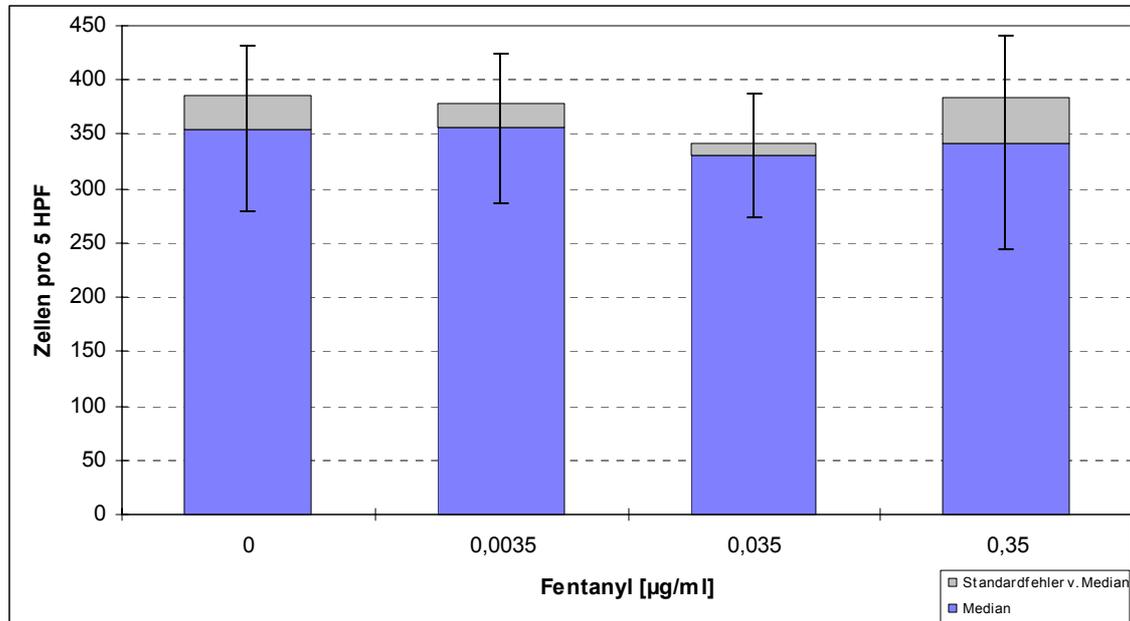
Mediane, Standardfehler der Mediane und Standardabweichungen der Chemotaxis von Monozyten in vitro aus 10 Messungen in Zellen pro 5 High-Power Fields (HPF) unter Einfluß dreier verschiedener Droperidol-Konzentrationen.

Die niedrige und mittlere Konzentration von Droperidol induzierten eine Verminderung der Chemotaxis von Monozyten. (Friedman-Test / Miller-Test,  $p \leq 0,05$ )

#### 4.6 Aus der Gruppe der Opiode:

### Fentanyl

#### Chemotaxis



n=10

Abbildung :

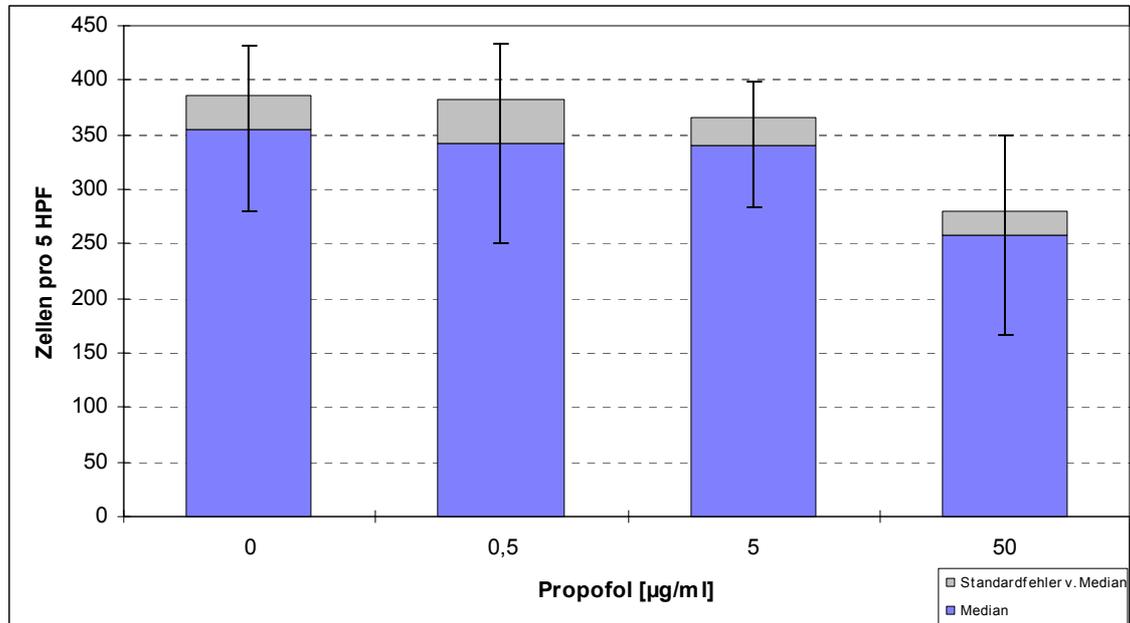
Mediane, Standardfehler der Mediane und Standardabweichungen der Chemotaxis von Monozyten in vitro aus 10 Messungen in Zellen pro 5 High-Power Fields (HPF) unter Einfluß dreier verschiedener Fentanyl-Konzentrationen.

Ein Effekt auf die Chemotaxis von Monozyten durch Fentanyl konnte nicht nachgewiesen werden.

4.7 Aus der Gruppe der Alkyphenolderivate:

### Propofol

#### Chemotaxis



n=10

Abbildung :

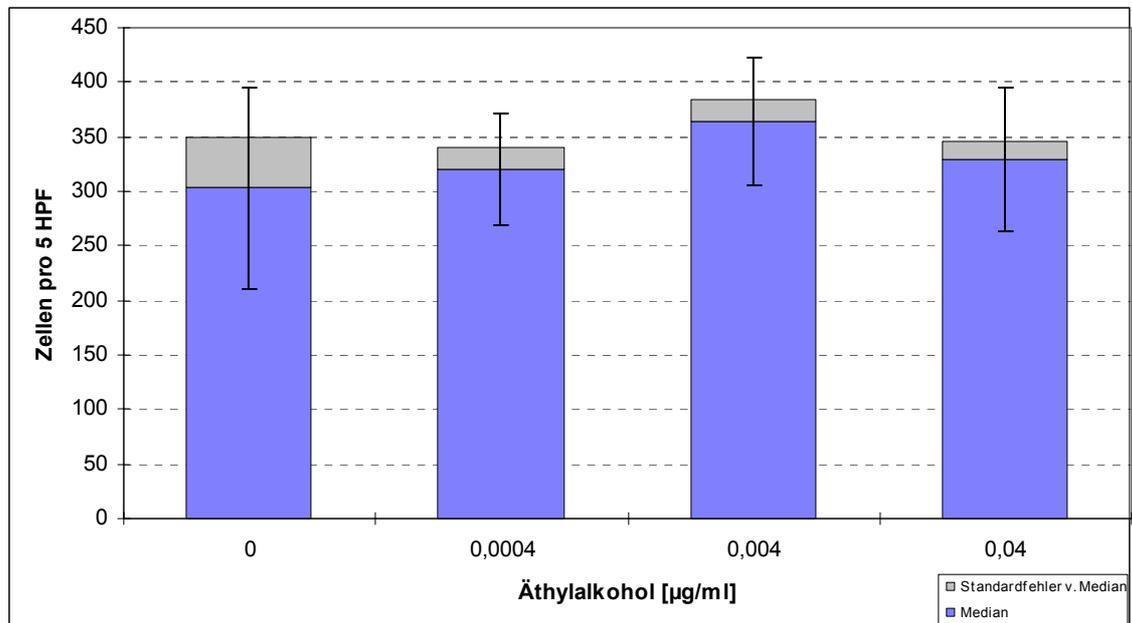
Mediane, Standardfehler der Mediane und Standardabweichungen der Chemotaxis von Monozyten in vitro aus 10 Messungen in Zellen pro 5 High-Power Fields (HPF) unter Einfluß dreier verschiedener Propofol-Konzentrationen.

Es zeigte sich, daß Propofol keine relevanten Effekte auf die Monozytenchemotaxis hatte.

## 4.8 Ergebnisse der Untersuchung der Hilfsstoffe

### Äthylalkohol

#### Chemotaxis



n=10

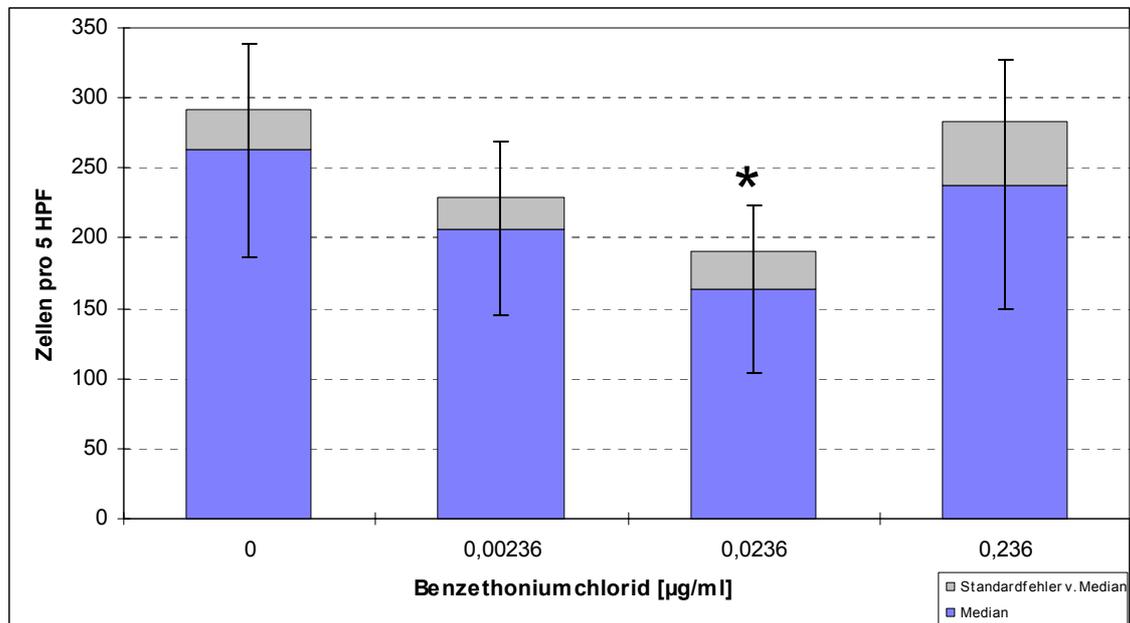
Abbildung :

Mediane, Standardfehler der Mediane und Standardabweichungen der Chemotaxis von Monozyten in vitro aus 10 Messungen in Zellen pro 5 High-Power Fields (HPF) unter Einfluß dreier verschiedener Äthanol-Konzentrationen.

Es konnte keine signifikante Beeinflussung der Chemotaxis von Monozyten durch Äthylalkohol nachgewiesen werden.

## Benzethoniumchlorid

### Chemotaxis



n=10

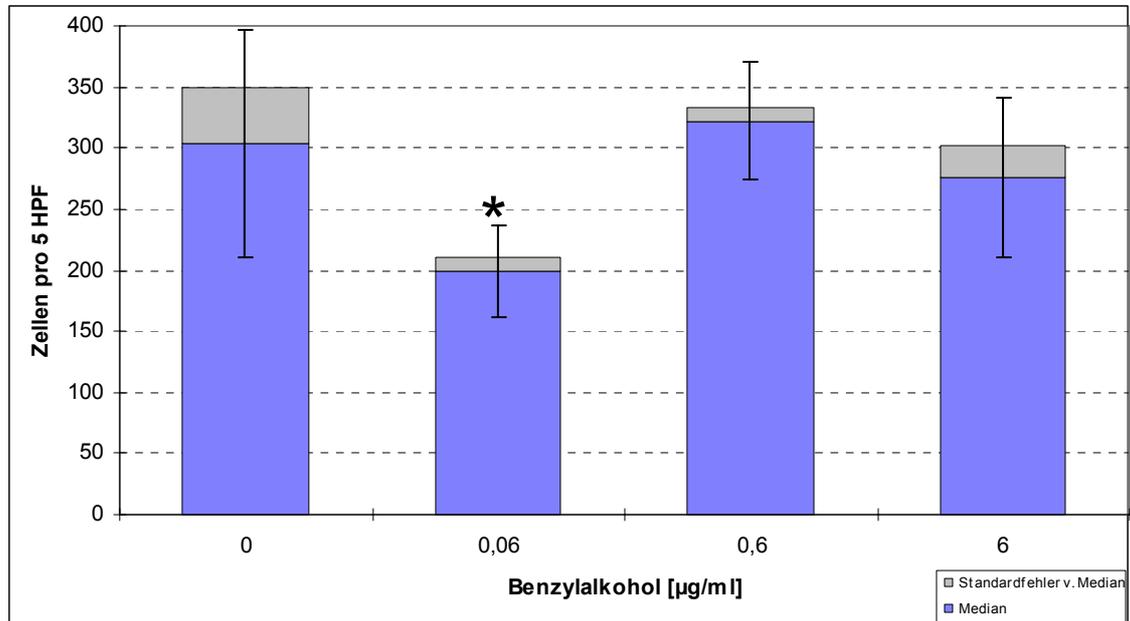
Abbildung :

Mediane, Standardfehler der Mediane und Standardabweichungen der Chemotaxis von Monozyten in vitro aus 10 Messungen in Zellen pro 5 High-Power Fields (HPF) unter Einfluß dreier verschiedener Benzethoniumchlorid-Konzentrationen.

