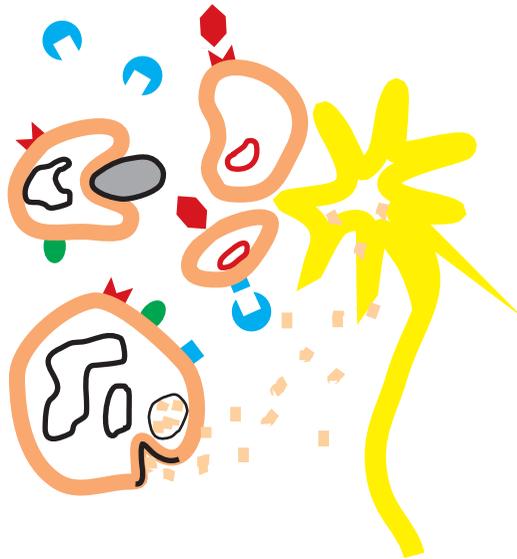


OPIOIDREZEPTOREN AUF NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN:

Physiologische und pathophysiologische Regulationsprozesse

ALEXANDER SCHMIDT



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin
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 2010

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.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Opioidrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten:
Physiologische und pathophysiologische
Regulationsprozesse**

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Alexander Robert Schmidt

aus Darmstadt

Gießen 2009

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anaesthesiologie und Urologie

Abteilung für Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. Markus A. Weigand

Gutachterin: Frau Prof. Dr. Welters

Gutachterin: Frau PD Dr. Lips

Tag der Disputation: 13.11.2009

Meinen Großeltern in Liebe und ewiger Erinnerung

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Darstellung der Thematik	1
1.1.1. Neutrophile Granulozyten.....	1
1.1.2. Opioidrezeptoren (μ -, κ -, δ - Rezeptor)	2
1.1.3. Lipopolysaccharid (LPS)	6
1.1.4. Staphylococcus aureus	8
1.1.5. Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)	9
1.1.6. Durchflusszytometrisches Verfahren	12
1.2. Zielsetzung der Studie	13
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. Probenmaterial	14
2.1.1. Probanden.....	14
2.1.2. Ausschlusskriterien	15
2.1.3. Probengewinnung und –aufarbeitung	15
2.1.4. Intensivpatienten	15
2.1.5. Auswahlkriterien	16
2.1.6. Probenaufarbeitung	17
2.2. Inkubation mit Stimulantien	18
2.3. Bestimmung der Opioidrezeptoren DOR, KOR und MOR	19
2.3.1. Testprinzip	19
2.3.2. Inkubation mit den FITC-markierten OR-Antikörpern	19
2.3.3. Auswahl geeigneter OR-Antikörper	20
2.4. Die Durchflusszytometrie	22
2.4.1. Optisches System	22
2.4.2. Flüssigkeitssystem	25
2.5. Darstellung der Messergebnisse	25
2.6. Statistische Auswertung	29

3. ERGEBNISSE	30
3.1. OR-Expression nach Stimulation mit Staphylococcus aureus.....	30
3.1.1. DOR	35
3.1.2. KOR	37
3.1.3. MOR.....	39
3.2. Veränderung der OR-Expression nach Stimulation mit TNF-α.....	41
3.2.1. DOR	41
3.2.2. KOR	43
3.2.3. MOR.....	45
3.3. Veränderungen der OR-Expression nach Stimulation mit LPS	47
3.3.1. DOR	47
3.3.2. KOR	49
3.3.3. MOR.....	51
3.4. Intensivpatienten.....	53
3.4.1. Stimulation mit Staphylococcus aureus	53
3.4.2. Stimulation mit TNF- α	56
3.4.3. Stimulation mit LPS.....	59
3.5. OR-Expression bei Sedierung mit Fentanyl vs. Ketamin.....	62
4. DISKUSSION	70
4.1. Diskussion der Methodik.....	70
4.1.1. Probenaufarbeitung	70
4.1.2. Wahl der Messparameter.....	72
4.1.3. Wahl der geeigneten Antikörper	73
4.1.4. Durchflusszytometrie	75
4.2. Diskussion der Ergebnisse.....	77
4.2.1. Effekte von St.aureus	77
4.2.2. Effekte von TNF- α	79
4.2.3. Effekte von LPS	81
4.2.4. Auswirkung der Stimulantien auf Granulozyten von septischen analgesedierten Patienten.....	84
4.2.5. Vergleich zwischen Ketamin und Fentanyl	85
4.3. Klinische Bedeutung	87

5. ZUSAMMENFASSUNG	90
6. SUMMARY	92
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	93
8. ANHANG	108
8.1. Abbildungsverzeichnis.....	108
8.2. Wertetabellen zu den Grafiken des Ergebnisteils.....	114
8.2.1. Zum Ergebnisteil 3.1	114
8.2.2. Zum Ergebnisteil 3.2.....	118
8.2.3. Zum Ergebnisteil 3.3.....	123
8.2.4. Zum Ergebnisteil 3.4.....	127
8.2.5. Zum Ergebnisteil 3.5.....	130
8.3. Abkürzungsverzeichnis	133
8.4. Verwendete Materialien	136
9. DANKSAGUNG.....	137
10.LEBENS LAUF	138
11. VERÖFFENTLICHUNGEN.....	140

1. EINLEITUNG

1.1. Darstellung der Thematik

1.1.1. Neutrophile Granulozyten

Im Blutaussstrich werden die Leukozyten in polymorphkernige Leukozyten und die mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) unterteilt. Polymorphkernige Leukozyten und Monozyten entstehen im Knochenmark, Lymphozyten in lymphatischen Geweben, wie Lymphknoten, Peyer-Plaques, Tonsillen, Milz und Thymus.

Die polymorphkernigen Granulozyten lassen sich weiter untergliedern in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Die neutrophilen Granulozyten sind durch ihre unregelmäßige Nukleusform und ihre Färbeeigenschaft gegenüber den anderen Leukozytenpopulationen differenzierbar. Ihre Lebensdauer im vaskulären System beträgt 8-20 Stunden, im Gewebe sind es einige Tage. Mit 55 –70 % stellen sie den größten Anteil der Leukozyten im Blut dar. Sie liegen in einer Konzentration von 2,2 – 6,3 G/l Blut vor. Einen geringeren Anteil bilden die eosinophilen (2-4%) und die basophilen Granulozyten (0-1%)¹.

Neutrophile Granulozyten und Monozyten stellen aufgrund ihrer Fähigkeit Pathogene zu erkennen, zu phagozytieren und zu vernichten, die wichtigsten Komponenten der unspezifischen Immunabwehr dar². Triggersubstanzen wie Pathogene, Immunstimulantien oder endogene Mediatoren binden an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche und leiten damit die Abwehrreaktion dieser Phagozyten ein. Ihre Rekrutierung im Inflammationsgebiet ist abhängig von der Chemokin-Rezeptor-Dichte, insbesondere vom Chemokin-Rezeptor-2 [CXCR2]. Die vier wichtigsten Chemokine sind *macrophage-inflammatory protein-2* (MIP-2), *keratinocyte chemoattractant* (KC), *cytokine-induced neutrophil*

chemoattractant-2 (CINC-2) und das Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Chemokin³. Neben funktionellen Veränderungen werden durch LPS intrazelluläre Kaskaden der Signaltransduktion aktiviert, wodurch die de-novo-Synthese von Entzündungsmediatoren auf transkriptioneller Ebene induziert wird. Von entscheidender Bedeutung sind dabei die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1, die unter anderem an der transkriptionellen Regulation von IL-8, TNF- α , IL-6, und IL-1 beteiligt sind^{4;5}.

Bekannt ist, dass neutrophile Granulozyten als opioidhaltige Leukozytensubpopulation als erste Zellpopulation im entzündeten Gewebe vorgefunden werden und dort endogene Opioidpeptide sezernieren, die über periphere Nerven an der Schmerzregulierung beteiligt sind³ und dadurch eine endogene Analgesie bewirken.

1.1.2. Opioidrezeptoren (μ -, κ -, δ - Rezeptor)

Opioide sind Substanzen, die als Liganden an den Opioidrezeptoren (OR) wirken. Nicht nur im zentralen und peripheren Nervensystem, sondern auch auf der Zelloberfläche der Granulozyten befinden sich Rezeptoren, die spezifisch für Opioide sind. Endogene Peptide, aber auch synthetische Opioide, können an diese Rezeptoren binden. Zur Gruppe der Opioide gehören unter anderem Morphin und Fentanyl⁶. Morphin ist der Hauptbestandteil des Opiums, Fentanyl ist ein synthetisches Opioid aus der Gruppe der Anilinopiperidine mit morphinartiger Wirkung. Fentanyl hat jedoch, durch die Einführung einer Methylgruppe in cis-Position zum Stickstoff-Atom⁷, die 100-fache Potenz von Morphin^{8;9}.

OR befinden sich auf Nervenzellen, aber auch auf Zellen des Immunsystems¹⁰⁻¹⁴ und werden in verschiedene Subtypen (μ , δ , κ) unterteilt. Morphin und Fentanyl binden überwiegend an den μ -Opioidrezeptor¹⁵⁻¹⁸, der zur Gruppe G-Protein gekoppelter Rezeptoren gehört. Charakteristisch für diesen Rezeptor ist seine heptahelikale Struktur mit sieben Transmembrandomänen und seine Kopplung an ein inhibitorisches G-Protein (G_i)^{19;20}, das zur Hemmung der Zykklase und damit einem Abfall der cAMP bzw. cGMP führt^{16;18;21;22}. Weiterhin kommt es zur Schließung von Ca^{++} -Kanälen und zur Öffnung von K^+ -Kanälen¹⁶ und somit zu

einer Veränderung der Erregbarkeit der Neurone und der Transmitterfreisetzung aus Nervenendigungen⁸. Jeder Rezeptor vermittelt verschiedene Reaktionen. Die Aktivierung des δ -Opioidrezeptors (DOR) führt zu stressinduzierter und spinaler Analgesie, Atemdepression und Hypotonie. Über den κ -Opioidrezeptor (KOR) wird Analgesie auf spinaler Ebene, Sedierung, Miosis und Dysphorie vermittelt. Der μ -Opioidrezeptor (MOR) kann in weitere Subtypen unterteilt werden: μ_1 (MOR1) bewirkt supraspinale Analgesie, μ_2 (MOR2) Atemdepression, Miosis, Euphorie und Abhängigkeit^{8;23} und vermittelt eine Suppression der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Während MOR1 und MOR2 im Zentralnervensystem vorkommen, wurde der μ -Rezeptor-Subtyp, der auf Immunzellen exprimiert wird, als μ_3 -Rezeptor (MOR3) definiert²⁴. Dieser setzt die Chemotaxis sowie die Phagozytose von neutrophilen Granulozyten herab²⁵. Liganden für den OR stellen Substanzen dar, die entweder als Agonist, partieller Agonist oder als Antagonist wirken. Agonisten können exogene oder endogene Opioide sein. Endogene Opioide werden in drei Gruppen unterteilt. Endorphine, Enkephaline und Dynorphine^{7;16;19;26} sind die typischen Vertreter dieser Gruppen. Dabei bindet Endorphin am MOR^{15;19}, Enkephalin am DOR^{14;15;19} und Dynorphin am KOR^{14;15;19;20;26}. Produktionsort der endogenen Opioide sind einerseits Zellen des Nervensystems, andererseits aber auch Immunzellen²⁷⁻³⁰. Im Rahmen von Entzündungsreaktionen werden diese endogenen Opioide ausgeschüttet^{28;30-37}. Endogene Opioidpeptide wirken darüber hinaus über ihre Rezeptoren auf den Immunozyten immunmodulatorisch, sie fungieren somit als Zytokine. So reguliert KOR die zelluläre und humorale Immunantwort, inhibiert über eine Veränderung des Zytokinspiegels die Antikörperproduktion¹⁴ und initiiert die T-Zell-Reifung im Thymus²⁶. Die Bindung am DOR moduliert die T-Zell-Proliferation¹⁴ und erhöht sowohl die Aktivität von NK-Zellen als auch die Zytotoxizität von T-Zellen¹⁷. MOR2 vermittelt eine Suppression der natürlichen Killerzellen und MOR3 setzt die Chemotaxis sowie die Phagozytose von neutrophilen Granulozyten herab²⁵. Eine immunsuppressive Wirkung und damit verbunden eine möglicherweise erhöhte Infektanfälligkeit von Patienten haben das Morphin und seine Derivate^{9;38-41}. Dieser Aspekt könnte für die perioperative Medizin, für die Schmerztherapie

oder auch besonders für die Intensivmedizin von Bedeutung sein ^{42;43}.

Im Rahmen der Intensivmedizin stellen septische Erkrankungen eine häufige Diagnose dar, die mit weit reichenden immunologischen Veränderungen assoziiert ist. Als Sepsis wird ein klinisches Syndrom bezeichnet, das die generalisierte inflammatorische Antwort auf eine bakterielle, virale, fungoide Infektionen bzw. eine Infektion unklarer Genese darstellt. Bereits 1914 formulierte der Mikrobiologe Hugo Schottmüller (1867 - 1936) die bis heute noch gültige Definition: „...eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem aus konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, derart, dass durch diese Invasion subjektive oder objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ ⁴⁴. Diese Definition der Sepsis wurde 1992 vom American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine im Rahmen einer Consensus Konferenz erweitert ⁴⁵. Dabei werden fünf klinische Stadien unterteilt (siehe Abbildung 1).

Infektion	mikrobiologisches Phänomen, charakterisiert durch das Vorhandensein von Mikroorganismen in normalerweise sterilem Gewebe
SIRS – 2 oder mehr Variablen	Körpertemperatur > 38 °C oder < 36 °C Herzfrequenz > 90/min Atemfrequenz > 20/min oder P _a CO ₂ < 32 mmHg Leukozyten > 12 G/l bzw. < 4 G/l, oder > 10% unreife Zellen
Sepsis	SIRS plus Infektion
Schwere Sepsis	Sepsis & Organdysfunktion (d. h. Zeichen der peripheren Minderperfusion, z. B. Laktatazidose, Oligurie, akute Änderung des mentalen Status)
Septischer Schock	Sepsis-induzierte Hypotension (d. h. systolischer Blutdruck < 90 mmHg oder Abfall des Blutdrucks um > 40 mmHg unter den Ausgangswert, trotz ‚fluid challenge‘)

Abbildung 1: Definition der Sepsis entsprechend der Consensus Conference von 1991 ⁴⁶. SIRS = Systemic Inflammatory Response Syndrom.

Die Immunveränderungen, die bei septischen Patienten beobachtet werden können, sind maßgeblich durch neutrophile Granulozyten bedingt. Neben den klassischen Funktionen der neutrophilen Granulozyten, wie Adhärenz am Endothel, Transmigration ins entzündete Gewebe, Phagozytose und Produktion von Sauerstoffradikalen (O_2^-), spielt in der Sepsis die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α und Il-6) speziell in Zusammenspiel mit Lipopolysacchariden eine wichtige Rolle ⁴⁷.

Obwohl die Bedeutung von Opioidrezeptoren sowie endogenen Opioidpeptiden für immunregulatorische Prozesse in zahlreichen Studien belegt wurde ^{14;15;17;26;34}, bleibt die Rolle des Opioidergen Systems bei systemischen Entzündungsprozessen, wie z. B. der Sepsis unklar. Eine weitere Problematik stellen hierbei das komplexe immunologische Geschehen in der Sepsis, sowie zahlreiche auslösende Pathomechanismen und inhomogene Krankheitsverläufe dar. Bislang existieren nur wenige Ansätze, die in-vitro gefundenen Veränderungen des Opioidergen Systems auf konkrete Krankheitsbilder zu übertragen ¹⁸.

1.1.3. Lipopolysaccharid (LPS)

LPS ist Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien. Der auch als Endotoxin bezeichnete Molekülkomplex besteht aus dem Lipoid A, dem „Core“-Polysaccharid und der O-spezifischen Polysaccharidkette.

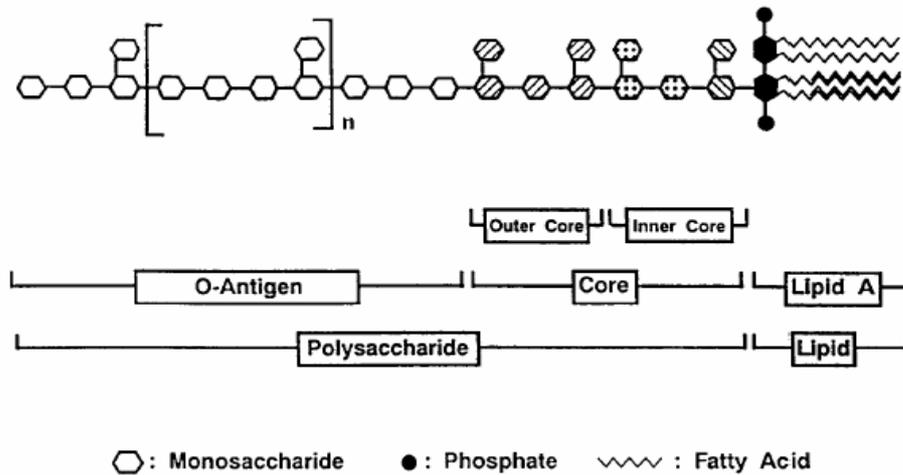


Abbildung 2: Aufbau des Lipopolysaccharids ⁴⁸.

Das Lipoid A ist für die toxische Wirkung verantwortlich ⁴⁹. Bei der gramnegativen Bakteriämie löst es eine Reihe von Reaktionen aus, welche einerseits zytoprotektiv, andererseits aber auch zellschädigend sind ⁵⁰. Die LPS-induzierte Zellaktivierung ist dabei von dem LPS binding-Protein (LBP) und einem trimolekularen Cluster aus den Proteinen CD14, MD2 und dem Toll-like-Receptor TLR4 abhängig ⁵¹. Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten exprimieren die membrangebundene Form des CD14 (mCD14), so dass LPS direkt am Rezeptor andockt, während bei Endothel- und Epithelzellen, glatten Muskelzellen, Astrozyten und dendritischen Zellen das LPS, durch LBP beschleunigt, mit dem im Plasma löslichen CD14 (sCD14) einen Komplex bildet und erst dann am TLR4-MD-2-Komplex binden kann ^{48;51;52}. Diese Kaskade bewirkt die Aktivierung von NF-κB und stimuliert die Produktion und Sekretion von Zytokinen (z.B. TNF-α, IL-1, Interferon-γ, IL-6, IL-8), Stickoxid (NO) und Superoxiden ⁵³⁻⁵⁵.

Mit LPS inkubierte neutrophile Granulozyten zeigen eine erhöhte zelluläre Aktivität, verbesserte Adhäsion am Endothel, vermehrte Sekretion von lysozymalen Enzymen, sowie eine gesteigerte Freisetzung von O_2^- . Dieser Effekt der gesteigerten neutrophilen Granulozyten-Funktion wird als „Priming“ bezeichnet^{56;57}.

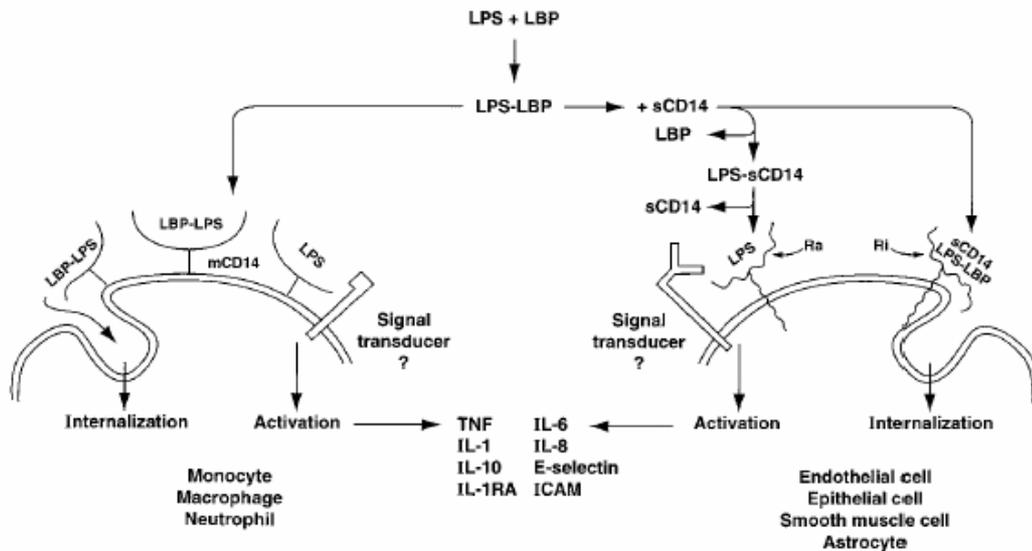


Abbildung 3: Wirkung von LPS auf die verschiedenen Zellen⁴⁸. Links ist die Wirkung von LPS auf neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Monozyten über den membranständigen mCD14-Rezeptor dargestellt, rechts auf Endothelzellen, Epithelzellen, glatten Muskelzellen und Astrozyten über den im Plasma löslichen sCD14-Rezeptor am TLR4-MD-2-Komplex.

Ferner aktiviert LPS das Komplementsystem auf dem alternativen Weg und auch das Bradykinin-System⁵⁸. Es induziert direkt und indirekt die Granulopoese, führt zur Aggregation und Degeneration von Thrombozyten und stimuliert die intravasale Gerinnung durch die Aktivierung von Faktor VII⁵⁸. Wird viel Endotoxin frei, so kann es zum septischen Schock kommen⁴⁸. Weiterhin kann es einen Blutdruckabfall und eine Kachexie verursachen. Aufgrund dieser spezifischen Effekte von LPS, wird die Stimulation von Vollblut mit LPS als ein in-vitro-Modell gram-negativer septischer Krankheitsbilder angesehen^{59;60}.

Das LPS-Modell in unseren Versuchen diente zur Untersuchung der Auswirkung einer gram-negativen Sepsis auf das Opioiderge System und die OR-Expression auf neutrophilen Granulozyten. Dabei ist bislang ungeklärt, ob das LPS eine Veränderung der OR-Dichte auf den neutrophilen Granulozyten hervorruft und ob dies gegebenenfalls direkt oder über verschiedene Zwischenschritte vermittelt wird. Denkbar ist hier zum einen die Freisetzung aus intrazellulären Pools, aber auch eine Neusynthese der OR. Diese Fragen könnten bei der durch LPS bedingten gram-negativen Sepsis eine Rolle für das Opioiderge System und damit für eine Therapie mit Opioiden spielen.

1.1.4. Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus (St.aureus) gehört zur Familie der Micrococcaceae. Diese grampositiven Bakterien sind kleine, kugelige Zellen (Kokken) von ca. 1 µm Durchmesser, die sich in Haufen oder Trauben anordnen. Der St.aureus ist ein fakultativer Anaerobier ⁶¹ und neben E. coli die häufigste Ursache nosokomialer Infekte wie Pneumonie und chirurgischer Wundinfekte. Aufgrund des zunehmenden Auftretens von Resistenzen, z. B. gegen Methicillin (MRSA, Methicillin resistenter St.aureus) ist dieser Keim von großer Bedeutung für die Klinik ⁶². Die zunehmende Inzidenz der gram-positivem Sepsis in den letzten 15 Jahren ist auf das vermehrte Auftreten von Staphylokokken-Infekten zurückzuführen ⁶³.

Die Bandbreite der durch St.aureus verursachten Symptome reicht vom einfachen Hautinfekt bis hin zum tödlichen Toxic Shock Syndrom (TSS). Dies liegt an der Fähigkeit des St.aureus verschiedene oberflächengebundene extrazelluläre Enzyme und Exotoxine zu produzieren und sezernieren (Koagulase, Alphatoxin, Protein A, Exfoliatin, Toxic-Schock-Syndrom-Toxin-1) ^{61;62}.

Die in der Zellwand enthaltene Teichon- und Lipoteichonsäure vermitteln eine Komplementaktivierung auf dem alternativem Weg und stimulieren Makrophagen zur Sekretion von Zytokinen wie z.B. TNF- α ^{61;64}. In-vivo Studien konnten zeigen, dass Lipoteichonsäure von St.aureus zu einem signifikanten Anstieg des TNF- α -Spiegels im Plasma führt⁶³.

Das Toxic-Schock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1) wird von ungefähr 1% der Stämme produziert⁶¹. Es ist ein Superantigen, das die klonale Expansion zahlreicher T-Lymphozyten induziert, was wiederum zur massiven Produktion von Zytokinen (z.B. TNF- α) führt. Diese rufen dann das klinische Bild des toxischen (septischen) Schocks hervor⁶¹.

Die Inkubation mit St.aureus diente in unserer Untersuchung als in-vitro-Modell der gram-positiven Sepsis, in dem die Auswirkung vitaler Bakterien auf das Opioiderge System und die OR-Dichte auf neutrophilen Granulozyten überprüft werden soll. Bislang ist unklar, ob und wie St.aureus einen Einfluss auf das Opioiderge System hat. Die Veränderung der OR-Dichte auf neutrophilen Granulozyten und damit eine Modifikation der Wirkung von endogenen und exogenen Opioiden stellen mögliche Folgeerscheinungen dar. Diese Fragen könnten für den Einsatz von Opioiden in der gram-positiven Sepsis eine wichtige Rolle spielen.

1.1.5. Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)

TNF- α ist ein toxisches, proinflammatorisches Zytokin, das von Makrophagen⁶⁵, T-Zellen und NK-Zellen gebildet wird. Zielzellen des TNF- α sind neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Tumorzellen, Endothelzellen und hämatopoetische Zellen. TNF- α bindet dabei über p55-, p75-, CD120a- und CD120b-Rezeptoren an die Zielzellen. Auf neutrophilen Granulozyten erhöht TNF- α die Expression der Komplementrezeptoren CD11b/CD18 und CD35, die eine verstärkte Migration und Phagozytose-Aktivität der neutrophilen Granulozyten vermitteln^{66;67}. CD11b/CD18 wird darüber hinaus mit der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Leber und der damit verbundenen Leberschädigung in Zusammenhang gebracht⁶⁸. TNF- α vermindert die Expression

von L-Selektin auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten, wodurch die Transmigration in entzündliches oder infektiöses Gewebe erleichtert und gesteigert wird⁶⁹. Als Zytokin reduziert TNF- α die Rezeptordichte für IL-8 (CXCR2) auf polymorphkernigen Leukozyten. Dies führt zur Reduktion von mobilisiertem intrazellulärem Calcium und vermindert die Chemotaxis, die über IL-8 vermittelt wird⁶⁵. Als zentrales Zytokin entzündlicher Prozesse aktiviert TNF- α das Endothel, steigert die Synthese von Prostaglandin E2 im Hypothalamus und löst somit als Pyrogen Fieber aus. Darüber hinaus spielt TNF- α auch bei der Aktivierung des Gerinnungssystems eine zentrale Rolle. Weiterhin ist TNF- α an der Pathogenese von gramnegativen Septikämien, beim Staphylokokken-Toxic-Schock-Syndrom und bei der Gruppe B Streptokokkensepsis⁷⁰ maßgeblich beteiligt. Durch TNF- α werden neutrophile Granulozyten zytotoxischer und haben eine erhöhte Fähigkeit auf schwächere Signale der Umgebung zu reagieren⁷¹.

Im Tiermodell kann die alleinige Applikation von TNF- α das klinische Bild eines septischen Schocks auslösen. Hierbei zeigt sich, dass das TNF- α eine wichtigere Rolle als die Bakteriämie an sich hat⁷². Die Ausschüttung des TNF- α kann als eine Überreaktion des Immunsystems angesehen werden, die entscheidend zur Entstehung septischer Krankheitsbilder beiträgt.

Für die Endotoxämie ist eine Aktivierung zentralnervöser OR beschrieben, wobei endogene Opiode hemmend auf die Makrophagenaktivität wirken und somit indirekt einen Einfluss auf die TNF- α -Produktion im Entzündungsgeschehen haben können (Abbildung 4). Weniger gut untersucht ist bislang die Rolle des peripheren Opioidergen Systems auf Immunzellen bei generalisierten Entzündungsprozessen. In unseren Versuchen sollte daher geklärt werden, ob durch TNF- α Veränderungen der OR-Expression auf neutrophilen Granulozyten induziert werden und inwiefern TNF- α in der Lage ist, bei entzündlichen Vorgängen das Opioiderge System zu modulieren. In Zusammenhang mit den LPS- und St.aureus-Inkubationsversuchen soll eine Differenzierung zwischen verschiedenen klinisch relevanten Immunstimulantien untersucht werden.

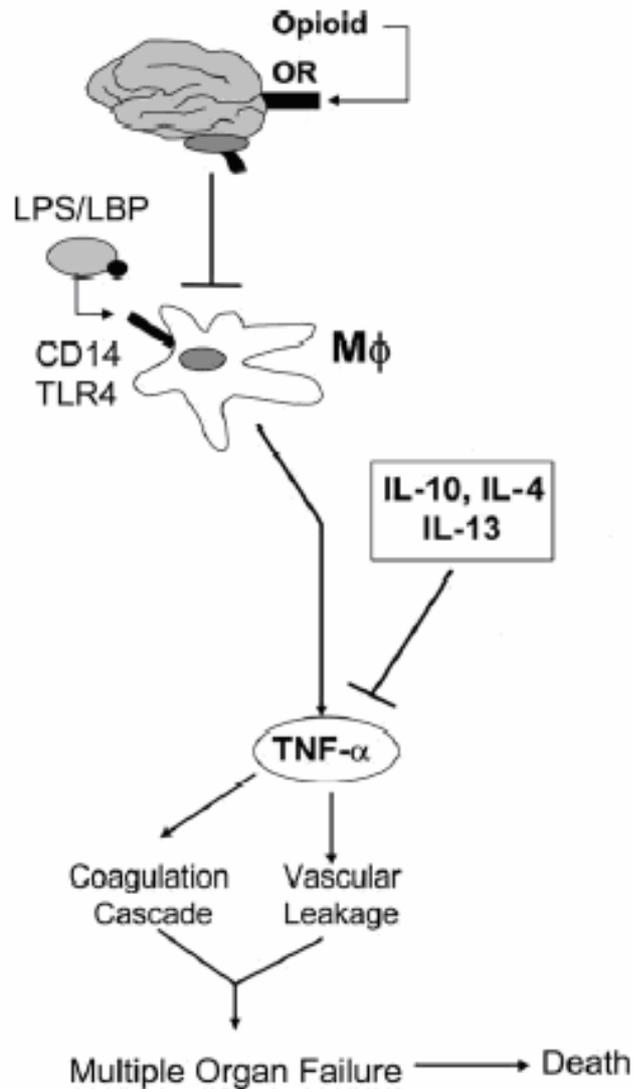


Abbildung 4: Schema über die Produktion und Wirkung von TNF- α (modifiziert nach ⁷³). Durch die Bindung von LPS/LBP an den CD14/TLR4-Rezeptor auf Makrophagen kommt es zur Produktion und Sekretion von TNF- α . Durch das freigesetzte TNF- α kommt es zur gesteigerten Gefäßpermeabilität und Aktivierung der Gerinnungskaskade. Dies kann zum Multiorganversagen und schließlich zum Tod führen. Über die Bindung von endogenen Opioiden an OR im zentralen Nervensystem kann diese TNF- α -Freisetzung zentral gehemmt werden. Darüber hinaus haben IL-10, IL-4 und IL-13 einen direkt hemmenden Einfluss auf TNF- α .

1.1.6. Durchflusszytometrisches Verfahren

In der zellulären Analytik wurden Aussagen über die funktionellen und morphologischen Vorgänge im Immunsystem hauptsächlich durch die Fluoreszenzmikroskopie getroffen. Diese Methodik ist jedoch zeitaufwendig und untersucherabhängig und ermöglicht daher nur Teilaussagen innerhalb eines eng begrenzten Anwendungsbereiches. Durchflusszytometrische Verfahren stellen Weiterentwicklungen der fluoreszenzmikroskopischen Ansätze dar und beinhalten den Vorteil, dass große Zellzahlen in kurzer Zeit gemessen werden können.

Die Durchflusszytometrie basiert auf dem Prinzip der gleichzeitigen Messung unterschiedlicher chemischer und physikalischer Eigenschaften einzelner Zellen, die an einem Messpunkt einzeln analysiert werden. Die zu untersuchende Zellsuspension wird dazu in das Zentrum eines Stroms aus partikelfreier Trägerflüssigkeit geleitet. Der Probenstrom nimmt dabei von einem 200µm großen, auf einen 10µm kleinen am Messpunkt befindlichen Durchmesser ab^{74;75}.

1.2.Zielsetzung der Studie

In dieser Studie sollen anhand einer Vollblutmethode eines gesunden Probandenkollektivs und eines septischen Patientenkollektivs folgende Fragestellungen durchflusszytometrisch an neutrophilen Granulozyten untersucht werden:

1. Welchen Einfluss hat die in-vitro-Stimulation von Vollblut gesunder Probanden mit TNF- α , LPS und Staphylococcus aureus auf die leukozytäre Expression von DOR, KOR und MOR?
2. Welchen Einfluss hat die in-vitro-Stimulation von Vollblut septischer Intensivpatienten mit TNF- α , LPS und Staphylococcus aureus auf die leukozytäre Expression dieser OR?
3. Unterscheidet sich die Expression von OR bei sedierten Intensivpatienten, die eine Analgesie mit Fentanyl bzw. Ketamin erhalten haben und eine Sepsis gemäß den Kriterien nach Bone aufweisen?

2. MATERIAL und METHODEN

Die Experimente wurden mittels einer Vollblutmethodik an neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Am Durchflusszytometer wurde die Expression von DOR, KOR und MOR nach Vorbehandlung mit verschiedenen Stimulantien bestimmt.

2.1. Probenmaterial

In dieser Arbeit wurden zwei Gruppen untersucht:

- 1.) 11 gesunde Probanden, deren Vollblut mit den drei verschiedenen Stimulantien LPS, TNF- α und St.aureus inkubiert wurde. Anschließend wurde die OR-Expression auf Leukozyten durchflusszytometrisch gemessen.
- 2.) 22 septische Intensivpatienten, aus deren Vollblut durchflusszytometrisch die leukozytäre OR-Expression bestimmt wurde. Bei weiteren 2 Intensivpatienten wurde darüber hinaus eine in-vitro-Stimulation des Blutes mit LPS, TNF- α und St.aureus durchgeführt.

2.1.1. Probanden

Die Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt (Studien-Nummer 94/04, Juli 2004). Untersucht wurde das Blut gesunder Männer im Alter zwischen 20 und 40 Jahren. Nach Aufklärung über den Inhalt, die Vorgehensweise und das Untersuchungsziel der Studie und schriftlichem Einverständnis wurden 11 männliche Probanden im Alter von 20 bis 40 Jahren in die Studie aufgenommen.

2.1.2. Ausschlusskriterien

Als Ausschlusskriterien für das gesunde Probandenkollektiv der Studie galten:

- Rauchen
- Allergien
- akute oder chronische Infektionen oder Erkrankungen
- immunsuppressive Therapie

2.1.3. Probengewinnung und –aufarbeitung

Die Probengewinnung war bei allen Probanden vergleichbar. Sie erfolgte einmalig im Zeitraum von 8 bis 11 Uhr morgens aus einer peripheren Vene der Ellenbeuge mit einer Kanüle. Dabei wurde darauf geachtet, dass nicht länger als eine Minute gestaut wurde. Das Volumen der Blutprobe betrug 4 ml, EDTA diente dabei als Antikoagulanz. Im Anschluss an die Blutentnahme wurden die Proben sorgfältig durchmischt und bis zur weiteren Aufarbeitung lichtgeschützt auf Eis gelagert.

2.1.4. Intensivpatienten

Untersucht wurde das Blut von Intensivpatienten, die das klinische Bild einer Sepsis aufwiesen. Die Patienten wurden durch den zuständigen Oberarzt der Intensivstation in die Studie aufgenommen, nachdem die Angehörigen über den Inhalt, die Vorgehensweise und das Untersuchungsziel der Studie aufgeklärt waren und schriftlich in die Studie eingewilligt hatten.