Bei der mittleren Konzentration von Benzethoniumchlorid zeigte sich eine signifikante Hemmung der Chemotaxis von Monozyten. (Friedman-Test / Miller-Test,  $p \leq 0,05$ )

## Benzylalkohol

### Chemotaxis



n=10

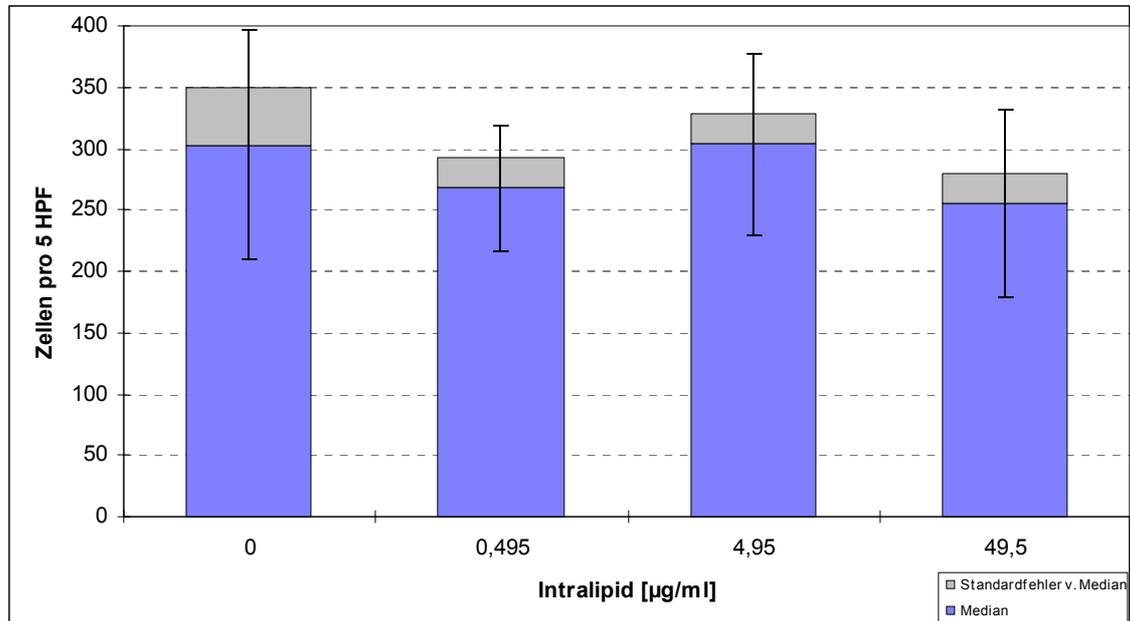
Abbildung :

Mediane, Standardfehler der Mediane und Standardabweichungen der Chemotaxis von Monozyten in vitro aus 10 Messungen in Zellen pro 5 High-Power Fields (HPF) unter Einfluß dreier verschiedener Benzylalkohol –Konzentrationen.

Die niedrige Konzentration von Benzylalkohol induzierte eine Verminderung der Chemotaxis von Monozyten. (Friedman-Test / Miller-Test,  $p \leq 0,05$ )

## Intralipid

### Chemotaxis



n=10

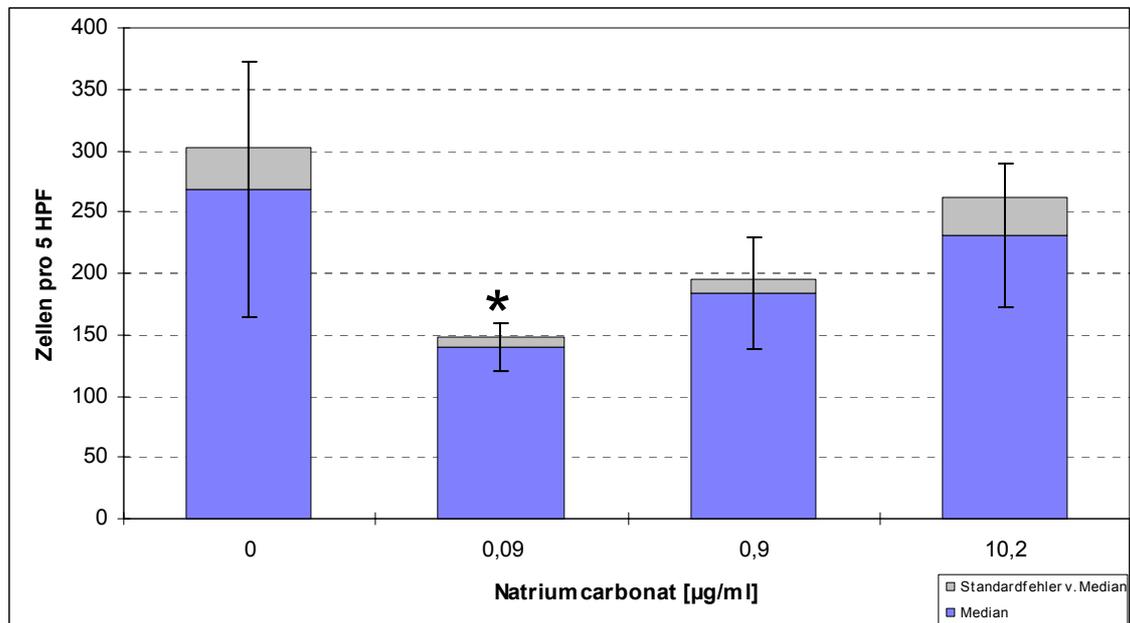
Abbildung :

Mediane, Standardfehler der Mediane und Standardabweichungen der Chemotaxis von Monozyten in vitro aus 10 Messungen in Zellen pro 5 High-Power Fields (HPF) unter Einfluß dreier verschiedener Intralipid –Konzentrationen.

Es konnte kein signifikanter Einfluß von Intralipid auf die Monozytenchemotaxis nachgewiesen werden.

## Natriumcarbonat

### Chemotaxis



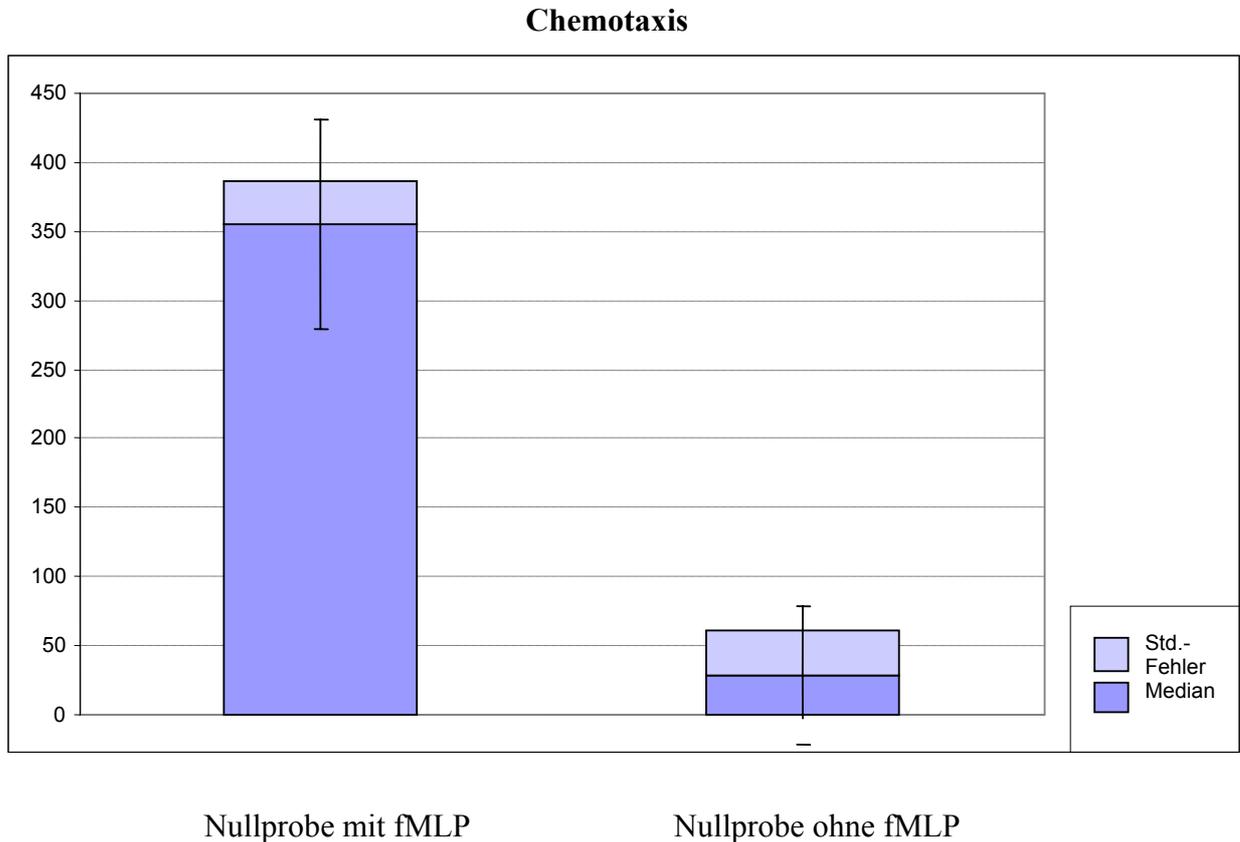
n=10

Abbildung :

Mediane, Standardfehler der Mediane und Standardabweichungen der Chemotaxis von Monozyten in vitro aus 10 Messungen in Zellen pro 5 High-Power Fields (HPF) unter Einfluß dreier verschiedener Natriumcarbonat –Konzentrationen.

Die niedrige Konzentration von Natriumcarbonat supprimierte die Chemotaxis von Monozyten signifikant. (Friedman-Test / Miller-Test,  $p \leq 0,05$ )

## Leerwert-Messung ohne Lockstoff



n=10

Abbildung :

Mediane, Standardfehler der Mediane und Standardabweichungen der Chemotaxis von Monozyten in vitro aus 10 Messungen in Zellen pro 5 High-Power Fields (HPF). Nullproben ohne Medikamente oder Hilfsstoffe in oberer Kammer, mit fMLP als Lockstoff in unterer Kammer und ohne fMLP in unterer Kammer.

## 5. Diskussion

### 5.1 Funktion der Monozyten bei der Abwehr eingedrungener Mikroorganismen

Das menschliche Immunsystem ist ein komplex reagierendes Organsystem, das in der Lage ist, körperfremde Substanzen zu erkennen, um sie dann zu eliminieren. Dazu verfügt es vereinfacht dargestellt über zwei Abwehrsysteme, die sich beide weiter in zelluläre und humorale Immunmechanismen unterteilen lassen. Das phylogenetisch ältere der beiden Systeme ist das schnell einsetzende unspezifische Abwehrsystem, d. h. die angeborene und genetisch determinierte Immunität, die im wesentlichen aus der entzündlichen Reaktion mit Ansammlungen phagozytierender Zellen besteht.

Das entwicklungsgeschichtlich jüngere Abwehrsystem besteht aus der verzögert einsetzenden, spezifischen und erworbenen Immunität, die den Erwerb eines immunologischen Gedächtnisses einschließt. Die zelluläre Komponente des spezifischen Abwehrsystems bilden verschiedene Lymphozyten, während die von Plasmazellen synthetisierten Antikörper die humorale Immunität vermitteln.

Zu den Mechanismen der unspezifischen Abwehr gehören ebenfalls humorale und zelluläre Faktoren. Die humoralen Faktoren bildet das Komplementsystem, ein aus über 20 kaskadenartig zusammenwirkenden Serumproteinen bestehendes System. Es löst außer direkter Membranschädigung über eine Steigerung der Gefäßpermeabilität, Mastzellendegranulation und Aktivierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten eine Entzündungsreaktion aus. Eine weitere Funktion des Komplementsystems besteht in der gesteigerten Phagozytose, da Antigene mit Hilfe von Komplementfaktoren leichter an phagozytierende Zellen gebunden werden können. Diese phagozytierenden Zellen, bestehend aus polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PNG) und mononukleären Phagozyten (MP), stellen die zelluläre Komponente des unspezifischen Abwehrsystems dar.

## 5.2 Monozytopoese

Monozyten, welche im roten Knochenmark produziert werden, üben einen wesentlichen Einfluß auf die humorale und die zellvermittelte Immunantwort aus. Die Reifung beginnt aus einer pluripotenten Stammzelle und bildet den funktionsfähigen Monozyten innerhalb von etwa 60 Stunden.

Die am frühesten identifizierbaren Zellen sind Monoblasten und Promonozyten im Knochenmark. Nach zwei bis drei weiteren Zellteilungen differenzieren sich aus diesen Monozyten, die nun nicht mehr teilungsfähig sind. Diese verlassen das Knochenmark, treten in den Blutkreislauf ein und verbleiben in diesem Pool für 8 bis 10 Stunden. Dort ist die Zelle Untersuchungen mittels Blutentnahme am einfachsten zugänglich.

Im Vergleich zum Lymphozyten ist der menschliche Blutmonozyt eine große Zelle (10-18 µm im Durchmesser), die gewöhnlich einen hufeisenförmigen Nukleus hat und oft schwach azurophile Granula enthält. Im ultrastrukturellen Bereich weist der Monozyt prominente Mikrovilli und undulierende Membranen auf, einen gut entwickelten Golgi-Apparat und viele intrazytoplasmatische Lysosomen. Diese Lysosomen enthalten mehrere Hydrolasen und Peroxidasen zur intrazellulären Abtötung von Mikroorganismen.

Aus dem Blutgefäßsystem wandern die Monozyten in die verschiedenen Gewebe und Organe ein und mutieren zu Makrophagen. Diese Zellen sind weit im Körper verbreitet, so zum Beispiel die Alveolarmakrophagen der Lunge, die Kupffer'schen Zellen der Leber, die lining macrophages der Milz und der Knochenmarksinsuside und die frei migrierenden Makrophagen in der Pleura- und Peritonealhöhle (18).

In Makrophagen umgewandelt werden die Zellen größer und zeigen eine Vermehrung der cytoplasmatischen Lysosomen und Mitochondrien. Die Lebenszeit beträgt bis zu einigen Monaten.

### 5.3 Monozytenaktivität

Die Hauptaufgabe der Monozyten besteht, wie oben bereits erwähnt, in dem Schutz des Wirtes vor eindringenden Mikroorganismen. Die Chemotaxis und Phagozytose von körperfremden Stoffen zählen zu den wichtigsten Funktionen von Monozyten.

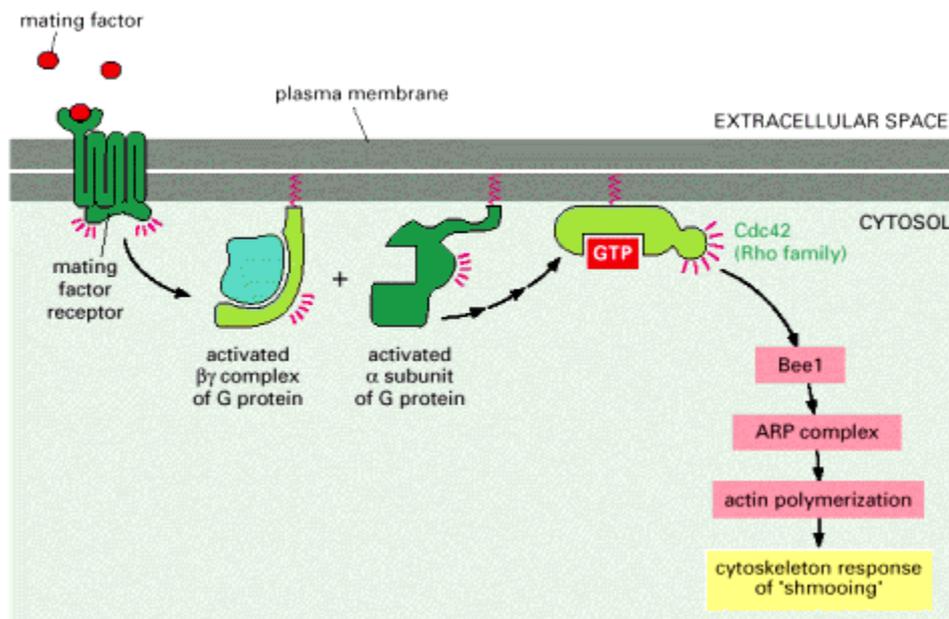
Vor allem im Bereich der postkapillären Venolen in infizierten Körperregionen beginnt der Abwehrvorgang mit der Adhärenz der Monozyten an den Gefäßendothelien. Durch erhöhte Gefäßpermeabilität kommt es zur Diapedese durch die Gefäßwand (92). Angezogen von chemotaxisinduzierenden Substanzen (zum Beispiel: Lymphokine, Immunkomplexe, kationische Proteine, Komplementfragment C5a, *N*-Formyl-Proteine, Endotoxin und andere bakterielle Faktoren) bewegen sich Monozyten amöboid auf ihr Ziel zu. Dabei ist die ungerichtete, ziellose Bewegung, genannt *Chemokinesis*, die von diversen chemischen und biologischen Substanzen verursacht wird, klar von der *Chemotaxis* zu unterscheiden. Erst die *Chemotaxis* befähigt die Abwehrzellen räumlich gerichtet zu agieren. Definitionsgemäß erklärt sich die *Chemotaxis* als eine Reaktion, durch welche eine gerichtete Bewegung von Zellen oder Organismen durch bestimmte Substanzen in ihrer Umgebung induziert wird (56). Nach Bindung an ein Partikel (zum Beispiel ein Bakterium) wird dieses von Monozyten eingeschlossen, wodurch ein intrazelluläres Phagosom entsteht. Nach Verschmelzungsprozessen mit den Lysosomen entsteht das Phagolysosom. Innerhalb dieser Vacuole wird das phagozytierte Partikel in den meisten Fällen zerstört und verdaut. Dies geschieht durch die in den Lysosomen enthaltenen Substanzen wie toxische Sauerstoffmetabolite, Myeloperoxidasen und andere kationische Proteine.

Die Antigenpräsentation ist eine weitere wichtige Funktion von Monozyten. Nach Phagozytieren eines Antigens wird dieses in den Endosomen aufbereitet. Die immunogenen Peptide werden an der Monozytenoberfläche in Kombination mit Klasse-II-Molekülen exprimiert. Das führt zur einer Aktivierung und Wachstumsstimulation von T-Zell-Lymphozyten, welche ihrerseits eine Reihe von Mediatoren sezernieren. Diese Substanzen wiederum lassen Monozyten Monokine freisetzen (Interleukin-1, Interleukin-6, Koloniestimulierender Faktor, Tumornekrosefaktor und andere), die eine Reihe von immunologischen Effekten in Gang setzen.

#### 5.4 Bedeutung der Chemotaxis für die Funktion der Monozyten

Die Fähigkeit zur Chemotaxis, also der zielgerichteten Fortbewegung der Monozyten, stellt ein wichtiges Bindeglied in der Immunabwehr des Organismus dar (48, 100).

Die Chemotaxis beginnt nach dem Eintritt des Monozyten in das Gewebe und ist die aktive gerichtete Fortbewegung in einem Konzentrationsgradienten und Ansammlung am Ort der höchsten Konzentration (56).



**Abbildung 10.:** Der Lockstoff bindet extrazellulär an einen in der Plasmamembran gelegenen mit G-Protein verbundenen Rezeptor. Die Aktivierung triggert die Dissoziation von der GTP-gebundenen  $\alpha$ -Untereinheit vom heterotrimerischem G-Protein. Dieser Schritt aktiviert das Rho-Familie GTP-Bindungsprotein, Cdc42, das Homologon zu der bei Säugetieren bekannten kleinen GTPase, dessen Aktivierung die Formation von Filopodien auslöst. Wie auch in Säugetierzellen aktiviert Cdc42 ein Protein (Bee1, das Homologon zu Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein WASp) welches seinerseits den ARP-Komplex aktiviert, was zu einer lokalen Aktinpolymerisation an der Seite der Lockstoffbindungsstelle führt. Die lokale Aktinpolymerisation und das Vergrößern von Filamenten lösen ein polarisiertes Wachstum mit dem Effekt der Ausbildung einer pseudopodenartigen Ausstülpung aus. (1,55)

Der erste molekulare Schritt, der zur Auslösung der Chemotaxis führt, ist die Interaktion des chemotaktisch aktiven Stoffes mit den zugehörigen Oberflächenrezeptoren des Monozyten. Die direkte Interaktion mit G-Protein (Guanosintriphosphat-bindendes-Protein) aktiviert den Phosphoinositolzyklus über die Phospholipase C; die anschließende Freisetzung von Calciumionen als auch Aktinpolymerisation in der Nähe des Rezeptors, an dem die Liganden binden, sind in die Chemotaxisreaktion involviert.

Diese Aktinpolymerisation ist von der monomeren  $\rho$ -Familie GTPase abhängig. Es werden von der reagierenden Zelle sodann Protrusionen in Richtung des Signals gestreckt. Die Präferenzrichtung dieser Protrusionsaktivität polarisiert damit die Zelle zu einer Seite und verursacht eine Reorientierung der Traktionsmechanismen des Zytoskelettes. Der Zellkörper folgt so der ausgestreckten „Nase“ nach in einer amöboiden Bewegung in Richtung des attraktiven Signals. Abgesehen von diesen Erkenntnissen ist der exakte Weg der Signaltransduktion, der zur Chemotaxis führt, noch unbekannt (1, 21, 55, 109, 121, 129). In der chemotaktisch angeregten Zelle kommt es zu einer erhöhten Esteraseaktivität, zur Aktivierung des Arachnoidonsäure-Metabolismus, Anregung des Hexose-Monophosphatshunts, zum Na-, K- und Ca-Ioneneinfluß sowie zur Veränderung des Membranpotentials. Danach setzt die Zellbewegung ein, realisiert über Pseudopodien durch kontraktile (Myosin) und regulierende Proteine.

Der in vivo wichtigste Weg der Aktivierung läuft über das Komplementsystem, wobei das C5a als chemotaktisches Fragment wirkt. Andere plasmagebundene Mediatoren mit chemotaktischer Aktivität sind die Hagemann Faktor abhängigen Chemotaxisfaktoren, Plasminogenaktivator sowie Nebenprodukte des Arachnoidonsäure-Metabolismus über den Lipoxygenase Weg (12-Hydroxy-d5,8,10,15-Eicosatetraensäure) und den Cyclooxygenase Weg (Prostaglandine und Thromboxane). Zellvermittelte Chemotaxisfaktoren sind Produkte von Leukozyten, Monozyten und polymorphkernigen Leukozyten (102). Bestimmte Gewebe-, Bakterien- und Virusprodukte enthalten C3- und C5-spaltende Enzyme, die indirekt eine komplementbegleitete Chemotaxisaktivierung bewirken können (102).

Als allgemein anerkannte Methode, die Chemotaxis von Leukozyten zu quantifizieren, hat sich das Prinzip der Chemotaxiskammer nach Boyden (8) bewährt. Dieses Verfahren ist über die Jahre weiterentwickelt worden, und es etablierte sich die Technik, die zu testenden Zellen durch einen Filter (Polycarbonat oder Nitrozellulose) auf einen chemotaktisch aktiven Stoff auf der Gegenseite des Filters über eine bestimmte Zeit wandern zu lassen (28, 119). In unserer Studie verwendeten wir eine 48-Zellen-Microchemotaxiskammer, in der 48 Testansätze gleichzeitig angesetzt werden konnten. Dies hatte den Vorteil, die individuellen Abweichungen durch gleichzeitige Durchführung mehrerer verschiedener Tests in einem Testansatz möglichst klein zu halten und damit einen direkten Vergleich verschiedener Hemmungsparameter (in unserem Falle intravenöse Anästhetika) überhaupt erst zu

ermöglichen. Die Methodik übernahmen wir mit geringfügigen Modifikationen aus der Arbeit von Martinet et al. (78)

Duncan (27) beschrieb in seiner Arbeit den Einfluß von Anästhetika auf verschiedene Funktionen des Immunsystems und zeigte eine immunsuppressive Wirkung dieser Substanzen. In der Arbeit von Stevenson et al. (116) konnte eine signifikante Hemmung der Sekretion von  $\alpha$ -Interferon menschlicher Monozyten unter Einfluß volatiler Anästhetika (Halothan) gezeigt werden.

Aufgrund der großen Bedeutung der Chemotaxis für die Funktionsfähigkeit von Monozyten ist die Annahme, daß Anästhetika, welche die Chemotaxis behindern, das perioperative Infektionsrisiko steigern, wohl berechtigt.

## 5.5 Diskussion der Ergebnisse

Der Einfluß von Anästhetika auf die chemotaktische Aktivität von Monozyten ist bisher nur wenig untersucht und zeigt zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. So wird die Wirkung der Barbiturate, welche zur Narkoseeinleitung verwandt werden, kontrovers diskutiert. Das hinsichtlich der Wirkung auf Leukozyten am gründlichsten untersuchte Präparat ist **THIOPENTAL**. Es wurde bereits 1934 klinisch eingeführt und gilt auch heute noch als das bedeutendste Barbiturat für anästhesiologische Zwecke.

Cullen et al. (20) stellten *in vitro* eine minimal verminderte Phagozytose von Latexpartikeln durch Monozyten, die Menschen während Vollnarkosen unter Thiopentalverabreichung entnommen wurden, fest. Salman et al. (104) dagegen beschrieben eine deutlich verminderte Phagozytosefähigkeit bei peritoneal migrierten Makrophagen von Ratten, die mit Thiopental narkotisiert waren. Bei einer *Ex-vivo*-Untersuchung der Wasserstoffperoxydbildung durch Alveolarmakrophagen zeigte sich bei Wilhelm et al. (126), daß Thiopental die Bildung von Wasserstoffperoxyd hemmte. Eine dosisabhängige Hemmung der LPS-induzierten Procoagulaseaktivität von menschlichen Blutmonozyten *in vitro* unter Thiopentaleinfluß wurde von Chu et al. beschrieben (16). Bezüglich der Zytokinfreisetzung von menschlichen Monozyten ergaben die Untersuchungen von Rossano et al. (103) und Brand et al. (11) eine vermehrte Freisetzung von Zytokinen (Ausschüttung von Interleukin-1, Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor) bei narkotisierten Menschen, bei denen Thiopental appliziert wurde. Heller et al. (43) zeigten in ihrer Studie über die Bakterienelimination nach Beimpfung von Blut mit *Escherichia Coli* *in vitro*, daß Thiopental einen hemmenden Effekt auf den Oxidativen Burst und die Phagozytoseaktivität von Monozyten hatte. Dies war jedoch nur in hohen Konzentrationen, wie sie klinisch nicht verwandt werden, nachweisbar.

Eine Untersuchung durch Hole et al. (47) demonstrierte eine dosisabhängige Suppression der monozytenvermittelten Zytolyse durch Thiopental.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß von Thiopental auf die Chemotaxis ermittelt. Wir konnten keinen signifikanten Effekt von Thiopental auf diese Funktion von menschlichen Monozyten zeigen. Da die mittlere untersuchte Thiopental-Konzentration von 15 µg/ml die Blutkonzentration unmittelbar nach intravenöser Applikation von 500 mg

Thiopental repräsentiert (26), kann man aus den Ergebnissen schließen, daß die Chemotaxis durch Thiopental in anästhesiologisch relevanten Konzentrationen nicht gehemmt wird.

Das zweite zur Narkoseeinleitung häufig verwendete Barbiturat ist **METHOHEXITAL**. Es ist um das fünffache stärker wirksam als Thiopental und besitzt eine größere Metabolisierungsrate, so daß die Wirkdauer kürzer ist (69).