2.1.5. Auswahlkriterien

Als Auswahlkriterien für die Aufnahme der Intensivpatienten in die Studie mussten mindestens fünf der folgenden „Diagnostischen Kriterien der Sepsis“ erfüllt werden:

Allgemeine Variablen	<ul style="list-style-type: none">• Ödeme oder positive Bilanz ($> 20\text{ml/kgKG/die}$)• Hyperglycämie (Glukose $> 120\text{mg/dl}$, kein Diabetes)
Inflammation	<ul style="list-style-type: none">• C-reaktives Protein (CRP) > 2 Standardabweichungen (SD) oberhalb der Norm• Procalcitonin (PCT) > 2 SD oberhalb der Norm
Hämodynamik	<ul style="list-style-type: none">• $\text{SvO}_2 > 70\%$• Herzindex $> 3.5 \text{ l/min/m}^2$
Organdysfunktion	<ul style="list-style-type: none">• Hypoxämie ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$)• Oligurie (Urin $< 0.5 \text{ ml/kg/h}$ über mindestens 2h)• Kreatinin-Anstieg 0.5 mg/dl• Gerinnungsstörung (INR > 1.5 oder aPTT $> 60 \text{ sec}$)• Ileus (fehlende Darmgeräusche)• Thrombocytopenie ($< 100.000/\mu\text{l}$)• Hyperbilirubinämie (Gesamtbilirubin $> 4 \text{ mg/dl}$)
Gewebeperfusion	<ul style="list-style-type: none">• Hyperlactatämie $> 1 \text{ mmol/l}$• reduzierte Kapillarfüllung

Abbildung 5: Diagnostische Kriterien der Sepsis. Ergänzung der Consensus Conference 2001 zum SIRS (INR = International Normalized Ratio, aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit, SvO₂ = Pulmonalarterielle, gemischtvenöse Sauerstoff-Sättigung, PaO₂ = arterieller Sauerstoffgehalt, FiO₂ = inspiratorisch Sauerstoffkonzentration) ⁴⁵.

Des Weiteren wurden die Patienten nach dem Analgesieverfahren in zwei Gruppen eingeteilt. Unterschieden wurde zwischen einer Analgesie mit Fentanyl und S-Ketamin.

Die Patienten der Fentanyl-Gruppe erhielten initial 3 µg/kg KG/h als Analgetikum via Perfusor bis zu einem Maximum von 10 µg/kgKG/h. Die S-Ketamin-Gruppe erhielt initial 2 mg/kgKG/h, bis zu einem Maximum von 6 mg/kgKG/h als Analgetikum via Perfusor. In beiden Gruppen wurde die Dosis nach klinischem Bedarf (subjektive Einschätzung der Schmerzfreiheit der Patienten durch das Pflegepersonal, Schmerzáußerungen wie Abwehrbewegungen, Gesichtverziehen) nach oben oder unten korrigiert. Die Sedierung erfolgte in allen Fällen durch die Gewichtsadaptierte Gabe von Propofol (Disoprivan® 2%) in einer Dosierung von 2,5 mg/kgKG/h. Die Dosisanpassungen sowie die Initialbehandlung der Patienten erfolgten durch einen studienunabhängigen Arzt, so dass der doppelblinde Modus gewahrt war. Dem Untersucher der Blutproben war zum Zeitpunkt der Messung und Auswertung die Gruppenzugehörigkeit der Patienten nicht bekannt.

Um die Intensivpatienten in Bezug auf die Erkrankung und Prognose vergleichen zu können, wurde der APACHE-II-Score mit einer standardisierten Schweregradeinteilung verwendet ⁷⁶.

2.1.6. Probenaufarbeitung

Den Intensivpatienten wurde im Zeitraum zwischen 8 und 11 Uhr 4 ml Blut aus dem liegenden arteriellen Zugang entnommen. EDTA diente dabei als Antikoagulanz. Die ersten 5 ml arterielles Blut wurden wegen der möglichen Verunreinigung mit Heparin verworfen. Im Anschluss an die Blutentnahme wurden die Proben sorgfältig durchmischt und bis zur weiteren Aufarbeitung lichtgeschützt auf Eis gelagert.

2.2. Inkubation mit Stimulantien

Das Vollblut (100 µl) aller gesunden Probanden, sowie zweier Intensivpatienten wurde nach der folgenden Methodik mit den Stimulantien inkubiert:

20 µl *Staphylococcus aureus* (Bakterienkonzentration 10^9 /ml)

10 µl LPS (100 ng/ml)

10 µl TNF- α (100 ng/ml)

Die Inkubation erfolgte bei 37°C in einem Wärmeschrank unter Zugabe von 5% Kohlendioxid (CO₂). Die Inkubationszeiten betragen für *St.aureus* 15, 30 und 60 Minuten, sowie drei und sechs Stunden. Die Inkubationszeit für LPS und TNF- α betrug drei, sechs, zwölf und vierundzwanzig Stunden. Vor der OR-Markierung wurden die Proben mit 2 ml PBS-Puffer versetzt, gut vermischt und für 5 Minuten bei 4°C und 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde eine Vitalitätsprüfung der neutrophilen Granulozyten mittels Tryptanblau durchgeführt, die zeigte, dass die Zellen einen Zeitraum von 24 Stunden überleben und weiterhin vital sind⁷⁷. Auf eine Vitalitätskontrolle wurde bei vergleichbarem Aufarbeitungsschema daher in dieser Untersuchung verzichtet.

Um zu zeigen, dass Veränderungen der OR-Expression auf Granulozyten durch die Stimulantien und nicht durch unspezifische Effekte, wie lange Inkubationszeit oder Kontakt mit Fremdoberflächen erfolgte, wurde eine Versuchsreihe mit den verschiedenen Inkubationszeiten, aber ohne Verwendung eines Stimulans als Negativkontrolle durchgeführt.

2.3. Bestimmung der Opioidrezeptoren DOR, KOR und MOR

2.3.1. Testprinzip

Mit diesem in-vitro-Assay wird die quantitative Expression der Oberflächenrezeptoren DOR, KOR und MOR auf neutrophilen Granulozyten im Vollblut nachgewiesen. Fluoresceinisothiocyanat-(FITC-)-markierte polyklonale OR-Antikörper (OR-AK), die gegen die oben genannten Rezeptoren gerichtet sind, dienen als Marker. Die Grünfluoreszenz der FITC-markierten OR-AK wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Zur Eichmessung und Einstellung des Durchflusszytometers wurden FITC-markierte Anti-Human-IgG-Antikörper verwendet.

2.3.2. Inkubation mit den FITC-markierten OR-Antikörpern

Die Markierung der Oberflächenrezeptoren fand bei Raumtemperatur statt. Jeweils 100 µl EDTA-Vollblut wurden in ein Probenröhrchen gegeben. Der Probe wurden 10 µl des FITC-markierten OR-Antikörpers zugegeben. Als Eichmessung wurde jeweils eine Probe mit FITC-markierten Anti-Human-IgG-Antikörpern inkubiert, um Messabweichungen durch granulozytäre Autofluoreszenz zu eliminieren. Als Kontrolle wurde jeweils eine Probe mit NaCl-0,9% inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze gemischt und 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert, dann mit 2 ml PBS-Puffer versetzt. Die Proben wurden gut durchgemischt und zentrifugiert (5 Minuten, 4°C, 1200 U/min). Der Überstand wurde verworfen. Zu jedem Röhrchen wurden 2 ml FACS[®] Brand-Lysing-Solution zur Fixierung und Lyse der Erythrozyten gegeben. Die Probenröhrchen wurden gemischt und für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (5 Minuten, 4°C, 1200 U/min) und der Überstand dekantiert. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt. Zur Messung der Probe im FACS-Gerät wurden 500µl PBS-Puffer hinzugegeben. Der beschriebene Arbeitsablauf galt für alle verwendeten Antikörper. Die Fluoreszenzintensität der Ansätze konnte nun durchflusszytometrisch bestimmt werden. Bei Raumtemperatur wurden die

Messungen innerhalb von 60 Minuten durchgeführt. Lichtgeschützt und eisgekühlt waren die Proben für 24 Stunden haltbar.

2.3.3. Auswahl geeigneter OR-Antikörper

Zur Auswahl standen mehrere polyklonale Antikörper gegen eine bestimmte Struktur in der heptahelikalen Transmembrandomäne von DOR, KOR und MOR. Dabei sind Antikörper mit dem Präfix „N“ gegen den N-Terminus des Rezeptors, gerichtet, während Antikörper mit dem Präfix „C“ den C-Terminus detektieren.

DOR (N-18), (M20), (H60)

KOR (N-19), (C20), (H70)

MOR (N-20), (C20)

In Vorversuchen wurde die Bindung der oben genannten Antikörper an den jeweiligen OR überprüft und im Vollblutansatz die Fluoreszenzintensität mit derjenigen von FITC-markierten Anti-Human-IgG-Antikörpern verglichen. Diejenigen Antikörper, die in den Vorversuchen zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität führten, wurden von der Firma Santa Cruz mit FITC markiert, so dass der Inkubationsschritt mit einem zweiten Antikörper zur Detektion des Anti-OR-Antikörpers entfallen konnte

Zur besseren Darstellung wurde für die Vorversuche die Fluoreszenzintensität des FITC-anti-human-IgG-Ansatzes auf 10^1 eingestellt, während bei den Stimulationsexperimenten entsprechend der Autofluoreszenz bzw. unspezifischen Bindung der Zellen eine Justierung von $<10^1$ vorgenommen wurde.

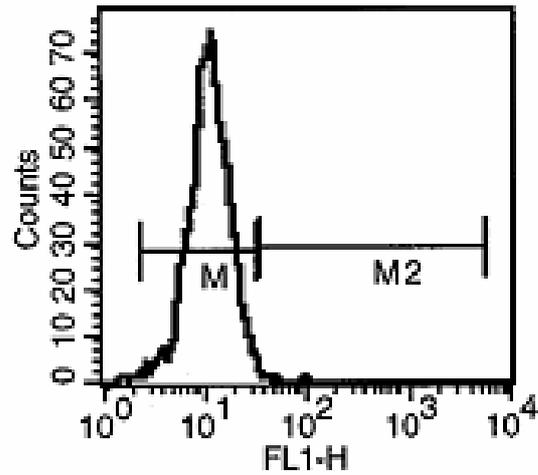


Abbildung 6: Eichmessung auf 10^1 mit FITC-markierten Anti-Human-IgG-Antikörpern ohne Verwendung eines Stimulans.

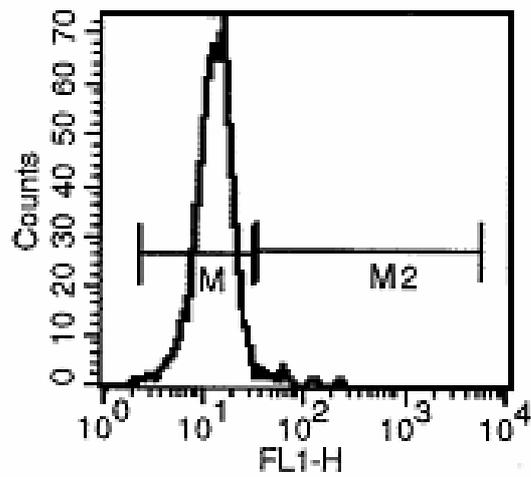


Abbildung 7: Inkubation von unstimuliertem Vollblut mit anti-MOR (C-20): Es findet sich im Vergleich zur Kontrolle mit FITC-anti-human-IgG kein Anstieg des Fluoreszenzsignals.

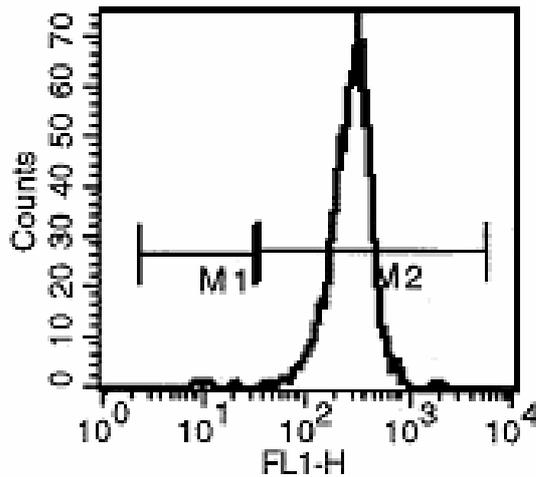


Abbildung 8: Inkubation von unstimuliertem Vollblut mit anti-MOR (N-20): Im Vergleich zu Abbildung 6, zeigt sich eine Zunahme der Fluoreszenz als Ausdruck der Bindung des FITC-markierten Antikörper an MOR.

MOR (N-20), DOR (N-18), KOR (N-19) bewirkten als OR-Antikörper, die gegen den auf der Zelloberfläche exprimierten N-terminalen Anteil des Opioidrezeptors gerichtet sind, eine Fluoreszenzsteigerung und wurden in den nachfolgenden Experimenten eingesetzt.

2.4. Die Durchflusszytometrie

2.4.1. Optisches System

Die Analyse der Proben wurde an einem FACS-Calibur®-Durchflusszytometer (Firma Becton Dickinson) durchgeführt, der mit einem Argon-Ionenlaser mit 15 mW Leistung und einer Emissionslinie von 488 nm ausgestattet war. Zur Auswertung der Messungen diente ein Power-Mac®-Computer der Firma Apple mit der Auswertesoftware Cell Quest® (Firma Becton Dickinson).

Das Durchflusszytometer ist ein optisches System, in dem Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner Partikel analysiert werden. Die Ergebnisse basieren

auf der gleichzeitigen Messung mehrerer biochemischer und physikalischer Parameter jeweils einer Zelle. Um die Proben durchflusszytometrisch untersuchen zu können, muss eine Suspension von Einzelzellen vorliegen. Wird diese Voraussetzung erfüllt, ist prinzipiell jede Zellart für die durchflusszytometrische Analyse geeignet. Die Zellen werden im Durchflusszytometer hintereinander, quasi wie im „Gänsemarsch“ zum Messpunkt geleitet, wo sie mit Licht bestrahlt werden. Dort werden Signale in Form von Fluoreszenz und Lichtstreuung, die beim Kontakt des Partikels mit einem Lichtstrahl entstehen, im Durchflusszytometer gemessen. Dies geschieht anhand von Detektionssystemen, die die Fluoreszenz- und Streulichtabgabe jedes Partikels messen. Pro Minute stehen dann mehr als 10^4 Zellen zur Analyse bereit.

Das Durchflusszytometer besteht aus einem Anregungsteil, in dem ein Laserstrahl mit Hilfe von prismatischen Linsen so verformt wird, dass er am Messpunkt einen elliptischen Durchmesser von ca. $20 * 60 \mu\text{m}$ besitzt, und einem Detektionsteil, in dem das durch die Ablenkung am Partikel entstehende Streulicht gemessen wird. Dabei wird zwischen Messung des Vorwärtsstreulichts (Forwardscatter = FSC) und des Seitwärtsstreulichts (Sidewardscatter = SSC) unterschieden. FSC-Detektion und SSC-Detektion stehen im rechten Winkel zueinander. Hierdurch wird eine gute räumliche Auflösung bei gleichzeitiger ausreichender Signalintensität erzielt. Fotozellen und Fotodioden im Detektionsbereich, wandeln die Lichtsignale in elektrische Signale um, die wie folgt verarbeitet werden: Das elektrische Signal ist abhängig von der Intensität des Lichtstrahls. Da das Seitwärtsstreulicht (SSC) und die Fluoreszenz nur sehr schwache Signale erzeugen, werden sie mittels einer Photoröhre verstärkt. In dieser Photoröhre werden Elektronen nach dem Auftreten von Photonen emittiert. Im weiteren Verlauf entsteht eine Kettenreaktion, ausgelöst durch die emittierten Elektronen, die an einer benachbarten Elektrode neue Elektronen ablösen, welche ihrerseits weitere Elektronen freisetzen. Durch diese Kettenreaktion wird das Ursprungssignal entweder logarithmisch oder linear verstärkt. Um zwischen zu verwertenden Signalen und Hintergrundrauschen differenzieren zu können, besitzt das Gerät eine elektronische Schwelle (Treshhold), die von einem bestimmten Parameter, in unserem Fall dem

Vorwärtsstreulicht (FSC) ausgelöst wird.

Die Zellgröße, die Zelloberfläche, die Zellform und die Granularität beeinflussen die Lichtstreuung, d. h. den Anteil der 90°-Ablenkung, so dass eine physikalische und funktionelle Charakterisierung der Zellen erfolgen kann. Die Größe der Zellen korreliert dabei mit dem Vorwärtsstreulicht (FSC), die Dichte bzw. Granularität der Zellen hingegen mit dem Seitwärtsstreulicht (SSC). Anhand des Vorwärts- bzw. des Seitwärtsstreulichtes weist jede Zellpopulation ein eigenes charakteristisches Verteilungsmuster auf. Dadurch können Leukozytensubpopulationen wie neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten voneinander abgegrenzt werden.

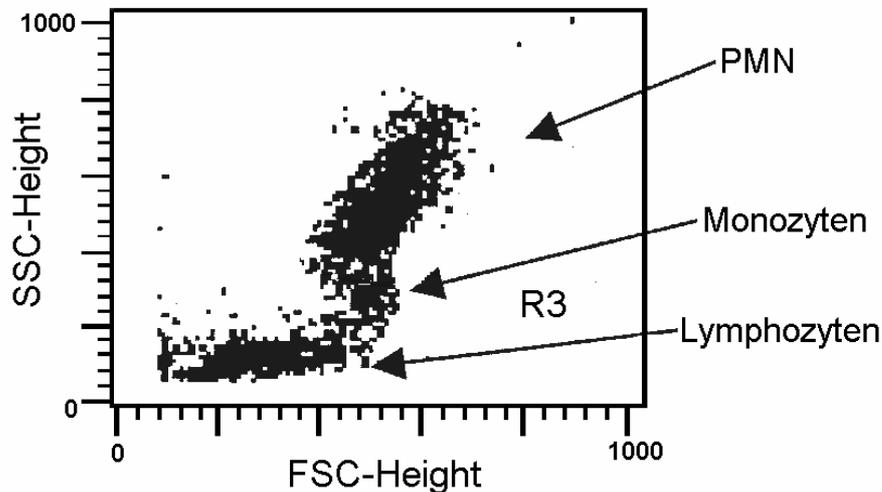


Abbildung 9: FSC/SSC-Diagramm (Originalregistrierung, FSC =Vorwärtsstreulicht, SSC=Seitwärtsstreulicht) mit Darstellung der verschiedenen Leukozyten Subpopulationen (Lymphozyten, Monozyten und polymorphkernige Neutrophile [PMN]).

Um eine ausreichend hohe Qualität der durchflusszytometrischen Messung zu gewährleisten, muss die Lichtquelle mehrere Funktionen aufweisen. Sie muss neben einer hohen Intensität eine konstante Strahlungsleistung haben, und das Emissionsspektrum muss im Absorptionsbereich der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe liegen. Der Argon-Ionenlaser mit einer Emissionslinie von 488 nm erfüllt diese Voraussetzungen.

2.4.2. Flüssigkeitssystem

Das Flüssigkeitssystem im FACS-Calibur®-Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson besteht aus zwei initial getrennten Leitungen, die sich später vereinigen. Unter konstantem Druck wird eine zellfreie Trägerflüssigkeit (FACS-Flow®, Firma Becton Dickinson) in die Messzelle gepumpt und anschließend in den Abfalltank geleitet. Durch eine Stahlkapillare, deren Ende auf das Zentrum der Messküvette gerichtet ist, wird die Zellsuspension aus dem Probenröhrchen gesaugt. Verlässt die Zellsuspension die Stahlkapillare, bewirkt die Trägerflüssigkeit, die parallel dazu einen laminaren Hüllstrom erzeugt, dass sich der Probenstrom verengt. Diese Verengung führt dazu, dass die Zellen einzeln hintereinander weitergeführt werden, aber gemäß dem Bernoullischen Prinzip auch beschleunigt werden. Pro Minute stehen mehr als 10^4 Zellen zur Analyse bereit. Dieser Vorgang wird als „hydrodynamische Fokussierung“ bezeichnet.

2.5. Darstellung der Messergebnisse

Die Darstellung der Messergebnisse erfolgte als Histogramm sowie als „Dot-Plot“-Grafik. In der Histogrammdarstellung wird die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten der ausgewählten Zellen analysiert. Dazu werden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten in verschiedene Klassen (Intensitätskanäle) eingeteilt und gegen die absolute Zellzahl aufgetragen. Die Verteilung erfolgt abhängig von der zuvor gewählten Signalverarbeitung und elektrischen Spannung des Zytometers.

Um die Zellpopulation darzustellen, wurde ein Punkthistogramm (Dot-Plot) gewählt. Jeder Punkt in der Grafik steht hierbei für eine bestimmte Zelle mit ihren Eigenschaften (Zellgröße, Zellform, Zelloberfläche und Granularität) und ist der Schnittpunkt der zwei Messparameter. Dabei korrelieren Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC), sowie Rot- und Grünfluoreszenz.

Pro Messung werden also für jede einzelne Zelle vier Parameter gemessen:

- Vorwärtsstreulicht (FSC)
- Seitwärtsstreulicht (SSC)
- Grünfluoreszenz (FL 1)
- Rotfluoreszenz (FL 2)

Durch Kombination dieser Parameter kann eine Darstellung in einem Diagramm erfolgen. Anhand des FSC/SSC-Diagramms ist eine Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen möglich (siehe Abbildung 10).

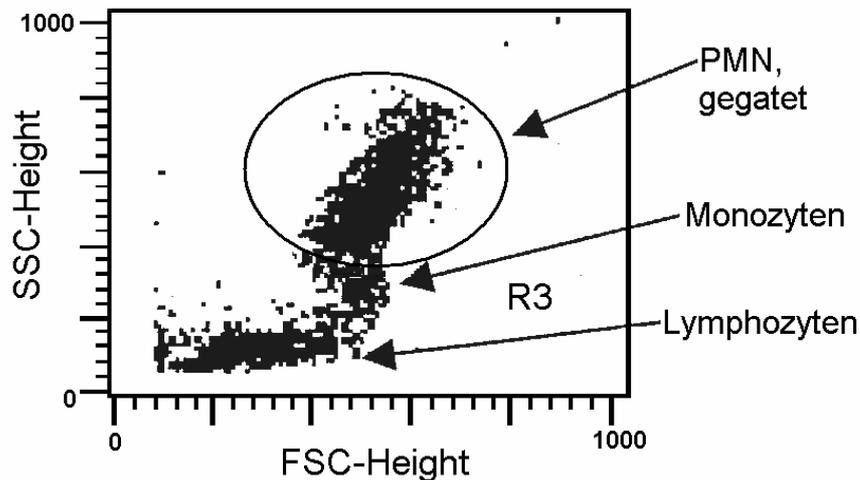


Abbildung 10: FSC/SSC-Diagramm (Originalregistrierung, FSC=Vorwärtsstreulicht, SSC=Seitwärtsstreulicht) mit Anordnung der verschiedenen Zellpopulationen (Lymphozyten, Monozyten und polymorphkernige Neutrophile [PMN]). Im nachträglich gesetzten Gate (Kreis) sind selektiv die neutrophilen Granulozyten ausgewertet. Die so erfasste Fluoreszenzintensität wird nachfolgend in einem separaten Histogramm dargestellt.

Um die Fluoreszenzintensität der Granulozyten getrennt von den anderen Zellpopulationen auszuwerten, wurden (wie in Abbildung 10 dargestellt) spezielle Auswertfenster (Gate) gesetzt.

Die Leukozytensubpopulationen setzen sich zusammen aus Lymphozyten (20-40%), Monozyten (2-8%) und Granulozyten (50-70%). Die „Zellwolke“ im Auswertfenster beinhaltet nicht nur neutrophile Granulozyten, sondern auch basophile und eosinophile Granulozyten. Da aber die neutrophilen Granulozyten mit 55 - 70% den beiden anderen Subpopulationen quantitativ deutlich überlegen sind (eosinophile 2 - 4% und basophile 0 - 1%)¹, kann die „Zell-Wolke“ stellvertretend für die neutrophilen Granulozyten angenommen und der Messfehler vernachlässigt werden. Die restlichen 30-40% der Zellen sind, wie oben bereits erwähnt die Lymphozyten und Monozyten, diese liegen nicht im Gate.

Die Grundeinstellung des Durchflusszytometers erfolgte anhand der Inkubation von Vollblut mit FITC-markierten anti-Human-IgG-Antikörpern und wird vor der Messung der untersuchungsrelevanten Zellsuspension durchgeführt. Die Autofluoreszenz unmarkierter Zellen wird definitionsgemäß mit $<10^1$ angegeben und entsprechend wurde das Durchflusszytometer anhand des FITC-anti-Human-IgG-behandelten Ansatzes eingestellt (Gate M1 in Abbildung 11). Diese Einstellung des Durchflusszytometers wird bei den anschließenden Messungen der Proben beibehalten. Durch diese Verfahren werden Messunregelmäßigkeiten durch eine unspezifische Bindung FITC-markierter Antikörper oder durch Autofluoreszenz der Zellen ausgeschlossen. Ausgehend von dieser Grundeinstellung können nun im Rahmen der Messung von Probenansätzen Auswertfenster gesetzt werden, die die Unterscheidung der nicht-fluoreszierenden, „nicht exprimierenden“ Zellen von den fluoreszierenden, „exprimierenden“ Zellen erlauben.

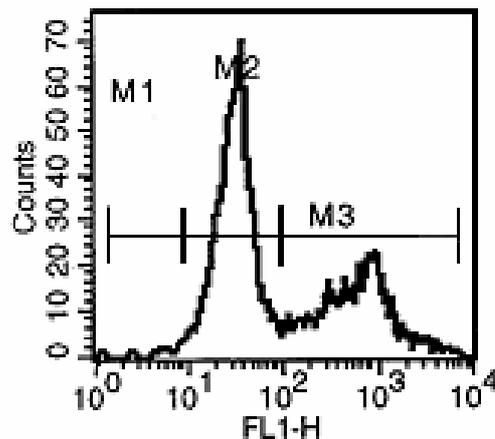


Abbildung 11: Gate M1: Negativbereich (Autofluoreszenz und unspezifische Bindung). Gate M2: Zellen ohne erhöhte Rezeptordichte („niedrig exprimierende“ Zellen). Gate M3: Zellen mit erhöhter Rezeptordichte („vermehrt exprimierende“ Zellen). Dargestellt ist die Messung einer unstimulierten Blutprobe unter Verwendung des MOR-Antikörpers N-20.

Die nicht-fluoreszierenden Zellen befinden sich im Auswertbereich M1. Die fluoreszierenden, „exprimierenden“ Zellen im Auswertbereich M2 bzw. M3. Dabei werden „niedrig exprimierende“ Zellen von „vermehrt exprimierenden“ Zellen unterschieden (siehe Abbildung 11), im weiteren Verlauf werden die in M2 dargestellten Zellen als „niedrig exprimierende“ und die in M3 analysierten Zellen als „vermehrt exprimierende“ Zellen bezeichnet.

Die einheitliche Grundeinstellung des Durchflusszytometers im IgG-Ansatz ermöglicht hierbei objektive Vergleiche zwischen verschiedenen Probenansätzen.

2.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Messergebnisse wurde mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS Version 14.0 durchgeführt. Es wurde der Mittelwert aus den Messergebnissen aller Probanden zu jedem Messzeitpunkt gebildet und die Standardabweichung errechnet. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde eine Ranganalyse für verbundene Stichproben mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt. Dieser nichtparametrische Test prüft die Null-Hypothese. Zur Verhinderung der Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen wurde die Bonferroni-Korrektur angewandt. Die verschiedenen Messzeitpunkte sind hinsichtlich der Messergebnisse vergleichbar. Für Vergleiche zwischen zwei Messzeitpunkten wurde nach Prüfung auf Normalverteilung der T-Test für verbundene Stichproben angewandt. Das Signifikanzniveau dieser Arbeit wurde mit $p < 0,05$ angesetzt.

3. ERGEBNISSE

3.1. OR-Expression nach Stimulation mit Staphylococcus aureus

Nachfolgend sind die durchflusszytometrisch gemessenen Veränderungen der Rezeptordichte auf den Granulozyten anhand einer Probanden-Versuchsreihe dargestellt. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen zum einen, wie sich die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der Granulozyten verändert (siehe X-Achse, FL1-H) und zum anderen wie bei Verlängerung der Inkubationszeit ein höherer Prozentsatz der Zellen den Opioidrezeptor (in diesen Abbildungen den MOR) verstärkt exprimieren. Dies lässt sich anhand der Zunahme der Fläche unter dem Peak im Auswertefenster M3 darstellen.

In Abbildung 12 ist zu erkennen, dass sich zwei Gipfel darstellen. Der größere Gipfel mit einer MFI von 41,42 und mit einem Zellanteil von 90,59%, der kleinere Gipfel mit 9,35% der Zellen und einer MFI von 805,84. Es lässt sich hieraus schließen, dass der Hauptanteil der Granulozyten verhältnismäßig wenige OR auf der Zelloberfläche exprimiert und dass ein geringer Prozentsatz von Granulozyten vermehrt OR auf ihrer Zelloberfläche aufweisen.

Je länger die Inkubation mit dem Stimulans, im genannten Beispiel St.aureus, andauerte, desto höher war der Prozentsatz vermehrt exprimierender Zellen:

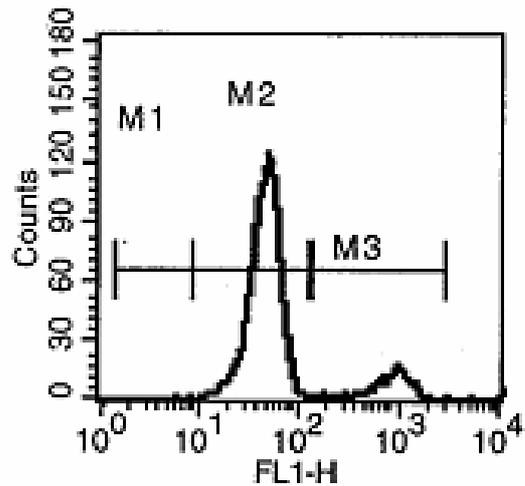


Abbildung 12: Histogramm der unstimulierten Kontrolle nach Inkubation mit anti-MOR (N-20). M2: Zellen mit geringer Fluoreszenz („niedrig exprimierend“) M3: „vermehrt exprimierende“ Zellen mit erhöhter OR-Dichte.

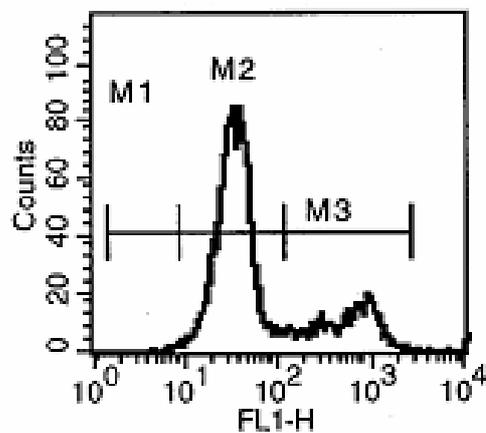


Abbildung 13: Histogramm nach 15 Minuten Inkubation mit St.aureus und Verwendung von anti-MOR (N-20). M1: „niedrig exprimierende“ Zellen (MFI 29,69 / 80,49%), M2: „vermehrt exprimierende“ Zellen (MFI 567,42 / 19,24%).

Die Messung nach 30-minütiger Inkubation mit St.aureus (Abbildung 14) zeigt deutlich, wie die Fläche unter dem zweiten Peak größer wird. Die MFI des linken Peaks liegt bei 27,14, das Gate enthält 65,09% der Zellen. Der rechte Peak hat eine MFI von 528,03 und beinhaltet 34,04% der Zellen.

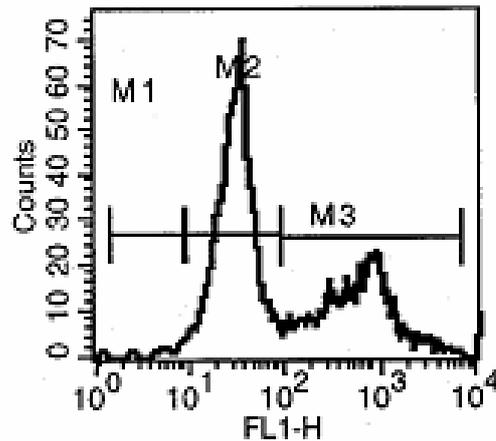


Abbildung 14: Histogramm nach 30 Minuten Inkubation mit St.aureus und Verwendung von anti-MOR (N-20). M1: „niedrig exprimierende“ Zellen (MFI 27,14 / 65,09%), M2: „vermehrt exprimierende“ Zellen (MFI 528,03/ 34,04%).

Im zeitlichen Verlauf dieser Versuchsreihe wird diese Tendenz noch eindrucksvoller.

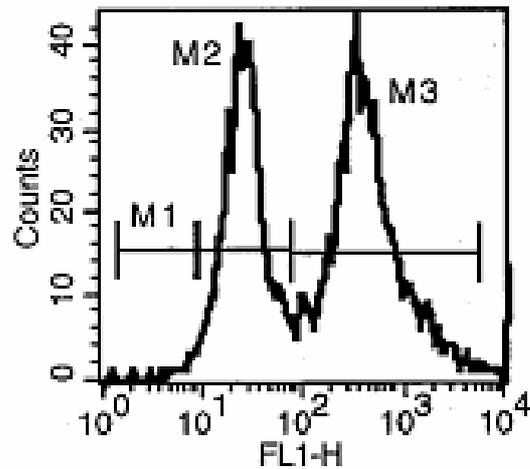


Abbildung 15: Histogramm nach 60 Minuten Inkubation mit St.aureus und Verwendung von anti-MOR (N-20). M1: „niedrig exprimierende“ Zellen (MFI 23,50 / 40,76%), M2: „vermehrt exprimierende“ Zellen (MFI 333,76 / 58,24%).

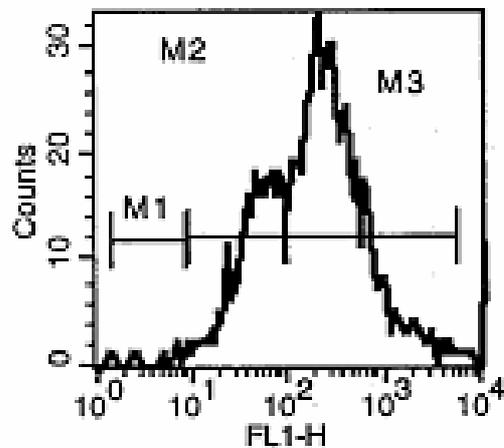


Abbildung 16: Histogramm nach drei Stunden Inkubation mit St.aureus und Verwendung von anti-MOR (N-20). M1: „niedrig exprimierende“ Zellen (MFI 45,73 / 29,61%), M2: „vermehrt exprimierende“ Zellen (MFI 241,44 / 68,21%).

Abbildung 17 zeigt, dass es zu einer Umkehr der Verteilung der Zellen gekommen ist, so dass überwiegend „vermehrt exprimierende“ Zellen (70,29%) vorliegen, die eine hohe Opioidrezeptordichte (MFI 220,67) aufweisen. Gleichzeitig sind es nur noch 27,31% der Granulozyten in Gate M2, diese zeigen keine erhöhte Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche (MFI 50,48). Einschränkend ist zu erwähnen, dass mit steigenden Inkubationszeiten die eindeutige Abgrenzbarkeit in den jeweiligen Auswertefenstern nachlässt, da beide Peaks verschmelzen.

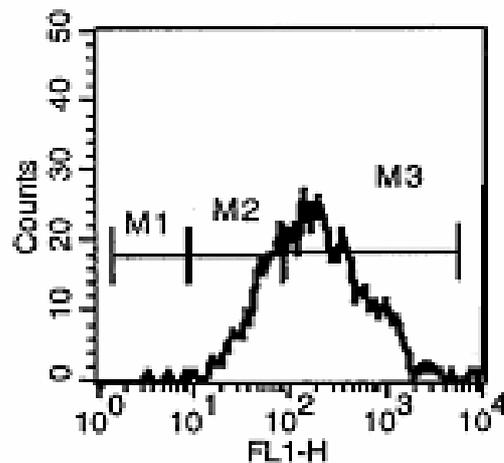


Abbildung 17: Histogramm nach sechs Stunden Inkubation mit St.aureus und Verwendung von anti-MOR (N-20). M1: „niedrig exprimierende“ Zellen (MFI 50,48 / 27,31%), M2: „vermehrt exprimierende“ Zellen (MFI 220,67 / 70,29%).

3.1.1. DOR

Zunächst wurde der Einfluss von St.aureus auf die DOR-Expression neutrophiler Granulozyten untersucht. 20 ml St.aureus (10^9 /ml) erhöhten schon nach 15 min signifikant den Prozentsatz der DOR-exprimierenden Granulozyten von 2,14% auf 14,75%. Die Verlängerung der Inkubation auf 30, 60, 180 und 360 Minuten führte zu einer weiteren Erhöhung bis auf einen maximalen Anteil von 57,92% der Zellen im positiven Auswertefenster M3.

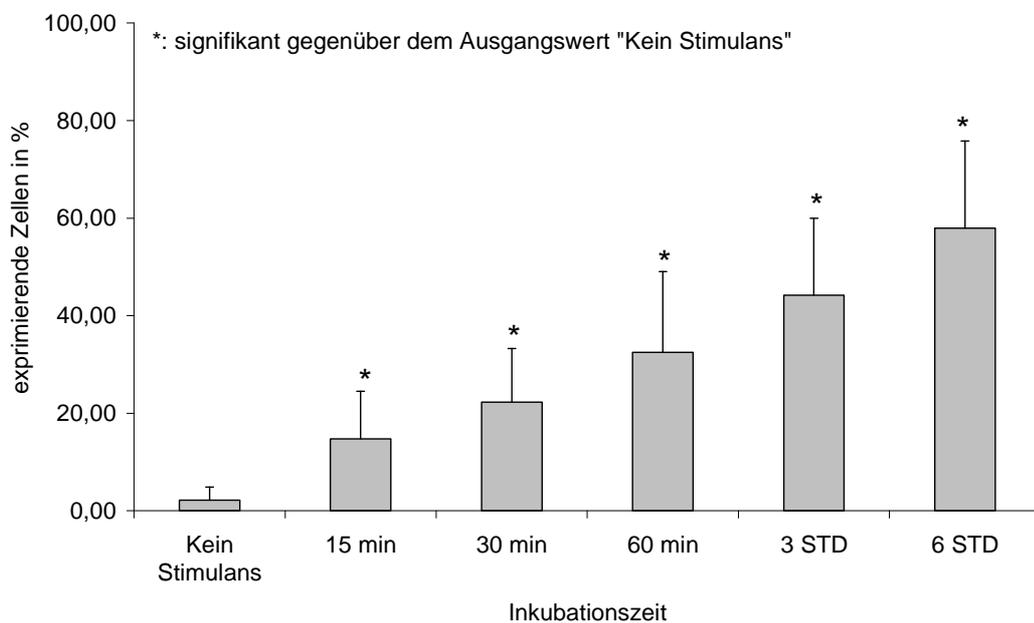


Abbildung 18: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Inkubation mit St.aureus den DOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 1.

Hingegen bleibt die mediane Fluoreszenzintensität der Granulozyten im Gate M2 sowie im Gate M3 annähernd konstant. Dabei wurden mit einem Fluoreszenzmedian von 47,08 in Gate M2 „niedrig exprimierende“ neutrophile Granulozyten, mit einer MFI von 204,93 in Gate M3 die „vermehrt exprimierenden“ Granulozyten erfasst. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Aktivierungsgrad in den einzelnen Auswertefenstern durch verlängerte Inkubation mit *St.aureus* nicht weiter gesteigert wird.

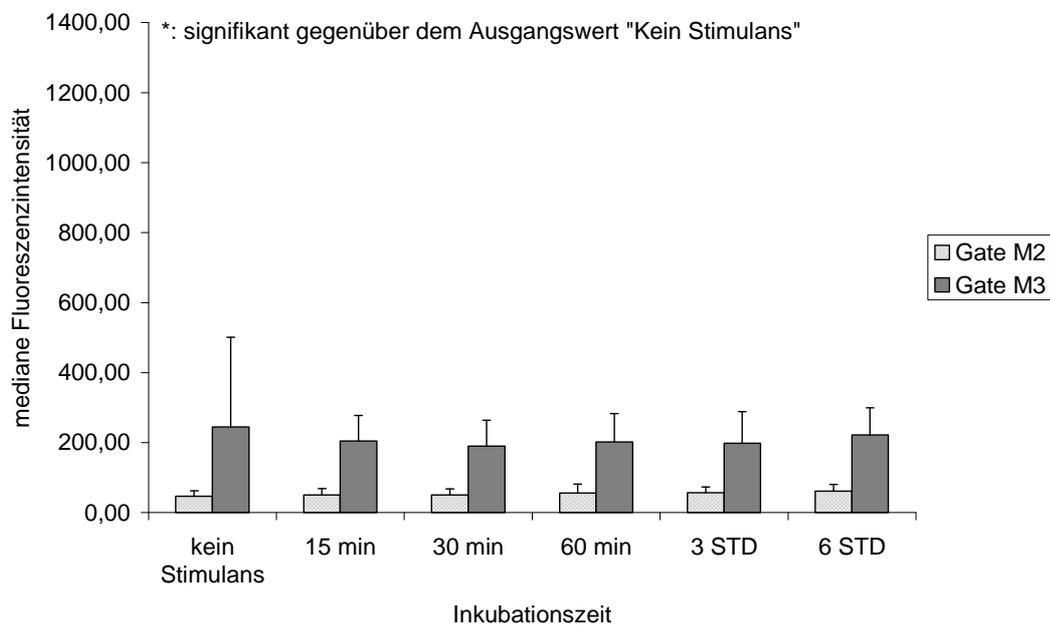


Abbildung 19: Expression des DOR auf PMN nach Inkubation mit *St.aureus* gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 2 und Tabelle 3.

3.1.2. KOR

Nach Markierung mit Anti-KOR-Antikörpern zeigte sich ein ähnliches Verlaufsbild wie für DOR. Nach Inkubation mit St.aureus wurde der Anteil der vermehrt KOR-exprimierenden Granulozyten gesteigert. Nach 15 Minuten erhöhte sich der Anteil der „vermehrt exprimierenden“ Granulozyten signifikant von 5,41% auf 24,19%. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 30, 60, 180 und 360 Minuten führte zu einer weiteren Zunahme der „vermehrt exprimierenden“ Zellen auf maximal 67,40%.

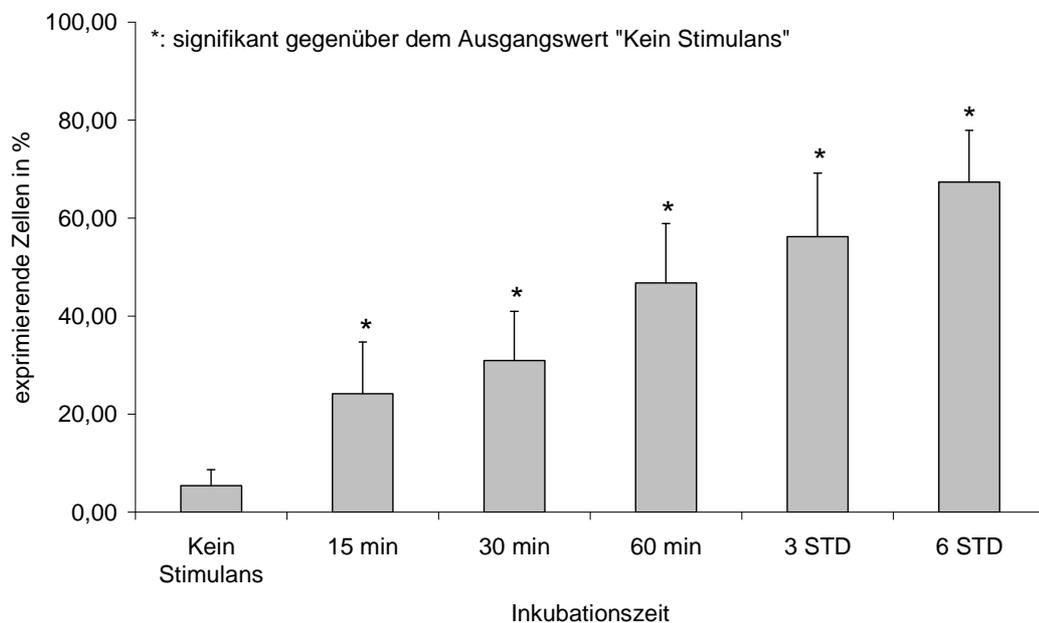


Abbildung 20: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit St.aureus den KOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 4.

Abbildung 21 zeigt, dass sich die mediane Fluoreszenzintensität der Granulozyten nach Stimulation mit *St.aureus* im Gate M2 und Gate M3 mit ansteigender Inkubationszeit nicht signifikant verändert. Der Abfall im Gate M3 vom Ausgangswert auf den 15 Minuten-Wert ist nicht signifikant ($p = 0,854$). Der signifikante Unterschied zum Zeitpunkt $t = 15$ Minuten ($p = 0,018$) und $t = 30$ Minuten ($p = 0,013$) im Vergleich zum Ausgangswert „kein Stimulans“ erklärt sich durch den sehr niedrigen absoluten Messwert von $56,64 \pm 7,69$).

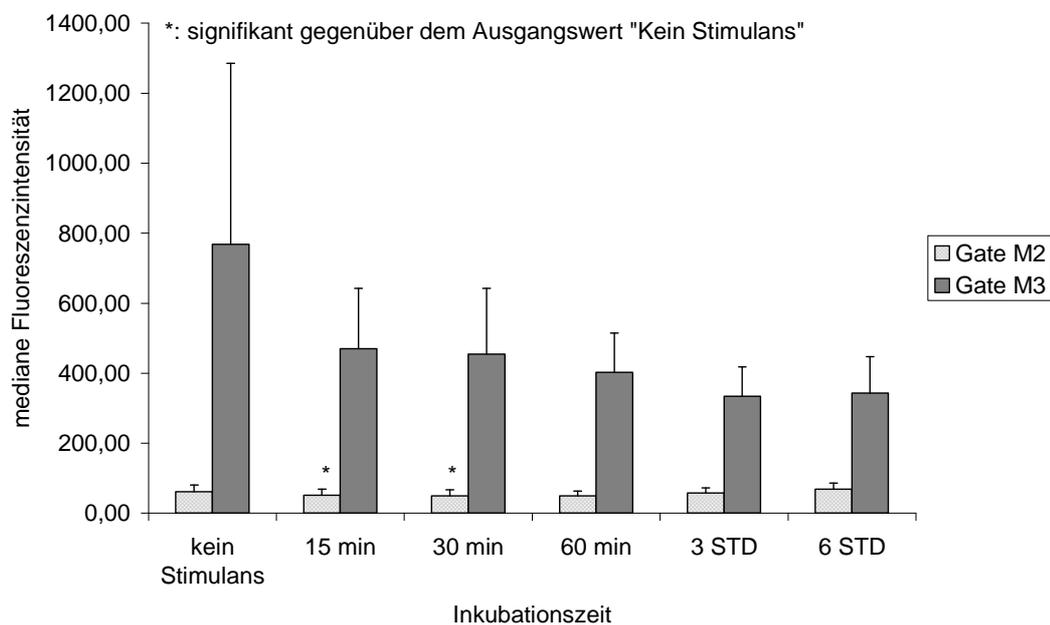


Abbildung 21: Expression des KOR auf Granulozyten nach Stimulation mit *St.aureus* gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 11$. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 5 und Tabelle 6.

3.1.3. MOR

St.aureus steigerte ebenfalls die Expression des MOR auf den neutrophilen Granulozyten. Nach 15 Minuten Stimulation mit 20 ml St.aureus (10^9 /ml) erhöhte sich der Zellanteil der „vermehrt exprimierenden“ Granulozyten von 5,37% auf 24,53%. Die Verlängerung der Inkubation auf 30, 60, 180 und 360 Minuten führte zu einer weiteren Erhöhung der „vermehrt exprimierenden“ Granulozyten bis zu einem Prozentsatz von 53,93% der Zellen.

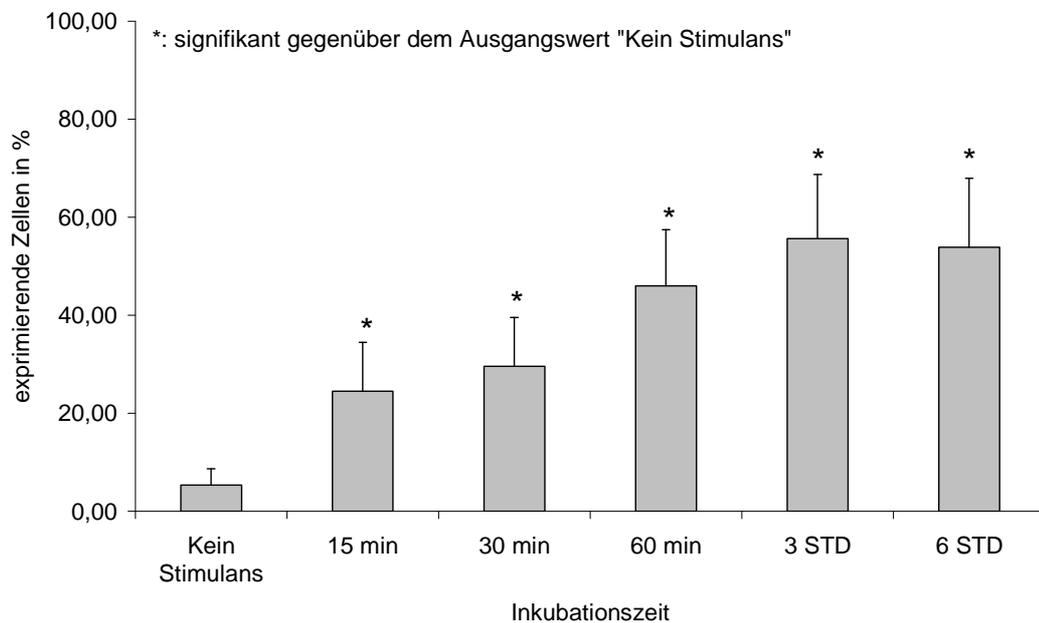


Abbildung 22: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Inkubation mit St.aureus den MOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 7.

Bei Verlängerung der Inkubationszeit mit St.aureus konnte keine Zunahme der medianen Fluoreszenzintensität der Granulozyten in Gate M2 oder Gate M3 beobachtet werden. Der Abfall im Gate M3 vom Ausgangswert auf den 15 Minuten-Wert ist nicht signifikant ($p = 0,131$).

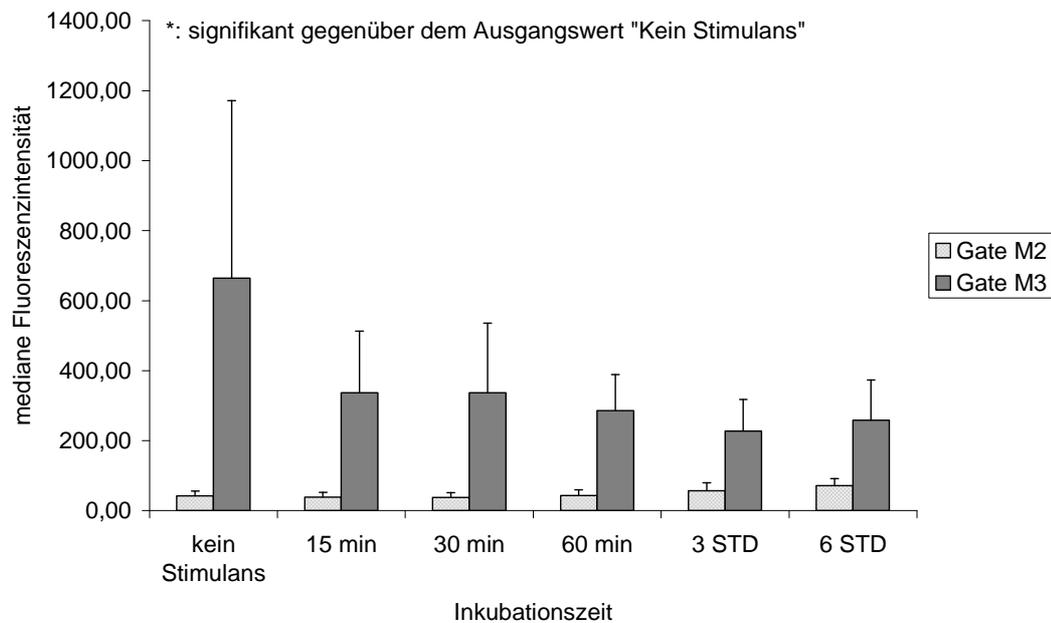


Abbildung 23: Expression des MOR auf neutrophilen Granulozyten nach Inkubation mit St.aureus gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 11$. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 8 und Tabelle 9.

3.2. Veränderung der OR-Expression nach Stimulation mit TNF- α

3.2.1. DOR

Um den Einfluss von TNF- α auf die Expression des DOR auf neutrophile Granulozyten zu untersuchen, wurde Vollblut drei, sechs, zwölf und vierundzwanzig Stunden mit TNF- α (100 ng/ml) inkubiert. Nach sechs Stunden Stimulation war der Anteil der Zellen, die den Opioidrezeptor vermehrt exprimieren signifikant von 2,14% auf 12,84% erhöht. Nach 12 Stunden lag der Anteil bei 28,57% und nach 24 Stunden bei 68,13%.

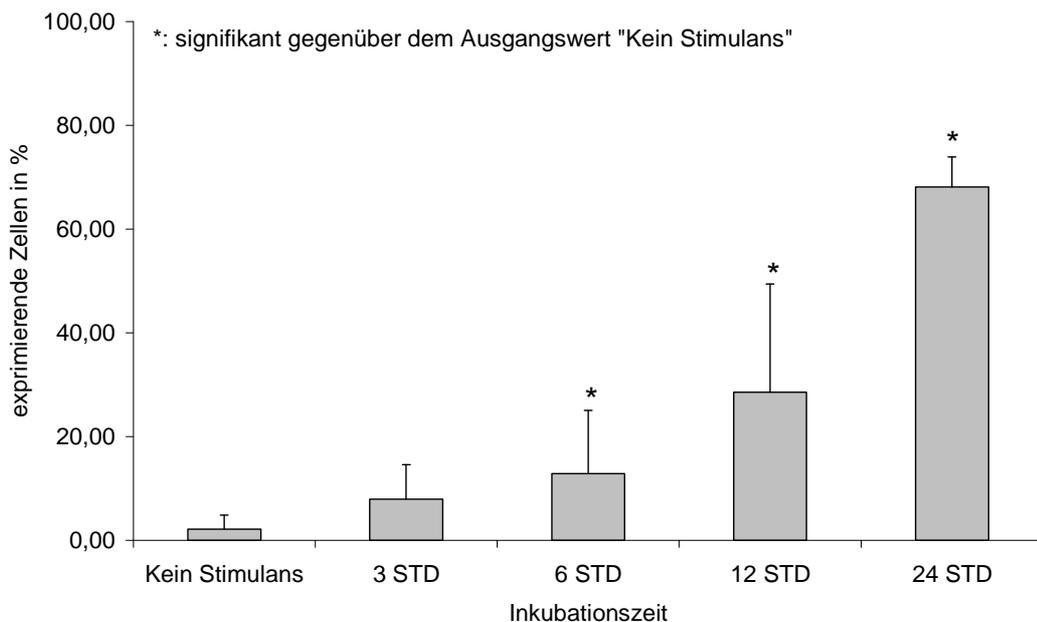


Abbildung 24: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml) den DOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 10.

Nach Stimulation mit TNF- α (100ng/ml) blieb in Gate M2 und Gate M3 die mediane Fluoreszenzintensität der Granulozyten im zeitlichen Verlauf konstant. Signifikante Unterschiede fanden sich nicht.

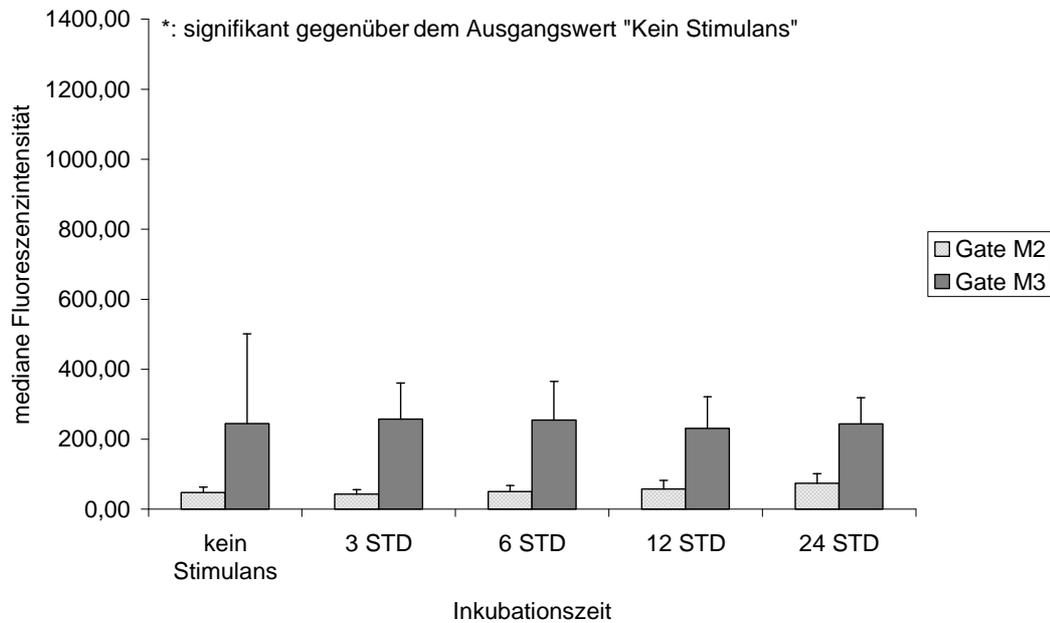


Abbildung 25: Expression des DOR auf Granulozyten nach Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml) gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 11 und Tabelle 12.

3.2.2. KOR

Die Stimulation mit TNF- α (100ng/ml) erhöhte den Prozentsatz der Granulozyten, die den KOR exprimieren. Nach sechs Stunden Inkubation mit TNF- α (100ng/ml) exprimierten bereits mehr als doppelt so viele Granulozyten (initial 5,34%, nach 6 Std 12,02%) den KOR auf ihrer Zelloberfläche im Gate M3.

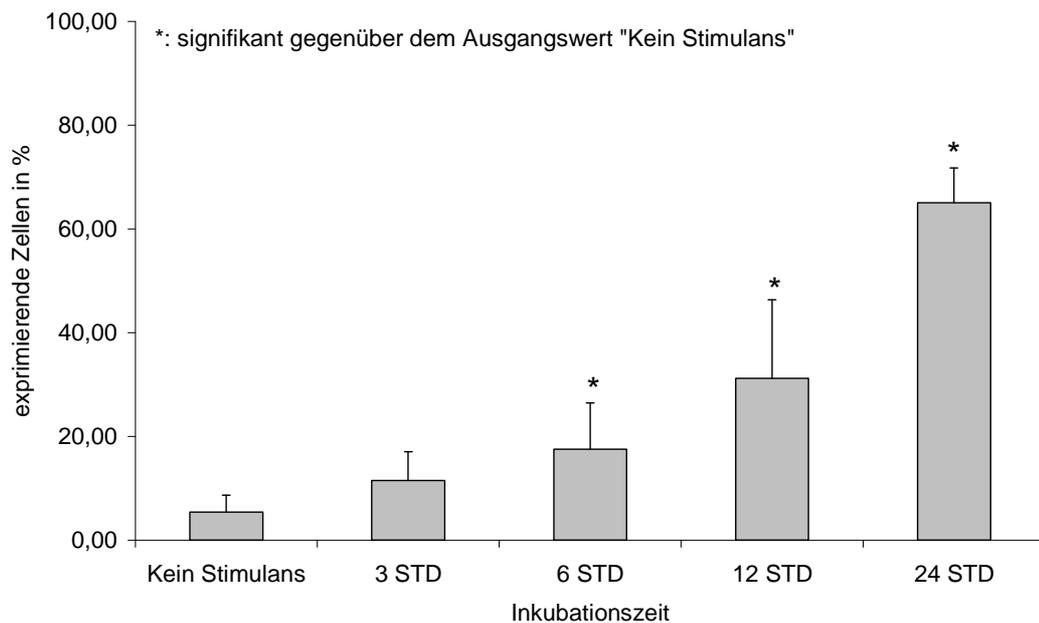


Abbildung 26: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml) den KOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 13.

Die mediane Fluoreszenzintensität der Granulozyten im Gate M2 und M3 veränderte sich dabei nicht signifikant. (n = 11, dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung).

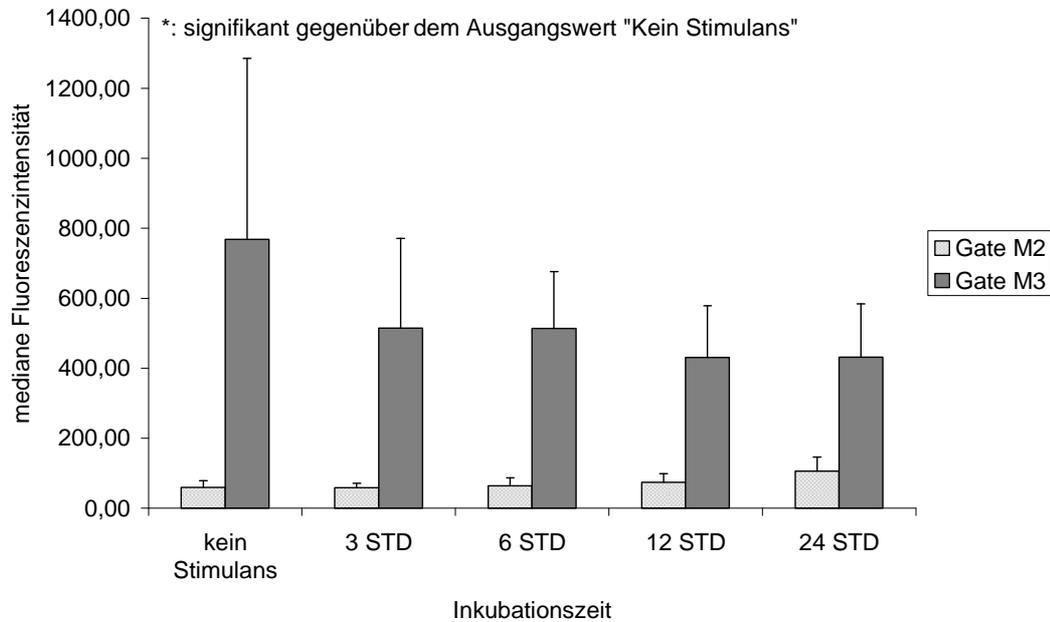


Abbildung 27: Expression des KOR auf PMN nach Inkubation mit TNF- α (100 ng/ml) gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 14 und Tabelle 15.

3.2.3. MOR

Der stimulatorische Effekt von TNF- α auf die OR-Expression auf Granulozyten zeigte sich auch bei der Messung des MOR. Nach sechs Stunden Stimulation mit TNF- α (100ng/ml) erhöhte sich der Anteil der Granulozyten, die diesen Rezeptor vermehrt exprimieren signifikant von 5,37 % auf 14,03%, nach 24 Stunden Inkubation auf 57,19%.

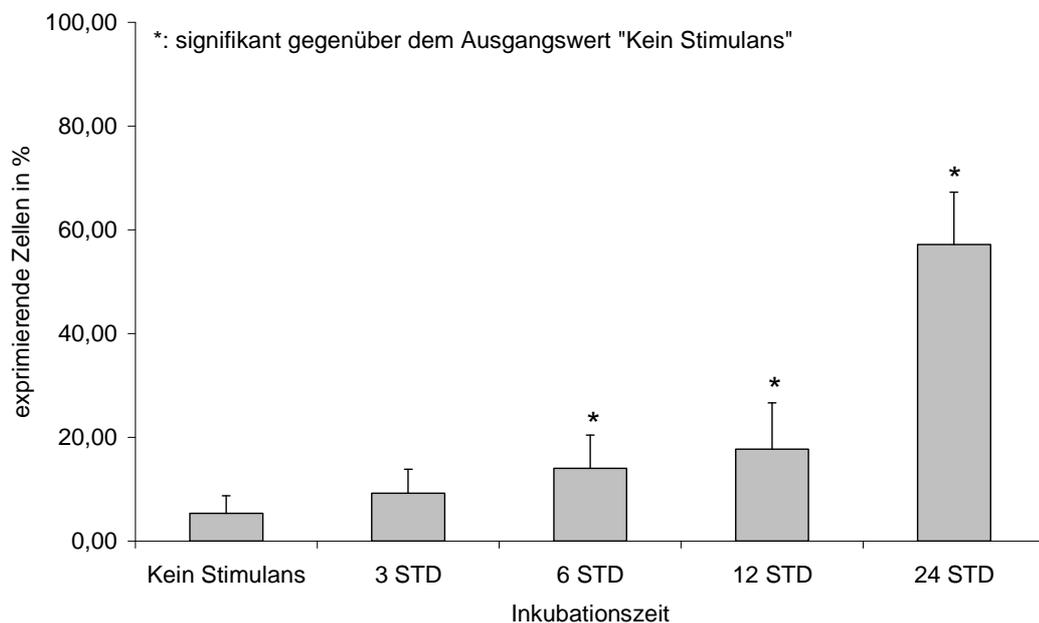


Abbildung 28: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml) den MOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 16.

Eine signifikante Zunahme oder Abnahme der medianen Fluoreszenzintensität auf der Zelloberfläche der Granulozyten konnte weder im Gate M2 noch Gate M3 gemessen werden.

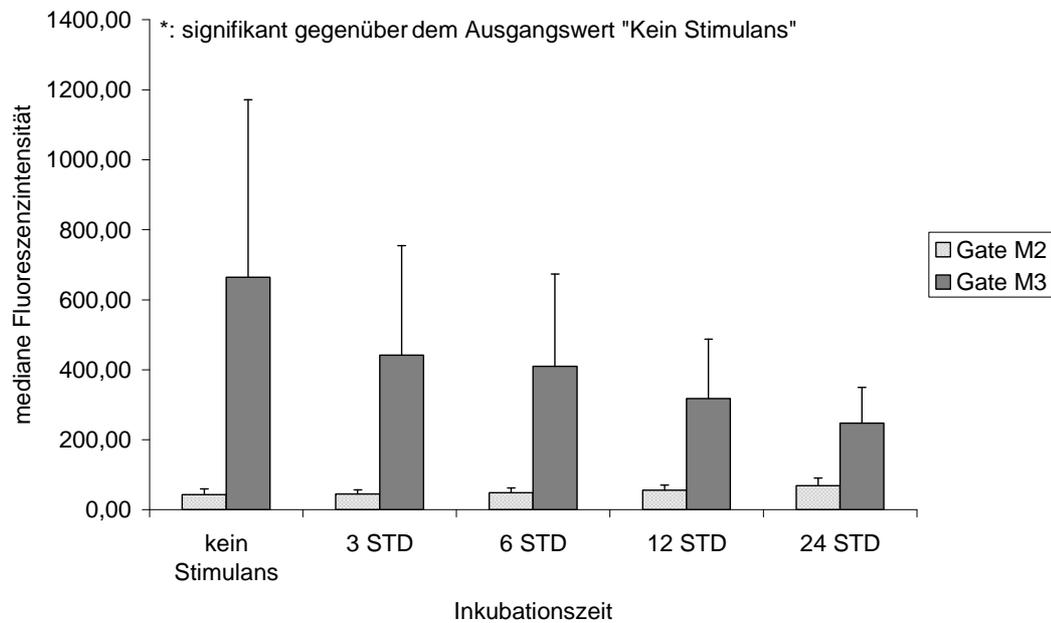


Abbildung 29: Expression des MOR auf neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml) gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 17 und Tabelle 18.

3.3. Veränderungen der OR-Expression nach Stimulation mit LPS

3.3.1. DOR

Im ähnlichen Maße wie durch TNF- α wurde durch Inkubation mit LPS (100ng/ml) die Dichte der DOR auf der Granulozytenoberfläche und die Zahl der vermehrt exprimierenden Zellen erhöht. 100 μ l Vollblut wurden für drei, sechs, zwölf und 24 Stunden mit LPS (100 ng/ml) inkubiert. Der stimulierende Effekt von LPS war nach sechs Stunden signifikant, hier erhöhte sich der Anteil der „vermehrt exprimierenden“ Zellen von 2,14% auf 9,92%. Nach 24 Stunden lag der Zellanteil der „vermehrt exprimierenden“ Granulozyten bei 55,16%.

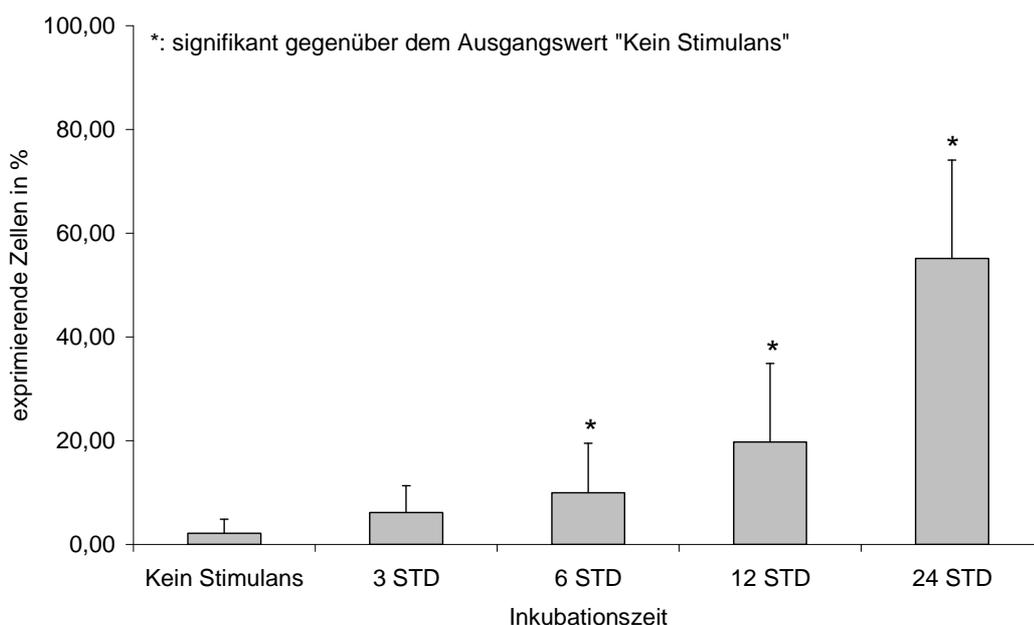


Abbildung 30: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) den DOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 19.

Die mediane Fluoreszenzintensität der Granulozyten veränderte sich nicht signifikant bei verlängerten Stimulationszeiten.

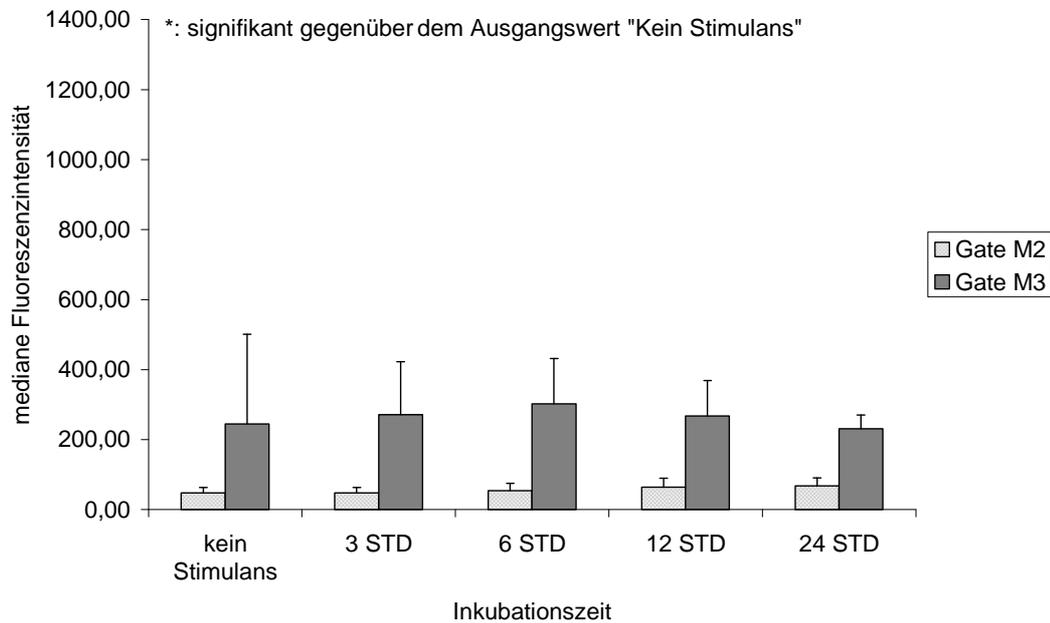


Abbildung 31: Expression des DOR auf PMN nach Inkubation mit LPS (100 ng/ml) gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 20 und Tabelle 21.

3.3.2. KOR

LPS induzierte eine vermehrte KOR-Expression auf neutrophilen Granulozyten. Nach zwölf Stunden Stimulation mit LPS (100 ng/ml) stieg der Prozentsatz der KOR exprimierenden „vermehrt exprimierenden“ Zellen von 5,34% auf 23,41% an. Nach 24 Stunden lag dieser Anteil der „vermehrt exprimierenden“ Granulozyten bei 44,15%.