Die Wirkung von Methohexital auf die Funktionsfähigkeit von menschlichen Monozyten ist bisher noch nicht umfassend erforscht. In der Untersuchung von Chu et al. (16) konnte bei der Messung der durch bakterielles Endotoxin (Lipopolysaccharide von *Escherichia coli* 0111:B4) induzierten Procoagulaseaktivität von menschlichen Blutmonozyten in vitro unter Methohexitaleinfluß eine dosisabhängige Hemmung gezeigt werden.

Wir konnten in unseren Untersuchungen keinen signifikanten Einfluß auf die Chemotaxis menschlicher Blutmonozyten nachweisen.

Von den hier untersuchten Barbituraten ist also weder Thiopental noch Methohexital in der Lage, in anästhesiologisch relevanter Konzentration die Chemotaxis menschlicher Blutmonozyten in vitro zu beeinflussen.

Beide Medikamente enthielten in ihrer kommerziellen Darreichungsform **Natriumcarbonat**. Die niedrige Konzentration dieses Reagenz inhibierte die Chemotaxis signifikant, während die mittlere und hohe Konzentration keine signifikante Hemmung zeigten. Als Ursache der verringerten Chemotaxis kommt eine kompetitive Hemmung bei der Signaltransduktion bei der Interaktion des Lockstoffes mit den Oberflächenrezeptoren der Monozyten oder ein hemmender Einfluß auf die Ausbildung spezifischer Membranpotentiale in Frage. Daß diese signifikante Änderung der Chemotaxis bei gleichzeitiger Anwesenheit der Wirkstoffe Thiopental und Methohexital nicht mehr in Erscheinung tritt, kann auf eine membranstabilisierende Wirkung dieser Barbiturate zurückzuführen sein. Eine weitere Klärung dieser Phänomene ist mit der hier gewählten Untersuchungsmethode nicht möglich, weitere Aufschlüsse könnten sich mit anderen Verfahren, wie zum Beispiel Patch-clamp-Techniken, ergeben. Die Verringerung des Effektes von Natriumcarbonat bei Erhöhung der Konzentration ist durch eine gesteigerte Chemokinesis erklärbar. In früheren Publikationen (64) wurde bereits gezeigt, daß Natriumcarbonat einen Einfluß auf die Immunantwort hat. Die Weise, in welcher dies

geschieht, ist weiterhin ungeklärt. Die Möglichkeit, daß das Anheben des pH-Wertes die Ursache ist, konnte ausgeschlossen werden.

Wegen seines schnellen Wirkungseintritts und der kurzen Wirkungsdauer wird das zu den Imidazolderivaten gehörende **ETOMIDAT** ebenfalls zur Narkoseeinleitung benutzt.

Bei Untersuchungen, die den Einfluß verschiedener intravenöser Anästhetika auf die spontane und endotoxinstimulierte Zytokin-Reaktion in Voll-Blut analysierten, konnten Larsen et al. (68) zeigen, daß bei Monozyten Etomidat in anästhesiologisch gebräuchlichen Konzentrationen die Freisetzung von IL1-Rezeptorantagonisten reduzierte. Unsere Untersuchungsergebnisse über die Beeinflussung der Chemotaxis durch Etomidat in drei verschiedenen Konzentrationen konnten keine signifikante Veränderung gegenüber den Vergleichsuntersuchungen zeigen.

Der Vertreter der Phencyclidinderivate, **KETAMIN**, hat im Gegensatz zu den bisher diskutierten Anästhetika auch analgetische Wirkung und kann sowohl zur Narkoseeinleitung als auch zur Unterhaltung einer Narkose eingesetzt werden.

Es wurde auch bei Ketamin eine Induktion der Ausschüttung von Interleukin-1, Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor bei Monozyten beobachtet (34, 92).

Li et al. (72) untersuchten die Funktion der Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) in mit Lipopolysacchariden behandelten Alveolarmakrophagen unter dem Einfluß von Ketamin. Es zeigte sich eine dosisabhängige, signifikante Hemmung bei Konzentrationen von 1 bis 100  $\mu\text{M}$  und eine vollständige Hemmung ab 100  $\mu\text{M}$ . Letztere entsprechen jedoch bereits klinisch nicht mehr gebräuchlichen, hohen Konzentrationen.

Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit dieser Untersuchung und zeigen, daß bei einer klinisch relevanten Konzentration von Ketamin ( $2,36 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) eine Suppression der Monozytenchemotaxis beobachtet werden kann.

Ketanest<sup>®</sup>, die in unserer Studie verwandte Darreichungsform von Ketamin, enthält das Konservierungsmittel **Benzethoniumchlorid** in der Konzentration von  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ . Wir konnten bei der separaten Untersuchung dieser Substanz eine signifikante Hemmung der Chemotaxis von Monozyten nachweisen. Dies geschah genau in der Konzentration des

Additivs, wie sie direkt nach klinisch gebräuchlicher Applikation der Handelssubstanz Ketanest® im Serum auftritt (0,0236µg/ml). Dies kann eine wesentliche Rolle bei unseren Versuchen gespielt haben.

Die seit 1960 klinisch eingesetzten Benzodiazepine werden wegen ihrer großen therapeutischen Breite und der nur geringen Beeinflussung des autonomen Nervensystems in vielen Gebieten der Medizin verwandt, so daß sie heute zu den am häufigsten verschriebenen Pharmaka gehören (59). Auch in der Anästhesie haben sich diese Tranquillantien durch ihre muskelrelaxierende, sedativ-hypnotische, antikonvulsive und anxiolytische Wirkung bewährt. Ferner dienen sie auch zur Potenzierung von Anästhetika, z.B. Opioiden, und als Prämedikationssubstanzen (69).

Benzodiazepine werden auch zur Sedation von Intensivpflegepatienten eingesetzt.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß von **FLUNITRAZEPAM** und **MIDAZOLAM** auf die Chemotaxis von menschlichen Blutmonozyten untersucht.

Lenfant et al. (71) konnten in ihren Studien den direkten Nachweis eines Benzodiazepinrezeptors auf isolierten Makrophagen erbringen. Dies legt nahe, daß Moleküle, die eine Affinität für diesen Typ von Benzodiazepinbindungsstellen zeigen, das Immunsystem in seiner Funktion modulieren können. Eine Studie, die von Zavala et al. (131) durchgeführt wurde, zeigte bei mit Flunitrazepam vorbehandelte Maus-Makrophagen eine verminderte humorale Immunantwort, wenn rote Blutzellen von Schafen hinzugefügt wurden. Auch gelang in dieser Studie der Nachweis einer Benzodiazepinbindung vom peripheren Typ auf dem Makrophagen. Kerkoff et al. (57) konnten bei Untersuchungen der Regulation des Acyl-CoA-Bindungsproteins (ACBP) und der Cholesterol-Acyltransferase (ACAT) eine kompetetive Hemmung durch Flunitrazepam nachweisen.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß von Flunitrazepam auf die Chemotaxis von Monozyten untersucht. Eine Modulation gegenüber den nicht exponierten Monozyten konnte nicht nachgewiesen werden. Der in den oben genannten Studien beschriebene Benzodiazepinrezeptor scheint also keinen relevanten Einfluß auf die Chemotaxis-Funktion zu haben.

Das Handelspräparat, das wir testeten, enthielt **Benzylalkohol** und **Ethylalkohol** als Hilfsstoffe. Während sich bei Ethylalkohol keine Veränderung der Chemotaxis zeigte,

konnte bei Benzylalkohol eine signifikante Suppression bei niedrigen Konzentrationen beobachtet werden. Dies ist vereinbar mit den Ergebnissen von Krumholz et al. (64), die einen hemmenden Einfluß von Benzylalkohol auf die Funktion von Granulozyten zeigten. Als Ursache der verringerten Chemotaxis kommt auch hier, wie bei Natriumcarbonat bereits beschrieben, ein hemmender Einfluß auf die Ausbildung spezifischer Membranpotentiale beziehungsweise Ionenflüsse in Frage. Haeseler et al. (38) zeigten in Ihren Studien einen hemmenden Einfluß auf die Funktion von Natriumkanälen durch Benzylalkohol in geringen Konzentrationen. Dass dieser Effekt bei gleichzeitiger Anwesenheit von Flunitrazepam nicht mehr auftritt kann auf eine membranstabilisierende Wirkung zurückzuführen sein.

Als Resultat des Ziels, ein wasserlösliches, stabiles, pharmakologisch aktives Benzodiazepinderivat zu entwickeln, entstand **MIDAZOLAM**. Es unterscheidet sich von Flunitrazepam durch seine Wasserlöslichkeit und seine kürzere Wirkdauer (69).

Bezüglich der Effekte auf die Freisetzung von Interleukin-1, Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor in Anwesenheit von Midazolam gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben. Während Rossano et al. (103) eine Stimulation in der Sekretion dieser Zytokine beschrieben, haben Taupin et al. (118) eine Inhibition beobachtet. Dieser Widerspruch mag in der unterschiedlichen Methodik begründet sein. Bei Untersuchungen, die den Einfluß verschiedener intravenöser Anästhetika auf die spontane und endotoxinstimulierte Zytokin-Reaktion in Voll-Blut analysierten, konnten Larsen et al. (68) zeigen, daß Midazolam in anästhesiologisch gebräuchlichen Konzentrationen keinen signifikanten Effekt auf diese Funktion von Monozyten hatte. Heller et al. (43) zeigten in ihrer Studie über die Bakterienelimination nach Beimpfung von Blut mit Escherichia Coli in vitro, daß Midazolam einen hemmenden Effekt auf den Oxidativen Burst und die Phagozytoseaktivität von Monozyten hatte. Dies war jedoch nur in hohen Konzentrationen, wie sie klinisch nicht verwandt werden, nachweisbar.

In unserer Untersuchung konnte bei einer praktisch relevanten Dosis von Midazolam ( $0,975 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) eine signifikante Hemmung der Chemotaxis von Monozyten beobachtet werden.

Es fällt auf, daß die beiden untersuchten Benzodiazepine unterschiedliche Ergebnisse liefern. Somit liegt nahe, daß die Hemmung der Chemotaxis menschlicher Blutmonozyten nicht an den chemisch-pharmakologischen Grundcharakter der Benzodiazepine an sich

gekoppelt ist, sondern eine individuelle Eigenschaft der einzelnen Pharmaka ist. Welchen Einfluß die vorhandenen Benzodiazepinrezeptoren der Monozyten haben, ist noch zu klären.

Die Informationen über den Einfluß des Butyrophenonderivates **DROPERIDOL** auf Monozyten ist äußerst spärlich. Das ursprünglich als Neuroleptikum eingesetzte Droperidol hat jedoch im Vergleich zu anderen Neuroleptika eine relativ kurze Wirkdauer von 2-3 Stunden und kann so mit dem kurz wirkenden Opioid Fentanyl zur Neuroleptanalgesie eingesetzt werden. Zusätzlich potenziert es die Wirkung von Analgetika (69).

Cullen et al. (20) untersuchten die Phagozytose von Latexpartikeln während Vollnarkosen beim Menschen. Hierbei zeigte sich eine nur minimale Hemmung der Phagozytose der Partikel von Monozyten unter dem Einfluß von Droperidol.

Unsere Versuche ergaben einen signifikant hemmenden Einfluß von Droperidol auf die Chemotaxis von Monozyten in klinisch relevanten Konzentrationen. Dies war sowohl in der mittleren Konzentration, die der Serumkonzentration nach intravenöser Applikation einer zu anästhetischen Zwecken verabreichten Dosis entsprach, als auch in der zehnfach geringeren Konzentration der Fall. Die zehnfach höhere Konzentration zeigte keine signifikante Hemmung der Chemotaxis. Da das in dieser Studie verwendete Handelspräparat keine weiteren Zusatzstoffe enthält, ist somit von einer Hemmung durch den Wirkstoff selbst auszugehen. Der Effekt ist in allen getesteten Konzentrationen nachweisbar, in der höchsten gerade nicht signifikant. Es ist aufgrund der substanzspezifischen Eigenschaften von Dehydrobenzperidol, im Sinne einer Blockade von m-Cholinrezeptoren (69), auch hier von einer kompetitiven Hemmung der Signaltransduktion oder der Bewegungsmechanismen auszugehen. Weitere Untersuchungen könnten über den genauen Hemmungsmechanismus und –ort Aufschluß geben. Eine gesteigerte Chemokinesis lässt sich aus den hier erhobenen Daten nicht direkt ableiten.

Opioide haben in der Anästhesiologie große Bedeutung. Ihre wichtigsten Anwendungsgebiete liegen im Bereich der Prämedikation, der Supplementierung anderer Anästhetika und der postoperativen Schmerzbekämpfung (69). Das am häufigsten eingesetzte Opioid ist derzeit das synthetisch hergestellte **FENTANYL**.

Makrophagen, die hohen Fentanylkonzentrationen ausgesetzt waren, zeigten eine verminderte Chemokinesis sowie eine bis 4-fach verlangsamte Chemotaxis. Im Bereich klinisch relevanter Konzentrationen war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar (115). Die Zellen wurden hier von Patienten, die sich kurz zuvor einer Coronaren-Bypass-Operation unterzogen hatten, gewonnen. Daher sind die Ergebnisse nicht direkt auf gesunde Menschen übertragbar.

Larsen et al. (68) zeigten in Studien, die den Einfluß verschiedener intravenöser Anästhetika auf die spontane und endotoxinstimulierte Zytokin-Reaktion in Voll-Blut untersuchten, daß Fentanyl in anästhesiologisch gebräuchlichen Konzentrationen keinen signifikanten Effekt auf diese Funktion von Monozyten hatte. Durch Fentanyl wird jedoch die Anzahl der im peripheren Blut nachweisbaren Monozyten reduziert. Gemessen wurde dies aber während Narkosen in Kombination mit Thiopental, Isofluran und Lachgas. Die Studie besitzt daher nur eine begrenzte Aussagefähigkeit (11). Ein Einfluß auf die Phagozytosefähigkeit von Monozyten durch Fentanyl ist nicht nachweisbar (20).