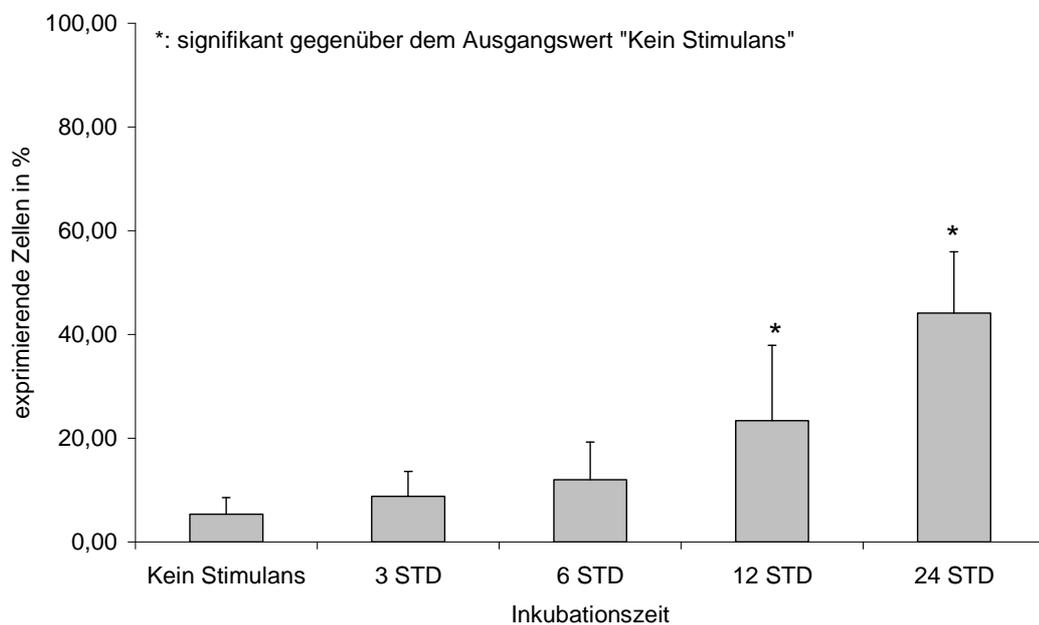


Abbildung 32: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) den KOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 22.

Die Fluoreszenzintensität der Granulozyten nach Stimulation mit LPS (100ng/ml) veränderte sich bei Verlängerung der Stimulationszeit weder in Gate M2 noch in Gate M3 signifikant. Bei einer Fluoreszenz der „niedrig exprimierenden“ Granulozyten von 58,66, lag die mediane Fluoreszenzintensität der „vermehrt exprimierenden“ Zellen bei 451,97.

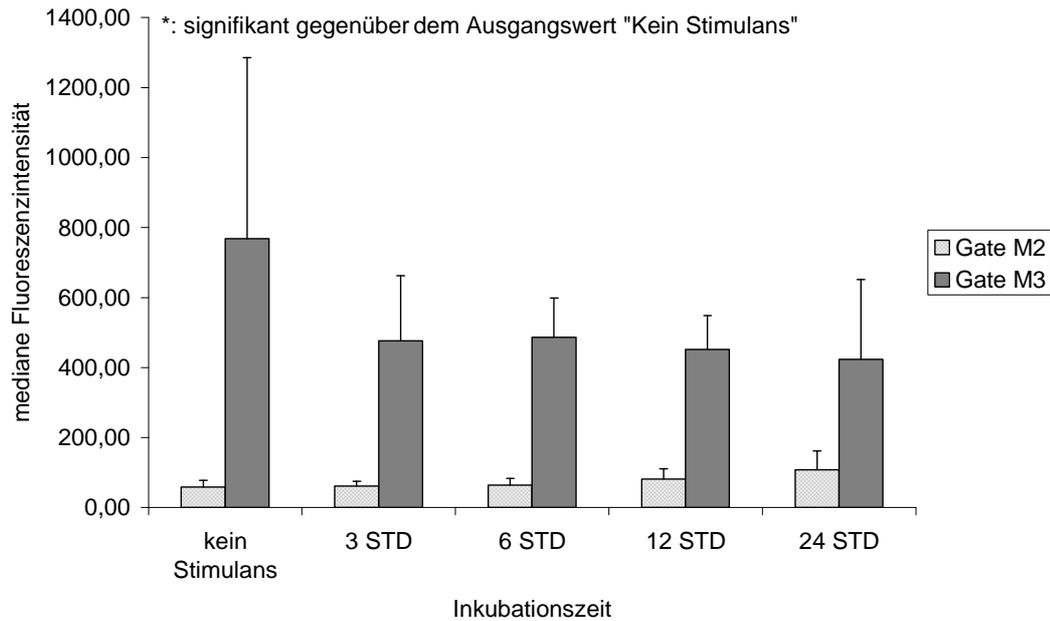


Abbildung 33: Expression des KOR auf neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 23 und Tabelle 24.

3.3.3. MOR

Die Stimulation mit LPS (100ng/ml) führte zu einer Zunahme des Prozentsatzes von Granulozyten, die den MOR auf der Zelloberfläche exprimieren. Nach zwölf Stunden wurde ein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert beobachtet. Dabei wurde eine Zunahme von 7,91% gemessen (von 5,37% auf 13,28%). Nach 24 Stunden lag der Anteil der „vermehrt exprimierenden“ Granulozyten bei 44,40%.

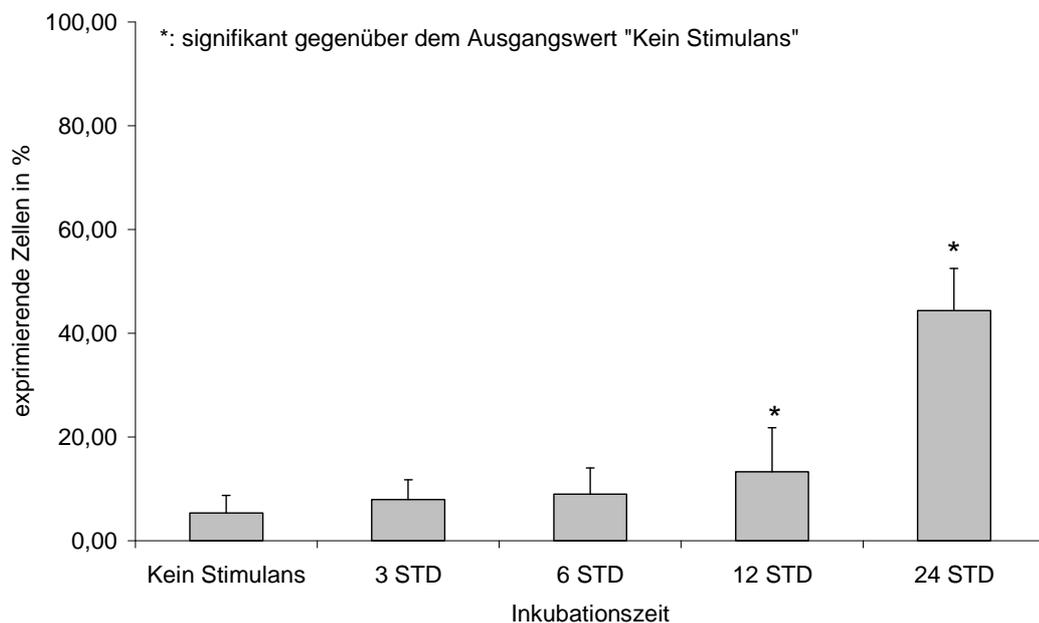


Abbildung 34: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) den MOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 25.

Die mediane Fluoreszenzintensität der Granulozyten blieb annähernd konstant. Eine signifikante Veränderung in Gate M2 oder Gate M3 war nicht zu messen.

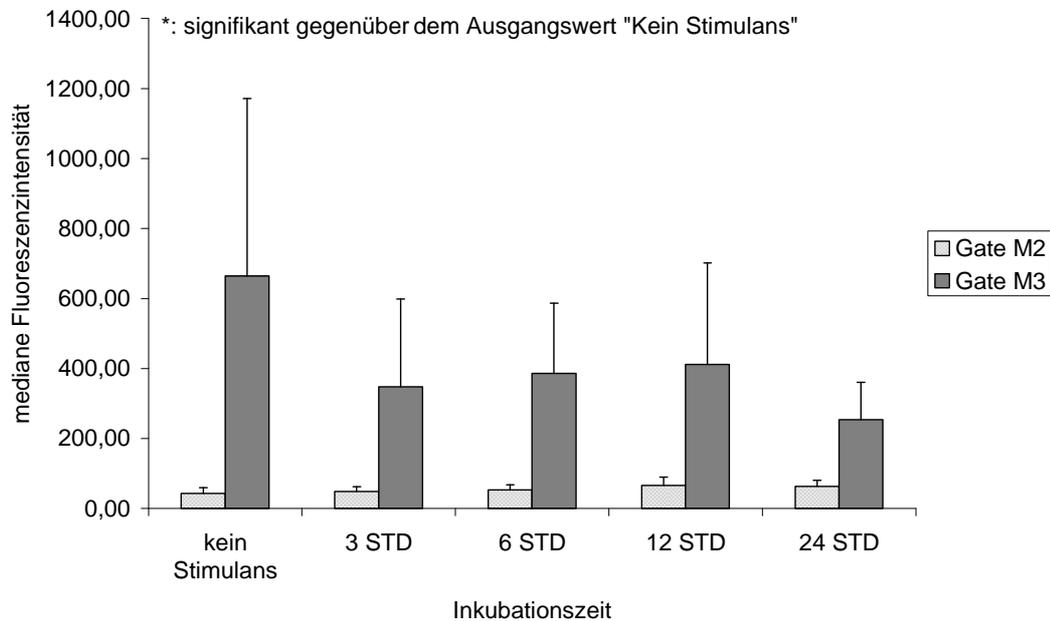


Abbildung 35: Expression des MOR auf neutrophilen Granulozyten nach Inkubation mit LPS (100 ng/ml) gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 26 und Tabelle 27.

3.4.Intensivpatienten

In einem Pilotversuch wurde EDTA-antikoaguliertes Blut von zwei septischen Intensivpatienten mit St.aureus (10^9 /ml), LPS (100ng/ml) und TNF- α (100ng/ml) stimuliert, um zu evaluieren, ob neutrophile Granulozyten septischer Intensivpatienten ein ähnliches Stimulationsmuster aufweisen wie neutrophile Granulozyten gesunder Probanden. Diese beiden exemplarischen Messreihen wurden mit dem Mittelwert der 11 gesunden Probanden verglichen.

Aufgrund der nur geringen Patientenanzahl (n=2) konnte weder eine statistische Auswertung, noch eine abschließende Beurteilung der Unterschiede in der granulozytären OR-Expression septischer Intensivpatienten und derjenigen gesunder Probanden getroffen werden. Jedoch ist in beiden Fällen zu beobachten, dass die OR-Expression nach Stimulation mit den unten aufgeführten Faktoren - möglicherweise als Ausdruck einer Voraktivierung der Zellen - verzögert eintritt.

3.4.1. Stimulation mit Staphylococcus aureus

Die Fluoreszenzintensität nach Stimulation mit St.aureus und nachfolgender Inkubation mit Anti-DOR-Antikörpern wies Unterschiede zwischen den beiden Intensivpatienten auf. Während bei dem Intensivpatient 1 (PAT-INT 1) der Balkenverlauf fast identisch mit dem gesunden Vergleichskollektiv war, zeigte sich bei Intensivpatient 2 (PAT-INT 2), dass die vermehrt exprimierenden Zellen später und in viel geringerem Ausmaß vorlagen (9,79% bei PAT-INT 2 nach drei Stunden Inkubation mit St.aureus).

ERGEBNISSE

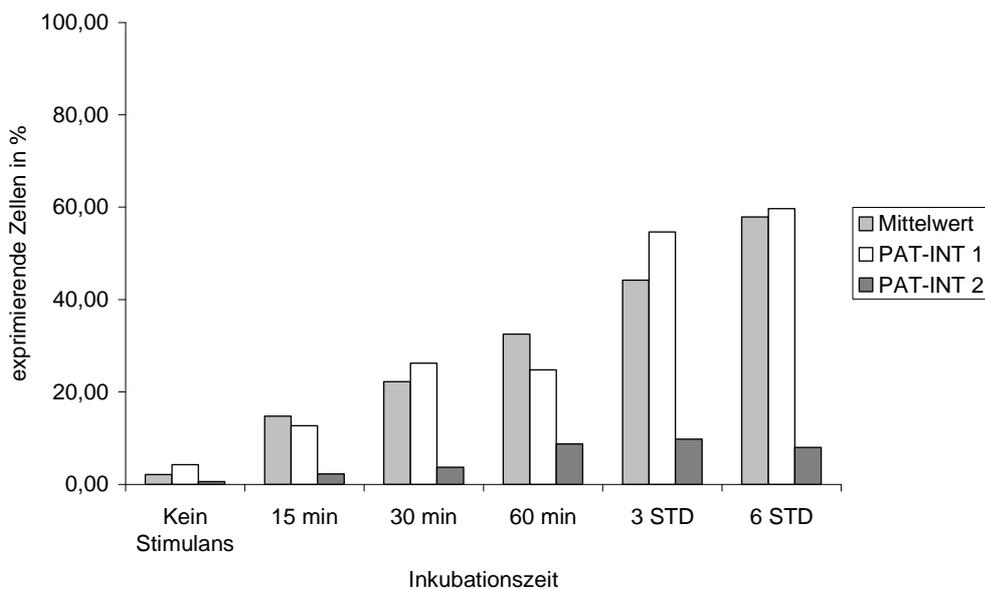


Abbildung 36: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Inkubation mit *St.aureus* vermehrt den DOR exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden ist zum Vergleich dargestellt.

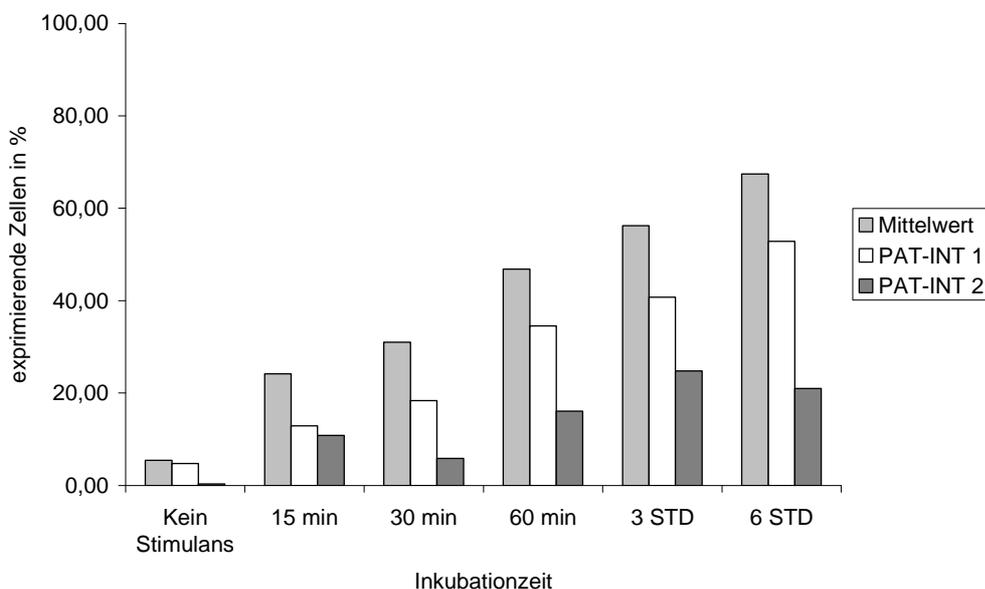


Abbildung 37: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit *St.aureus* vermehrt den KOR exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden dient als Vergleich für PAT-INT-1 und PAT-INT-2.

Bei Messung des KOR (siehe Abbildung 37) auf den PMN konnte nach 15-minütiger Stimulation mit St.aureus ähnliche Kurvenverläufe bei beiden Intensivpatienten gemessen werden. Im weiteren zeitlichen Verlauf nahmen bei PAT-INT 1 die Anzahl der „vermehrt exprimierenden“ Zellen konstant zu und erreichten nach sechs Stunden einen Wert von 52,80%, während der Anteil dieser Zellen bei PAT-INT 2 wesentlich geringer war (Maximum nach drei Stunden bei 24,76%).

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Markierung des MOR (siehe Abbildung 38). Nach 15 Minuten Stimulation mit St.aureus wiesen beide Patienten einen Prozentsatz vermehrt exprimierender Zellen von ca. 12% auf. Nach sechs Stunden Inkubation lag das Maximum nach stetigem Anstieg von PAT-INT 1 bei 61,77%, während bei PAT-INT 2 nach drei Stunden ein Maximum von 37,86% erreicht hatte, das nachfolgend wieder abfiel.

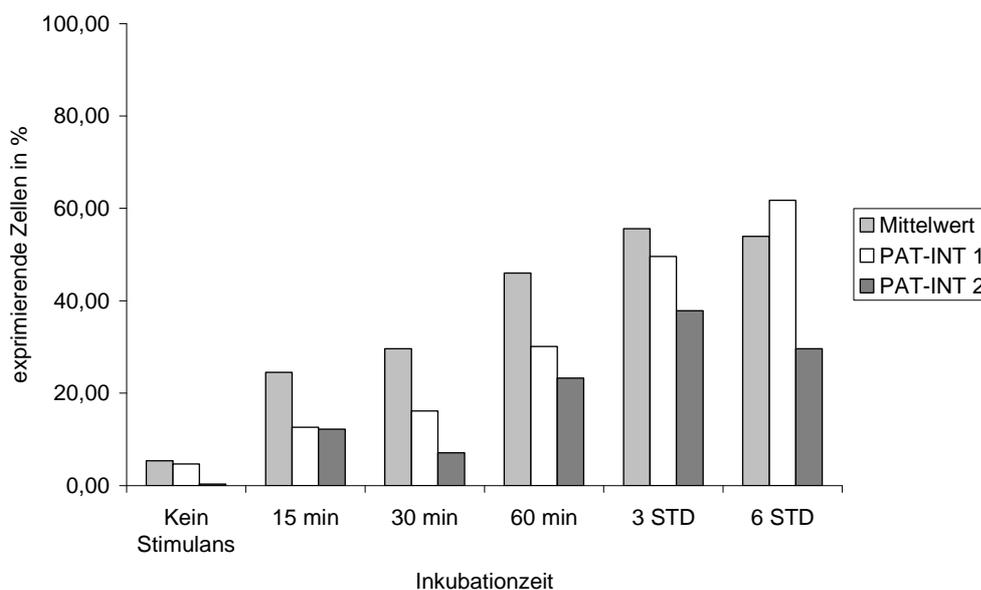


Abbildung 38: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Inkubation mit St.aureus vermehrt den MOR exprimieren (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden ist zum Vergleich dargestellt.

Insgesamt fällt auf, dass der Anteil der vermehrt exprimierenden Zellen bei PAT-INT 2 im Vergleich zu PAT-INT 1 niedriger lag und ein Anstieg später und langsamer stattfand.

3.4.2. Stimulation mit TNF- α

Bei beiden Intensivpatienten verminderte TNF- α den Anteil der vermehrt exprimierenden Zellen bei Messung des DOR. Während die DOR-Expression bei PAT-INT 1 bis zum Inkubationszeitpunkt von sechs Stunden mit dem gesunden Vergleichskollektiv vergleichbar war und erst dann vermindert war, konnte bei PAT-INT 2 schon von Beginn an ein deutlich reduzierter Prozentsatz von vermehrt DOR exprimierenden Zellen gemessen werden.

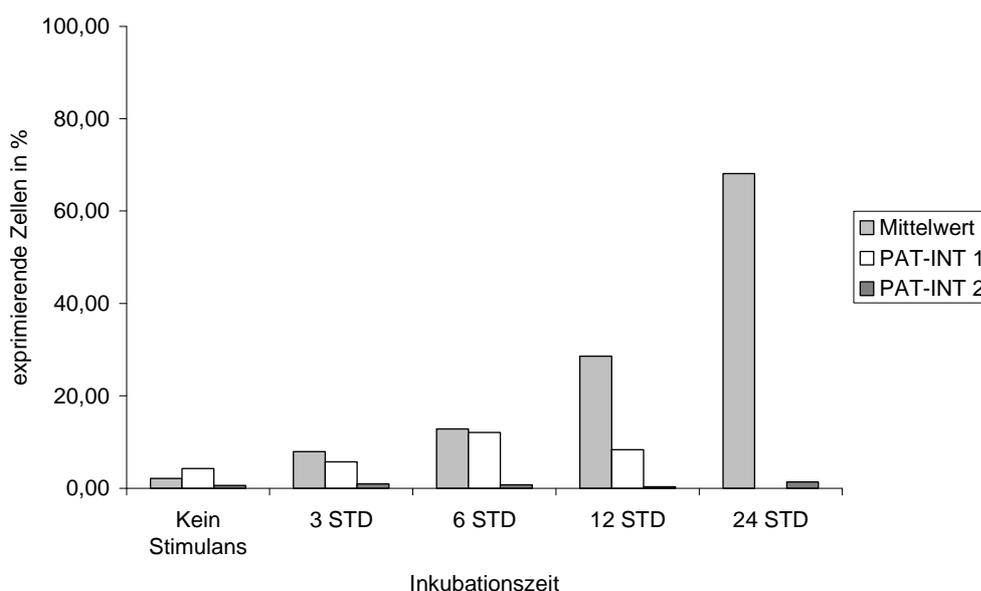


Abbildung 39: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Inkubation mit TNF- α (100 ng/ml) vermehrt den DOR exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden ist zum Vergleich dargestellt.

Auch bei der Untersuchung des KOR ist zu erkennen, dass durch TNF- α der Anteil der vermehrt exprimierenden Zellen vermindert wurde. Beim PAT-INT 1 geschah dies erst nach einer Inkubationszeit von drei Stunden, beim PAT-INT 2 war diese Verminderung von Beginn an zu messen.

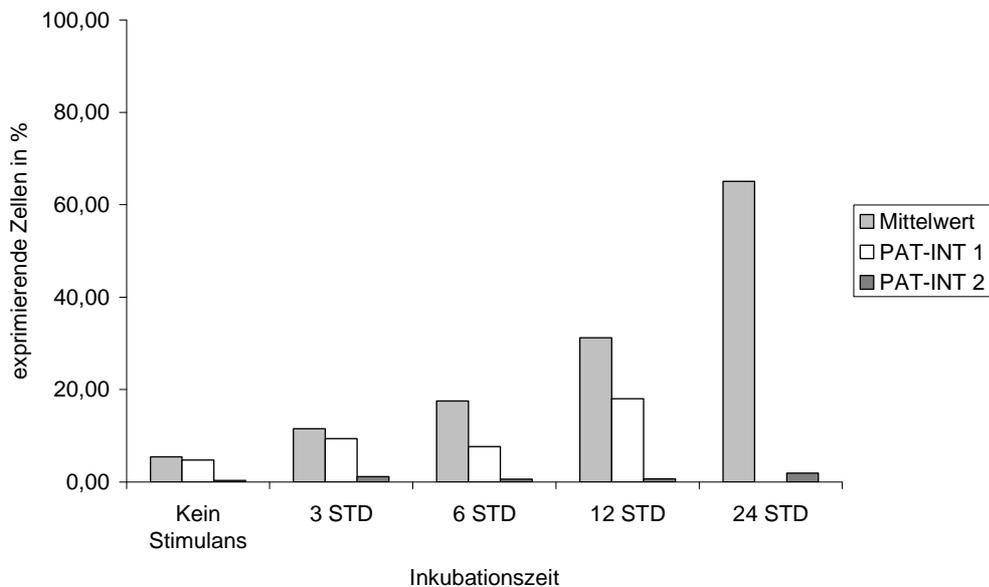


Abbildung 40: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml) vermehrt den KOR exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden ist zum Vergleich dargestellt.

Wie auch bei der DOR- und KOR-Expression, konnte auch bei der Messung des MOR eine Reduktion der vermehrt exprimierenden Zellen beobachtet werden.

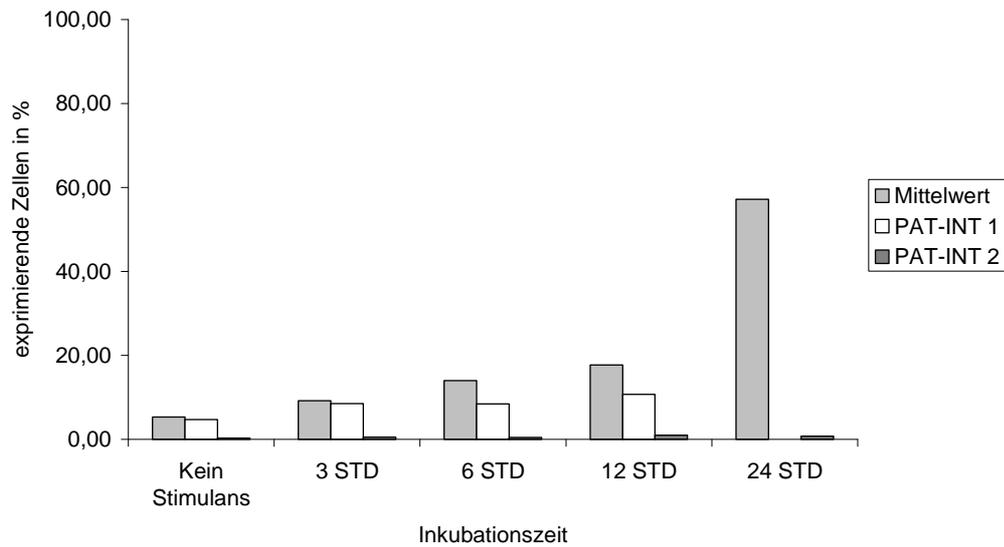


Abbildung 41: Prozentualer Anteil der PMN die nach Inkubation mit TNF- α (100 ng/ml) vermehrt den MOR exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden ist zum Vergleich dargestellt.

3.4.3. Stimulation mit LPS

Ähnlich wie TNF- α zeigte auch LPS eine supprimierende Wirkung auf die granulozytäre DOR-Expression. Bei PAT-INT 1 war bis zu einem Zeitpunkt von sechs Stunden der Balkenverlauf fast identisch mit dem Vergleichskollektiv und erst nach zwölf Stunden stieg der Anteil der vermehrt exprimierenden Zellen nicht weiter an, nach 24 Stunden waren keine DOR-positiven Zellen mehr nachweisbar. Bei PAT-Int 2 war diese Reduktion der DOR-Expression schon von Beginn an zu beobachten.

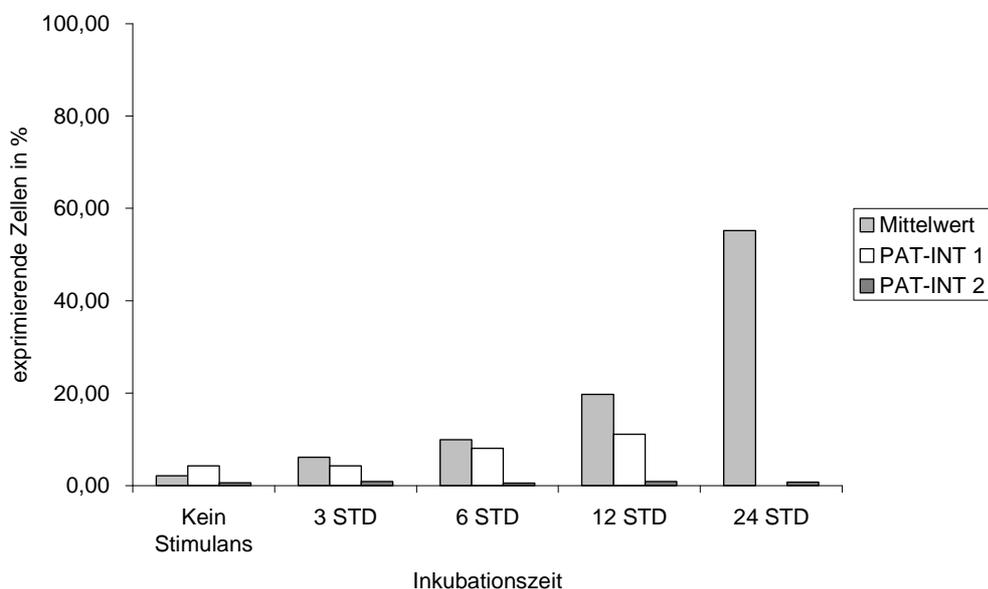


Abbildung 42: Prozentualer Anteil der Granulozyten die nach Inkubation mit LPS (100 ng/ml) vermehrt den DOR exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden ist zum Vergleich dargestellt.

Die KOR-Expression, gemessen anhand des Prozentsatzes vermehrt exprimierender Zellen, war bei beiden Intensivpatienten vermindert, wobei PAT-INT 2 diesen Effekt von Anfang an aufwies, während er bei PAT-INT 1 erst nach 3-stündiger Inkubationszeit ein Abfall auffiel.

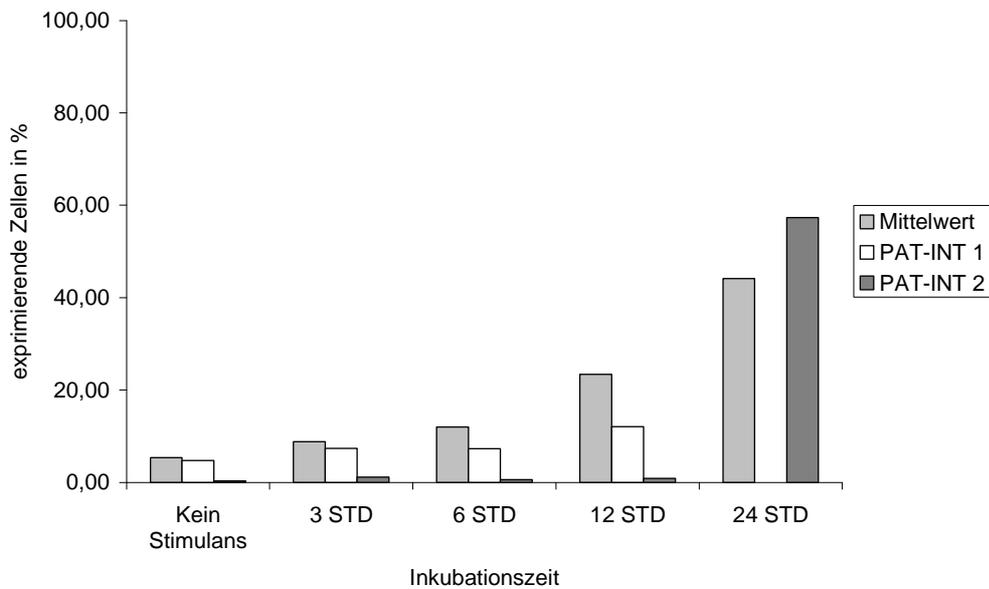


Abbildung 43: Prozentualer Anteil der PMN die nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) vermehrt den KOR exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden ist zum Vergleich dargestellt.

Ein ähnliches Bild zeigt sich für die LPS-induzierte Expression des MOR. Bei PAT-INT 1 sinkt der Anteil vermehrt exprimierender Zellen nach 24 Stunden unter die Nachweisgrenze, bei PAT-INT 2 ist diese Verminderung von Beginn an zu messen.

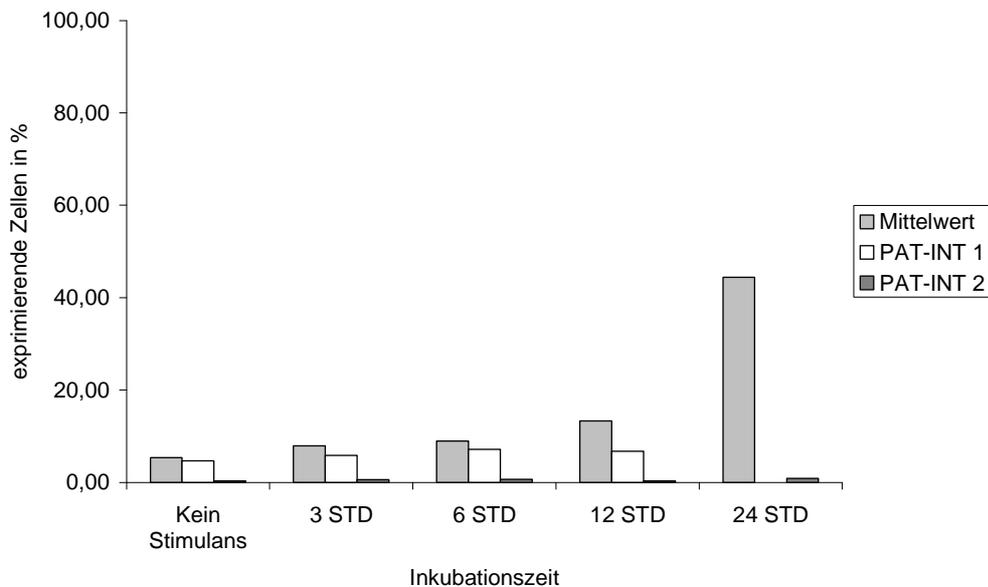


Abbildung 44: Prozentualer Anteil der PMN die nach Inkubation mit LPS (100 ng/ml) vermehrt den MOR exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden ist zum Vergleich dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl TNF- α als auch LPS auf Granulozyten septischer Patienten eine Suppression der vermehrt exprimierenden Zellen bewirkt.

3.5. OR-Expression bei Sedierung mit Fentanyl vs. Ketamin

Die folgenden Ergebnisse unterscheiden zwei Gruppen von Patienten, wobei eine Gruppe mit Fentanyl, die andere mit Ketamin sediert wurde.

Es handelt sich dabei um 24 Intensivpatienten. Jeweils 12 Patienten wurden mit Fentanyl bzw. Ketamin sediert, davon je neun männliche und drei weibliche Patienten. Das mittlere Alter lag insgesamt bei 64 ± 14 Jahren, das der Fentanyl-Gruppe lag bei 65 ± 12 Jahren, das der Ketamin-Gruppe bei 60 ± 15 Jahren. Der APACHE-II lag im Mittel bei 25 ± 3 , in der Fentanyl-Gruppe bei 25 ± 3 und bei der Ketamin-Gruppe 24 ± 3 . Die Mortalität lag insgesamt bei 37,5%, in der Fentanyl-Gruppe bei 25%, in der Ketamin-Gruppe bei 50%. Die biologischen Daten (Geschlecht, Alter, Hauptdiagnose, Medikation und Outcome) sind nachfolgend auf Seite 63 tabellarisch dargestellt:

ERGEBNISSE

Patient	APACHE	Geschlecht	Alter	Hauptdiagnose	Sedierung	Katecholamine
3	22	weiblich	45	Toxic Shock Syndrom	Fentanyl und Disoprivan 2%	Dobutamin
5	22	männlich	74	Darmperforation mit Sepsis	Fentanyl und Disoprivan 2%	Dobutamin/Arterenol
6	20	männlich	47	Pneumonie, Erreger nicht bekannt	Fentanyl und Disoprivan 2%	Dobutamin/Arterenol
7	21	männlich	47	Spannungspneue und Perikardruptur	Ketamin und Disoprivan 2%	Dobutamin/Arterenol
8	23	weiblich	82	Leberruptur mit Abriss Segment 6	Ketamin und Disoprivan 2%	Dobutamin/Arterenol
9	27	männlich	72	Akute respiratorische Insuffizienz	Ketamin und Disoprivan 2%	Dobutamin/Arterenol
10	24	männlich	69	Sigmaperforation bei Abszess	Ketamin und Disoprivan 2%	Arterenol
12	21	männlich	50	Akute respiratorische Insuffizienz	Ketamin und Disoprivan 2%	Dobutamin/Arterenol
13	29	männlich	60	nicht kodiert, unklare Sepsis	Ketamin und Disoprivan 2%	Arterenol
14	25	männlich	43	Akute respiratorische Insuffizienz	Ketamin und Disoprivan 2%	Dobutamin/Arterenol
15	26	männlich	67	nicht kodiert, unklare Sepsis	Fentanyl	keine
16	27	männlich	77	Enterokolitis bei Clostridium difficile	Fentanyl und Disoprivan 2%	Dobutamin/Arterenol
18	24	männlich	82	Pneumonie, durch E. coli	Ketamin und Disoprivan 2%	Dobutamin/Arterenol
19	26	männlich	58	Wundinfektion Skrotum und Testes	Ketamin und Disoprivan 2%	Dobutamin/Arterenol
20	20	weiblich	32	bakterielle Pneumonie	Ketamin und Disoprivan 2%	Dobutamin/Arterenol
22	22	männlich	54	Traumatischer Hämatothorax	Fentanyl und Disoprivan 2%	Arterenol
23	24	männlich	53	nicht kodiert, unklare Sepsis	Fentanyl und Disoprivan 2%	Dobutamin/Arterenol
24	27	männlich	69	Sepsis, serratia marcescens	Fentanyl und Disoprivan 2%	Arterenol
25	20	männlich	61	Spontanpneumothorax	Ketamin und Disoprivan 2%	Dobutamin/Arterenol
26	28	weiblich	74	nicht kodiert, unklare Sepsis	Fentanyl oder Disoprivan 2%	Arterenol
27	25	weiblich	69	ARDS	Ketamin und Disoprivan 2%	Arterenol
28	29	weiblich	67	Bösartige Neubildung, MKG-Bereich	Fentanyl und Disoprivan 2%	Dobutamin/Arterenol
29	31	männlich	84	Akutes Nierenversagen	Fentanyl und Disoprivan 2%	Dobutamin/Arterenol
30	27	männlich	66	nicht kodiert, unklare Sepsis	Fentanyl oder Disoprivan 2%	Arterenol

Abbildung 45: Biologische und medizinische Daten der 24 Intensivpatienten.