In unserer Studie zeigte sich, daß Fentanyl keinen statistisch relevanten Effekt auf die Chemotaxis von Monozyten hatte. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen von Hole et al. (47), die keinen Einfluß auf die monozyteninduzierte Zytolyse durch Fentanyl beobachteten.

**PROPOFOL** ist ein barbituratfreies intravenöses Hypnotikum mit schnellem Wirkungseintritt und kurzer Wirkdauer. Es wird daher im klinischen Gebrauch zur Narkoseeinleitung und Narkoseunterhaltung genutzt (69).

In einer Studie von Kotani et al. (61) zeigte sich keine vermehrte Expression von Genen proinflammatorischer Zytokine (Interleukin-1 beta, Interleukin-6 und Interleukin-8) durch Alveolarmakrophagen unter Einfluß von Propofol. Jedoch bezüglich der Zytokinfreisetzung von menschlichen Monozyten ergaben die Untersuchungen von Rossano et al. (103) und Brand et al. (11) eine vermehrte Freisetzung von Zytokinen (Interferon  $\gamma$ , Interleukin 1  $\alpha$ , Interleukin 4 und Tumornekrosefaktor) bei klinisch relevanten Konzentrationen von Propofol.

Bei Untersuchungen, die den Einfluß verschiedener intravenöser Anästhetika auf die spontane und endotoxinstimulierte Zytokin-Reaktion in Voll-Blut analysierten, konnten Larsen et al. (68) zeigen, daß bei Monozyten Propofol in anästhesiologisch gebräuchlichen

Konzentrationen die Freisetzung von IL1-Rezeptorantagonisten reduzierte und simultan die Interleukin-10 Konzentration steigen ließ. Heller et al. (43) zeigten in ihrer Studie über die Bakterienelimination nach Beimpfung von Blut mit Escherichia Coli in vitro, daß Propofol einen hemmenden Effekt auf den Oxidativen Burst und die Phagozytoseaktivität von Monozyten hatte. Dies war jedoch nur in hohen Konzentrationen, wie sie klinisch nicht verwandt werden, nachweisbar.

In unserer Studie konnte bei Propofol in allen getesteten Konzentrationen keine Modulation der Chemotaxis nachgewiesen werden. Auch die separate Untersuchung des Hilfsstoffes **Intralipid**, welcher zu 10% in der Suspension des untersuchten Handelspräparates vorhanden ist, zeigte keine signifikante Beeinflussung der Chemotaxis von Monozyten. Hingegen ist bekannt, daß Propofol einen stimulierenden Effekt auf die Ausschüttung von Zytokinen besitzt (35).

Die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse verschiedener Autoren zu den einzelnen Anästhetika lassen sich durch methodische Unterschiede erklären. So haben einige Autoren Inkubationszeiten des Anästhetikums mit den Zellen verwendet, die die klinisch bedeutsamen Zeiten um ein Vielfaches überschreiten. Andere Autoren arbeiteten nur mit anästhesiologisch irrelevant hohen Konzentrationen.

Bedeutsam ist die signifikante Suppression der Chemotaxis von Monozyten unter Einfluß von Ketamin, Midazolam und Droperidol in klinisch relevanten Serumkonzentrationen. Daß bei hohen Konzentrationen die gemessene Chemotaxisrate sich wieder scheinbar normalisierte, kann möglicherweise mit der vermehrten Zytokinfreisetzung durch die Monozyten selbst erklärt werden. Eine dadurch resultierende Erhöhung der Chemokinesis könnte die veränderte Chemotaxis überdecken. Dieses läßt sich jedoch mit den bisherigen Methoden zur Quantifizierung der Chemotaxis mit Membranfiltern nicht unterbinden. Ein Modellversuch, bei dem dies trennbar wäre, und eine Untersuchung bezüglich der Chemokinesisrate könnten hier Klärung schaffen. Somit ist davon auszugehen, daß Ketamin, Midazolam und Droperidol möglicherweise in der Lage sind, das im Rahmen von Operationen auftretende Infektionsrisiko zu erhöhen. Falls entsprechende klinische Untersuchungen diese Ergebnisse bestätigen sollten, wäre es ratsam, den Einsatz dieser

Medikamente in erste Linie bei Patienten mit manifesten bakteriellen Infektionen neu zu überdenken.

Ferner stellt die Chemotaxis von Monozyten nur einen Teilaspekt der Immunantwort auf eingedrungene Krankheitserreger dar, so daß nicht ohne weiteres auf eine Beeinträchtigung der gesamten Immunitätslage geschlossen werden kann.

## 6. Zusammenfassung

Seit über einhundert Jahren ist bekannt, daß verschiedene Anästhetika in der Lage sind, die körpereigenen Abwehrkräfte herabzusetzen. Eine der ersten Verteidigungsreihen bei der Abwehr eingedrungener Mikroorganismen stellen die Monozyten dar. Sie bilden zusammen mit den von ihnen abstammenden Makrophagen das Mononucleäre-Phagozytische-System. Eine Schlüsselfunktion der Monozyten ist dabei die Chemotaxis, welche die Zellen befähigt, sich selbstständig und zielgerichtet zu infizierten Gewebsanteilen fortzubewegen. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß folgender intravenöser Anästhetika auf die Chemotaxis menschlicher Blutmonozyten *in vitro* untersucht:

Barbiturate:	-Thiopental -Methohexital
Imidazolderivate:	-Etomidat
Phenzyklidinderivate:	-Ketamin
Benzodiazepine:	-Flunitrazepam -Midazolam
Butyrophenone:	-Droperidol
Opioide:	-Fentanyl
Alkylphenolderivate:	-Propofol

Die Bestimmung der Chemotaxis von Monozyten wurde nach der von Martinet et al. (78) beschriebenen Methode mit geringfügiger Modifikation durchgeführt. Aus dem Blut gesunder Probanden wurden Monozyten isoliert. In einer Micro-Chemotaxiskammer mit 48 Meßplätzen wurde die Chemotaxis dieser Zellen durch ein Polycarbonatfilter mit 5 µm Porengröße ermittelt. Als chemotaktisch aktiver Lockstoff diente N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin. Von jedem Anästhetikum wurden drei verschiedene Konzentrationen in jeweils 10 Versuchen untersucht. Die mittlere Konzentration entsprach jeweils der, welche unmittelbar nach i.v.-Applikation der anästhesiologisch üblichen Dosis im Blutserum auftritt. Die hohe und niedrige Konzentration waren jeweils um den Faktor 10 größer bzw. kleiner. Die Inkubationszeit der Monozyten mit dem Anästhetikum betrug 90 min.

In dieser Studie hatten die Barbiturate Thiopental und Methohexital keinen relevanten Effekt auf die Chemotaxis von Monozyten. Beide Medikamente enthielten in ihrer kommerziellen Darreichungsform Natriumcarbonat. Niedrige Konzentrationen ( $0,09 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) dieses Reagens inhibierten die Chemotaxis signifikant. Bei Etomidat, Propofol sowie dem Hilfsstoff Intralipid konnte keine signifikante Beeinflussung der Chemotaxis von Monozyten gezeigt werden.

Ketamin suppressierte bei klinisch relevanten Konzentrationen die Monozytenchemotaxis. Die Versuche zeigten ferner, daß der Konservierungstoff Benzethoniumchlorid selbst einen inhibierenden Effekt auf die Chemotaxis hatte. Dies kann eine wesentliche Rolle bei unseren Versuchen gespielt haben. In unserer Untersuchung konnte bei einer anästhesiologisch relevanten Dosis von Midazolam ( $0,975 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) eine signifikante Hemmung der Chemotaxis beobachtet werden.

Es wurde gezeigt, daß Flunitrazepam keinen Einfluß auf die Chemotaxis von Monozyten hatte. Das Handelspräparat, welches wir testeten, enthielt Benzylalkohol und Ethylalkohol als Hilfsstoffe. Während sich bei Ethylalkohol keine Veränderung der Chemotaxis zeigte, konnte bei Benzylalkohol eine signifikante Suppression bei niedriger Konzentration beobachtet werden. Es zeigte sich, daß Fentanyl keinen statistisch relevanten Effekt auf die Chemotaxis von Monozyten hatte. Eine signifikante Suppression der Chemotaxis durch Droperidol zeigte sich in klinisch relevanten Konzentrationen.

Somit sind Ketamin, Midazolam und Droperidol möglicherweise in der Lage, perioperative Infektionen zu begünstigen. Ein endgültiger Beweis ist jedoch nur durch eine klinische Studie möglich.

## Summary

For more than one hundred years, it has been known that divers anaesthetics are able to reduce human immune competence. One of the first lines of defence in combat of microorganisms are represented by monocytes. Together with the macrophages derived from them, they constitute "the mononuclear-phagocytic-system". A key function of monocytes is chemotaxis which enables cells to move autonomously to infected tissues. In the present study the influence of the following intravenous anaesthetics was tested on chemotaxis of human blood monocytes in vitro:

Barbiturates:	- thiopentone - methohexitone
Imidazolderivates:	- etomidate
Phencyclidinderivates:	- ketamine
Benzodiazepines:	- flunitrazepam - midazolam
Butyrophenones:	- droperidol
Opiates	- fentanyl
Alkylphenolderivates:	- propofol

The evaluation of chemotaxis of monocytes was performed using a method described by Martinet et al (78) with slight modification. From the blood samples of healthy male volunteers, monocytes were isolated. In a microchemotaxis chamber with 48 measuring-wells, chemotaxis was examined using a filter of polycarbonate with 5µm pore size. Chemotactically attractant agent was N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin. For each anaesthetic, three different concentrations were tested in 10 trials for each. The medium concentration was equivalent to that achieved by i.v. application in the anaesthesiologically used dose in serum. The greater or lower concentration was 10 times greater or smaller. The incubation time of the anaesthetic was 90 min.

In this study, thiopentone and methohexitone had no relevant effect on chemotaxis of monocytes. Both drugs contained sodiumcarbonate in their commercially available application form. Lower concentration of this substance ( $0.09 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) inhibited chemotaxis significantly.

For etomidate, propofol, as well as for the aiding substance intralipid, no significant effect on chemotaxis of monocytes could be shown. Ketamin suppressed chemotaxis of monocytes in clinically relevant concentrations. Our trials showed in addition to that benzethoniumchlorid itself, which is used for conservation, has an inhibiting effect on chemotaxis. This may have played a relevant role in our tests. Furthermore, an inhibition on chemotaxis could be shown for the anaesthesiologically relevant dose of midazolam ( $0,975 \mu\text{g ml}^{-1}$ ).

Flunitrazepam, on the contrary, does not exert an effect on chemotaxis of monocytes.

The drug we tested contained benzylalcohol and ethylalcohol as aiding agents. Whereas no difference was observed for ethylalcohol, for benzylalcohol a significant suppression could be seen in low concentrations. Fentanyl does not change chemotaxis significantly. Droperidol suppressed chemotaxis significantly in clinically relevant concentrations.

This gives reason for the hypothesis that ketamine, midazolam and droperidol impair the immunological system in vivo and facilitate postoperative infections. To prove this, clinical trials are necessary.

## 7. Literaturangaben

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *The molecular biology of the cell 4<sup>th</sup> edition*, New York: Garland Publishing. 2002
2. Amrein R, Cano JP, Eckert M, Coassolo P. Pharmakokinetik von Midazolam nach intravenöser Verabreichung. *Arzneimittelforschung* 1981; **31**: 2202-2205.
3. Bauer M, Rensing H, Ziegenfuss T. Anesthesia and perioperative immune function. *Anaesthesist*. 1998; **47**: 538-556.
4. Becker P, Ungemach J, Knab G. Differences in IgM increase following operations in general anesthesia and paraspinal regional anesthesia. *Anasth Intensivther Notfallmed*. 1984; **19**: 245-249.
5. Beilin B, Shavit Y, Hart J, Mordashov B, Cohn S, Notti I, Bessler H. Effects of anesthesia based on large versus small doses of fentanyl on natural killer cell cytotoxicity in the perioperative period. *Anesth Analg*. 1996; **82**: 492-497
6. Bentley JB, Borel JD, Nenad RE, Gillespie TJ. Age and fentanyl pharmacokinetics. *Anesth Analg* 1982; **61**: 968-971.
7. Bette M, Schlimme S, Mutters R, Menendez S, Hoffmann S, Schulz S. Influence of different anaesthetics on pro-inflammatory cytokine expression in rat spleen. *Lab Anim*. 2004; **38**: 272-279.
8. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 1962; **115**: 453-466.
9. Bøyum A. Separation of white blood cells. *Nature* 1964; **204**: 793-794.

10. Brand JM, Frohn C, Luhm J, Kirchner H, Schmucker P. Early alterations in the number of circulating lymphocyte subpopulations and enhanced proinflammatory immune response during opioid-based general anesthesia. *Shock*. 2003; **20**:213-217.
11. Brand JM, Kirchner H, Poppe C, Schmucker P. Zytokinfreisetzung und Verteilung mononuklearer Zellen im peripheren Blut unter dem Einfluß der Allgemeinnarkose. *Anaesthesist* 1998; **47**: 379-386.
12. Brand JM, Kirchner H, Poppe C, Schmucker P. The effects of general anesthesia on human peripheral immune cell distribution and cytokine production. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997; **83**: 190-194.
13. Cano PJ, Soliva M, Hartmann D, Ziegler WH, Amrein R. Bioavailability from various galenic formulations of flunitrazepam. *Arzneimittelforschung* 1977; **27**: 2383-2388.
14. Carr DJ, DeCosta BR, Kim CH, Jacobson AE, Guarcello V, Rice KC, Blalock JE. Opioid receptors on cells of the immune system: evidence for delta- and kappa-classes. *J Endocrinol*. 1989; **122**: 161-168.
15. Chanimov M, Berman S, Weissgarten J, Averbukh Z, Cohen M, Grinshpun Y, Bahar M. Substances used for local and general anaesthesia in major surgery suppress proliferative responsiveness of normal rat peripheral blood mononuclear cells in culture. *Eur J Anaesthesiol*. 2000; **17**: 248-255.
16. Chu AJ. Inhibition of endotoxin-induced monocytic procoagulant activity by n-alcohols and anesthetics. *Comp Biochem Physiol* 1991; **99**: 451-456.
17. Cockshott ID. Propofol (Diprivan) pharmacokinetics and metabolism- an overview. *Postgrad Med J* 1985; **61** (Suppl. 3): 45-50.

18. Cline MJ, Lehrer R, Territo M, Golde D. Monocytes and macrophages: Functions and diseases. *Ann Intern Med* 1978; **88**: 78-88.
19. Crozier TA, Beck D, Schuff-Werner P, Kettler D. Changes in expression of lymphocyte surface markers following administration of etomidate, midazolam or methohexital. *Anaesthesist*. 1987; **36**: 692-695
20. Cullen B, Hume R, Chretien P. Phagocytosis during general anesthesia in man. *Anesth Analg* 1995; **54**: 501-504.
21. Damme van J, Conings R. Assay for chemotaxis. In: Balkwill FR(Ed.) Cytokines, a practical approach. Oxford University Press, Oxford, 1991; 137.
22. Daniel E, Koshland J. Chemotaxis as a model second-messenger system. *Am Chem Soc* 1988; **27**: 5827-5833.
23. Delogu G, Antonucci A, Moretti S, Marandola M, Tellan G, Signore M, Famularo G. Oxidative stress and mitochondrial glutathione in human lymphocytes exposed to clinically relevant anesthetic drug concentrations. *J Clin Anesth*. 2004; **16**: 189-194.
24. Delogu G, Moretti S, Antonucci A, Marandola M, Tellan G, Sale P, Carnevali R, Famularo G. Apoptogenic effect of fentanyl on freshly isolated peripheral blood lymphocytes. *J Trauma*. 2004; **57**: 75-81.
25. Devlin EG, Clarke RS, Mirakhur RK, McNeill TA. Effect of four i.v. induction agents on T-lymphocyte proliferations to PHA in vitro. *Br J Anaesth*. 1994;**73**: 315-317.
26. Doenicke A. General pharmacology of barbiturates. *Acta Anaesthesiol Scand* 1965; **17** (Suppl.): 11-16.

27. Duncan P, Cullen B. Anesthesia and immunology. *Anesthesiology* 1976; **45**: 522-538.
28. Falk W, Goodwin R, Leonard E. A 48- well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leucocyte migration. *J Immunol Methods* 1980; **33**: 239-247.
29. Falk W, Harvath L, Leonard EJ. Only the chemotactic subpopulation of human blood monocytes expresses receptors for the chemotactic peptide N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine. *Infect Immun.* 1982; **36**: 450-454.
30. Fischler M, Bonnet F, Trang H, Jacob L, Levron J, Flaisler B, Vourch G. The pharmacokinetics of droperidol in anaesthetized patients. *Anaesthesiology* 1986; **64**: 486-489.
31. Gadulov VP, Filatov PP, Medvedev VN, Malik SS. Droperidol, seduxen, fentanyl: a study of immune reactions in vitro. *Anesteziol Reanimatol.* 1989; **4**: 18-21.
32. Galley HF, Dubbels AM, Webster NR. The effect of midazolam and propofol on interleukin-8 from human polymorphonuclear leukocytes. *Anesth Analg.* 1998; **86**: 1289-1293.
33. Garib V, Niggemann B, Zanker KS, Brandt L, Kubens BS. Influence of non-volatile anesthetics on the migration behavior of the human breast cancer cell line MDA-MB-468. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2002; **46**: 836-844.
34. Gitter A, Heilmeyer L, Brüscke G. Taschenbuch klinischer Funktionsprüfungen. Stuttgart: Gustav Fischer, 1978; 285-286.
35. Goldstein IM, Snyderman R (Eds.), Inflammation: Basic principles and clinical correlates, Raven Press, New York 1992, 281.

36. Goto Y, O'Malley C, Fanning NF, Wang J, Redmond HP, Shorten GD. Benzodiazepines inhibit the rate of neutrophil apoptosis. *Ir J Med Sci.* 2003; **172**: 191-194.
37. Grotendorst GR. Spectrophotometric assay for the quantitation of cell migration in the Boyden chamber chemotaxis assay. *Methods Enzymol* 1987; **147**: 144-152.
38. Haeseler G, Mamarvar M, Bufler J, Dengler R, Hecker H, Aronson JK, Piepenbrock S, Leuwer M. Voltage-dependent blockade of normal and mutant muscle sodium channels by benzylalcohol. *Br J Pharmacol.* 2000; **130**: 1321-30.
39. Hamme van MJ, Ghoneim MM, Ambre JJ. Pharmacokinetics of etomidate, a new intravenous anaesthetic. *Anesthesiology* 1978; **49**: 274-277.
40. Hansbrough JF, Zapata-Sirvent RL, Bartle EJ, Anderson JK, Elliott L, Mansour MA, Carter WH. Alterations in splenic lymphocyte subpopulations and increased mortality from sepsis following anesthesia in mice. *Anesthesiology.* 1985; **63**: 267-273.
41. Hashimoto H, Araki I, Sato T, Takagi Y, Hashimoto Y, Ishihara H, Matsuki A. Clinical study on total intravenous anesthesia with droperidol, fentanyl and ketamine--12. Effects on plasma complement and immunoglobulin concentrations. *Masui.* 1991; **40**: 1838-1842.
42. Hashimoto H, Araki I, Sato T, Matsuki A. Clinical study on total intravenous anesthesia with droperidol, fentanyl and ketamine--7. Effects on natural killer cell activity. *Masui.* 1991; **40**: 912-917.
43. Heller A, Heller S, Blecken S, Urbaschek R, Koch T. Effects of intravenous anesthetics on bacterial elimination in human blood in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* 1998; **42**: 518-26.

44. Helmy SA, Al-Attiyah RJ. The immunomodulatory effects of prolonged intravenous infusion of propofol versus midazolam in critically ill surgical patients. *Anaesthesia*. 2001; **56**: 4-8.
45. Henderson GL, Frincke J, Leung CY, Torten M, Benjamini E. Antibodies to fentanyl. *J Pharmacol Exp Ther*. 1975; **192**: 489-496.
46. Hofbauer R, Kaye AD, Kapiotis S, Frass M. The immune system and the effects of non-volatile anesthetics on neutrophil transmigration through endothelial cell monolayers. *Curr Pharm Des*. 1999; **5**:1015-1027.
47. Hole A. Depression of monocytes and lymphocytes by stress-related humoral factors and anaesthetic-related drugs. *Acta Anaesthesiol Scand* 1984; **28**: 280-286.
48. House RV, Thomas PT, Bhargava HN. In vitro evaluation of fentanyl and meperidine for immunomodulatory activity. *Immunol Lett* 1995; **46**: 117-1124.
49. Hoyt DB, Ozkan AN, Ninnemann JL, Immunologic Monitoring of Infection Risk in Traumapatient: Research Questions and an Approach to the Problem. *J Burn Care Rehabil*. 1987; **8**: 549-553.
50. Humar M, Andriopoulos N, Pischke SE, Loop T, Schmidt R, Hoetzel A, Roesslein M, Pahl HL, Geiger KK, Pannen BH. Inhibition of AP-1 by barbiturates is mediated by differential effects on MAP-kinases and the small G proteins Ras and Rac-1. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; **311**: 1232-1240.
51. Ichiyama T, Nishikawa M, Lipton JM, Matsubara T, Takashi H, Furukawa S. Thiopental inhibits NF-kappaB activation in human glioma cells and experimental brain inflammation. *Brain Res*. 2001; **911**(1): 56-61.

52. Irwin RS, Rippe JM. *Intensive Care Medicine fifth edition*, Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins, 2003
53. Jacobs R, Karst M, Scheinichen D, Bevilacqua C, Schneider U, Heine J, Schedlowski M, Schmidt RE. Effects of fentanyl on cellular immune functions in man. *Int J Immunopharmacol*. 1999; **21**: 445-454.
54. Jameson P, Desborough JP, Bryant AE, Hall GM. The effect of cortisol suppression on interleukin-6 and white blood cell responses to surgery. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1997; **41**:304-308.
55. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology. The immunesystem in health and disease*. 6th edition, New York: Churchill Livingstone, 2005
56. Keller HU, Wilkinson P, Abercrombie M, Becker E, Hirsch J, Miller M, Ramsey S, Zigmond S. A proposal for the definition of terms related to locomotion of leucocytes and other cells. *Clin Exp Immunol* 1977; **27**: 377-380.
57. Kerkhoff C, Beuck M, Threige-Rasmussen J, Spener F, Knudsen J, Schmitz G. Acyl-CoA binding protein (ACBP) regulates acyl-CoA:cholesterol-acyltransferase (ACAT) in human mononuclear phagocytes. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1346**: 163-172.
58. Klein E, Coxwell CF. Ein Beitrag zur Immunitätsfrage. *Centralbl Bacteriol Parasitenk* 1892; **11**: 464.
59. Koenig, A, Mallmann P, Nadstawek J. Immunsystem und Benzodiazepine. *Anaesth Intensivther Notfallmed* 1988; **23**: 136-140.

60. Kolles H. BIOMED. Ein System zur statistischen Analyse biomedizinischer Daten. Neckarsulm: Jungjohann, 1988.
61. Kotani N, Hashimoto H, Sessier DI, Yasuda T, Muraoka M, Matsuki A. Expression of genes for proinflammatory cytokines in alveolar macrophages during propofol and isoflurane anaesthesia. *Anesth Analg* 1999; **89**: 1250-1256.
62. Kress HG, Eberlein T. Effect of anesthesia and operation on essential immune functions. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 1992; **27**: 393-402.
63. Krumholz W, Demel C, Jung S, Meuthen G, Knecht J, Hempelmann G. The effects of thiopentone, etomidate, ketamine and midazolam on several bactericidal functions of polymorphonuclear leucocytes in vitro. *Eur J Anaesth* 1995; **12**: 141-146.
64. Krumholz W, Endrass J, Hempelmann G. Inhibition of phagocytosis and killing of bacteria by anaesthetic agents in vitro. *Br J Anaesth* 1995; **75**: 66-70.
65. Krumholz W, Reussner D, Hempelmann G. The influence of several intravenous anaesthetics on the chemotaxis of human monocytes in vitro. *Eur J Anaesthesiol.* 1999; **16**: 547-549.
66. Kuby J, *Immunology*. New York: W.H. Freeman and Company, 2000
67. Lahteenmaki M, Salo M, Tenovuo. Mucosal host defence response to hysterectomy assessed by saliva analyses: a comparison of propofol and isoflurane anaesthesia. *Anaesthesia.* 1998; **53**: 1067-1073.
68. Larsen B, Hoff G, Wilhelm W, Buchinger H, Wanner GA, Bauer M. Effect of intravenous anesthetics on spontaneous and endotoxin-stimulated cytokine response in cultured human whole blood. *Anaesthesiology* 1998; **89**: 1218-1227.
69. Larsen R, *Anästhesie 6. Auflage*, München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1999

70. Lauven PM, Stoeckel H, Schwilden H, Schüttler J. Klinische Pharmakokinetik von Midazolam, Flunitrazepam und Diazepam. *Anaesth Intensivther Notfallmed* 1981; **16**: 135-142.
71. Lenfant M, Zavala F, Haumont J, Potier P. Presence of peripheral type benzodiazepine binding site on the macrophage, its possible role in immunomodulation *C R Acad Sci III* 1985; **300**: 309-314.
72. Li CY, Chou TC, Wong CS, Ho ST, Wu CC, Yen MH, Ding Ya. Ketamine inhibits nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated rat alveolar macrophages. *Can J Anaesth* 1997; **44**: 989-995.
73. Li W, Tang HZ, Jiang YB, Xu MX. Influence of different doses of fentanyl on T-lymphocyte subpopulations and natural killer cells of patients with esophageal tumor during preoperation and postoperation. *Ai Zheng*. 2003; **22**: 634-636.
74. Liu J. Das intrazelluläre Zytokinmuster bei kritisch Kranken.  
URL: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2004/1435/>
75. Lovett EJ 3rd, Varani J, Lundy J. Suppressor cells and increased primary tumor growth rate induced by thiopental. *J Surg Oncol*. 1983; **22**(1): 26-32.
76. Markovic SN, Murasko DM. Anesthesia inhibits interferon-induced natural killer cell cytotoxicity via induction of CD8+ suppressor cells. *Cell Immunol*. 1993; **151**: 474-480.
77. Marone G, Stellato C, Mastronardi P, Mazzarella B. Mechanisms of activation of human mast cells and basophils by general anesthetic drugs. *Ann Fr Anesth Reanim*. 1993; **12**: 116-125.
78. Martinet Y, Martinet N, Vignaud JM, Plenat F. Blood monocyte chemotaxis. *J Immunol Methods* 1994; **174**: 209- 214.