Die Ergebnisse dieser Vergleichsstudie zwischen einer Sedierung mit Ketamin oder Fentanyl führten zu keinem signifikanten Unterschied in der Expression von OR auf Granulozyten. Bei drei Patienten aus der Fentanyl-Gruppe und sechs Patienten aus der Ketamin-Gruppe war eine Messung am Entlassungstag nicht möglich, da die Patienten an ihrer Grunderkrankung bzw. deren Komplikationen verstarben.

Die Ergebnisse der Patienten, die Fentanyl als Analgetikum erhielten, sind im Folgenden grafisch dargestellt.

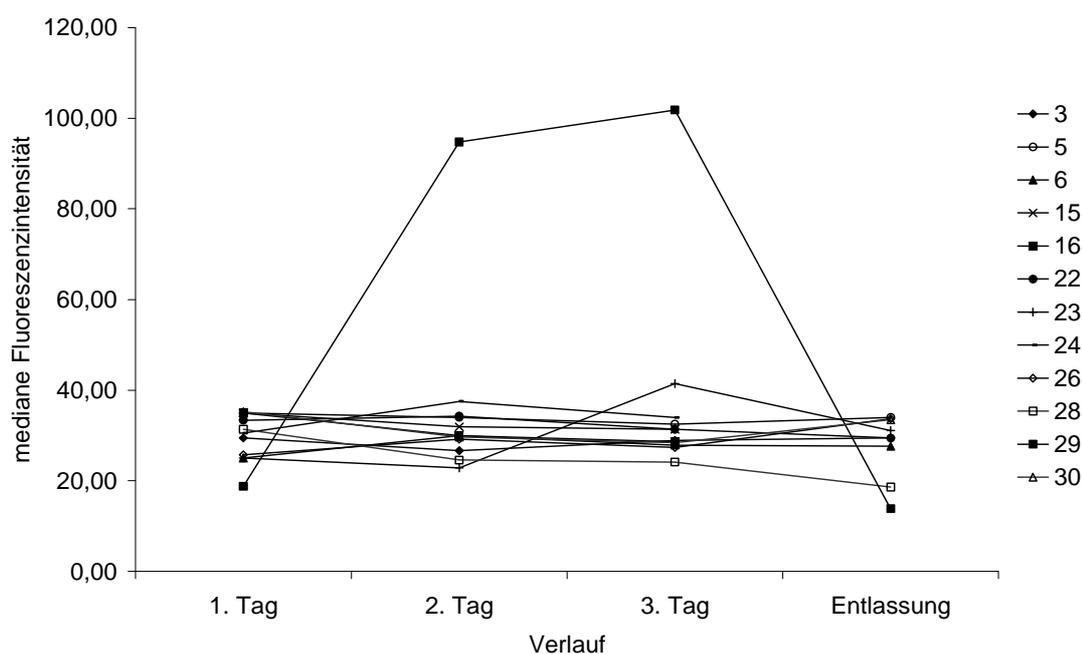


Abbildung 46: Verlauf der DOR-Expression auf PMN der einzelnen Intensivpatienten (Fentanyl-Gruppe) über drei Messtage und dem Entlassungstag. Messwerte siehe Tabelle 37. (1.Tag = Aufnahmetag in die Studie mit zwei darauf folgenden Messtagen [2. und 3. Tag] und Messung am Entlassungstag von Intensivstation.

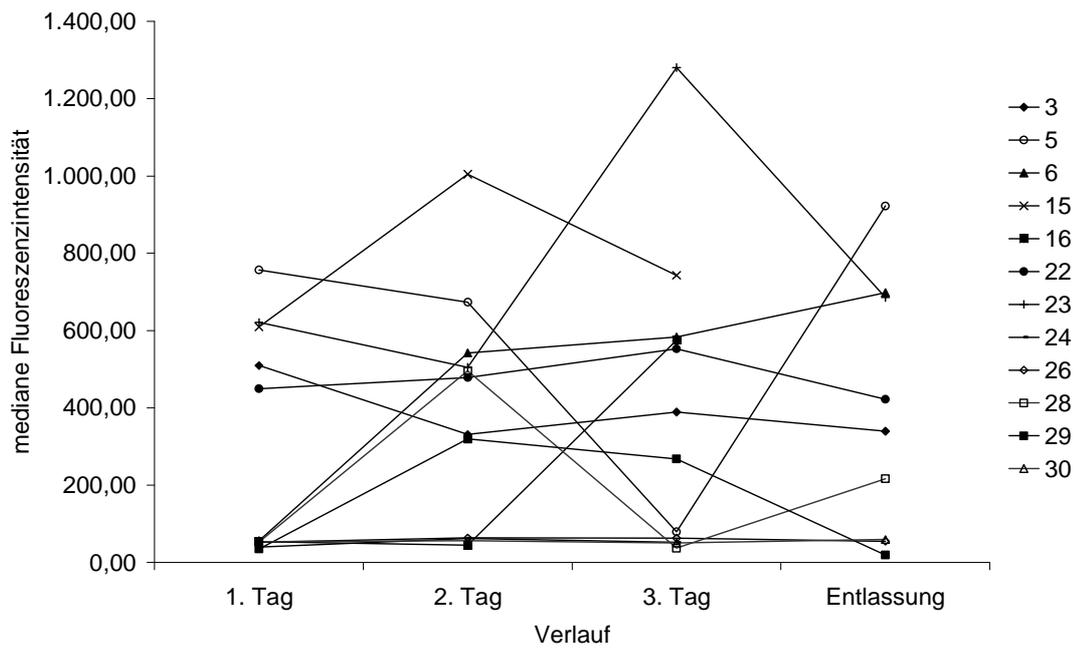


Abbildung 47: Verlauf der KOR-Expression der einzelnen Intensivpatienten (Fentanyl-Gruppe) an drei Messtagen und dem Entlassungstag. Messwerte siehe Tabelle 38. (1.Tag = Aufnahmetag in die Studie mit zwei darauf folgenden Messtagen [2. und 3. Tag] und Messung am Entlassungstag von Intensivstation).

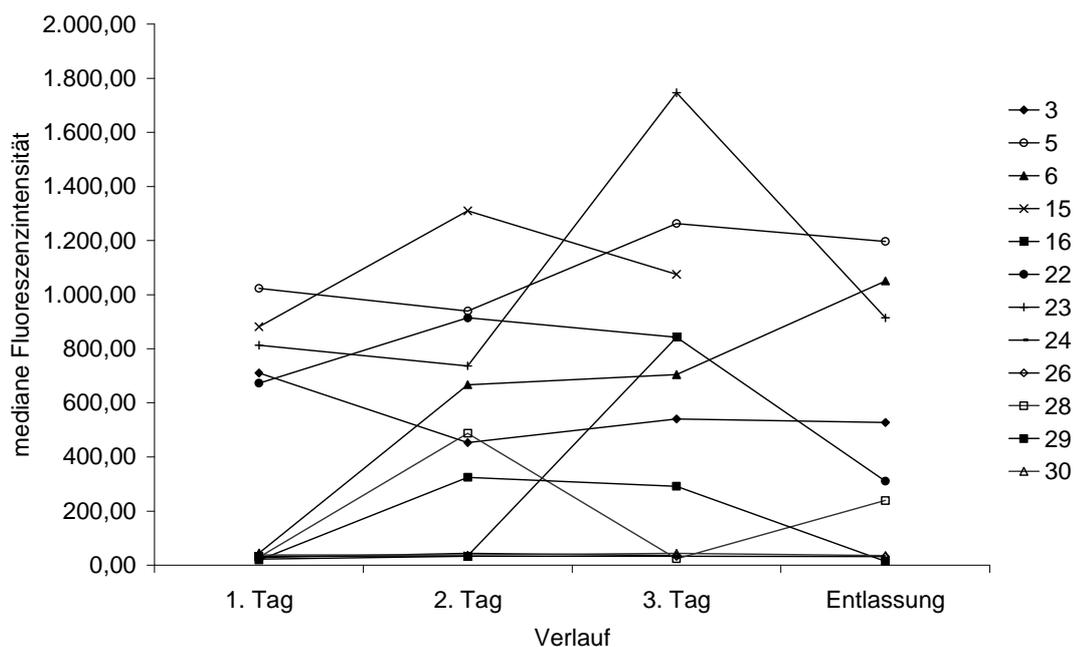


Abbildung 48: Verlauf der MOR-Expression auf neutrophilen Granulozyten der einzelnen Intensivpatienten (Fentanyl-Gruppe) über eine Zeit von drei Tagen und dem Entlassungstag. Messwerte siehe Tabelle 39. (1.Tag = Aufnahmetag in die Studie mit zwei darauf folgenden Messtagen [2. und 3. Tag] und Messung am Entlassungstag von Intensivstation).

Der Vergleich dieser Kurvenverläufe für die einzelnen Patienten ist nur schwer möglich, da eine zu große Streuung der Werte von 30,0 bis 1.800,00 besteht.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Patienten, die Ketamin als Analgetikum erhielten, dargestellt.

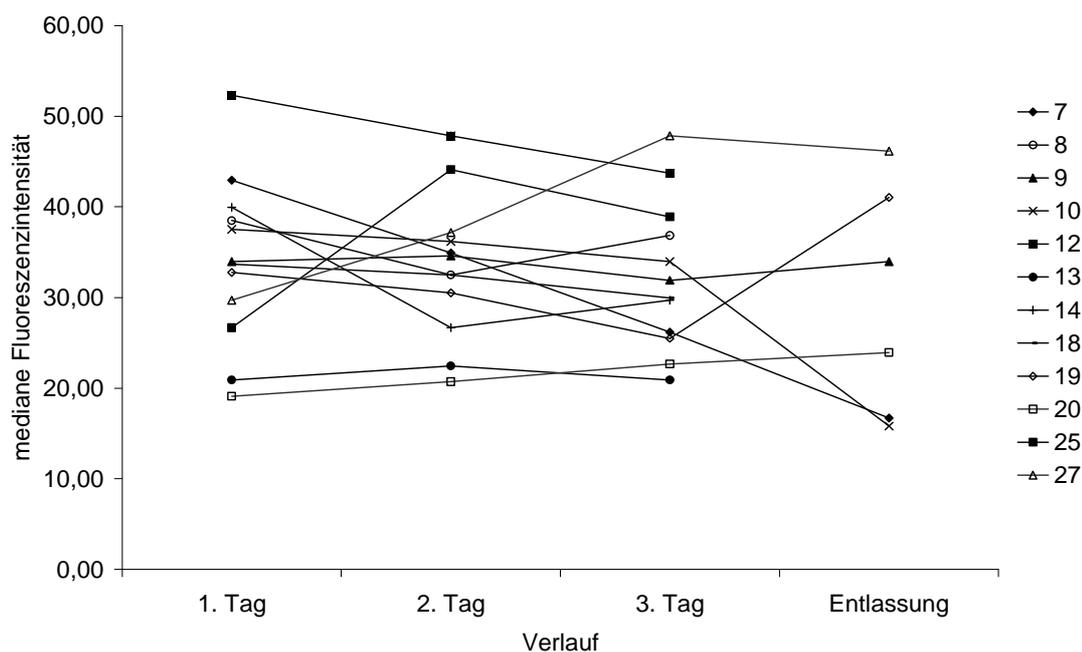


Abbildung 49: Verlauf der DOR-Expression der einzelnen Intensivpatienten (Ketamin-Gruppe) an drei Messtagen und dem Entlassungstag. Messwerte siehe Tabelle 40. (1.Tag = Aufnahmetag in die Studie mit zwei darauf folgenden Messtagen [2. und 3. Tag] und Messung am Entlassungstag von Intensivstation).

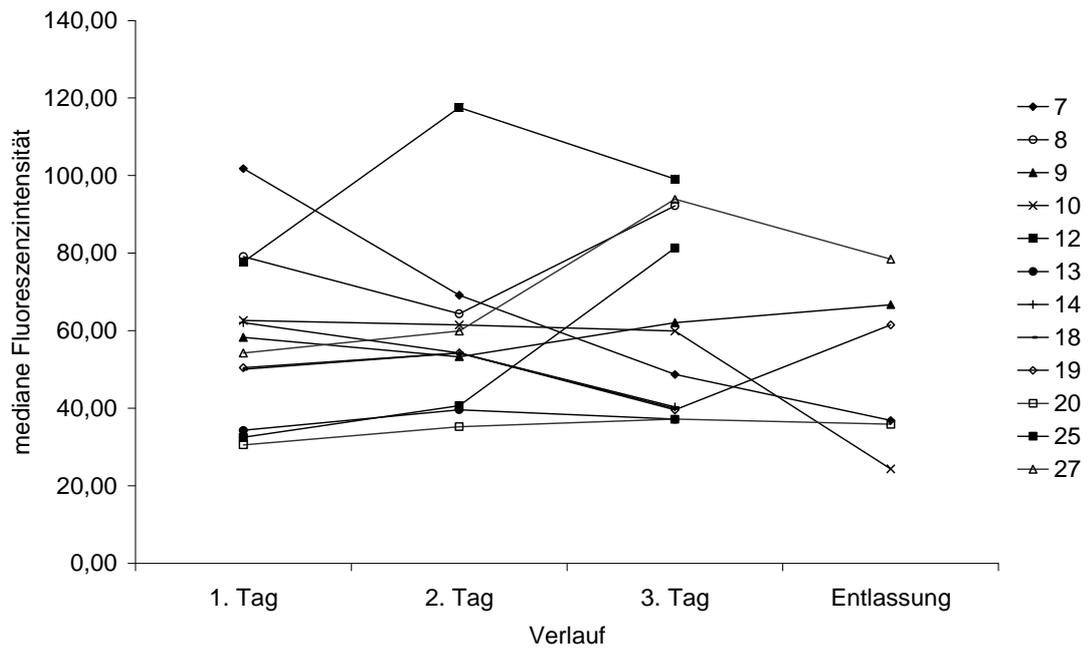


Abbildung 50: Verlauf der KOR-Expression auf Granulozyten der einzelnen Intensivpatienten (Ketamin-Gruppe) über eine Zeit von drei Tagen und dem Entlassungstag. Messwerte siehe Tabelle 41. (1.Tag = Aufnahmetag in die Studie mit zwei darauf folgenden Messtagen [2. und 3. Tag] und Messung am Entlassungstag von Intensivstation).

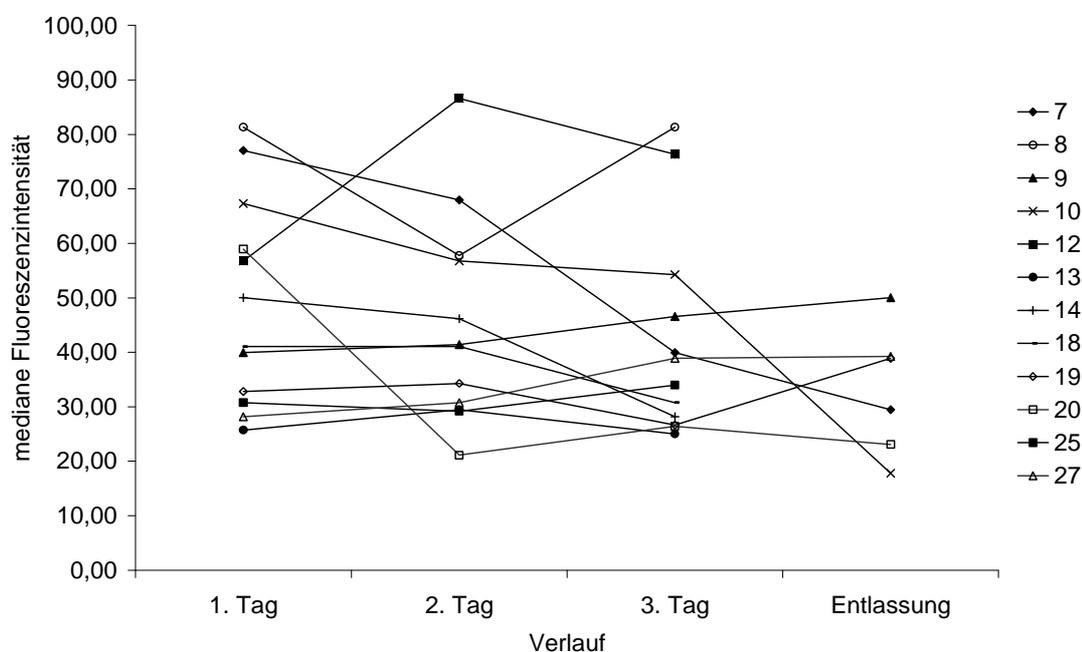


Abbildung 51: Verlauf der MOR-Expression auf PMN der einzelnen Intensivpatienten (Ketamin-Gruppe) über drei Messtage und dem Entlassungstag. Messwerte siehe Tabelle 42. (1.Tag = Aufnahmetag in die Studie mit zwei darauf folgenden Messtagen [2. und 3. Tag] und Messung am Entlassungstag von Intensivstation).

Im Vergleich der beiden Patientengruppen (Fentanyl und Ketamin) fällt auf, dass sich die Fluoreszenzintensität für alle OR-Subtypen in der Ketamingruppe in einem Messintervall von 26,00 bis 120,00 bewegt, während die Fentanylgruppe mit Werten von 20,00 bis 1.800,00 eine höhere Streubreite aufzeigt. Ursache hierfür können die interindividuell stark divergierenden Verläufe bei den Patienten, die Fentanyl erhielten, sein.

4. DISKUSSION

4.1. Diskussion der Methodik

4.1.1. Probenaufarbeitung

Bei der vorliegenden Methodik wurden Vollblutproben verwendet. Vorteil dieser Methode ist, dass die neutrophilen Granulozyten in ihrer Morphologie und Funktion nicht beeinflusst werden und eine vorzeitige Aktivierung durch eine Zellseparation verhindert wird⁷⁸. Die Vollblutmethodik gewährleistet darüber hinaus, dass immunologische Interaktionen zwischen humoralen und zellulären Faktoren erhalten bleiben⁷⁹⁻⁸³.

Verschiedene Antikoagulantien, z.B. EDTA oder Lithiumheparinat, haben einen Einfluss auf die Aktivität der Granulozyten und auf deren Rezeptor-Expression⁸⁴. Bislang liegen keine Literaturhinweise über die Wirkung von Antikoagulantien auf das Expressionsverhalten von OR auf neutrophilen Granulozyten vor. Daher orientierte sich die vorliegende Arbeit an Studien, die sich mit der Wirkung von Antikoagulantien auf Funktion und Expression von Oberflächenrezeptoren auf neutrophile Granulozyten beschäftigten. Repo et al. zeigten, dass die Verwendung von EDTA bei der durchflusszytometrischen Messung von CD11b nicht geeignet ist, da die Ligandenbindung an diesem Rezeptor von Ca^{++} abhängig ist⁸⁵. Da Studien über die Struktur von und die Bindung an OR nicht über eine Bindungsabhängigkeit der Liganden von Ca^{++} berichteten⁸⁶⁻⁸⁸, erscheint eine Interaktion der OR mit EDTA vernachlässigbar. In Studien von Sharp et al.⁸⁹ und Beck et al.¹⁸ wurde EDTA als Antikoagulanzen zur anschließenden Messung der OR verwendet und damit plausible Ergebnisse erzielt, so dass auch wir EDTA als Antikoagulanzen verwendeten.

Um einen störenden Einfluss von EDTA auf die Expression von OR ausschließen

zu können, wurden zwei parallele Versuchsreihen, eine mit EDTA, die andere mit Lithiumheparinat als Antikoagulanzen durchgeführt. Dabei war kein Unterschied in der Expression der OR bei der Negativkontrolle zwischen den beiden Proben zu messen. Es zeigte sich jedoch, dass unter Verwendung von Lithiumheparinat die Stimulation der Immunzellen mit *St.aureus* nicht möglich war. Aus diesem weiteren Grund wurde EDTA als Antikoagulanzen verwendet.

Zur Erythrozytenlyse wurde dem Vollblutansatz FACS-Lysing-Solution® der Firma Becton Dickinson zugegeben. Die Zelllyse ist eine etablierte Methode mit dem Vorteil, dass die für die Messung wichtigen neutrophilen Granulozyten weder geschädigt, noch aus dem Ansatz eliminiert werden⁹⁰. Es kommt sogar zu einer Reduktion von Debris und einer guten Fixierung der Leukozytenpopulationen und somit zu einer wesentlich besseren durchflusszytometrischen Detektion der neutrophilen Granulozyten. Durch die Zelllyse wird lediglich das Streulichtsignal verändert, das Fluoreszenzsignal bleibt hingegen konstant⁹⁰. Es wird vermutet, dass die Lyse des Vollblutes die Hintergrundfluoreszenz aufgrund unspezifischer Antikörper-Bindung im Blut erhöht⁸⁵. Um dieses Phänomen zu verringern, wurde in dieser Arbeit das Vollblut zunächst mit Antikörpern inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Lyse der Erythrozyten.

Die Inkubation der Vollblutproben mit den verschiedenen Stimulantien erfolgte im Wärmeschrank bei 37°C unter Zugabe von 5% CO₂. Da keinerlei Ergebnisse anderer Studien zum zeitlichen Verlauf der OR-Expression auf Granulozyten vorlagen, wurden Versuchsreihen mit verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt.

Die im Durchflusszytometer registrierte Fluoreszenz setzt sich aus zwei Komponenten zusammen. Zunächst ist die Kopplung der verwendeten FITC-markierten OR-Antikörper an dem spezifischen Rezeptor maßgeblich für die gemessene Fluoreszenz verantwortlich. Hinzu kommt die zelluläre Autofluoreszenz, die durch im Zellstoffwechsel vorhandene Flavoproteine entsteht^{75;91}. Durch den Eichansatz mit FITC-markierten Anti-Human-IgG-Antikörpern wurde dieser Effekt und die unspezifische Bindung von Antikörpern, die zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal beitragen kann, ausgeschlossen. Die Eichung des

Gerätes mit dem Eichansatz erfolgte auf $<10^1$, dies beinhaltet sowohl die Autofluoreszenz als auch die unspezifische Antikörper-Bindung.

Um zu zeigen, dass eine Inkubationszeit von bis zu maximal 24 Stunden oder der Kontakt mit Fremdoberflächen nicht zur Aktivierung der Granulozyten und damit verbunden zur Erhöhung der OR auf Granulozyten führt, wurde einmalig eine Versuchsreihe mit den verschiedenen Inkubationszeiten, aber ohne Verwendung eines Stimulans durchgeführt und mit der Ausgangsexpression verglichen. Hier zeigte sich keine Veränderung der Grundfluoreszenz.

4.1.2. Wahl der Messparameter

OR auf Immunozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Immunsystems und haben eine spezielle Bedeutung im Hinblick auf die endogene Analgesie. Sie stellen einen wichtigen Angriffspunkt für Zytokine und endogene Opioidpeptide dar und vermitteln somit eine Immunmodulation^{4;26;37} bzw. durch Bindung von Opioiden an entsprechenden Rezeptoren eine Immunsuppression^{40;41}. In dieser Arbeit sollten die Stimulantien St.aureus, TNF- α und LPS hinsichtlich ihrer Wirkung auf die OR-Expression auf Immunozyten untersucht werden. In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde die stimulierende Wirkung von St.aureus auf die Expression von Komplementrezeptoren und Phagozytose-Aktivität, sowie den Oxidativen Burst von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen⁹².

Wir wählten St.aureus als klinisch relevanten Keim, um einen Vergleich mit dem Symptomenkomplex des septischen Krankheitsbildes ziehen zu können. Die physiologische Situation im Organismus sollte, soweit es in-vitro-Experimente zulassen, annähernd dargestellt werden. Die Stimulation von Vollblut mit St.aureus stellt somit ein in-vitro-Modell für die grampositive Sepsis dar.

Als Bestandteil gramnegativer Bakterien hingegen spielt LPS als Auslöser der gram-negativen Sepsis eine wichtige Rolle. Das auch als Endotoxin bezeichnete LPS führt zu einer Aktivierung von Granulozyten und Monozyten; diese sezernieren u.a. vermehrt TNF- α und IL-1 und induzieren über die Aktivierung des Komplementsystems eine generalisierte Entzündungsreaktion. Diese systemische

Inflammation führt zur Zellschädigung mit metabolischen Veränderungen, die sich klinisch als Sepsis manifestieren⁹³. Es ist bekannt, dass LPS die Sekretion von IL-1 erhöht, was wiederum zu einer erhöhten Expression von OR auf der Zelloberfläche von Granulozyten führt^{4;55}.

Eine weitere wichtige Rolle des septischen Krankheitsbildes nimmt TNF- α ein. LPS und TNF- α steigen bei einer beginnenden Infektion zeitversetzt im Patientenplasma an. Als initialer Mediator der Sepsis erreicht TNF- α sein Ausschüttungsmaximum in einem Zeitintervall von 45 Minuten bis zwei Stunden nach stattgefundener Stimulation⁹⁴⁻⁹⁶. Spinas et al. zeigten, dass es nach Endotoxininfusion (LPS) bei gesunden Probanden innerhalb von 30 Minuten bis drei Stunden zu einem 4-5fachen Anstieg des TNF- α -Plasmaspiegels kommt⁹⁷. TNF- α ist in der Sepsis erhöht⁹⁸, der Plasmaspiegel korreliert jedoch nicht mit der Mortalität der Patienten^{93;96}.

4.1.3. Wahl der geeigneten Antikörper

In unseren Experimenten verwendeten wir die Antikörper MOR-1 (sc7489), DOR-1 (sc7491) und KOR-1 (sc 7494) der Firma Santa Cruz Biotechnology, die gegen die Aminosäuren 1-50 des N-terminalen Anteils des jeweiligen OR gerichtet waren (mündliche Auskunft Firma Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg). In unseren Vorversuchen konnten wir zeigen, dass ausschließlich mit den Antikörpern, die sich gegen den N-terminalen Teil des Rezeptors richten, eine erhöhte Expression nach Stimulation gemessen werden konnte. Untersuchungen über die Struktur der OR zeigen, dass es sich um 7-Helix-Proteine handelt, die ein extrazelluläres N-terminales Ende aufweisen (siehe Abbildung 52). Das C-terminale Ende liegt intrazellulär^{99;100}. Dies erklärt, warum die Antikörper, die sich gegen den C-terminalen Teil des Rezeptors richten, keine Messung des OR ermöglichen.

Topham et al. zeigten in ihrer Studie einen wesentlichen Unterschied und hohe Variabilität in der Struktur der drei verschiedenen OR in der N-terminalen Region und der fünften Helix (EL2) als zentrale Bindungsstelle, bei 61%iger Strukturgleichheit in den anderen Regionen⁸⁶. Somit ist gewährleistet, dass die von uns verwendeten Antikörper, die gegen das N-terminale Ende gerichtet sind, keine

Kreuzreaktionen mit den anderen beiden OR aufweisen und nur an dem für sie spezifischen Rezeptor binden. Dynorphin, ein selektiver KOR-Agonist, bindet an der N-terminalen Region von EL2 im KOR⁸⁷. Dies unterstützt die These, dass die N-terminale Region spezifisch für den jeweiligen Rezeptor ist. Metzger et al. postulierten, dass die N-terminalen Regionen mit der höchsten Sequenz-Variabilität spezifisch für die OR sind und dort die Interaktion mit den Liganden stattfindet⁸⁸.

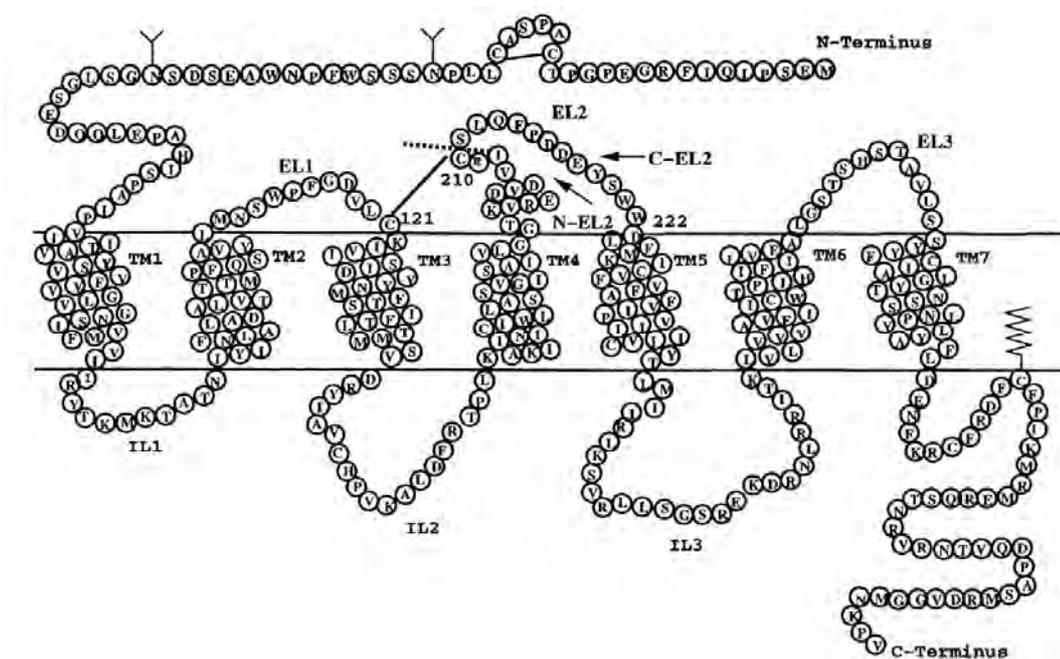


Abbildung 52: Struktureller Aufbau eines Opioidrezeptors⁸⁷, mit dem extrazellulären N-terminalen Ende und dem intrazellulären C-terminalen Ende. Dies erklärt, warum nur die für den N-Terminus spezifischen OR-Antikörper zur Markierung der OR auf der Zelloberfläche geeignet sind.

4.1.4. Durchflusszytometrie

Neben der Fluoreszenzmikroskopie dient insbesondere die Durchflusszytometrie der quantitativen Auswertung verschiedener Zellpopulationen. Beide Verfahren korrelieren zwar gut ⁷⁵, im direkten Vergleich zeigt sich jedoch bei Messungen des Verhältnisses der Leukozytenpopulationen eine Diskrepanz. Von Sucic et al. wurde gezeigt ¹⁰¹, dass es aufgrund der ungenauen Abgrenzung der Leukozytensubpopulationen innerhalb der graphischen Darstellung des Durchflusszytometers zu unterschiedlichen Messergebnissen kommen kann. Nach längerer Stimulation mit St.aureus, insbesondere aber nach Stimulation mit TNF- α und LPS konnten wir im FSC/SSC-Diagramm eine zunehmende Inhomogenität der neutrophilen Granulozytenpopulation im Vergleich zur unstimulierten Probe feststellen. Dies geht mit einer Zunahme des Vorwärtsstreulichtes einher. Die Unterscheidung zwischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten im FSC/SSC-Diagramm kann durch Ähnlichkeiten beider Zellpopulationen in Größe und Granularität erschwert sein ¹⁰². Bei einem Monozytenanteil von 2-8 % im Vergleich zu 50-70% neutrophiler Granulozyten vom Gesamtanteil aller Leukozyten ¹, ist die Anzahl der im Auswertefenster fehlerhaft mitanalysierten Monozyten nur sehr gering, und der Messfehler kann vernachlässigt werden ¹⁰¹.

Bei der Darstellung der Messergebnisse, lagen die gemessenen Fluoreszenzsignale im Häufigkeitsdiagramm um einen Mittelwert gestreut. Das Programm Cell Quest® der Firma BD errechnet neben dem Mittelwert auch den Median der Fluoreszenzintensität, der sich als robuster Messparameter bewährt hat ¹⁰³. Eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität drückt sich in einer Verschiebung des Medians nach rechts innerhalb der gegateten Zellpopulation aus und ist mit der Erhöhung der Anzahl von OR auf der Zelloberfläche gleichzusetzen.

Wir entschieden uns für den Median als statistisch auszuwertende Größe, da dieser im Vergleich zum Mittelwert einer Normalverteilung methodische Vorteile hat. So ist der Median bei Messungen mit großer Streubreite gegenüber „Ausreißern“ sehr stabil. Dies gewährleistet eine wesentlich bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und eine höhere Genauigkeit der Probenanalyse ¹⁰³. Bei einer Differenz

von nur ca. 10% gegenüber den Kontrollwerten wurde in dieser Studie aufgrund der geringen Standardabweichung bei den Messergebnissen das Signifikanzniveau erreicht. Die Vergleichbarkeit der Standardabweichungen erhöhte dabei die Reproduzierbarkeit und damit die Validität der Ergebnisse¹⁰³.

In dieser Studie diente die Durchflusszytometrie der Detektion der extrazellulären, sich auf der Zelloberfläche befindlichen OR. Intrazelluläre OR-Pools oder eine de-novo-Synthese von OR über eine erhöhte mRNA-Transkription wurden nicht untersucht. Deshalb bleibt die Unterscheidung von „niedrig exprimierenden“ und „vermehrt exprimierenden“ Zellen vorerst eine Hypothese und es sind weitere Untersuchungen über die intrazellulären Kaskaden der OR-Regulation in Erwägung zu ziehen. Eine Möglichkeit bietet die quantitative Darstellung des DNA-gebundenen NF- κ B-Gehaltes mittels Durchflusszytometrie. In vorangegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Transkription des OR-Gens und die OR-Expression nach Stimulation mit z.B. TNF- α oder IL-1 NF- κ B-abhängig ist^{5;104;105}. Daher könnten Transkriptionsassays einen validen Ansatz darstellen, die intrazellulären Kaskaden, die an der OR-Expression beteiligt sind, zu überprüfen. Eine weitere Methode stellt die quantitative PCR zum Nachweis eines erhöhten mRNA-Gehaltes nach Inkubation mit dem Stimulus dar. So ließe sich die vermehrte OR-Expression auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten durch eine gesteigerte intrazelluläre de-novo-Synthese (erhöhter mRNA-Gehalt nach Stimulation) erklären oder das Vorhandensein von präformierten OR aus intrazellulären Pools (unveränderter mRNA-Gehalt vor und nach Stimulation) darstellen. Die Immunhistochemie kann weiteren Aufschluss über die Lokalisation intrazellulärer Pools liefern. Einen gravierenden Nachteil dieser Methoden stellt die erforderliche Zellseparation dar, die erforderlich ist, um die einzelnen Leukozytenpopulationen selektiv untersuchen zu können. Eine Zellseparation führt jedoch zu einer Änderung des Aktivitätszustandes, so dass die Interpretation dieser Daten erschwert wird.

Eine unspezifische Reaktion als Ausdruck einer generalisierten Zellaktivierung sollte ebenfalls durch weitere Experimente ausgeschlossen werden.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Effekte von St.aureus

In unserer Studie untersuchten wir die Wirkung von St.aureus auf die Expression der drei bekannten OR auf neutrophilen Granulozyten. Nach Gabe von St.aureus zeigte sich in eine zeitabhängige Zunahme derjenigen neutrophilen Granulozyten, die den Opioidrezeptor vermehrt exprimierten („vermehrt exprimierende“ Granulozyten). Unsere Ergebnisse deuten somit auf einen kausalen Zusammenhang zwischen St.aureus und der erhöhten Expression von OR auf neutrophilen Granulozyten hin. Eine solche Aktivierung von Phagozyten durch St.aureus wurde für zahlreiche andere Funktionsparameter bereits beschrieben. So ist bekannt, dass St.aureus über membranständige Zuckerphosphate an den CR 3-Rezeptor bindet und die granulozytäre Chemotaxis sowie die Aggregation neutrophiler Granulozyten aktiviert ¹⁰⁶.

Schmitz et al. konnten zeigen, dass das δ -Toxin von St.aureus eine hohe Bindungsaffinität zu neutrophilen Granulozyten hat ¹⁰⁷. Es bewirkt eine vermehrte Expression von CD11b/CD18 (CR3) als Ausdruck einer Aktivierung der neutrophilen Granulozyten. Unklar ist bislang, ob über die gleiche Signalkaskade auch die Expression von OR auf der Zelloberfläche von Granulozyten stimuliert werden kann.

Weiterhin ist bekannt, dass das Staphylokokken Enterotoxin B den DOR-mRNA-Spiegel in T-Zellen von Mäusen 15 bis 24 Stunden nach Stimulation erhöht ¹⁰⁸. Es ist nicht auszuschließen, dass das Enterotoxin auf Granulozyten eine vergleichbare Wirkung auf die OR-mRNA hat. Granulozyten zählen im Gegensatz zu T-Lymphozyten zu den Zellen der primären Immunantwort. Dies könnte erklären, warum Granulozyten in unserer Studie bereits nach 15 Minuten und nicht wie T-Zellen erst nach 15 Stunden, wie in der Studie von Sharp eine erhöhte DOR-Expression aufweisen ¹⁰⁸. Diese Annahme deckt sich mit einer Studie von Rittner et al. in der nachgewiesen werden konnte, dass bei Entzündungsprozessen Granulozyten schon nach zwei bis sechs Stunden eine erhöhte Produktion und

Sekretion von endogenen Opioidpeptiden zeigen³⁷. Unsere Ergebnisse stützen die Hypothese, dass *St.aureus* einen unmittelbar einsetzenden Effekt auf die OR-Expression auf Granulozyten hat.

Insbesondere im Zusammenhang mit der Sekretion endogener Opioidpeptide erscheint eine gleichzeitige Erhöhung der OR auf Granulozyten sinnvoll.

Zu den endogenen Opioidpeptiden, die von Granulozyten im entzündeten Gewebe sezerniert werden zählen β -Endorphin, Met-Enkephalin und Dynorphin^{7;16;19;26;29}. Endorphin bindet am MOR^{15;19}, Enkephalin am DOR^{14;15;19} und Dynorphin am KOR^{14;15;19;20;26}. Dies führt zu einer klinisch relevanten peripheren Analgesie, ohne dabei die zentralen Nebeneffekte von Opioiden, wie Atemdepression, Sedation, Euphorie oder Abhängigkeit zu verursachen²⁸⁻³⁰.

Eine Bindung am OR auf Granulozyten wirkt immunmodulatorisch und könnte einen Feedback-Mechanismus über die sezernierten endogenen Opioidpeptide ermöglichen, durch den zum einen die Sekretion von Opioidpeptiden oder anderer Entzündungsmediatoren gesteuert und zum anderen die Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche reguliert werden könnte.

So reguliert der KOR die zelluläre und humorale Immunantwort, inhibiert über eine Veränderung des Zytokinspiegels die Antikörperproduktion¹⁴ und initiiert die T-Zell-Reifung im Thymus²⁶. Die Bindung am DOR moduliert die T-Zell-Proliferation¹⁴ und erhöht sowohl die Aktivität von NK-Zellen als auch die Zytotoxizität von T-Zellen¹⁷. MOR2 vermittelt eine Suppression der NK-Zellen und MOR3 setzt die Chemotaxis sowie die Phagozytose von neutrophilen Granulozyten herab²⁵.

Die Messung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche der „vermehrt exprimierenden“ Granulozyten ergab eine Zunahme bereits nach 15-minütiger Inkubation. Es könnte sich hierbei um ein „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ handeln. Um diesen raschen Prozess zu erklären, kann vermutet werden, dass die erhöhte Expression der Oberflächenrezeptoren durch die Mobilisierung bereits präformierter, intrazellulärer Rezeptoren ermöglicht wird, wie dies für andere Rezeptoren, z.B. CD11b bereits beschrieben ist^{106;109}. Da jedoch auch noch nach sechs Stunden Inkubationszeit eine Veränderung der OR-Dichte zu messen ist,

kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch eine gesteigerte de-novo-Synthese zur vermehrten OR-Expression beiträgt. Wie bereits in Abschnitt 4.1.4 diskutiert sind zur Überprüfung dieser Hypothese weitere molekularbiologische Experimente, die eine gesteigerte Neusynthese von OR ausschließen bzw. belegen, erforderlich.

4.2.2. Effekte von TNF- α

Viele Studien beschreiben die Wirkung von TNF- α auf Immunzellen. So zeigten Asagoe et al. in ihrer Arbeit, dass TNF- α die Expression des Chemokinrezeptors CXCR-2 auf polymorphkernigen Leukozyten reduziert, die O₂⁻-Sekretion erhöht und die durch IL-8 induzierte Chemotaxis inhibiert⁶⁵. In anderen Studien wurde dargestellt, dass neutrophile Granulozyten nach Stimulation mit TNF- α in ihrer zytotoxischen Aktivität verstärkt werden, auf schwache Signale ihrer Umgebung heftiger reagieren⁷¹, die Komplementrezeptoren CR1 und CR3 vermehrt exprimieren und konsekutiv die Margination und Phagozytose-Aktivität erhöht ist^{66;67}. TNF- α ist verantwortlich für die Zunahme von CD11b/CD18 auf neutrophilen Granulozyten⁶⁸ und erhöht deren Apoptose nach Aufnahme von Bakterien¹¹⁰, ein Vorgang der durch Opioidpeptide weiter gesteigert wird¹¹¹. Unklar ist bislang, ob über eine Signalkaskade auch die Expression von OR auf der Zelloberfläche von Granulozyten stimuliert werden kann.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass TNF- α sechs Stunden nach Stimulation die Anzahl der „vermehrt exprimierenden“ neutrophilen Granulozyten signifikant erhöht. Nach sechsständiger Inkubation des Vollblutes mit TNF- α (100 ng/ml) versechsfachte sich der Prozentsatz der Granulozyten, die vermehrt den DOR exprimierten.

Kraus et al. wiesen nach, dass in T-Lymphozyten, Monozyten und PMN die Transkription des MOR-Gens zwei bis sechs Stunden nach Stimulation mit TNF- α über den Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert wird. In unstimulierten Immunzellen hingegen konnten keine MOR-spezifischen Transkripte gefunden werden⁵. Dies könnte erklären, warum in unseren Experimenten erst nach sechs Stunden eine erhöhte Opioidrezeptordichte auf den neutrophilen Granulozyten gefunden wurde. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass das Gen für MOR

eine Promotorsequenz enthält, die IL-1-abhängig reguliert wird ¹⁰⁵, so dass Zwischenschritte, z. B. die Produktion von IL-1, erforderlich sein könnten, um die Transkription des MOR-Gens zu aktivieren. IL-1 ist ein Zytokin, das wie TNF- α bei Inflammation sezerniert wird und ähnliche Wirkungen aufweist. Sowohl IL-1 als auch TNF- α sind in der Lage β -Endorphin freizusetzen ¹¹² und somit indirekt eine endogene Analgesie zu bewirken ¹¹³. Es ist ferner bekannt, dass IL-1 die Expression des MOR auf Endothelzellen nach Stimulation mit LPS durch NF- κ B-Aktivierung erhöht ^{105;114}.

Die Regulation der OR durch TNF- α könnte im Hinblick auf die entzündungsinduzierte Analgesie sehr wichtig sein. Es ist nachgewiesen, dass neutrophile Granulozyten endogene Opioidpeptide und Morphin sezernieren ^{25;27;115;116} und über den OR auf peripheren Nervenenden eine Analgesie im entzündeten Gewebe bewirken können ^{4;31;33}. Die TNF- α -induzierte Erhöhung der OR auf den Granulozyten ermöglicht eine Feedback-Regulation durch endogene Opioidpeptide, die entweder deren eigene Sekretion oder die anderer Zytokine steuern könnte ⁵. Ein Hinweis hierfür ist die Steigerung der TNF- α -induzierten Apoptoserate von Granulozyten durch Opioidpeptide ¹¹¹.

Die Ergebnisse unserer Studie deuten auf ein Zusammenspiel zwischen Opioiden und Zytokinen hin. Die KOR-vermittelte Modulation der zellulären und humoralen Immunantwort inhibiert über eine Veränderung des Zytokinspiegels die Antikörperproduktion ¹⁴ und initiiert die T-Zell-Reifung im Thymus ²⁶. Über den DOR wird die T-Zell-Proliferation moduliert ¹⁴. Dies erhöht sowohl die Aktivität von NK-Zellen als auch die Zytotoxizität von T-Zellen ¹⁷. Der MOR-2 vermittelt die Suppression der NK-Zellen und vermindert die Chemotaxis, der MOR-3 reduziert die Phagozytoseleistung von neutrophilen Granulozyten ²⁵. Diese opioid-abhängigen Vorgänge können möglicherweise durch die Zytokin-induzierte Expression von OR auf Immunozyten modifiziert und verstärkt werden.

4.2.3. Effekte von LPS

Viele Studien haben sich mit der Wirkung von LPS auf das Immunsystem, insbesondere die Wirkung auf neutrophile Granulozyten befasst. So reagieren neutrophile Granulozyten auf LPS mit erhöhter zellulärer Aktivität, wie z.B. Sekretion von Lysozymen, Produktion von Platelet-Activating-Factor (PAF), Leukotriene B4 und 5-Lipoxygenase-Produkten, Freisetzung von Arachidonsäure und O^{2-} , sowie erhöhter Phagozytose^{57;117}. Nur einzelne Studien untersuchten das Expressionsmuster der OR auf Immunzellen nach Stimulation mit LPS.

Bei der Inkubation mit LPS entschieden wir uns für die Vollblutmethode, mit dem Vorteil, dass die für die LPS-Wirkung benötigten Cofaktoren (LBP oder sCD14)^{48;52} enthalten sind. Es wurde gezeigt, dass für die Wirkung von LPS die Anwesenheit von Serum notwendig ist⁵⁷. Gabrilovac et al. zeigten in ihrer Studie, dass LPS nur in Verbindung mit $IFN\gamma$ die Zytotoxizität von Leukozyten erhöht, allerdings wurden diese Versuche mit wesentlich geringeren LPS-Konzentrationen (10 ng/ml) und an isolierten Makrophagen durchgeführt¹¹⁸.

Die Stimulation mit LPS bewirkt nach Bindung an den trimolekularen Cluster aus CD14, MD2 und TLR4^{51;53}, durch Phosphorylierung des NF- κ B-Inhibitors $I\kappa$ B α die Aktivierung von NF- κ B^{73;119}. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert die Transkription von Adhäsionsmolekülen, Interleukinen und iNOS¹⁰⁰ und aktiviert diverse Entzündungsmediatoren wie TNF- α und IL-1^{73;120}. TNF- α und IL-1 selbst sind wiederum in der Lage NF- κ B zu aktivieren¹²⁰ und dadurch z.B. die Transkription des MOR-Gens zu induzieren⁵. Ob LPS in der Lage ist eine NF- κ B-abhängige Transkription von OR-Genen zu induzieren ist bislang jedoch nicht bewiesen. Die Fähigkeit von LPS den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu aktivieren lässt dies jedoch vermuten. Eine Aktivierung von NF- κ B über die LPS-induzierte Sekretion von TNF- α und IL-1 und somit eine Transkription eines OR-Gens erscheint jedoch möglich.

Weiterhin bewirkt LPS die erhöhte Adhäsion von PMN an proteinbedeckten Oberflächen, die Zunahme des Oxidativen Burst, eine erhöhte antibakterielle Potenz^{121;122}, sowie die vermehrte Expression des CD11b/CD18 Rezeptors auf

PMN^{123;124}. Diese Studien verdeutlichen die Aktivierung von Granulozyten durch LPS, so dass angenommen werden kann, dass im Rahmen der Aktivierung auch die OR-Expression auf den Granulozyten positiv beeinflusst wird.

In der vorliegenden Studie konnte eine zeitabhängige, signifikante Zunahme der vermehrt OR-exprimierenden Granulozyten durch die Inkubation mit LPS beobachtet werden. Im Vergleich zu TNF- α geschieht dies jedoch erst verzögert, nämlich nach Stimulationsintervallen von mindestens sechs Stunden.

Frühere Studien belegen bereits, dass LPS zu einer erhöhten MOR-Expression auf Mesenterialzellen von Ratten führt und dass eine Vorbehandlung mit Morphin die LPS-induzierte Sekretion von IL-1 aus Leukozyten potenziert. Dies zeigt, dass durch LPS opioid-abhängige Prozesse im Rahmen der Zytokin-induzierten OR-Expression modifiziert werden könnten⁵⁵. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Naltrexon, ein OR-Antagonist, die LPS-induzierten Symptome des septischen Schocks, wie z. B. Temperaturanstieg, Gewebeschäden und Blutdruckabfall, durch eine verminderte Produktion bzw. Freisetzung von TNF- α verhindert, Morphin diese inhibierende Wirkung jedoch aufhebt⁷³. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass LPS die MOR-mRNA im Jejunum von männlichen Swiss CD-1 Mäusen steigert¹²⁵. Dabei bewirkt die erhöhte Sekretion von Zytokinen wie IL-1 die Zunahme der OR auf Endothelzellen^{4;55}.

An einem in-vitro-Modell mit Makrophagen von Mäusen konnte gezeigt werden, dass Dynorphin-A, ein KOR-Agonist in der Lage ist, die durch LPS-induzierte NO-Freisetzung in murinen Makrophagen und die Zunahme der Zytotoxizität zu inhibieren¹¹⁸.

LPS induziert die Synthese immunreaktiver Endorphine in Makrophagen und Mononukleären Zellen, dies hat modulierende Wirkungen auf das Immun- und Kreislaufsystem¹²⁶. Bekannt ist außerdem, dass LPS eine Sekretion von IL-1 bewirkt^{54;55}. IL-1 wiederum führt zur Freisetzung von β -Endorphin¹²⁷, einem endogenem Opioidpeptid und Liganden am MOR^{15;19}. Zusammenfassend deuten diese Studien auf einen engen Zusammenhang der LPS-vermittelten Effekte mit dem Opioidrezeptorsystem und endogenen Opioidpeptiden hin.

Im Vergleich zu TNF- α , kommt die in unseren Ergebnissen dargestellte zeitliche Verzögerung der OR-Expression nach Inkubation mit LPS durch einen über die Zytokine TNF- α und IL-1 vermittelten Zwischenschritt zustande. Die Sekretion von TNF- α und IL-1 aus Makrophagen und Monozyten wird dabei durch LPS induziert^{73;126;128;129}.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen einen kausalen Zusammenhang zwischen LPS und den Zytokinen TNF- α und IL-1 einerseits und der Erhöhung der OR auf Granulozyten andererseits vermuten. So ist es möglich, dass exogene Opioidpeptide oder endogene Opioidpeptide, die direkt oder indirekt (über TNF- α und IL-1) nach LPS-Stimulation von neutrophilen Granulozyten sezerniert werden, über OR an neutrophile Granulozyten binden und deren Immunfunktion modulieren.

Es bleibt jedoch weiterhin unklar, welche intrazellulären Signalkaskaden durch OR aktiviert werden und wie diese die Sekretion von endogenen Opioidpeptiden bewirken oder beeinflussen. Weitere Studien müssen klären, inwieweit die OR-Expression durch de-novo-Synthese bzw. durch Freisetzung von Rezeptormolekülen aus präformierten Pools gesteuert wird. Die molekularbiologische Untersuchung transkriptioneller Regulationsvorgänge, wie z. B. die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch proinflammatorische Stimulantien und ihre Bedeutung für das leukozytäre Opioidsystem stellen weitere Ansatzpunkte für Folgestudien dar.

4.2.4. Auswirkung der Stimulantien auf Granulozyten von septischen analgosedierten Patienten

Untersucht wurde das Expressionsverhalten des Opioidrezeptors neutrophiler Granulozyten von mit Ketamin oder Fentanyl sedierten septischen Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden.

Bei der Stimulation mit St.aureus konnte eine verzögerte OR-Expression bei einem der beiden Intensivpatienten beobachtet werden. Bei dem Intensivpatienten, bei dem eine Sedierung mit Ketamin erfolgte (PAT-INT-1), ist ein mit den gesunden Probanden fast paralleler Kurvenverlauf zu messen, wo hingegen der mit Fentanyl sedierte Patient (PAT-INT 2) erst später eine Reaktion auf die Stimulation mit St.aureus aufzeigt.

Diese als exemplarisch anzusehenden Messreihen lassen vermuten, dass die Sedierung mit Fentanyl eine Auswirkung auf die Messung der OR auf der Oberfläche der Granulozyten haben könnte. Ein negativer Einfluss von Fentanyl auf die Phagozytose und den oxidativen Burst von Granulozyten konnte in früheren Studien allerdings nicht nachgewiesen werden ^{130,100}. Eine stimulierende Wirkung von Fentanyl ist für einen rapiden und signifikanten Anstieg der NK-Zell-Zytotoxizität, einhergehend mit einer Erhöhung der CD16 und CD8 Zellen im peripheren Blut, beschrieben worden ⁹. Andere Immunreaktionen wurden durch Fentanyl nicht beeinflusst ¹³¹. Auch Jacobs et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass Fentanyl zwar die Granulozytenfunktion und die Zirkulation von T- und B-Lymphozyten nicht beeinflusst, die NK-Zell-Anzahl im peripheren Blut jedoch signifikant erhöht ¹³². Im Gegensatz zu Versuchen, bei denen die akute Reaktion des Fentanyls (15 – 30 Minuten nach Applikation) beschrieben wurde, konnten Martucci et al. bei männlichen Swiss Mäusen einen inhibierenden Effekt auf die Lymphoproliferation, die NK-Zell-Aktivität, sowie die IL-2 und IFN- γ Produktion nach einer kontinuierlichen Gabe von Fentanyl über 24 Stunden nachweisen ¹³³. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die OR auf den Granulozyten durch das Fentanyl blockiert sind und die Zellen erst verzögert aktiviert werden können. Zur Überprüfung dieser Hypothese sind weitere Studien mit entsprechendem

Stichprobenumfang erforderlich. Des Weiteren muss zwischen einer Kurzzeit und Langzeit-Applikation von Fentanyl unterschieden werden.

Während LPS bei gesunden Probanden eine erhöhte Sekretion von Zytokinen bewirkt, ist eine Verringerung dieser Freisetzung bei septischen Patienten die mit LPS stimuliert wurden zu beobachten¹³⁴. Dies lässt vermuten, dass die Leukozyten septischer Patienten weniger ausgeprägt auf Endotoxin reagieren und dass es zu einer geringeren Freisetzung von TNF- α und IL-1 kommt. Dies könnte die verzögerte und geringere OR-Expression bei den beiden hier exemplarisch untersuchten Intensivpatienten erklären. Bergmann et al. bewiesen in ihrer Studie einen supprimierenden Effekt von Katecholaminen auf die LPS-induzierte TNF- α Produktion bei gesunden Probanden und septischen Patienten¹³⁵. Die bei unseren Intensivpatienten in der Mehrheit der Fälle durchgeführte Katecholamintherapie kann somit ebenfalls die Reagibilität der Leukozyten beeinflussen. Diese Ergebnisse deuten wiederum auf eine über TNF- α und IL-1-vermittelte Wirkung von LPS auf die Expression von OR auf neutrophilen Granulozyten hin.

Die in diesem Teil der Studie gesammelten Ergebnisse stellen Einzelbeobachtungen dar, die in Folgestudien detailliert untersucht werden müssen. Die Interpretation ist aufgrund der geringen Patientenzahl (n=2) nicht möglich. Möglicherweise weisen neutrophile Granulozyten von septischen Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden ein differentes Stimulationsmuster auf, da das Immunsystem dieser Patienten bereits aktiviert ist.

4.2.5. Vergleich zwischen Ketamin und Fentanyl

Die beiden Medikamente Ketamin und Fentanyl werden zur Analgesie von Intensivpatienten verwendet, unterscheiden sich jedoch in ihrer Wirkung auf das Immunsystem:

Bekannt ist, dass Ketamin die LPS-induzierte TNF- α -Produktion um 50% reduziert¹⁰⁰. Takenaka et al. zeigten, dass Ketamin die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α aus Mäuse-Makrophagen supprimiert¹³⁶. In weiteren Studien wurde dargelegt, dass Ketamin bei Alveolarzellen und neutrophilen Granulozyten aus pulmonalem Gewebe von erwachsenen, männlichen Wistar-Ratten die LPS-

induzierte NF- κ B Aktivierung und damit die TNF- α Produktion und Sekretion inhibiert¹³⁷. Yu et al demonstrierten, dass LPS nach intraperitonealer Applikation an männlichen Sprague-Dawley Ratten, zu einer erhöhten TLR4-Expression und zur NF- κ B-Aktivierung führt, diese NF- κ B-Aktivierung aber durch die Gabe von Ketamin, möglicherweise über die Suppression der TLR4-Expression inhibiert wird¹³⁸. Die hemmende Wirkung von Ketamin auf die NF- κ B-induzierten Transkriptionswege ist daher als entscheidender Wirkmechanismus anzusehen.

Darüber hinaus ist ein inhibitorischer Effekt von Ketamin auf Entzündungsmediatoren^{137;139} und eine herabgesetzte O₂⁻-Produktion von neutrophilen Granulozyten in-vitro durch Ketamin^{139;140} bekannt. Weigand et al. wiesen eine Hemmung der CD18-Expression nach Gabe von Ketamin nach¹⁴⁰. Der Wirkungsmechanismus ist jedoch noch nicht geklärt, es wird davon ausgegangen, dass er nicht über spezifische Rezeptoren vermittelt wird¹⁴⁰. Zusammenfassend lässt sich also vermuten, dass auch die OR-Expression auf Granulozyten durch Ketamin inhibierend beeinflusst werden könnte, da wie oben dargestellt, nachgewiesen werden konnte, dass die OR-Expression auf Granulozyten durch LPS und TNF- α über NF- κ B vermittelt wird und diese Kaskade durch Ketamin inhibiert wird.

Für Fentanyl konnte bislang kein inhibitorischer Einfluss auf die Phagozytose oder den Oxidativen Burst festgestellt werden^{100;141-143}, so dass die für Morphin beschriebenen Wirkungen, wie Verringerung der Migration gegenüber komplementgebundenem LPS und der Adhäsion am Endothel^{40;144}, die Potenzierung der LPS-induzierte Sekretion von IL-1^{20;55}, sowie den supprimierenden Effekt auf das Immunsystem und die gesteigerte Wirkung von LPS¹⁴⁵, nicht sicher auf Fentanyl übertragen werden können. Unsere Arbeitsgruppe zeigte in vorangegangenen Studien, dass Fentanyl im Vergleich zu Morphin keine Affinität zum μ 3-Rezeptor besitzt und somit keine immunmodulatorischen Effekte ausübt¹⁴⁴. Fraglich bleibt, ob Fentanyl über einen der anderen beiden OR (DOR oder KOR) eine Wirkung vermitteln kann. In einer Studie von Suzuki et al. konnte gezeigt werden, dass Morphin in MOR-Knockout-Mäusen über den KOR einen immunsuppressiven Effekt vermittelt¹⁴⁶. Über diesen

Rezeptor könnte Fentanyl immunmodulatorisch wirken. Experimente an männlichen CD₁ Mäusen zeigten weiterhin, dass Morphin bei den Versuchstieren den Ausbruch von Infektionen begünstigte, was vor allem auf eine Verminderung der Phagozytose und des Oxidativen Burst der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zurückgeführt wurde¹⁴⁷. Krumholz et al. untersuchten in-vitro den Effekt von Ketamin, Fentanyl und Morphin auf die Aktivität von Lysozym und β -Glucuronidase (BG), die durch PMN sezerniert werden. Ketamin, Fentanyl und Morphin bewirken eine erhöhte BG-Aktivität, Morphin sogar in therapeutischen Plasmakonzentrationen. Alle drei Substanzen hatten jedoch keinen Effekt auf die lysozymale Aktivität¹⁴⁸, was wiederum darauf hinweist, dass Fentanyl auf die lysozymale Aktivität von Granulozyten keinen Einfluss hat. Unklar bleibt, inwieweit diese immunmodulatorischen Effekte von Morphin auf Fentanyl übertragen werden können.

Aus unseren Ergebnissen konnten keine Schlüsse gezogen werden, da aufgrund der zu großen individuellen Unterschiede (Grunderkrankung, Begleiterkrankung, zusätzliche Medikation und ein individueller Immunstatus) eine zu große Streuung der Messwerte vorlag. Eine zukünftige Studie mit einem möglichst homogenem Patientenkollektiv und größerem Stichprobenumfang könnte Aufschluss darüber liefern.

4.3.Klinische Bedeutung

Eine steigende Inzidenz der gram-negativen und besonders der gram-positiven Sepsis, und eine nach wie vor hohe Mortalität und unzureichende Therapiemöglichkeit stellen auch heute noch ein ungelöstes Problem dar, obwohl zahlreiche Untersuchungen über die Pathophysiologie und zellulären Interaktionen des septischen Krankheitsbildes durchgeführt worden sind^{149;150}. Das Zusammenspiel von Opioid- und Immunsystem unter diesem Krankheitsbild könnte dabei eine zentrale Rolle spielen, da eine immunmodulierende Wirkung von endogenen und exogenen Opioiden über OR auf den Zellen des Immunsystems bekannt ist¹⁰⁰.

Im Rahmen von Inflammation und Stress wird sowohl die Opioidrezeptordichte auf primären zentralen und peripheren Afferenzen, als auch die Sekretion von endogenen Opioidpeptiden erhöht¹¹¹. Dabei dient Corticotropin als Stimulans für die Freisetzung von Opioidpeptiden⁹², wie β -Endorphin aus dem Vorläufermolekül POMC¹⁵¹. Die endogenen Opioidpeptide bewirken an peripheren Neuronen eine Schmerzlinderung¹⁰⁰. Auf neutrophilen Granulozyten kommt es zur Steigerung der CD11b/CD18- und Fc γ -Rezeptoren-Expression sowie zu erhöhter Phagozytose-Aktivität und Produktion von Sauerstoff-Radikalen⁹². Des Weiteren ist bekannt, dass Opioidpeptide die TNF-induzierte Apoptoserate von neutrophilen Granulozyten erhöhen¹¹¹.

In anderen Studien konnte die Produktion von endogenem Morphin in den chromaffinen Zellen der Nebenniere nachgewiesen werden¹⁵². Endogenes Morphin wird nach Trauma oder Stress sezerniert und bewirkt über MOR eine Reduktion der Phagozytose und Zytokinproduktion von Granulozyten²⁵. Möglicherweise spielt die Morphinkonzentration dabei eine wichtige Rolle, da nachgewiesen werden konnte, dass mit höheren Morphinkonzentrationen die CD11b-, CD16- und CD35-Rezeptordichte auf neutrophilen Granulozyten stärker vermindert wird¹⁴⁴ und dass die LPS-induzierte Aktivierung von NF- κ B, die zur Zytokinproduktion und -Sekretion führt, durch höhere Morphinkonzentrationen inhibiert wird¹¹⁹.

Aber nicht nur endogene Opioide, sondern auch exogene Opioide wirken über diese Rezeptoren auf die Immunzellen. κ -Agonisten stimulieren über KOR T- und B-Zellen und aktivieren Granulo- und Monozyten. Über μ -agonistisch wirkende Substanzen werden hingegen die Funktionen von mononukleären Zellen und Granulozyten gehemmt. Über μ - und δ -Agonisten wird die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten inhibiert¹⁵³. Auf Granulozyten bewirkt Morphin eine Reduktion der Komplement- und IgG-Rezeptoren, wodurch die Phagozytose-Aktivität und der Oxidative Burst eingeschränkt werden¹⁵⁴. Morphin inhibiert ferner die LPS-induzierte NF- κ B-^{25;119} und AP-1-Aktivierung¹⁵⁵. Dadurch könnte Morphin die Expression von Genen, die pro-inflammatorische Mediatoren kodieren²⁵ regulieren. Es ist bekannt, dass die chronische Behandlung mit Morphin die

Konzentration von TNF- α und Il-1 senkt, die granulozytäre Aktivität herabsetzt und die Mortalität erhöht¹⁵⁶. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Opiode über KOR stimulierende Effekte und über MOR inhibierende Effekte auf Zellen des Immunsystems haben.

Die Supprimierung des Immunsystems könnte den Ausbruch von Infektionen begünstigen. Im Umkehrschluss kann allerdings vermutet werden, dass septische Patienten, die eine erhöhte OR-Expression auf neutrophilen Granulozyten aufweisen, durch eine Therapie mit Opioiden, insbesondere Morphin mit einer verminderten Abwehrleistung reagieren. Die im Tierexperiment beobachtete erhöhte Mortalität von LPS in Verbindung mit Morphin ließe sich so erklären⁷³.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Immunstimulantien St.aureus, LPS und TNF- α , eine Aktivierung des Opioidsystem auf Leukozyten stattfindet. Daher sollten immunmodulatorische Eigenschaften von Analgetika bei der Sedierung von septischen Patienten mit Opioiden in Betracht gezogen werden, auch wenn weitere Studien die klinische Bedeutung dieses Phänomens klären müssen. Die derzeit vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass Fentanyl gegenüber Morphin und Ketamin möglicherweise Vorteile aufweisen könnte, da Fentanyl in vitro und teils auch in vivo einen geringeren immunsuppressiven Effekt insbesondere auf die Funktion von PMN aufweist. Weitere Studien sind jedoch zwingend erforderlich, um diese Frage abschließend zu beurteilen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In vorangegangenen Studien wurde nachgewiesen, dass auch auf Immunozyten die drei klassischen Opioidrezeptoren (μ , δ und κ) exprimiert werden. Im Rahmen von Entzündungsprozessen produzieren und sezernieren Granulozyten endogene Opioidpeptide, die über periphere Nervenafferenzen eine Schmerzregulierung bewirken. In unserer Studie wollten wir die Wirkung von St.aureus und zwei potenten Immunstimuli (LPS und TNF- α) auf das Expressionsverhalten der OR auf Granulozyten untersuchen.

Dazu wurde Vollblut von 12 gesunden Probanden für 15, 30 und 60 Minuten sowie für 3 und 6 Stunden mit St.aureus inkubiert sowie für 3, 6, 12 und 24 Stunden mit LPS oder TNF- α . In weiteren Untersuchungen wurde das Expressionsmuster der verschiedenen OR auf Granulozyten von septischen und mit Fentanyl oder Ketamin analgesiierten Intensivpatienten gemessen.

In in-vitro Versuchen mit St.aureus konnte eine signifikante Zunahme der vermehrt OR exprimierenden Granulozyten bereits nach 15 Minuten für alle drei OR-Subtypen beobachtet werden. TNF- α aktivierte nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden und LPS nach 12-stündiger Inkubation die OR-Expression auf Granulozyten. Die Auswertung der OR-Expression bei Intensivpatienten wies eine hohe Streubreite der Messwerte auf, so dass signifikante Unterschiede nicht nachgewiesen werden konnten. Ursache hierfür ist vermutlich das Vorhandensein verschiedener Einfluss- und Störfaktoren wie Grund- und Begleiterkrankungen, zusätzliche Medikation und individueller Immunstatus.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Entzündungsmediatoren und -induktoren die OR-Expression auf Granulozyten beeinflussen. Die unmittelbar einsetzende Wirkung von St.aureus (15 Minuten) steht im Gegensatz zu zeitlich verzögert auftretenden LPS- und TNF- α -Effekten und lässt auf unterschiedliche Wirkungsmechanismen schließen. Es kann vermutet werden, dass St.aureus

überwiegend über eine Freisetzung von Rezeptoren aus intrazellulären Pools die Erhöhung der Rezeptoren bewirkt, während LPS und TNF- α über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B eine de-novo-Synthese der Rezeptoren induziert. Zur Überprüfung dieser Hypothese sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

6. SUMMARY

Previous studies have shown that immunocytes express the three classical opioid receptors (μ , δ and κ). During inflammation granulocytes produce and release endogenous opioid peptides, which affect pain control by binding on peripheral nerves. In this study we demonstrate the effect of St.aureus, and two major immune stimuli (LPS and TNF- α) on the expression of opioid receptors on granulocytes.

Whole blood from 12 healthy volunteers was incubated for 15, 30 and 60 minutes as well as for 3 and 6 hours with St.aureus, for 3, 6, 12 and 24 hours with LPS or TNF- α . In further experiments we investigated the expression of the different opioid receptors on granulocytes from septic intensive care unit patients receiving either fentanyl or ketamine analgesia.

Our results show a significant increase of activated granulocytes by stimulation with St.aureus after 15 minutes for all three opioid receptors. TNF- α increased the expression of opioid receptors on granulocytes after 6 hours and LPS after 12 hours of incubation. Opioid receptor expression varied considerably between septic patients, so that a significant difference between ketamine and fentanyl analgesia could not be demonstrated. These patients differed in their underlying disease, their additional medication and their individual immune status.