79. Martucci C, Panerai AE, Sacerdote P. Chronic fentanyl or buprenorphine infusion in the mouse: similar analgesic profile but different effects on immune responses. *Pain*. 2004; **110**: 385-392.
80. Massoco C, Palermo-Neto J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. *Vet Immunol Immunopathol*. 2003; **95**: 11-19.
81. Matsuki A, Ishihara H, Kotani N, Sakai T, Hirota K, Muraoka M, Hashimoto H, Tsubo T, Takahashi S, Koh H, Wakayama S, Sato Y, Nagao H. A clinical study of total intravenous anesthesia by using mainly propofol, fentanyl and ketamine--with special reference to its safety based on 26,079 cases. *Masui*. 2002; **51**: 1336-1342.
82. Mattila-Vuori A, Salo M, Iisalo E. Immune response in infants undergoing application of cast: comparison of halothane and balanced anesthesia. *Can J Anaesth*. 1999; **46**: 1036-1042.
83. Menzebach A, Hirsch J, Nost R, Mogk M, Hempelmann G, Welters ID. Morphine inhibits complement receptor expression, phagocytosis and oxidative burst by a nitric oxide dependent mechanism. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 2004; **39**: 204-211.
84. Molina PE, Zambell KL, Zhang P, Vande Stouwe C, Carnal J. Hemodynamic and immune consequences of opiate analgesia after trauma/hemorrhage. *Shock*. 2004; **21**: 526-534.
85. Moore TC, Spruck CH, Leduc LE. Depression of lymphocyte traffic in sheep by anaesthesia and associated changes in efferent-lymph PGE2 and antibody levels. *Immunology*. 1988; **63**: 139-143

86. Moudgil GC, Allan RB, Russell RJ, Wilkinson PC. Inhibition, by anesthetic agents, of human leucocyte locomotion towards chemical attractants. *Br J Anaesth* 1977; **49**: 97-105.
87. Moudgil GC, Gordon J, Forrest JB. Comparative effects of volatile anaesthetic agents and nitrous oxide on human leucocyte chemotaxis in vitro. *Can Anaesth Soc J*. 1984; **31**: 631-637.
88. Muhling J, Campos ME, Sablotzki A, Krull M, Dehne MG, Gonther J, Weiss S, Fuchs M, Hempelmann G. Effects of propofol and taurine on intracellular free amino acid profiles and immune function markers in neutrophils in vitro. *Clin Chem Lab Med*. 2002; **40**: 111-121.
89. Muhling J, Fuchs M, Sablotzki A, Krull M, Ogal HP, Weiss S, Dehne MG, Engel J, Hempelmann G. Methohexital affects neutrophil (PMN) dynamic free amino acid pool and immune functions in vitro. *Eur J Anaesthesiol*. 2001; **18**: 366-376
90. Nemes C, Niemer M, Noack G. *Datenbuch Anaesthesiologie 3. Aufl.*, Stuttgart New York: Gustav Fischer, 1985
91. Nielsen H. Influence of five different anticoagulants on human blood monocyte isolation and functional activities. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect C* 1985; **93**: 49-52.
92. Norberg B, Bandmann U, Rydgren L. Amoeboid movement in human leucocytes: Basic mechanisms, cytobiological and clinical significance. *J Mechanochem Cell Motil*, 1977; **4**: 37-53.
93. O'Donnell NG, McSharry CP, Wilkinson PC, Asbury AJ. Comparison of the inhibitory effect of propofol, thiopentone and midazolam on neutrophil polarization in vitro in the presence or absence of human serum albumin. *Br J Anaesth*. 1992; **69**: 70-74.

94. Ouedraogo N, Roux E, Forestier F, Rossetti M, Savineau JP, Marthan R. Effects of intravenous anesthetics on normal and passively sensitized human isolated airway smooth muscle. *Anesthesiology*. 1998; **88**:317-326.
95. Pekoe GM, Peden D, Van Dyke K. Impairment of leukocyte myeloperoxidase bactericidal mechanisms with ketamine (Ketalar). *Agents Action..* 1983; **13**: 59-62
96. Pirttikangas CO, Salo M, Riutta A, Perttila J, Peltola O, Kirvela O. Effects of propofol and Intralipid on immune response and prostaglandin E2 production. *Anaesthesia*. 1995; **50**: 317-321.
97. Platania, Dell' influenza del sistema nervoso sulle infezioni. *Giornale internaziolale delle science mediche* 1890, **12**.
98. Procopio MA, Rassias AJ, DeLeo JA, Pahl J, Hildebrandt L, Yeager MP. The in vivo effects of general and epidural anesthesia on human immune function. *Anesth Analg*. 2001; **93**: 460-465.
99. Rick W. *Klinische Chemie und Mikroskopie*, 6. Aufl., Berlin Heidelberg New York Paris Tokyo: Springer, 1990.
100. Roitt IM. *Leitfaden der Immonologie*, 4. Aufl., Berlin: Blackwell-Wiss.-Verl., 1993.
101. Roitt IM, Brostoff J, Male DK, *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. 3. Auflage. Stuttgart, New York: Thieme, 1995
102. Rose NR, Friedmann H, Faney JL. *Manual of clinical laboratory and immunology*. Washington D.C.: American Soc. for Microbiology, 1986

103. Rossano F, Tufano R, Cipollaro de L, Servillo G, Baroni A, Tufano MA. Anesthetic agents induce human mononuclear leucocytes to release cytokines. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992; **14**: 439- 450.
104. Salman H, Bergman M, Bessler H, Alexandrova S, Beilin B, Djaldetti M. Effect of sodium thiopentone anesthesia on the phagocytic activity of rat peritoneal macrophages. *Life Sciences* 1998; **63**: 2221-2226.
105. Salo M, Pirttikangas CO, Pulkki K. Effects of propofol emulsion and thiopentone on T helper cell type-1/type-2 balance in vitro. *Anaesthesia*. 1997; **52**: 921-923.
106. Sato W, Enzan K, Masaki Y, Kayaba M, Suzuki M. The effect of isoflurane on the secretion of TNF-alpha and IL-1 beta from LPS-stimulated human peripheral blood monocytes. *Masui*. 1995; **44**: 971-975.
107. Schmidt H, Ebeling D, Bauer H, Bach A, Bohrer H, Gebhard MM, Martin E. Ketamine attenuates endotoxin-induced leukocyte adherence in rat mesenteric venules. *Crit Care Med*. 1995; **23**: 2008-2014.
108. Schneemilch CE, Bank U. Release of pro- and anti-inflammatory cytokines during different anesthesia procedures. *Anaesthesiol Reanim*. 2001; **26**: 4-10.
109. Senior RM, Daughaday C. *Chemotaxis*. In: Crystal RG, Barnes JB, Cherniack NS, Weibel ER (eds.), *The Lung*, Raven Press, New York, 1991; 131.
110. Shavit Y, Ben-Eliyahu S, Zeidel A, Beilin B. Effects of fentanyl on natural killer cell activity and on resistance to tumor metastasis in rats. Dose and timing study. *Neuroimmunomodulation*. 2004; **11**: 255-260.
111. Sinclair R, Eriksson AS, Gretzer C, Cassuto J, Thomsen P. Inhibitory effects of amide local anaesthetics on stimulus-induced human leukocyte metabolic activation,

- LTB4 release and IL-1 secretion in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1993; **37**: 159-165.
112. Snel JJ. Immunität und Narkose. *Berlin Klin Wschr* 1903; **40**: 212.
113. Song HK, Jeong DC. The effect of propofol on cytotoxicity and apoptosis of lipopolysaccharide-treated mononuclear cells and lymphocytes. *Anesth Analg.* 2004; **98**(6):1724-8.
114. Sperber K. Mononuclear phagocytic cells. In : Sigal LH, Ron Y, eds. *Immunology and inflammation. Basic mechanisms and clinical consequences.* New York: McGraw- Hill, 1994: 319-336.
115. Stefano GB, Bilfinger TV. Human neutrophil and macrophage chemokinesis induced by cardiopulmonary bypass: loss of DAME and IL-1 Chemotaxis. *J Neuroimmunol* 1993; **47**: 189-97.
116. Stevenson G, Hall S, Miller PJ, Alvord G, Leventhal J, Seleny F, Stevenson HC. The effect of anesthetic agents on human immune system function. *J Immunol Methods* 1986; **88**: 277-283.
117. Sunshine I, Whitwam JG, Fike WW, Finkle B, LeBeau J. Distribution and excretion of methohexitone in man. *Br J Anaesth* 1966; **38**: 23-28.
118. Taupin V, Jayais P, Descamps-Latscha B, Cazalaa J, Barrier G, Bach J, Zavala F. Benzodiazepine anesthesia in humans modulates the interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 responses of blood monocytes. *J Neuroimmunol* 1991; **35**: 13-19.
119. Territo M, Cline MJ. Monocyte Function in Man. *J Immunol* 1977; **118**: 187-192.

120. Thomas J, Carver M, Haisch C, Thomas F, Welch J, Carchman R. Differential effects of intravenous anaesthetic agents on cell-mediated immunity in the Rhesus monkey. *Clin Exp Immunol*. 1982; **47**: 457-466.
121. Tufano R, Rossano F, Cipollaro G, Baroni A, Servillo G. Anesthetic agents induce human mononuclear leucocytes to release cytokines. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1992; **14**: 439-450.
122. Watkins J. Etomidate: an 'immunologically safe' anaesthetic agent. *Anaesthesia*. 1983; **38** Suppl: 34-38.
123. Weiss M, Birkhahn A, Mettler S, Schneider M, Wernet P. Stereoselective suppression of neutrophil function by ketamine? *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1995; **17**: 91-107.
124. Welters ID, Menzebach A, Goumon Y, Cadet P, Menges T, Hughes TK, Hempelmann G, Stefano GB. Morphine inhibits NF-kappaB nuclear binding in human neutrophils and monocytes by a nitric oxide-dependent mechanism. *Anesthesiology*. 2000; **92**: 1677-1684.
125. Wieber J, Gugler R, Hengstmann JH, Dengler HJ. Pharmacokinetics of ketamine in man. *Anaesthesist* 1975; **24**: 260-263.
126. Wilhelm J, Sojkova J, Herget J. Production of hydrogen peroxide by alveolar macrophages. Effect of barbiturates. *Physiol Res* 1995; **44**: 369-375.
127. Wilkinson PC. Micropore Filter Methods for Leucocyte Chemotaxis. *Methods in Enzymology* 1988; **162**: 38-50.
128. Wilson RD, Priano LL, Traber DL, Sakai H, Daniels JC, Ritzmann SE. An investigation of possible immunosuppression from ketamine and 100 percent oxygen in normal children. *Anesth Analg*. 1971; **50**: 464-470.

129. Yasui K, Yamazaki M, Miyabayashi M, Tsuno T, Komiyama A. Signal transduction pathway in human polymorphonuclear leucocytes for chemotaxis induced by a chemotactic factor. *J Immunol* 1994; **152**: 5922-5929.
130. Yeager MP, Procopio MA, DeLeo JA, Arruda JL, Hildebrandt L, Howell AL. Intravenous fentanyl increases natural killer cell cytotoxicity and circulating CD16(+) lymphocytes in humans. *Anesth Analg*. 2002; **94**: 94-99.
131. Zavala F, Haumont J, Lenfant M. Interaction of benzodiazepines with mouse macrophages. *Eur J Pharmacol* 1984; **106**: 561-566.

## **8. Erklärung**

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

## 9. Anhang

### 9.1 Tabellen

**Tabelle 1**

Der Einfluß verschiedener Konzentrationen von Thiopental, Methohexital und Natriumcarbonat auf die Chemotaxis von Monozyten in vitro (Anzahl der Monozyten pro 5 mikroskopische Felder, n=10, Median  $\pm$  Standardfehler des Medians, Standardabweichung). \*P $\leq$  0.05

	Median	Standardabweichung	
Kontrolle	269 $\pm$ 34	104	
Thiopental 1.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	194 $\pm$ 16	52	
Thiopental 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$	189 $\pm$ 19	39	
Thiopental 150 $\mu\text{g ml}^{-1}$	219 $\pm$ 26	56	
Methohexital 1.7 $\mu\text{g ml}^{-1}$	202 $\pm$ 6	47	
Methohexital 17 $\mu\text{g ml}^{-1}$	216 $\pm$ 20	56	
Methohexital 170 $\mu\text{g ml}^{-1}$	195 $\pm$ 22	45	
Natriumkarbonat 0.09 $\mu\text{g ml}^{-1}$	140 $\pm$ 8	20	*
Natriumkarbonat 0.9 $\mu\text{g ml}^{-1}$	184 $\pm$ 11	45	
Natriumkarbonat 9 $\mu\text{g ml}^{-1}$	231 $\pm$ 30	58	

**Tabelle 2**

Der Einfluß verschiedener Konzentrationen von Propofol, Etomidat und Intralipid 10 % auf die Chemotaxis von Monozyten in vitro (Anzahl der Monozyten pro 5 mikroskopische Felder, n=10, Median  $\pm$  Standardfehler des Medians, Standardabweichung).

	Median	Standardabweichung
Kontrolle	355 $\pm$ 31	76
Propofol 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	342 $\pm$ 41	92
Propofol 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	341 $\pm$ 25	57
Propofol 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$	258 $\pm$ 22	92
Etomidat 0.032 $\mu\text{g ml}^{-1}$	326 $\pm$ 19	74
Etomidat 0.32 $\mu\text{g ml}^{-1}$	346 $\pm$ 27	68
Etomidat 3.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$	312 $\pm$ 63	118
Kontrolle	303 $\pm$ 47	93
Intralipid 10 % 0.0495 $\mu\text{g ml}^{-1}$	268 $\pm$ 25	51
Intralipid 10 % 0,495 $\mu\text{g ml}^{-1}$	304 $\pm$ 24	74
Intralipid 10 % 4.95 $\mu\text{g ml}^{-1}$	255 $\pm$ 24	76

**Tabelle 3**

Der Einfluß verschiedener Konzentrationen von Ketamin und des Zusatzstoffes Benzethoniumchlorid auf die Chemotaxis von Monozyten in vitro (Anzahl der Monozyten pro 5 mikroskopische Felder, n=10, Median  $\pm$  Standardfehler des Medians, Standardabweichung). \*P $\leq$  0.05

	Median	Standardabweichung	
Kontrolle	263 $\pm$ 29	76	
Ketamin 0.236 $\mu\text{g ml}^{-1}$	224 $\pm$ 13	42	
Ketamin 2.36 $\mu\text{g ml}^{-1}$	197 $\pm$ 36	80	*
Ketamin 23.6 $\mu\text{g ml}^{-1}$	214 $\pm$ 19	41	
Benzethoniumchlorid 0.00236 $\mu\text{g ml}^{-1}$	207 $\pm$ 22	62	
Benzethoniumchlorid 0.0236 $\mu\text{g ml}^{-1}$	164 $\pm$ 26	60	*
Benzethoniumchlorid 0.236 $\mu\text{g ml}^{-1}$	238 $\pm$ 45	89	

#### Tabelle 4

Der Einfluß verschiedener Konzentrationen von Midazolam auf die Chemotaxis von Monozyten in vitro  
(Anzahl der Monozyten pro 5 mikroskopische Felder, n=10, Median  $\pm$  Standardfehler des Medians, Standardabweichung). \*P  $\leq$  0.05

	Median	Standardabweichung	
Kontrolle	263 $\pm$ 29	76	
Midazolam 0.0975 $\mu\text{g ml}^{-1}$	205 $\pm$ 16	57	
Midazolam 0.975 $\mu\text{g ml}^{-1}$	166 $\pm$ 31	71	*
Midazolam 9.75 $\mu\text{g ml}^{-1}$	225 $\pm$ 12	51	

**Tabelle 5**

Der Einfluß verschiedener Konzentrationen von Flunitrazepam und der Additive Benzylalkohol and Ethylalkohol auf die Chemotaxis von Monozyten in vitro (Anzahl der Monozyten pro 5 mikroskopische Felder, n=10, Median  $\pm$  Standardfehler des Medians, Standardabweichung). \*P $\leq$  0.05

	Median	Standardabweichung	
Kontrolle	303 $\pm$ 47	93	
Flunitrazepam 0.004 $\mu\text{g ml}^{-1}$	309 $\pm$ 15	67	
Flunitrazepam 0.04 $\mu\text{g ml}^{-1}$	301 $\pm$ 15	39	
Flunitrazepam 0.4 $\mu\text{g ml}^{-1}$	317 $\pm$ 39	80	
Benzylalkohol 0.06 $\mu\text{g ml}^{-1}$	199 $\pm$ 12	37	*
Benzylalkohol 0.6 $\mu\text{g ml}^{-1}$	322 $\pm$ 11	48	
Benzylalkohol 6.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$	276 $\pm$ 26	65	
Ethylalkohol 0.0004 $\mu\text{l ml}^{-1}$	320 $\pm$ 21	51	
Ethylalkohol 0.004 $\mu\text{l ml}^{-1}$	364 $\pm$ 20	59	
Ethylalkohol 0.04 $\mu\text{l ml}^{-1}$	330 $\pm$ 16	66	

## Tabelle 6

Der Einfluß verschiedener Konzentrationen von Fentanyl auf die Chemotaxis von Monozyten in vitro.  
(Anzahl der Monozyten pro 5 mikroskopische Felder, n=10, Median  $\pm$  Standardfehler des Medians, Standardabweichung).

	Median	Standardabweichung
Kontrolle	355 $\pm$ 31	76
Fentanyl 0.0035 $\mu\text{g ml}^{-1}$	356 $\pm$ 23	69
Fentanyl 0.035 $\mu\text{g ml}^{-1}$	331 $\pm$ 11	57
Fentanyl 0.35 $\mu\text{g ml}^{-1}$	342 $\pm$ 41	98

**Tabelle 7**

Der Einfluß verschiedener Konzentrationen von Droperidol auf die Chemotaxis von Monozyten in vitro  
(Anzahl der Monozyten pro 5 mikroskopische Felder, n=10, Median  $\pm$  Standardfehler des Medians, Standardabweichung). \*P  $\leq$  0.05

	Median	Standardabweichung	
Kontrolle	263 $\pm$ 29	76	
Droperidol 0.1235 $\mu\text{g ml}^{-1}$	185 $\pm$ 19	45	*
Droperidol 1.235 $\mu\text{g ml}^{-1}$	186 $\pm$ 22	61	*
Droperidol 12.35 $\mu\text{g ml}^{-1}$	198 $\pm$ 46	71	

## 9.2 Rohdaten

### **Auswertung Chemotaxisversuch**

1/1

Namenskürzel: BK

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	208	171	198	157
	2	238	104	186	406
	3	134	109	138	271
II	4	136	30	138	346
	5	126	80	209	158
	6	233	114	186	129
III	7	41	111	214	272
	8	233	223	411	313
	9	209	203	260	385
IV	10	162	208	236	298
	11	201	35	217	99
	12	168	131	255	321

### **Auswertung Chemotaxisversuch**

1/2

Namenskürzel: BK

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	363	223	205	469
	2	253	400	486	390
	3	236	280	49	406
II	4	318	354	436	293
	5	401	379	237	202
	6	261	390	359	213
III	7	589	436	251	179
	8	521	470	339	284
	9	413	303	370	227
IV	10	550	359	603	76
	11	503	354	423	399
	12	474	499	286	392

**Auswertung Chemotaxisversuch**

2/1

Namenskürzel: CF

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	318	150	418	346
	2	257	223	257	177
	3	215	107	42	305
II	4	356	290	207	237
	5	269	24	257	329
	6	232	179	173	137
III	7	323	150	189	123
	8	81	253	109	173
	9	190	125	133	177
IV	10	198	130	147	285
	11	185	104	190	343
	12	236	160	213	309

**Auswertung Chemotaxisversuch**

2/2

Namenskürzel: CF

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	340	355	361	306
	2	431	265	220	227
	3	269	343	62	252
II	4	215	312	326	349
	5	380	433	417	233
	6	395	431	418	300
III	7	491	608	394	264
	8	421	380	295	286
	9	471	397	360	60
IV	10	225	266	390	28
	11	211	404	297	347
	12	242	271	365	347

**Auswertung Chemotaxisversuch****3/1**

Namenskürzel: AR

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	180	171	125	188
	2	293	140	214	248
	3	318	56	45	300
II	4	236	298	239	366
	5	284	287	122	227
	6	268	232	282	262
III	7	199	172	304	252
	8	220	129	191	220
	9	146	77	179	208
IV	10	92	229	172	286
	11	139	146	282	396
	12	208	178	282	506

**Auswertung Chemotaxisversuch****3/2**

Namenskürzel: AR

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	288	170	319	375
	2	367	326	324	341
	3	385	351	105	458
II	4	304	240	398	383
	5	291	254	346	351
	6	272	272	268	190
III	7	285	286	290	170
	8	355	343	241	287
	9	265	264	331	138
IV	10	289	336	380	37
	11	276	305	566	515
	12	287	327	476	482

**Auswertung Chemotaxisversuch**

4/1

Namenskürzel: ME

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	216	281	210	405
	2	104	222	276	473
	3	303	136	30	285
II	4	136	123	165	273
	5	185	166	348	419
	6	159	156	340	381
III	7	291	288	194	153
	8	202	234	225	177
	9	237	229	282	214
IV	10	43	28	191	178
	11	216	335	158	311
	12	258	218	226	302

**Auswertung Chemotaxisversuch**

4/2

Namenskürzel: ME

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	374	321	373	399
	2	428	214	282	250
	3	361	387	64	180
II	4	414	382	394	171
	5	358	346	334	137
	6	322	365	267	294
III	7	110	252	262	57
	8	389	326	320	42
	9	440	335	305	36
IV	10	271	283	411	26
	11	324	284	188	233
	12	305	423	293	263

**Auswertung Chemotaxisversuch**

5/1

Namenskürzel: SK

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	262	185	241	196
	2	169	232	84	209
	3	154	294	45	271
II	4	189	89	238	209
	5	239	188	217	182
	6	145	274	169	336
III	7	328	174	246	209
	8	234	143	160	119
	9	315	225	227	154
IV	10	307	354	341	248
	11	265	285	295	344
	12	274	210	268	360

**Auswertung Chemotaxisversuch**

5/2

Namenskürzel: SK

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	203	213	236	220
	2	227	303	50	173
	3	322	280	52	211
II	4	351	258	325	258
	5	297	389	382	346
	6	470	359	426	336
III	7	534	392	501	310
	8	486	425	456	282
	9	414	368	442	20
IV	10	377	288	367	26
	11	425	233	374	341
	12	378	398	440	385

**Auswertung Chemotaxisversuch****6/1**

Namenskürzel: KR

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	122	251	257	349
	2	245	181	194	673
	3	319	258	37	320
II	4	207	169	241	339
	5	214	172	172	412
	6	185	242	171	249
III	7	213	186	154	257
	8	274	119	227	146
	9	329	178	123	233
IV	10	273	188	214	254
	11	188	231	162	201
	12	247	236	211	221

**Auswertung Chemotaxisversuch****6/2**

Namenskürzel: KR

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	418	307	207	289
	2	425	305	246	274
	3	153	182	64	386
II	4	152	243	311	424
	5	252	236	321	354
	6	93	400	186	214
III	7	335	331	421	316
	8	246	359	258	289
	9	274	354	361	20
IV	10	232	372	298	34
	11	181	430	556	312
	12	309	429	404	371

**Auswertung Chemotaxisversuch**

7/1

Namenskürzel: AM

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	165	158	234	314
	2	124	119	159	358
	3	107	33	58	270
II	4	146	282	256	175
	5	106	213	290	166
	6	189	216	136	135
III	7	138	18	115	96
	8	90	82	83	119
	9	102	116	155	181
IV	10	168	97	229	153
	11	188	185	137	213
	12	164	132	157	233

**Auswertung Chemotaxisversuch**

7/2

Namenskürzel: AM

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	335	345	301	287
	2	419	266	285	185
	3	259	261	98	197
II	4	367	404	367	383
	5	374	361	389	256
	6	290	305	358	269
III	7	571	464	479	317
	8	449	324	420	410
	9	550	459	433	32
IV	10	461	523	299	28
	11	293	415	500	472
	12	239	393	366	347

**Auswertung Chemotaxisversuch**

8/1

Namenskürzel: DR

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	160	195	164	259
	2	164	188	216	263
	3	258	193	54	271
II	4	207	257	251	176
	5	158	289	271	110
	6	148	180	185	151
III	7	221	153	191	238
	8	260	179	201	195
	9	169	223	198	144
IV	10	238	177	158	71
	11	180	265	192	263
	12	200	228	283	230

**Auswertung Chemotaxisversuch**

8/2

Namenskürzel: DR

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	218	252	334	464
	2	184	341	386	466
	3	140	338	67	356
II	4	410	336	282	332
	5	196	311	342	368
	6	382	187	282	238
III	7	199	302	337	222
	8	314	278	288	162
	9	241	307	283	15
IV	10	242	252	230	11
	11	254	322	254	331
	12	219	270	364	272

**Auswertung Chemotaxisversuch**

9/1

Namenskürzel: CN

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	217	238	233	222
	2	288	107	209	331
	3	241	212	32	225
II	4	315	180	209	154
	5	293	254	173	338
	6	218	212	234	276
III	7	229	247	190	39
	8	265	278	224	163
	9	273	195	191	137
IV	10	328	183	222	194
	11	335	267	243	256
	12	250	251	181	303

**Auswertung Chemotaxisversuch**

9/2

Namenskürzel: CN

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	226	212	396	479
	2	274	289	334	421
	3	270	330	44	244
II	4	279	397	205	371
	5	286	385	318	289
	6	372	426	329	321
III	7	331	368	277	35
	8	279	317	228	35
	9	325	303	288	6
IV	10	348	369	225	11
	11	180	266	292	201
	12	322	294	286	324

*Namenskürzel: TW*

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	385	196	145	133
	2	240	247	179	243
	3	196	135	36	78
II	4	264	182	200	75
	5	239	203	227	115
	6	221	233	157	238
III	7	172	321	223	171
	8	244	265	274	81
	9	285	291	225	165
IV	10	152	268	275	263
	11	172	313	239	237
	12	334	352	233	241

*Namenskürzel: TW*

Zellen pro 5 High-Power-Field

Objektträger	Spot	A	B	C	D
I	1	308	448	286	291
	2	207	312	307	271
	3	229	356	58	256
II	4	260	258	351	275
	5	251	365	408	226
	6	213	414	282	119
III	7	287	317	319	63
	8	295	377	397	41
	9	313	437	334	6
IV	10	124	258	250	11
	11	183	262	317	382
	12	158	269	241	464

### **9.3 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Hempelmann danke ich sehr für die Überlassung des Themas sowie für die Bereitstellung des Laborplatzes für die Dauer der praktischen Tätigkeit.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. W. Krumholz, der durch die Ausarbeitung des Konzeptes die Studie zunächst ermöglichte und im Weiteren die Arbeit zu jeder Zeit zuverlässig und mit hohem persönlichen Engagement betreute.

Frau B. Weber danke ich für die zügige Materialbeschaffung.

Meinen Eltern danke ich für die Möglichkeit das Studium der Medizin zu ergreifen.

Meiner Frau Wiebke und meinem Sohn Philipp für die Motivation und Geduld.

## 9.4 Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Dirk Peter Reußner  
Geburtstag und -ort: 17.06.1971 in Groß-Gerau  
Familienstand: verheiratet  
Nationalität: deutsch

### Schulbildung

8/1976 - 6/1982 Grundschule in Darmstadt-Arheilgen  
8/1982 - 6/1990 Justus-Liebig-Gymnasium Darmstadt  
22.06.1990 Abitur

### Zivildienst

8/1990 - 10/1991 Rettungsdienst bei der DRK Rettungsdienst gGmbH Darmstadt  
28.02.1992 Prüfung zum Rettungssanitäter

### Hochschulbildung

10/1991 - 9/1993 Vorklinisches Studium an der Justus-Liebig-Universität Gießen  
10/1993 - 3/1997 Hauptstudium an der Justus-Liebig-Universität Gießen  
4/1997 - 3/1998 Praktisches Jahr Hessenklinik Wetzlar/Klinikum der JLU-Gießen  
07.05.1998 Abschluß des Studiums mit ärztlicher Prüfung  
10/1998 – 3/2000 Arzt im Praktikum an der Universitäts Hals-Nasen-Ohren Klinik Gießen  
5/2000 – heute Wiss. Assistent / Arzt in der Universitäts Hals-Nasen-Ohren Klinik Gießen  
03.03.2004 Facharztprüfung Gebietsbezeichnung Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde



édition scientifique

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
GLEIBERGER WEG 4  
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-084-X



9 783896 870841