Our study demonstrates that mediators and inductors of inflammation influence opioid receptor expression on granulocytes. The immediate response to incubation with St.aureus (15 minutes) is in contrast to the late effects of LPS and TNF- α . The existence of two different pathways could explain this observation: St.aureus might possibly releases opioid receptors from a preformed pool, while LPS and TNF- α might activate the de-novo-synthesis of opioid receptors via transcription factor NF- κ B. Further experiments such as molecular biology studies are needed to investigate this hypothesis.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Zankovich R, Diehl V: Leukozytopenie und Leukozytose, Innere Medizin, 4 edition. Edited by Classen, Diehl, Kochsiek. Urban & Schwarzenberg, 1998, p 161
2. Edwards SW: Neutrophils and host defense, Biochemistry and physiology of the neutrophil. Edited by Edwards SW. Cambridge, Cambridge University Press, 1994, p 32
3. Brack A, Rittner HL, Machelska H, Leder K, Mousa SA, Schafer M, Stein C: Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. Pain 2004; 112: 229-38
4. Borner C, Holtt V, Kraus J: Involvement of activator protein-1 in transcriptional regulation of the human mu-opioid receptor gene. Mol.Pharmacol. 2002; 61: 800-5
5. Kraus J, Borner C, Giannini E, Holtt V: The role of nuclear factor kappaB in tumor necrosis factor-regulated transcription of the human mu-opioid receptor gene. Mol.Pharmacol 2003; 64: 876-84
6. Herz, A. Opioids. Hdb.Exp.Pharmac. 104(1), 2. 2000.
Ref Type: Abstract
7. Barker DP, Rutter N: Stress, severity of illness, and outcome in ventilated preterm infants. Arch Dis Child Fetal Neonatal 1996; 75: 187-90
8. Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 1996,
9. 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: 94-9, table
10. Chuang TK, Killam KF, Jr., Chuang LF, Kung HF, Sheng WS, Chao CC, Yu L, Chuang RY: Mu opioid receptor gene expression in immune cells. Biochem.Biophys.Res.Commun. 1995; 216: 922-30

11. Hassan AH, Pzewlocki R, Herz A, Stein C: Dynorphin, a preferential ligand for kappa-opioid receptors, is present in nerve fibers and immune cells within inflamed tissue of the rat. *Neurosci.Lett.* 1992; 140: 85-8
12. Sharp BM, Roy S, Bidlack JM: Evidence for opioid receptors on cells involved in host defense and the immune system. *J.Neuroimmunol.* 1998; 83: 45-56
13. Madden JJ, Whaley WL, Ketelsen D: Opiate binding sites in the cellular immune system: expression and regulation. *J.Neuroimmunol.* 1998; 83: 57-62
14. Bidlack JM: Detection and function of opioid receptors on cells from the immune system. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 2000; 7: 719-23
15. Sibinga NE, Goldstein A: Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune system. *Annu.Rev.Immunol.* 1988; 6:219-49.: 219-49
16. Jordan B, Devi LA: Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. *Br J Anaesth* 1998; 81: 12-9
17. Arakawa K, Akami T, Okamoto M, Akioka K, Nakai I, Oka T, Nagase H: Immunosuppression by delta opioid receptor antagonist. *Transplant.Proc.* 1993; 25: 738-40
18. Beck M, Mirmohammadsadegh A, Franz B, Blanke J, Hengge UR: Opioid receptors on white blood cells: effect of HIV infection and methadone treatment. *Pain* 2002; 98: 187-94
19. Mizoguchi H, Tseng LF, Suzuki T, Sora I, Narita M: Differential mechanism of G-protein activation induced by endogenous mu-opioid peptides, endomorphin and beta-endorphin. *Jpn J Pharmacol JID - 2983305R* 2002; 89: 229-34
20. Suzuki S, Chuang TK, Chuang LF, Doi RH, Chuang RY: Morphine upregulates kappa-opioid receptors of human lymphocytes. *Adv Exp Med Biol* 2002; 493: 81-7
21. Sharp BM: Lymphocyte modulation by seven transmembrane receptors: a brief review of session 1. *Adv Exp Med Biol* 2002; 493: 255-8
22. Connor M, Christie MD: Opioid receptor signalling mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 493-9
23. Karow T, Lang R: Analgetika, Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Edited by Karow T, Lang R. 2000, p 438

24. Cadet P, Mantione K, Bilfinger TV, Stefano GB: Real-time RT-PCR measurement of the modulation of Mu opiate receptor expression by nitric oxide in human mononuclear cells. *Med.Sci.Monit.* 2001; 7: 1123-8
25. Stefano GB, Goumon Y, Casares F, Cadet P, Fricchione GL, Rialas C, Peter D, Sonetti D, Guarna M, Welters ID, Bianchi E: Endogenous morphine. *Trends Neurosci.* 2000; 23: 436-42
26. Gaveriaux-Ruff C, Simonin F, Filliol D, Kieffer BL: Enhanced humoral response in kappa-opioid receptor knockout mice. *J.Neuroimmunol.* 2003; 134: 72-81
27. Harbour DV, Smith EM, Blalock JE: Splenic lymphocyte production of an endorphin during endotoxic shock. *Brain Behav.Immun.* 1987; 1: 123-33
28. Rittner HL, Machelska H, Stein C: Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. *J.Leukoc.Biol.* 2005; 78: 1215-22
29. Rittner HL, Brack A, Stein C: Pain and the immune system. *Br.J.Anaesth.* 2008; .:
30. Machelska H, Stein C: Leukocyte-derived opioid peptides and inhibition of pain. *J.Neuroimmune.Pharmacol.* 2006; 1: 90-7
31. Sharp BM, Tsukayama DT, Gekker G, Keane WF, Peterson PK: Beta-endorphin stimulates human polymorphonuclear leukocyte superoxide production via a stereoselective opiate receptor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1987; 242: 579-82
32. Sharp BM, Keane WF, Suh HJ, Gekker G, Tsukayama D, Peterson PK: Opioid peptides rapidly stimulate superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and macrophages. *Endocrinology* 1985; 117: 793-5
33. Van Epps DE, Saland L, Taylor C, Williams RC, Jr.: In vitro and in vivo effects of beta-endorphin and met-enkephalin on leukocyte locomotion. *Prog.Brain Res.* 1983; 59:361-74.: 361-74
34. Ernst G, Pfaffenzeller P: [Effect on morphine and other opioids on immune function]. *Schmerz.* 1998; 12: 187-94
35. Pasotti D, Mazzone A, Rossi M, Ricevuti G: In vitro effect of opioid agonist and antagonist on superoxide release by granulocytes. *Funct.Neurol.* 1992; 7: 445-9
36. Stein C, Machelska H, Schafer M: Peripheral analgesic and antiinflammatory effects of opioids. *Z Rheumatol* 2001; 60: 416-24

37. Rittner HL, Brack A, Machelska H, Mousa SA, Bauer M, Schafer M, Stein C: Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology* JID - 1300217 2001; 95: 500-8
38. Mellon RD, Bayer BM: Evidence for central opioid receptors in the immunomodulatory effects of morphine: review of potential mechanism(s) of action. *J Neuroimmunol* 1998; 83: 19-28
39. Roy S, Charboneau RG, Barke RA, Loh HH: Role of mu-opioid receptor in immune function. *Adv.Exp.Med Biol.* 2001; 493:117-26.: 117-26
40. Suzuki S, Miyagi T, Chuang TK, Chuang LF, Doi RH, Chuang RY: Morphine upregulates mu opioid receptors of human and monkey lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 621-8
41. Sacerdote P, Gaspani L, Rossoni G, Panerai AE, Bianchi M: Effect of the opioid remifentanyl on cellular immune response in the rat. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 713-9
42. Bilfinger TV, Kushnerik V, Bundz S, Liu Y, Stefano GB: Evidence for morphine downregulating immunocytes during cardiopulmonary bypass in a porcine model. *Int.J.Cardiol.* 1996; 53 Suppl:S39-46.: S39-S46
43. Yeager MP, Yu CT, Campbell AS, Moschella M, Guyre PM: Effect of morphine and beta-endorphin on human Fc receptor-dependent and natural killer cell functions. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1992; 62: 336-43
44. Kreymann G, Wolf M: [History and definition of sepsis--do we need new terminology?]. *Anesthesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther.* 1996; 31: 9-14
45. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003; 31: 1250-6
46. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992; 20: 864-74
47. Riedemann NC, Guo RF, Bernacki KD, Reuben JS, Laudes IJ, Neff TA, Gao H, Speyer C, Sarma VJ, Zetoune FS, Ward PA: Regulation by C5a of neutrophil activation during sepsis. *Immunity.* 2003; 19: 193-202
48. Tobias PS, Tapping RI, Gegner JA: Endotoxin interactions with lipopolysaccharide-responsive cells. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 476-81

49. Galanos C, Luderitz O, Rietschel ET, Westphal O, Brade H, Brade L, Freudenberg M, Schade U, Imoto M, Yoshimura H, .: Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. Eur.J.Biochem. 1985; 148: 1-5
50. Sweet MJ, Hume DA: Endotoxin signal transduction in macrophages. J Leukoc Biol 1996; 60: 8-26
51. Dunzendorfer S, Lee HK, Soldau K, Tobias PS: Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses. FASEB J. 2004; 18: 1117-9
52. Hailman E, Vasselon T, Kelley M, Busse LA, Hu MC, Lichenstein HS, Detmers PA, Wright SD: Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of lipopolysaccharide and soluble CD14. J Immunol 1996; 156: 4384-90
53. Doyle SL, O'Neill LA: Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. Biochem.Pharmacol. 2006; 72: 1102-13
54. Mukaida N, Ishikawa Y, Ikeda N, Fujioka N, Watanabe S, Kuno K, Matsushima K: Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock: biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF- kappaB and regulation of cytokine production/action through beta2 integrin in vivo. J Leukoc Biol 1996; 59: 145-51
55. Chang SL, Felix B, Jiang Y, Fiala M: Actions of endotoxin and morphine. Adv.Exp.Med Biol. 2001; 493:187-96.: 187-96
56. Aida Y, Pabst MJ: Priming of neutrophils by lipopolysaccharide for enhanced release of superoxide. Requirement for plasma but not for tumor necrosis factor-alpha. J.Immunol. 1990; 145: 3017-25
57. Aida Y, Pabst MJ: Neutrophil responses to lipopolysaccharide. Effect of adherence on triggering and priming of the respiratory burst. J Immunol 1991; 146: 1271-6
58. Kayser FH: Allgemeine Bakteriologie, Lipopolysaccharid, Medizinische Mikrobiologie, 10 edition. Edited by Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. Stuttgart, Thieme, 2001, pp 163-4
59. Marie C, Muret J, Fitting C, Losser MR, Payen D, Cavaillon JM: Reduced ex vivo interleukin-8 production by neutrophils in septic and nonseptic systemic inflammatory response syndrome. Blood 1998; 91: 3439-46

60. Marie C, Fitting C, Muret J, Payen D, Cavaillon JM: Interleukin 8 production in whole blood assays: Is interleukin 10 responsible for the downregulation observed in sepsis? *Cytokine* 2000; 12: 55-61
61. Kayser FH: Bakterien als Krankheitserreger, *Staphylococcus aureus*, Medizinische Mikrobiologie, 10 edition. Edited by Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. Stuttgart, Thieme, 2001, pp 239-44
62. Edwards-Jones V, Foster HA: Effects of silver sulphadiazine on the production of exoproteins by *Staphylococcus aureus*. *J.Med.Microbiol.* 2002; 51: 50-5
63. Sheu JR, Lee CR, Lin CH, Hsiao G, Ko WC, Chen YC, Yen MH: Mechanisms involved in the antiplatelet activity of *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid in human platelets. *Thromb.Haemost.* 2000; 83: 777-84
64. Bubeck WJ, Williams WA, Missiakas D: Host defenses against *Staphylococcus aureus* infection require recognition of bacterial lipoproteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2006; 103: 13831-6
65. Asagoe K, Yamamoto K, Takahashi A, Suzuki K, Maeda A, Nohgawa M, Harakawa N, Takano K, Mukaida N, Matsushima K, Okuma M, Sasada M: Down-regulation of CXCR2 expression on human polymorphonuclear leukocytes by TNF-alpha. *J.Immunol.* 1998; 160: 4518-25
66. Berger M, Wetzler EM, Wallis RS: Tumor necrosis factor is the major monocyte product that increases complement receptor expression on mature human neutrophils. *Blood* 1988; 71: 151-8
67. Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht E, Svedersky LP, Finkle BS, Palladino MA, Jr.: Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. *J Immunol.* 1985; 135: 2069-73
68. Witthaut R, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H: Complement and tumor necrosis factor-alpha contribute to Mac-1 (CD11b/CD18) up-regulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia in vivo. *J Leukoc.Biol.* 1994; 55: 105-11
69. Ahmed NA, Yee J, Giannias B, Kapadia B, Christou NV: Expression of human neutrophil L-selectin during the systemic inflammatory response syndrome is partly mediated by tumor factor alpha. *Arch.Surg.* 1996; 131: 31-5

70. Cuzzola M, Mancuso G, Beninati C, Biondo C, von Hunolstein C, Orefici G, Espevik T, Flo TH, Teti G: Human monocyte receptors involved in tumor necrosis factor responses to group B streptococcal products. *Infect Immun* 2000; 68: 994-8
71. Yee J, Christou NV: The local role of tumor necrosis factor alpha in the modulation of neutrophil function at sites of inflammation. *Arch.Surg.* 1994; 129: 1249-55
72. van DM: Kinetics of tumour necrosis factor-alpha, soluble tumour necrosis factor receptors, interleukin 1-beta and its receptor antagonist during serious infections. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 1994; 13 Suppl 1:S12-6.: S12-S16
73. Greeneltch KM, Haudenschild CC, Keegan AD, Shi Y: The opioid antagonist naltrexone blocks acute endotoxic shock by inhibiting tumor necrosis factor-alpha production. *Brain Behav.Immun.* 2004; 18: 476-84
74. Raffael A, Nebe CT, Valet G: Grundlagen der Durchflußzytometrie., Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Edited by G.Schmitz und G.Rothe (Hrsg.). Stuttgart, Schattauer-Verlag, 1994, pp 3-49
75. Nebe CT: [Flow cytometry and data analysis]. *Infusionsther.Transfusionsmed.* 1996; 23: 111-3
76. J.Graf, U.Janssens: Scoring-Systeme in der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung der Sepsis - diagnostische und therapeutische Implikation. *Intensivmed* 2004; 41: 476-87
77. Menzebach, A., Hirsch, J., Hempelmann, G., and Welters, I. D. Different Effekte von Opiaten und Opioidpeptiden auf die Funktion neutrophiler Granulozyten. 2001. Medizinisches Zentrum für Chirurgie, Anaesthesiologie und Urologie, Abteilung für Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin, <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2001/515/>.
Ref Type: Thesis/Dissertation
78. Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, Tervaert JW: Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med.* 2000; 26: 883-92
79. Antal P, Sipka S, Suranyi P, Csipo I, Seres T, Marodi L, Szegedi G: Flow cytometric assay of phagocytic activity of human neutrophils and monocytes in whole blood by neutral red uptake. *Ann.Hematol.* 1995; 70: 259-65

80. Bednar MM, Balazy M, Murphy M, Booth C, Fuller SP, Barton A, Bingham J, Golding L, Gross CE: Peroxynitrite augments fMLP-stimulated chemiluminescence by neutrophils in human whole blood. *J.Leukoc.Biol.* 1996; 60: 619-24
81. Blix IJ, Helgeland K, Kahler H, Lyberg T: LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the expression of beta2 integrins and L-selectin in an ex vivo human whole blood system. *Eur J Oral Sci* 1999; 107: 14-20
82. Bossuyt X, Marti GE, Fleisher TA: Comparative analysis of whole blood lysis methods for flow cytometry. *Cytometry* 1997; 30: 124-33
83. Francis C, Connelly MC: Rapid single-step method for flow cytometric detection of surface and intracellular antigens using whole blood. *Cytometry* 1996; 25: 58-70
84. Carter PH, Resto-Ruiz S, Washington GC, Ethridge S, Palini A, Vogt R, Waxdal M, Fleisher T, Noguchi PD, Marti GE: Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants, and five cell preparations. *Cytometry* 1992; 13: 68-74
85. Repo H, Jansson SE, Leirisalo-Repo M: Anticoagulant selection influences flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo and ex vivo. *J.Immunol.Methods* 1995; 185: 65-79
86. Topham CM, Mouldous L, Meunier JC: On the spatial disposition of the fifth transmembrane helix and the structural integrity of the transmembrane binding site in the opioid and ORL1 G protein-coupled receptor family. *Protein Eng* 2000; 13: 477-90
87. Paterlini G, Portoghese PS, Ferguson DM: Molecular simulation of dynorphin A-(1-10) binding to extracellular loop 2 of the kappa-opioid receptor. A model for receptor activation. *J.Med.Chem.* 1997; 40: 3254-62
88. Metzger TG, Ferguson DM: On the role of extracellular loops of opioid receptors in conferring ligand selectivity. *FEBS Lett.* 1995; 375: 1-4
89. Sharp BM, McAllen K, Gekker G, Shahabi NA, Peterson PK: Immunofluorescence detection of delta opioid receptors (DOR) on human peripheral blood CD4+ T cells and DOR-dependent suppression of HIV-1 expression. *J.Immunol.* 2001; 167: 1097-102

90. Romeu MA, Mestre M, Gonzalez L, Valls A, Verdaguer J, Corominas M, Bas J, Massip E, Buendia E: Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults. Comparison of fresh whole blood lysis technique, Ficoll-Paque separation and cryopreservation. *J.Immunol.Methods* 1992; 154: 7-10
91. Cheung K, Archibald AC, Robinson MF: Luminol-dependent chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by immune complexes. *Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci.* 1984; 62: 403-19
92. Menzebach A, Hirsch J, Hempelmann G, Welters ID: Effects of endogenous and synthetic opioid peptides on neutrophil function in vitro. *Br.J.Anaesth.* 2003; 91: 546-50
93. Werner M., Otto U., Schreiter D., Lamesch P., Kohlhaw K.: Der immunologische Risikopatient bei Sepsis und Transplantation. *Transplantationsmedizin* 2003; 15: 1-16
94. Engelberts I, Moller A, Leeuwenberg JF, van der Linden CJ, Buurman WA: Administration of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) inhibitors after exposure to TNF alpha prevents development of the maximal biological effect: an argument for clinical treatment with TNF alpha inhibitors. *J.Surg.Res.* 1992; 53: 510-4
95. Baxter F: Septic shock. *Can.J.Anaesth.* 1997; 44: 59-72
96. Borrelli E, Roux-Lombard P, Grau GE, Girardin E, Ricou B, Dayer J, Suter PM: Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit Care Med.* 1996; 24: 392-7
97. Spinaz GA, Keller U, Brockhaus M: Release of soluble receptors for tumor necrosis factor (TNF) in relation to circulating TNF during experimental endotoxemia. *J.Clin.Invest.* 1992; 90: 533-6
98. Damas P, Canivet JL, de GD, Vrindts Y, Albert A, Franchimont P, Lamy M: Sepsis and serum cytokine concentrations. *Crit Care Med.* 1997; 25: 405-12
99. Surratt CK, Johnson PS, Moriwaki A, Seidleck BK, Blaschak CJ, Wang JB, Uhl GR: -mu opiate receptor. Charged transmembrane domain amino acids are critical for agonist recognition and intrinsic activity. *J.Biol.Chem.* 1994; 269: 20548-53
100. Welters I: [Opioids and immunosuppression. Clinical relevance?]. *Anaesthesist* 2003; 52: 442-52

101. Sucic M, Kolevska T, Kopjar B, Kosanovic M, Drobnjak M, Zalud I, Marusic M: Accuracy of routine flow-cytometric bitmap selection for three leukocyte populations. *Cytometry* 1989; 10: 442-7
102. Morel F, Doussiere J, Vignais PV: The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur.J.Biochem.* 1991; 201: 523-46
103. Sachs L: Anwendung statistischer Methoden, Angewandte Statistik. Edited by Sachs L. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag, 1997, pp 380-93
104. Yasumoto K, Okamoto S, Mukaida N, Murakami S, Mai M, Matsushima K: Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene. *J Biol Chem* 1992; 267: 22506-11
105. Vidal EL, Patel NA, Wu GD, Fiala M, Chang SL: Interleukin-1 induces the expression of μ opioid receptors in endothelial cells. *Immunopharmacology* 1998; 38: 261-6
106. Edwards SW: The generation and recognition of neutrophil-activating factors: Structure and function of neutrophil receptors, *Biochemistry and physiology of the neutrophil*. Edited by Edwards SW. Cambridge, Cambridge University Press, 1994, pp 77-127
107. Schmitz FJ, Veldkamp KE, Van Kessel KP, Verhoef J, Van Strijp JA: Delta-toxin from *Staphylococcus aureus* as a costimulator of human neutrophil oxidative burst. *J Infect Dis* 1997; 176: 1531-7
108. Sharp BM, Li MD, Matta SG, McAllen K, Shahabi NA: Expression of delta opioid receptors and transcripts by splenic T cells. *Ann N Y Acad Sci JID - 7506858* 2000; 917: 764-70
109. Edwards SW, Watson F: The cell biology of phagocytes. *Immunol Today* 1995; 16: 508-10
110. Hachiya O, Takeda Y, Miyata H, Watanabe H, Yamashita T, Sendo F: Inhibition by bacterial lipopolysaccharide of spontaneous and. *Microbiol.Immunol.* 1995; 39: 715-23
111. Sulowska Z, Majewska E, Tchorzewski H, Klink M: Effect of exogenous opioid peptides on TNF-alpha-induced human neutrophil apoptosis in vitro. *Arch Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)* 2003; 51: 267-72

112. Benamar K, McMenamin M, Geller EB, Chung YG, Pintar JE, Adler MW: Unresponsiveness of mu-opioid receptor knockout mice to lipopolysaccharide-induced fever. *Br.J.Pharmacol.* 2005; 144: 1029-31
113. Czlonkowski A, Stein C, Herz A: Peripheral mechanisms of opioid antinociception in inflammation: involvement of cytokines. *Eur.J.Pharmacol.* 1993; 242: 229-35
114. Chang SL, Wu GD, Patel NA, Vidal EL, Fiala M: The effects of interaction between morphine and interleukin- 1 on the immune response. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1998; 437: 67-72
115. Boettcher C, Fischer W, Zenk MH: Comment on "Human white blood cells synthesize morphine: CYP2D6 modulation". *J.Immunol.* 2006; 176: 5703-4
116. Zhu W, Cadet P, Baggerman G, Mantione KJ, Stefano GB: Human white blood cells synthesize morphine: CYP2D6 modulation. *J.Immunol.* 2005; 175: 7357-62
117. Nakatomi K, Aida Y, Kusumoto K, Pabst MJ, Maeda K: Neutrophils responded to immobilized lipopolysaccharide in the absence of lipopolysaccharide-binding protein. *J Leukoc Biol* 1998; 64: 177-84
118. Gabrilovac J, Balog T, Andreis A: Dynorphin-A(1-17) decreases nitric oxide release and cytotoxicity induced with lipopolysaccharide plus interferon-gamma in murine macrophage cell line J774. *Biomed.Pharmacother.* 2003; 57: 351-8
119. 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: 1677-84
120. Welters ID, Fimiani C, Bilfinger TV, Stefano GB: NF-kappaB, nitric oxide and opiate signaling. *Med.Hypotheses* 2000; 54: 263-8
121. Wright SD, Ramos RA, Hermanowski-Vosatka A, Rockwell P, Detmers PA: Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *J.Exp.Med.* 1991; 173: 1281-6
122. Doerfler ME, Danner RL, Shelhamer JH, Parrillo JE: Bacterial lipopolysaccharides prime human neutrophils for enhanced production of leukotriene B4. *J Clin Invest* 1989; 83: 970-7
123. Lynam EB, Simon SI, Rochon YP, Sklar LA: Lipopolysaccharide enhances CD11b/CD18 function but inhibits neutrophil aggregation. *Blood* 1994; 83: 3303-11

124. Rubel C, Miliani DM, Vermeulen M, Isturiz MA, Palermo MS: Lipopolysaccharide enhances Fc γ R-dependent functions in vivo through CD11b/CD18 up-regulation. *Immunology* 1999; 97: 429-37
125. Pol O, Alameda F, Puig MM: Inflammation enhances μ -opioid receptor transcription and expression in mice intestine. *Mol.Pharmacol.* 2001; 60: 894-9
126. Morrison DC, Ryan JL: Endotoxins and disease mechanisms. *Annu.Rev.Med.* 1987; 38:417-32.: 417-32
127. Xin L, Zhao SF, Geller EB, McCafferty MR, Sterling GH, Adler MW: Involvement of beta-endorphin in the preoptic anterior hypothalamus during interleukin-1 beta-induced fever in rats. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1997; 813:324-6.: 324-6
128. Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G: Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J.Exp.Med.* 1993; 178: 2207-11
129. Raetz CR, Ulevitch RJ, Wright SD, Sibley CH, Ding A, Nathan CF: Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J.* 1991; 5: 2652-60
130. Jaeger K, Scheinichen D, Heine J, Andre M, Bund M, Piepenbrock S, Leuwer M: Remifentanyl, fentanyl, and alfentanil have no influence on the respiratory burst of human neutrophils in vitro. *Acta Anaesthesiol.Scand.* 1998; 42: 1110-3
131. Sacerdote P: Opioids and the immune system. *Palliat.Med.* 2006; 20 Suppl 1:s9-15.: s9-15
132. 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: 445-54
133. 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: 385-92
134. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW: Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* 1995; 85: 1341-7

135. Bergmann M, Gornikiewicz A, Sautner T, Waldmann E, Weber T, Mittlbock M, Roth E, Fugger R: Attenuation of catecholamine-induced immunosuppression in whole blood from patients with sepsis. *Shock* 1999; 12: 421-7
136. Takenaka I, Ogata M, Koga K, Matsumoto T, Shigematsu A: Ketamine suppresses endotoxin-induced tumor necrosis factor alpha production in mice. *Anesthesiology*. 1994; 80: 402-8
137. Yang J, Li W, Duan M, Zhou Z, Lin N, Wang Z, Sun J, Xu J: Large dose ketamine inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Inflamm.Res.* 2005; 54: 133-7
138. Yu M, Shao D, Yang J, Feng S, Xu J: Ketamine suppresses intestinal TLR4 expression and NF-kappaB activity in lipopolysaccharide-treated rats. *Croat.Med.J.* 2006; 47: 825-31
139. Zilberstein G, Levy R, Rachinsky M, Fisher A, Greemberg L, Shapira Y, Appelbaum A, Roytblat L: Ketamine attenuates neutrophil activation after cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 2002; 95: 531-6, table
140. Weigand MA, Schmidt H, Zhao Q, Plaschke K, Martin E, Bardenheuer HJ: Ketamine modulates the stimulated adhesion molecule expression on human neutrophils in vitro. *Anesth.Analg.* 2000; 90: 206-12
141. Krumholz W, Demel C, Jung S, Meuthen G, Hempelmann G: The influence of fentanyl and alfentanil on functions of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Acta Anaesthesiol.Scand.* 1993; 37: 386-9
142. Krumholz W, Endrass J, Knecht J, Hempelmann G: The effects of midazolam, droperidol, fentanyl, and alfentanil on phagocytosis and killing of bacteria by polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Acta Anaesthesiol.Scand.* 1995; 39: 624-7
143. Krumholz W, Weber C, Kabisch S, Hempelmann G: Effect of opioids on granulocyte adherence. *Anasth.Intensivther.Notfallmed.* 1988; 23: 313-5
144. Welters ID, Menzebach A, Goumon Y, Langefeld TW, Teschemacher H, Hempelmann G, Stefano GB: Morphine suppresses complement receptor expression, phagocytosis, and respiratory burst in neutrophils by a nitric oxide and mu(3) opiate receptor-dependent mechanism. *J.Neuroimmunol.* 2000; 111: 139-45
145. Bhaskaran M, Reddy K, Sharma S, Singh J, Radhakrishnan N, Kapasi A, Singhal PC: Morphine-induced degradation of the host defense barrier: role of macrophage injury. *J Infect Dis* 2001; 184: 1524-31

146. Suzuki S, Chuang LF, Doi RH, Bidlack JM, Chuang RY: Kappa-opioid receptors on lymphocytes of a human lymphocytic cell line: morphine-induced up-regulation as evidenced by competitive RT-PCR and indirect immunofluorescence. *Int Immunopharmacol JID - 100965259* 2001; 1: 1733-42
147. Tubaro E, Santiangeli C, Belogi L, Borelli G, Cavallo G, Croce C, Avico U: Methadone vs morphine: comparison of their effect on phagocytic functions. *Int.J Immunopharmacol.* 1987; 9: 79-88
148. Krumholz W, Weidenbusch H, Menges T, Keller G, Hempelmann G: The influence of intravenous anaesthetics on the activity of enzymes released from polymorphonuclear leucocytes in vitro. *Eur.J.Anaesthesiol.* 2001; 18: 151-8
149. Marshall JC, Vincent JL, Guyatt G, Angus DC, Abraham E, Bernard G, Bombardier C, Calandra T, Jorgensen HS, Sylvester R, Boers M: Outcome measures for clinical research in sepsis: a report of the 2nd Cambridge Colloquium of the International Sepsis Forum. *Crit Care Med.* 2005; 33: 1708-16
150. Dremsizov TT, Kellum JA, Angus DC: Incidence and definition of sepsis and associated organ dysfunction. *Int.J.Artif.Organs.* 2004; 27: 352-9
151. Berrettini WH, Nurnberger JI, Jr., Chan JS, Chrousos GP, Gaspar L, Gold PW, Seidah NG, Simmons-Alling S, Goldin LR, Chretien M, .: Pro-opiomelanocortin-related peptides in cerebrospinal fluid: a study of manic-depressive disorder. *Psychiatry Res.* 1985; 16: 287-302
152. Goumon Y, Muller A, Glattard E, Marban C, Gasnier C, Strub JM, Chasserot-Golaz S, Rohr O, Stefano GB, Welters ID, Van DA, Schoentgen F, Aunis D, Metz-Boutigue MH: Identification of morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules. *J.Biol.Chem.* 2006; 281: 8082-9
153. Rogers TJ, Steele AD, Howard OM, Oppenheim JJ: Bidirectional heterologous desensitization of opioid and chemokine receptors. *Ann.N Y.Acad.Sci.* 2000; 917:19-28.: 19-28
154. Azuma Y, Ohura K: Endomorphins 1 and 2 inhibit IL-10 and IL-12 production and innate immune functions, and potentiate NF-kappaB DNA binding in THP-1 differentiated to macrophage-like cells. *Scand.J.Immunol.* 2002; 56: 260-9
155. Welters ID, Menzebach A, Goumon Y, Langefeld TW, Harbach H, Muhling J, Cadet P, Stefano GB: Morphine inhibits AP-1 activity and CD14 expression in leukocytes by a nitric oxide and opioid receptor-dependent mechanism. *Eur.J.Anaesthesiol.* 2007; 24: 958-65

156. Wang J, Barke RA, Charboneau R, Roy S: Morphine impairs host innate immune response and increases susceptibility to *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *J.Immunol.* 2005; 174: 426-34

8. ANHANG

8.1. Abbildungsverzeichnis (mit Seitenangabe)

Abbildung 1: Definition der Sepsis entsprechend der Consensus Conference von 1991 ⁴⁶. SIRS = Systemic Inflammatory Response Syndrom. 4

Abbildung 2: Aufbau des Lipopolysaccharids ⁴⁸. 6

Abbildung 3: Wirkung von LPS auf die verschiedenen Zellen ⁴⁸. Links ist die Wirkung von LPS auf neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Monozyten über den membranständigen mCD14-Rezeptor dargestellt, rechts auf Endothelzellen, Epithelzellen, glatten Muskelzellen und Astrozyten über den im Plasma löslichen sCD14-Rezeptor am TLR4-MD-2-Komplex. 7

Abbildung 4: Schema über die Produktion und Wirkung von TNF- α (modifiziert nach ⁷³). Durch die Bindung von LPS/LBP an den CD14/TLR4-Rezeptor auf Makrophagen kommt es zur Produktion und Sekretion von TNF- α . Durch das freigesetzte TNF- α kommt es zur gesteigerten Gefäßpermeabilität und Aktivierung der Gerinnungskaskade. Dies kann zum Multiorganversagen und schließlich zum Tod führen. Über die Bindung von endogenen Opioiden an OR im zentralen Nervensystem kann diese TNF- α -Freisetzung zentral gehemmt werden. Darüber hinaus haben IL-10, IL-4 und IL-13 einen direkt hemmenden Einfluss auf TNF- α . 11

Abbildung 5: Diagnostische Kriterien der Sepsis. Ergänzung der Consensus Conference 2001 zum SIRS (INR = International Normalized Ratio, aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit, SvO₂ = Pulmonalarterielle, gemischtvenöse Sauerstoff-Sättigung, PaO₂ = arterieller Sauerstoffgehalt, FiO₂ = inspiratorisch Sauerstoffkonzentration) ⁴⁵. 16

Abbildung 6: Eichmessung auf 10¹ mit FITC-markierten Anti-Human-IgG-Antikörpern ohne Verwendung eines Stimulans. 21

Abbildung 7: Inkubation von unstimuliertem Vollblut mit anti-MOR (C-20): Es findet sich im Vergleich zur Kontrolle mit FITC-anti-human-IgG kein Anstieg des Fluoreszenzsignals. 21

Abbildung 8: Inkubation von unstimuliertem Vollblut mit anti-MOR (N-20): Im Vergleich zu Abbildung 6, zeigt sich eine Zunahme der Fluoreszenz als Ausdruck der Bindung des FITC-markierten Antikörper an MOR. 22

Abbildung 9: FSC/SSC-Diagramm (Originalregistrierung, FSC =Vorwärtsstreulicht, SSC=Seitwärtsstreulicht) mit Darstellung der verschiedenen Leukozyten Subpopulationen (Lymphozyten, Monozyten und polymorphkernige Neutrophile [PMN]). 24

Abbildung 10: FSC/SSC-Diagramm (Originalregistrierung, FSC=Vorwärtsstreulicht, SSC=Seitwärtsstreulicht) mit Anordnung der verschiedenen Zellpopulationen (Lymphozyten, Monozyten und polymorphkernige Neutrophile [PMN]). Im nachträglich gesetzten Gate (Kreis) sind selektiv die neutrophilen Granulozyten ausgewertet. Die so erfasste Fluoreszenzintensität wird nachfolgend in einem separaten Histogramm dargestellt. 26

Abbildung 11: Gate M1: Negativbereich (Autofluoreszenz und unspezifische Bindung). Gate M2: Zellen ohne erhöhte Rezeptordichte („niedrig exprimierende“ Zellen). Gate M3: Zellen mit erhöhter Rezeptordichte („vermehrt exprimierende“ Zellen). Dargestellt ist die Messung einer unstimulierten Blutprobe unter Verwendung des MOR-Antikörpers N-20. 28

Abbildung 12: Histogramm der unstimulierten Kontrolle nach Inkubation mit anti-MOR (N-20). M2: Zellen mit geringer Fluoreszenz („niedrig exprimierend“) M3: „vermehrt exprimierende“ Zellen mit erhöhter OR-Dichte. 31

Abbildung 13: Histogramm nach 15 Minuten Inkubation mit St.aureus und Verwendung von anti-MOR (N-20). M1: „niedrig exprimierende“ Zellen (MFI 29,69 / 80,49%), M2: „vermehrt exprimierende“ Zellen (MFI 567,42 / 19,24%). 31

Abbildung 14: Histogramm nach 30 Minuten Inkubation mit St.aureus und Verwendung von anti-MOR (N-20). M1: „niedrig exprimierende“ Zellen (MFI 27,14 / 65,09%), M2: „vermehrt exprimierende“ Zellen (MFI 528,03/ 34,04%). 32

Abbildung 15: Histogramm nach 60 Minuten Inkubation mit St.aureus und Verwendung von anti-MOR (N-20). M1: „niedrig exprimierende“ Zellen (MFI 23,50 / 40,76%), M2: „vermehrt exprimierende“ Zellen (MFI 333,76 / 58,24%). 33

Abbildung 16: Histogramm nach drei Stunden Inkubation mit St.aureus und Verwendung von anti-MOR (N-20). M1: „niedrig exprimierende“ Zellen (MFI 45,73 / 29,61%), M2: „vermehrt exprimierende“ Zellen (MFI 241,44 / 68,21%). 33

Abbildung 17: Histogramm nach sechs Stunden Inkubation mit St.aureus und Verwendung von anti-MOR (N-20). M1: „niedrig exprimierende“ Zellen (MFI 50,48 / 27,31%), M2: „vermehrt exprimierende“ Zellen (MFI 220,67 / 70,29%). 34

Abbildung 18: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Inkubation mit St.aureus den DOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 1. 35

Abbildung 19: Expression des DOR auf PMN nach Inkubation mit St.aureus gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 2 und Tabelle 3. 36

Abbildung 20: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit St.aureus den KOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 4. 37

Abbildung 21: Expression des KOR auf Granulozyten nach Stimulation mit St.aureus gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 5 und Tabelle 6. 38

Abbildung 22: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Inkubation mit St.aureus den MOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 7. 39

Abbildung 23: Expression des MOR auf neutrophilen Granulozyten nach Inkubation mit St.aureus gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 8 und Tabelle 9. 40

Abbildung 24: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml) den DOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 10. 41

Abbildung 25: Expression des DOR auf Granulozyten nach Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml) gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 11 und Tabelle 12. 42

Abbildung 26: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml) den KOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 13. 43

Abbildung 27: Expression des KOR auf PMN nach Inkubation mit TNF- α (100 ng/ml) gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 14 und Tabelle 15. 44

Abbildung 28: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml) den MOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 16. 45

Abbildung 29: Expression des MOR auf neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml) gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 17 und Tabelle 18. 46

Abbildung 30: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) den DOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 19. 47

Abbildung 31: Expression des DOR auf PMN nach Inkubation mit LPS (100 ng/ml) gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 20 und Tabelle 21. 48

Abbildung 32: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) den KOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 22. 49

Abbildung 33: Expression des KOR auf neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 23 und Tabelle 24. 50

Abbildung 34: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) den MOR vermehrt exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 25. 51

Abbildung 35: Expression des MOR auf neutrophilen Granulozyten nach Inkubation mit LPS (100 ng/ml) gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität. (min = Minuten, STD = Stunden, Gate M2 = niedrig exprimierend, Gate M3 = vermehrt exprimierend). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 11. Messwerte inkl. p-Werte siehe Tabelle 26 und Tabelle 27. 52

Abbildung 36: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Inkubation mit St.aureus vermehrt den DOR exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden ist zum Vergleich dargestellt. 54

Abbildung 37: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit St.aureus vermehrt den KOR exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden dient als Vergleich für PAT-INT-1 und PAT-INT-2. 54

Abbildung 38: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Inkubation mit St.aureus vermehrt den MOR exprimieren (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden ist zum Vergleich dargestellt. 55

Abbildung 39: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Inkubation mit TNF- α (100 ng/ml) vermehrt den DOR exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden ist zum Vergleich dargestellt. 56

Abbildung 40: Prozentualer Anteil der PMN, die nach Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml) vermehrt den KOR exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden ist zum Vergleich dargestellt. 57

Abbildung 41: Prozentualer Anteil der PMN die nach Inkubation mit TNF- α (100 ng/ml) vermehrt den MOR exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden ist zum Vergleich dargestellt. 58

Abbildung 42: Prozentualer Anteil der Granulozyten die nach Inkubation mit LPS (100 ng/ml) vermehrt den DOR exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden ist zum Vergleich dargestellt. 59

Abbildung 43: Prozentualer Anteil der PMN die nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) vermehrt den KOR exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden ist zum Vergleich dargestellt. 60

Abbildung 44: Prozentualer Anteil der PMN die nach Inkubation mit LPS (100 ng/ml) vermehrt den MOR exprimieren. (min = Minuten, STD = Stunden). Der Mittelwert der 11 gesunden Probanden ist zum Vergleich dargestellt. 61

Abbildung 45: Biologische und medizinische Daten der 24 Intensivpatienten. 63

Abbildung 46: Verlauf der DOR-Expression auf PMN der einzelnen Intensivpatienten (Fentanyl-Gruppe) über drei Messtage und dem Entlassungstag. Messwerte siehe Tabelle 37. (1.Tag = Aufnahmetag in die Studie mit zwei darauf folgenden Messtagen [2. und 3. Tag] und Messung am Entlassungstag von Intensivstation). 64

Abbildung 47: Verlauf der KOR-Expression der einzelnen Intensivpatienten (Fentanyl-Gruppe) an drei Messtagen und dem Entlassungstag. Messwerte siehe Tabelle 38. (1.Tag = Aufnahmetag in die Studie mit zwei darauf folgenden Messtagen [2. und 3. Tag] und Messung am Entlassungstag von Intensivstation). 65

Abbildung 48: Verlauf der MOR-Expression auf neutrophilen Granulozyten der einzelnen Intensivpatienten (Fentanyl-Gruppe) über eine Zeit von drei Tagen und dem Entlassungstag. Messwerte siehe Tabelle 39. (1.Tag = Aufnahmetag in die Studie mit zwei darauf folgenden Messtagen [2. und 3. Tag] und Messung am Entlassungstag von Intensivstation). 66

Abbildung 49: Verlauf der DOR-Expression der einzelnen Intensivpatienten (Ketamin-Gruppe) an drei Messtagen und dem Entlassungstag. Messwerte siehe Tabelle 40. (1.Tag = Aufnahmetag in die Studie mit zwei darauf folgenden Messtagen [2. und 3. Tag] und Messung am Entlassungstag von Intensivstation). 67

Abbildung 50: Verlauf der KOR-Expression auf Granulozyten der einzelnen Intensivpatienten (Ketamin-Gruppe) über eine Zeit von drei Tagen und dem Entlassungstag. Messwerte siehe Tabelle 41. (1.Tag = Aufnahmetag in die Studie mit zwei darauf folgenden Messtagen [2. und 3. Tag] und Messung am Entlassungstag von Intensivstation). 68

Abbildung 51: Verlauf der MOR-Expression auf PMN der einzelnen Intensivpatienten (Ketamin-Gruppe) über drei Messtage und dem Entlassungstag. Messwerte siehe Tabelle 42. (1.Tag = Aufnahmetag in die Studie mit zwei darauf folgenden Messtagen [2. und 3. Tag] und Messung am Entlassungstag von Intensivstation). 69

Abbildung 52: Struktureller Aufbau eines Opioidrezeptors ⁸⁷, mit dem extrazellulären N-terminalen Ende und dem intrazellulären C-terminalen Ende. Dies erklärt, warum nur die für den N-Terminus spezifischen OR-Antikörper zur Markierung der OR auf der Zelloberfläche geeignet sind. 74

8.2. Wertetabellen zu den Grafiken des Ergebnisteils

8.2.1. Zum Ergebnisteil 3.1

Proband	Kein Stimulans	15 min	30 min	60 min	3 STD	6 STD
1	0,11	31,24	29,15	29,52	43,75	63,10
2	5,44	15,33	30,80	32,65	37,71	50,89
3	2,65	5,59	13,30	16,20		
4	0,00	6,32	13,00	29,74		
5	0,00	14,51	17,58	32,92		
6	7,96	11,72	22,22	53,97	81,38	92,22
7	2,08	14,03	19,61	19,39	30,72	33,47
8	0,11	20,28	44,18	69,38	39,29	54,26
9	4,34	10,24	14,60	23,19	35,21	41,18
10	0,57	1,46	6,66	13,92	40,00	61,40
14	0,24	31,57	33,38	36,59	45,69	66,87
Mittelwert	2,14	14,75	22,23	32,50	44,22	57,92
Standardabweichung	2,71	9,73	11,05	16,50	15,73	17,87
p-Werte		0,003	0,003	0,003	0,012	0,012

Tabelle 1: Prozentualer Anteil der PMN, die nach 15-, 30- und 60-minütiger, sowie drei- und sechs-stündiger Inkubation mit St.aureus den DOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	15 min	30 min	60 min	3 STD	6 STD
1	71,69	87,38	83,54	115,48	88,96	88,96
2	57,25	59,89	57,25	58,29	45,73	60,98
3	23,08	21,10	21,10	35,23		
4	42,55	46,14	41,79	48,26		
5	65,52	62,64	58,82	62,64		
6	29,69	26,18	26,42	22,47	31,91	26,90
7	53,76	56,74	63,21	62,08	58,29	65,52
8	35,87	49,58	44,91	41,05	58,82	69,78
9	37,86	37,86	39,24	32,78	50,48	46,56
10	48,70	56,23	58,29	69,78	54,25	57,25
14	51,86	51,86	60,43	71,69	67,32	78,44
Mittelwert	47,08	50,51	50,45	56,34	56,97	61,80
Standardabweichung	14,93	18,18	17,90	25,37	16,65	19,14
p-Werte		0,549	0,697	0,252	0,250	0,086

Tabelle 2: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M2, die nach 15-, 30- und 60-minütiger, sowie drei- und sechs-stündiger Inkubation mit St.aureus den DOR vermehrt exprimieren.

ANHANG

Proband	Kein Stimulans	15 min	30 min	60 min	3 STD	6 STD
1	842,91	307,81	323,42	368,47	339,82	291,64
2	175,44	194,56	125,21	135,77	110,40	219,68
3	92,22	104,60	114,44	235,01		
4	0,00	177,83	159,63	152,61		
5	0,00	142,02	149,84	159,63		
6	126,35	126,35	115,48	93,90	78,44	78,44
7	186,85	257,13	264,16	245,82	230,82	216,74
8	585,57	214,80	143,30	116,52	125,21	144,60
9	145,90	165,48	166,98	182,69	181,06	271,39
10	230,82	330,77	264,16	271,39	254,83	299,61
14	310,59	232,91	261,80	254,83	266,55	257,13
Mittelwert	245,15	204,93	189,86	201,51	198,39	222,40
Standardabweichung	255,64	72,54	73,93	81,43	89,98	76,70
p-Werte		0,721	1,000	0,790	0,464	0,575

Tabelle 3: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M3, die nach 15-, 30- und 60-minütiger, sowie drei- und sechs-stündiger Inkubation mit St.aureus den DOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	15 min	30 min	60 min	3 STD	6 STD
1	3,26	35,95	35,47	36,33	50,11	60,13
2	10,74	29,32	24,33	39,06	50,05	69,59
3	4,29	12,39	21,60	28,83		
4	0,00	14,59	18,51	45,50		
5	7,24	12,46	21,48	42,99		
6	9,35	19,24	34,04	58,24	68,21	70,29
7	3,74	29,21	40,13	53,75	51,49	46,43
8	2,65	33,84	50,69	74,45	82,62	82,16
9	8,38	16,24	22,80	43,99	41,72	70,57
10	3,71	19,62	33,49	47,78	54,69	66,27
14	6,20	43,21	38,13	43,98	50,97	73,79
Mittelwert	5,41	24,19	30,97	46,81	56,23	67,40
Standardabweichung	3,24	10,59	10,02	12,12	12,98	10,53
p-Werte		0,003	0,003	0,003	0,012	0,012

Tabelle 4: Prozentualer Anteil der PMN, die nach 15-, 30- und 60-minütiger, sowie drei- und sechs-stündiger Inkubation mit St.aureus den KOR vermehrt exprimieren.

ANHANG

Proband	Kein Stimulans	15 min	30 min	60 min	3 STD	6 STD
1	82,05	77,04	67,93	63,21	46,98	102,74
2	69,16	62,64	58,29	44,11	50,94	79,15
3	24,14	21,10	19,28	41,79		
4	48,70	44,51	40,32	52,33		
5	71,05	56,23	51,86	74,99		
6	41,42	29,69	27,14	23,50	45,73	50,48
7	91,40	75,67	67,93	59,89	72,34	70,41
8	46,14	48,26	42,17	37,86	47,83	74,32
9	67,93	45,73	65,52	52,33	85,82	46,56
10	66,12	40,68	46,98	52,33	59,35	64,94
14	67,93	63,78	63,78	46,98	57,77	62,64
Mittelwert	61,46	51,39	50,11	49,94	58,35	68,91
Standardabweichung	19,41	17,73	16,66	13,69	14,17	17,63
p-Werte		0,018	0,013	0,131	0,646	0,779

Tabelle 5: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M2, die nach 15-, 30- und 60-minütiger, sowie drei- und sechs-stündiger Inkubation mit *St.aureus* den KOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	15 min	30 min	60 min	3 STD	6 STD
1	632,09	469,76	429,35	441,09	368,47	504,81
2	697,83	643,57	763,51	368,47	310,59	425,51
3	100,00	104,60	114,44	294,27		
4	0,00	324,88	295,60	368,47		
5	881,68	673,17	661,17	685,39		
6	805,84	567,42	528,03	333,76	241,44	220,67
7	1669,77	482,61	421,70	321,97	299,61	291,64
8	368,47	557,31	392,42	388,91	218,70	226,71
9	1096,79	634,94	670,15	523,30	469,76	291,64
10	710,50	349,12	368,47	352,27	399,54	433,23
14	1485,51	361,90	355,45	345,99	368,47	355,45
Mittelwert	768,04	469,93	454,57	402,17	334,57	343,71
Standardabweichung	517,00	172,27	188,09	112,80	83,40	103,54
p-Werte		0,854	0,260	0,692	0,111	0,111

Tabelle 6: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M3, die nach 15-, 30- und 60-minütiger, sowie drei- und sechs-stündiger Inkubation mit *St.aureus* den KOR vermehrt exprimieren.

ANHANG

Proband	Kein Stimulans	15 min	30 min	60 min	3 STD	6 STD
1	4,72	38,66	34,07	41,76	46,00	38,97
2	11,94	29,37	26,32	41,33	54,48	59,73
3	4,01	14,68	13,50	24,49		
4	0,00	14,39	16,77	41,21		
5	7,23	13,71	22,56	44,86		
6	9,12	20,08	36,23	56,49	72,89	72,73
7	3,73	26,83	39,62	52,33	52,38	44,72
8	2,71	34,72	46,45	69,91	76,50	61,30
9	7,20	16,38	23,26	39,60	37,07	50,14
10	2,83	20,79	33,01	50,48	54,46	34,45
14	5,55	40,20	33,75	43,80	51,31	69,40
Mittelwert	5,37	24,53	29,59	46,02	55,64	53,93
Standardabweichung	3,34	9,97	10,01	11,46	13,11	14,06
p-Werte		0,003	0,003	0,003	0,012	0,012

Tabelle 7: Prozentualer Anteil der PMN, die nach 15-, 30- und 60-minütiger, sowie drei- und sechs-stündiger Inkubation mit St.aureus den MOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	15 min	30 min	60 min	3 STD	6 STD
1	40,68	48,70	46,14	57,25	40,68	100,90
2	29,96	30,78	30,51	28,64	36,85	86,60
3	16,40	16,85	14,86	37,25		
4	43,32	38,20	34,91	46,14		
5	49,58	41,79	37,52	73,65		
6	27,88	25,03	23,08	19,63	34,14	46,14
7	71,69	66,12	59,35	61,25	72,99	69,78
8	41,05	38,20	38,54	29,69	54,74	85,05
9	50,48	45,32	56,74	37,18	102,74	48,70
10	38,89	34,29	31,62	49,14	55,23	82,79
14	49,14	44,91	44,51	39,24	59,35	50,94
Mittelwert	41,73	39,11	37,98	43,55	57,09	71,36
Standardabweichung	14,40	13,00	13,34	15,91	22,54	20,67
p-Werte		0,364	0,365	0,722	0,072	0,200

Tabelle 8: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M2, die nach 15-, 30- und 60-minütiger, sowie drei- und sechs-stündiger Inkubation mit St.aureus den MOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	15 min	30 min	60 min	3 STD	6 STD
1	459,31	177,83	187,69	199,89	151,25	228,76
2	637,80	535,20	593,52	392,42	321,97	509,37
3	66,71	78,44	71,69	214,80		
4	0,00	230,82	194,56	259,46		
5	697,83	528,03	500,29	537,61		
6	577,72	449,10	478,29	241,44	179,43	149,89
7	1539,93	283,87	264,16	252,55	196,32	214,80
8	361,90	313,40	305,05	281,33	203,51	209,08
9	1046,00	640,68	697,83	339,82	410,47	243,62
10	445,08	264,16	216,74	239,28	173,09	333,76
14	1478,84	201,69	191,10	181,06	189,38	179,43
Mittelwert	664,65	336,66	336,45	285,42	228,18	258,59
Standardabweichung	506,47	176,36	199,42	103,46	89,83	114,71
p-Werte		0,131	0,082	0,164	0,059	0,059

Tabelle 9: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M3, die nach 15-, 30- und 60-minütiger, sowie drei- und sechs-stündiger Inkubation mit St.aureus den MOR vermehrt exprimieren.

8.2.2. Zum Ergebnisteil 3.2.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	0,11	13,04	16,27	21,92	
2	5,44	0,84	10,82	22,38	73,22
3	2,65	12,50	26,86	50,59	
4	0,00	8,96	10,02	39,76	
5	0,00	0,23	0,71	3,70	
6	7,96	7,50	11,67	13,39	70,11
7	2,08	3,85	4,28	7,55	59,05
8	0,11	0,62	2,03	14,06	65,98
9	4,34	14,17	10,16	42,04	
10	0,57	20,77	42,44	72,78	
14,00	0,24	4,91	5,96	26,12	72,30
Mittelwert	2,14	7,94	12,84	28,57	68,13
Standardabweichung	2,71	6,64	12,21	20,82	5,79
p-Werte		0,021	0,003	0,003	0,043

Tabelle 10: Prozentualer Anteil der PMN, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit TNF- α (100 ng/ml) den DOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	71,69	66,71	77,04	65,52	
2	57,25	44,51	65,52	102,74	82,79
3	23,08	33,38	38,54	36,19	
4	42,55	39,95	35,87	42,17	
5	71,05	62,08	78,44	100,90	
6	29,69	27,63	30,78	39,95	47,83
7	53,76	35,87	51,40	60,43	77,04
8	35,87	30,78	34,29	43,71	48,26
9	37,86	38,54	31,91	32,78	
10	48,70	42,17	45,73	38,54	
14	51,86	54,25	63,78	71,69	114,44
Mittelwert	47,58	43,26	50,30	57,69	74,07
Standardabweichung	15,69	12,70	18,07	25,22	27,70
p-Werte		0,301	0,328	0,248	0,172

Tabelle 11: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M2, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit TNF- α (100 ng/ml) den DOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	842,91	296,93	219,68	187,69	
2	175,44	239,28	476,14	385,42	254,83
3	92,22	210,97	165,48	181,06	
4	0,00	254,83	261,80	182,69	
5	0,00	453,16	375,16	339,82	
6	126,35	105,54	145,90	122,98	173,09
7	186,85	275,08	198,10	371,80	324,88
8	585,57	143,30	135,77	179,43	159,63
9	145,90	182,64	201,69	222,67	
10	230,82	266,55	237,14	170,01	
14	310,59	403,15	385,42	196,32	305,05
Mittelwert	245,15	257,40	254,75	230,90	243,50
Standardabweichung	255,64	102,80	110,53	90,30	75,05
p-Werte		0,286	0,286	0,722	0,686

Tabelle 12: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M3, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit TNF- α (100 ng/ml) den DOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	3,26	12,72	22,21	28,19	
2	10,74	11,82	19,60	27,86	67,62
3	4,29	13,44	29,62	39,17	
4	0,00	13,45	19,19	50,37	
5	7,24	7,74	8,46	16,61	
6	9,35	8,63	16,41	15,43	58,40
7	3,74	3,47	9,19	18,75	57,94
8	2,65	3,73	4,28	14,38	67,73
9	8,38	15,84	15,38	40,92	
10	3,71	23,17	34,07	60,26	
14	6,20	12,26	14,53	31,22	73,56
Mittelwert	5,41	11,48	17,54	31,20	65,05
Standardabweichung	3,24	5,59	8,89	15,13	6,73
p-Werte		0,010	0,003	0,003	0,043

Tabelle 13: Prozentualer Anteil der PMN, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit TNF- α (100 ng/ml) den KOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	82,05	72,99	105,54	54,25	
2	69,16	57,77	80,58	124,09	120,79
3	24,14	53,28	59,35	60,98	
4	48,70	59,89	46,98	74,32	
5	49,58	68,54	88,17	94,75	
6	41,42	33,08	25,23	43,71	74,32
7	91,40	68,54	86,60	99,10	115,48
8	46,14	43,71	54,25	64,36	57,77
9	67,93	65,52	42,94	55,23	
10	66,12	65,52	54,25	56,74	
14	67,93	62,08	59,89	91,40	161,08
Mittelwert	59,51	59,17	63,98	74,45	105,89
Standardabweichung	19,43	11,89	23,58	24,68	40,84
p-Werte		0,594	0,657	0,438	0,172

Tabelle 14: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M2, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit TNF- α (100 ng/ml) den KOR vermehrt exprimieren.

ANHANG

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	632,09	355,45	736,53	281,33	
2	697,83	243,62	495,81	528,03	429,35
3	100,00	417,92	429,35	355,45	
4	0,00	371,80	410,47	395,96	
5	881,68	710,50	632,09	736,53	
6	805,84	371,80	457,25	474,00	264,16
7	1669,77	956,78	835,36	632,62	562,34
8	368,47	333,76	408,63	355,45	299,61
9	1096,79	1000,00	349,12	316,23	
10	710,50	425,51	330,77	281,33	
14	1485,51	469,76	567,42	381,97	604,30
Mittelwert	768,04	514,26	513,89	430,81	431,95
Standardabweichung	517,00	257,11	162,14	147,74	151,97
p-Werte		0,301	0,523	0,202	0,172

Tabelle 15: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M3, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit TNF- α (100 ng/ml) den KOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	4,72	10,03	16,59	8,90	
2	11,94	12,63	21,60	20,08	53,16
3	4,01	9,12	14,16	17,80	
4	0,00	7,30	15,76	35,01	
5	7,23	9,06	9,50	16,69	
6	9,12	9,40	12,73	13,09	53,09
7	3,73	0,85	4,58	8,79	46,95
8	2,71	3,47	4,76	9,93	59,32
9	7,20	9,70	17,03	10,48	
10	2,83	18,66	25,48	29,98	
14	5,55	11,03	12,19	24,51	73,42
Mittelwert	5,37	9,20	14,03	17,75	57,19
Standardabweichung	3,34	4,60	6,39	8,91	10,07
p-Werte		0,016	0,003	0,003	0,043

Tabelle 16: Prozentualer Anteil der PMN, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit TNF- α (100 ng/ml) den MOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	40,68	35,87	57,77	37,18	
2	29,96	31,06	46,98	72,34	69,78
3	16,40	50,94	58,82	67,93	
4	43,32	57,77	42,17	48,26	
5	67,32	63,78	58,82	54,74	
6	27,88	23,50	27,38	29,96	46,14
7	71,69	47,40	71,69	75,67	94,75
8	41,05	40,32	49,14	53,76	50,03
9	50,48	54,25	34,60	64,94	
10	38,89	42,17	57,25	54,74	
14	49,14	47,40	29,16	57,25	85,05
Mittelwert	43,35	44,95	48,53	56,07	69,15
Standardabweichung	16,25	11,91	14,03	14,06	21,23
p-Werte		0,929	0,508	0,131	0,216

Tabelle 17: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M2, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit TNF- α (100 ng/ml) den MOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	459,31	212,88	243,62	345,99	
2	637,80	355,45	321,97	248,05	182,69
3	66,71	264,16	352,27	305,05	
4	0,00	264,16	273,84	132,16	
5	697,83	881,68	604,30	604,30	
6	577,72	414,18	513,97	445,08	130,97
7	1539,93	412,32	1113,97	609,76	399,54
8	361,90	310,59	336,78	214,80	259,46
9	1046,00	1186,37	218,70	278,81	
10	445,08	142,02	196,32	140,75	
14	1478,84	419,80	333,76	171,54	266,55
Mittelwert	664,65	442,15	409,95	317,84	247,84
Standardabweichung	506,47	313,06	263,60	169,90	101,74
p-Werte		0,912	0,377	0,164	0,216

Tabelle 18: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M3, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit TNF- α (100 ng/ml) den MOR vermehrt exprimieren.

8.2.3. Zum Ergebnisteil 3.3.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	0,11	3,60	10,96	6,07	
2	5,44	1,80	7,63	12,63	38,07
3	2,65	10,15	20,50	39,81	
4	0,00	6,36	5,84	38,27	
5	0,00	0,19	1,57	1,23	
6	7,96	6,81	9,14	12,28	32,90
7	2,08	4,45	3,52	3,84	63,45
8	0,11	1,50	2,65	7,51	63,80
9	4,34	10,50	8,00	36,83	
10	0,57	18,19	34,19	33,76	
14	0,24	3,98	5,12	24,88	77,60
Mittelwert	2,14	6,14	9,92	19,74	55,16
Standardabweichung	2,71	5,20	9,56	15,16	18,94
p-Werte		0,026	0,003	0,003	0,043

Tabelle 19: Prozentualer Anteil der PMN, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit LPS (100 ng/ml) den DOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	71,69	79,86	89,77	79,86	
2	57,25	42,17	58,82	88,17	84,67
3	23,08	36,52	42,17	43,71	
4	42,55	45,32	43,32	50,48	
5	71,05	68,54	87,38	90,58	
6	29,69	30,78	30,23	39,24	42,94
7	53,76	38,54	50,94	66,12	63,21
8	35,87	34,60	37,18	43,71	48,70
9	37,86	34,29	31,62	31,91	
10	48,70	46,14	55,23	60,98	
14	51,86	64,94	68,54	113,42	98,22
Mittelwert	47,58	47,43	54,11	64,38	67,55
Standardabweichung	15,69	16,28	20,60	25,78	23,52
p-Werte		0,79	0,202	0,018	0,172

Tabelle 20: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M2, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit LPS (100 ng/ml) den DOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	842,91	542,47	378,55	313,40	
2	175,44	146,56	399,54	433,23	261,80
3	92,22	261,80	222,67	209,08	
4	0,00	395,96	445,08	237,14	
5	0,00	361,90	307,81	381,97	
6	126,35	97,34	122,98	107,46	171,54
7	186,85	145,90	166,98	360,28	268,96
8	585,57	133,35	127,49	134,56	220,67
9	145,90	140,75	278,81	212,88	
10	230,82	316,23	395,96	286,44	
14	310,59	445,08	486,97	264,16	235,01
Mittelwert	245,15	271,58	302,99	267,33	231,60
Standardabweichung	255,64	150,73	129,03	101,12	38,88
p-Werte		0,722	0,424	04,24	0,893

Tabelle 21: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M3, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit LPS (100 ng/ml) den DOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	3,26	7,88	16,09	19,93	
2	10,74	10,39	11,85	20,64	39,67
3	4,29	10,58	18,26	37,74	
4	0,00	8,10	8,29	42,19	
5	7,24	2,66	2,22	7,59	
6	9,35	11,94	10,92	15,23	35,00
7	3,74	2,75	8,05	9,99	50,93
8	2,65	2,38	3,04	4,04	50,98
9	8,38	14,53	13,39	28,98	
10	3,71	16,80	28,05	47,74	
14	6,20	6,86	10,53	18,29	65,40
Mittelwert	5,34	8,80	12,02	23,41	44,15
Standardabweichung	3,24	4,82	7,24	14,48	11,81
p-Werte		0,075	0,021	0,003	0,043

Tabelle 22: Prozentualer Anteil der PMN, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit LPS (100 ng/ml) den KOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	82,05	64,94	82,79	59,35	
2	69,16	59,35	87,38	124,09	106,50
3	24,14	60,98	65,52	66,12	
4	48,70	73,65	62,64	109,41	
5	49,58	88,96	94,75	102,74	
6	41,42	38,54	35,87	38,72	63,21
7	91,40	58,29	70,41	95,60	92,22
8	46,14	47,83	62,08	66,71	78,44
9	67,93	70,41	36,52	63,78	
10	66,12	55,23	51,40	56,23	
14	67,93	62,08	60,43	119,71	199,89
Mittelwert	58,66	61,84	64,53	82,04	108,05
Standardabweichung	19,43	13,27	19,00	29,03	53,79
p-Werte		0,929	0,594	0,301	0,172

Tabelle 23: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M2, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit LPS (100 ng/ml) den KOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	632,09	387,16	532,80	395,96	
2	697,83	239,28	557,31	593,52	445,08
3	100,00	441,09	478,29	330,77	
4	0,00	491,37	588,21	523,30	
5	881,68	820,47	547,37	547,37	
6	805,84	392,42	500,29	388,91	271,39
7	1669,77	798,63	615,27	582,94	547,37
8	368,47	289,03	441,09	449,10	433,23
9	1096,79	523,30	224,68	349,12	
10	710,50	378,55	381,97	358,66	
14	1485,51	394,19	562,34	461,37	881,68
Mittelwert	768,04	476,13	486,73	451,97	424,27
Standardabweichung	517,00	186,52	111,71	96,21	227,17
p-Werte		0,301	0,523	0,248	0,318

Tabelle 24: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M3, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit LPS (100 ng/ml) den KOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	4,72	10,02	6,32	7,52	
2	11,94	11,48	17,73	9,79	45,32
3	4,01	7,73	8,85	9,82	
4	0,00	5,02	6,00	28,04	
5	7,23	4,09	3,65	10,06	
6	9,12	11,19	11,83	14,19	30,44
7	3,73	4,02	3,65	5,89	46,73
8	2,71	2,34	2,63	3,51	48,99
9	7,20	9,15	11,38	16,69	
10	2,83	14,74	16,15	29,56	
14	5,55	7,22	10,46	11,03	50,54
Mittelwert	5,37	7,91	8,97	13,28	44,40
Standardabweichung	3,34	3,82	5,07	8,47	8,06
p-Werte		0,062	0,026	0,006	0,043

Tabelle 25: Prozentualer Anteil der PMN, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit LPS (100 ng/ml) den MOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	40,68	43,71	73,65	32,78	
2	29,96	31,62	53,28	110,40	56,74
3	16,40	58,82	69,16	76,35	
4	43,32	77,04	43,32	67,32	
5	67,32	59,89	72,99	76,65	
6	27,88	27,38	27,14	29,96	46,56
7	71,69	48,70	58,29	93,90	71,50
8	41,05	38,54	54,74	49,58	52,33
9	50,48	58,29	37,18	69,16	
10	38,89	46,98	52,80	53,76	
14	49,14	43,32	40,68	64,94	89,77
Mittelwert	43,35	48,57	53,02	65,89	63,38
Standardabweichung	16,25	14,24	15,11	24,09	17,40
p-Werte		0,424	0,697	0,029	0,398

Tabelle 26: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M2, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit LPS (100 ng/ml) den MOR vermehrt exprimieren.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
1	459,31	239,28	278,81	292,95	
2	637,80	268,96	252,55	637,80	156,79
3	66,71	276,32	381,97	469,76	
4	0,00	324,88	342,89	164,00	
5	697,83	637,80	453,16	513,97	
6	577,72	268,96	371,80	307,81	143,30
7	1539,93	208,14	930,57	1165,22	399,54
8	361,90	199,89	330,77	294,27	303,68
9	1046,00	1000,00	224,68	187,69	
10	445,08	164,00	205,35	196,32	
14	1478,84	242,53	478,29	299,61	266,55
Mittelwert	664,65	348,25	386,44	411,76	253,97
Standardabweichung	506,47	250,11	200,67	290,16	106,67
p-Werte		0,309	0,377	0,372	0,216

Tabelle 27: Mediane Fluoreszenzintensität der PMN im Gate M3, die nach drei-, sechs-, zwölf- und vierundzwanzig-stündiger Inkubation mit LPS (100 ng/ml) den MOR vermehrt exprimieren.

8.2.4. Zum Ergebnisteil 3.4.

Proband	Kein Stimulans	15 min	30 min	60 min	3 STD	6 STD
Mittelwert	2,14	14,75	22,23	32,50	44,22	57,92
PAT-INT 1	4,22	12,67	26,24	24,81	54,62	59,71
PAT-INT 2	0,58	2,26	3,69	8,74	9,79	7,99

Tabelle 28: Dargestellt sind der Mittelwert der gesunden Probandengruppe, sowie die Messwerte der beiden Intensivpatienten nach Stimulation mit *St.aureus* über die vorgegebenen Inkubationszeiten und unter Verwendung des DOR.

Proband	Kein Stimulans	15 min	30 min	60 min	3 STD	6 STD
Mittelwert	5,41	24,19	30,97	46,81	56,23	67,40
PAT-INT 1	4,75	12,90	18,39	34,50	40,73	52,80
PAT-INT 2	0,33	10,81	5,83	16,08	24,76	21,02

Tabelle 29: Dargestellt sind der Mittelwert der gesunden Probandengruppe, sowie die Messwerte der beiden Intensivpatienten nach Stimulation mit *St.aureus* über die vorgegebenen Inkubationszeiten und unter Verwendung des KOR.

Proband	Kein Stimulans	15 min	30 min	60 min	3 STD	6 STD
Mittelwert	5,37	24,53	29,59	46,02	55,64	53,93
PAT-INT 1	4,68	12,59	16,16	30,08	49,58	61,77
PAT-INT 2	0,32	12,19	7,10	23,25	37,86	29,64

Tabelle 30: Dargestellt sind der Mittelwert der gesunden Probandengruppe, sowie die Messwerte der beiden Intensivpatienten nach Stimulation mit *St.aureus* über die vorgegebenen Inkubationszeiten und unter Verwendung des MOR.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
Mittelwert	2,14	7,94	12,84	28,57	68,13
PAT-INT 1	4,22	5,67	12,09	8,35	
PAT-INT 2	0,58	0,95	0,74	0,32	1,38

Tabelle 31: Dargestellt sind der Mittelwert der gesunden Probandengruppe, sowie die Messwerte der beiden Intensivpatienten nach Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml) über die vorgegebenen Inkubationszeiten und unter Verwendung des DOR.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
Mittelwert	5,41	11,48	17,54	31,20	65,05
PAT-INT 1	4,75	9,36	7,64	18,03	
PAT-INT 2	0,33	1,17	0,57	0,68	1,87

Tabelle 32: Dargestellt sind der Mittelwert der gesunden Probandengruppe, sowie die Messwerte der beiden Intensivpatienten nach Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml) über die vorgegebenen Inkubationszeiten und unter Verwendung des KOR.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
Mittelwert	5,37	9,20	14,03	17,75	57,19
PAT-INT 1	4,68	8,55	8,46	10,76	
PAT-INT 2	0,32	0,52	0,46	0,98	0,77

Tabelle 33: Dargestellt sind der Mittelwert der gesunden Probandengruppe, sowie die Messwerte der beiden Intensivpatienten nach Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml) über die vorgegebenen Inkubationszeiten und unter Verwendung des MOR.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
Mittelwert	2,14	6,14	9,92	19,74	55,16
PAT-INT 1	4,22	4,22	8,06	11,08	
PAT-INT 2	0,58	0,84	0,51	0,83	0,75

Tabelle 34: Dargestellt sind der Mittelwert der gesunden Probandengruppe, sowie die Messwerte der beiden Intensivpatienten nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) über die vorgegebenen Inkubationszeiten und unter Verwendung des DOR.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
Mittelwert	5,34	8,80	12,02	23,41	44,15
PAT-INT 1	4,75	7,37	7,31	12,10	
PAT-INT 2	0,33	1,13	0,56	0,85	57,36

Tabelle 35: Dargestellt sind der Mittelwert der gesunden Probandengruppe, sowie die Messwerte der beiden Intensivpatienten nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) über die vorgegebenen Inkubationszeiten und unter Verwendung des KOR.

Proband	Kein Stimulans	3 STD	6 STD	12 STD	24 STD
Mittelwert	5,37	7,91	8,97	13,28	44,40
PAT-INT 1	4,68	5,84	7,18	6,74	
PAT-INT 2	0,32	0,62	0,68	0,30	0,82

Tabelle 36: Dargestellt sind der Mittelwert der gesunden Probandengruppe, sowie die Messwerte der beiden Intensivpatienten nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) über die vorgegebenen Inkubationszeiten und unter Verwendung des MOR.

8.2.5. Zum Ergebnisteil 3.5.

Intensivpatient	1. Messtag	2. Messtag	3. Messtag	Entlassungstag
3	29,43	26,66	28,90	29,43
5	34,91	33,98	32,49	33,98
6	25,03	29,96	27,88	27,63
15	34,91	31,91	31,34	
16	34,91	29,96	28,64	
22	33,38	34,29	31,34	29,43
23	25,03	22,88	41,42	31,06
24	30,51	37,52	33,98	
26	25,71	29,16	27,38	33,68
28	31,34	24,58	24,14	18,60
29	18,77	94,75	101,82	13,82
30	35,23	29,69	28,39	33,48

Tabelle 37: Messergebnisse der Fentanyl-Gruppe mit Verwendung des DOR ohne Zugabe eines Stimulans an den vier definierten Messtagen.

Intensivpatient	1. Messtag	2. Messtag	3. Messtag	Entlassungstag
3	509,37	330,77	388,91	339,82
5	756,67	673,17	79,15	922,24
6	56,23	542,47	582,94	697,83
15	609,76	1.004,51	743,18	
16	53,76	44,51	575,13	
22	449,10	478,29	552,32	421,70
23	620,82	504,81	1.280,62	685,39
24	39,60	62,08	52,08	
26	51,86	63,21	62,64	54,74
28	52,33	495,81	36,85	216,74
29	34,60	319,08	267,75	19,11
30	53,76	55,73	50,03	58,82

Tabelle 38: Messergebnisse der Fentanyl-Gruppe mit Verwendung des KOR ohne Zugabe eines Stimulans an den vier definierten Messtagen.

Intensivpatient	1. Messtag	2. Messtag	3. Messtag	Entlassungstag
3	710,50	453,16	540,03	528,03
5	1.022,74	938,98	1.263,46	1.197,09
6	45,32	667,14	704,14	1.050,71
15	881,68	1.309,75	1.074,61	
16	33,08	33,68	842,91	
22	673,17	913,98	842,91	310,59
23	813,12	736,53	1.746,58	913,98
24	28,39	42,94	35,23	
26	22,88	32,20	32,49	31,91
28	28,90	486,97	24,14	239,28
29	18,27	324,88	291,64	13,70
30	37,52	36,85	42,94	34,91

Tabelle 39: Messergebnisse der Fentanyl-Gruppe mit Verwendung des MOR ohne Zugabe eines Stimulans an den vier definierten Messtagen.

Intensivpatient	1. Messtag	2. Messtag	3. Messtag	Entlassungstag
7	42,94	34,91	26,18	16,70
8	38,49	32,49	36,85	
9	33,98	34,60	31,91	33,98
10	37,52	36,19	33,98	15,82
12	52,33	47,83	43,71	
13	20,91	22,47	20,91	
14	39,95	26,66	29,69	
18	33,68	32,49	29,96	
19	32,78	30,51	25,48	41,05
20	19,11	20,72	22,67	23,93
25	26,66	44,11	38,89	
27	29,69	37,18	47,83	46,14

Tabelle 40: Messergebnisse der Ketamin-Gruppe mit Verwendung des DOR ohne Zugabe eines Stimulans an den vier definierten Messtagen.

Intensivpatient	1. Messtag	2. Messtag	3. Messtag	Entlassungstag
7	101,82	69,16	48,70	36,85
8	79,15	64,36	92,22	
9	58,29	53,28	62,08	66,71
10	62,64	61,53	59,89	24,36
12	77,74	117,57	99,10	
13	34,29	39,60	37,18	
14	62,08	54,25	40,32	
18	50,03	54,25	39,95	
19	50,48	54,25	39,60	61,53
20	30,51	35,23	37,18	35,87
25	32,49	40,68	81,31	
27	54,25	59,89	93,90	78,44

Tabelle 41: Messergebnisse der Ketamin-Gruppe mit Verwendung des KOR ohne Zugabe eines Stimulans an den vier definierten Messtagen.

Intensivpatient	1. Messtag	2. Messtag	3. Messtag	Entlassungstag
7	77,04	67,93	39,95	29,43
8	81,31	57,77	81,31	
9	39,95	41,42	46,56	50,03
10	67,32	56,74	54,25	17,78
12	56,74	86,60	76,35	
13	25,71	29,43	25,03	
14	50,03	46,14	28,13	
18	41,05	41,05	30,78	
19	32,78	34,29	26,66	38,89
20	58,94	21,10	26,42	23,08
25	30,78	29,16	33,98	
27	28,13	30,78	38,89	39,24

Tabelle 42: Messergebnisse der Ketamin-Gruppe mit Verwendung des MOR ohne Zugabe eines Stimulans an den vier definierten Messtagen.

8.3. Abkürzungsverzeichnis

AP1	Aktivator-Protein 1
AK	Antikörper
BG	β -Glucuronidase
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Ca^{++}	Kalzium-Ionen
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-monosulfat
CD	Cluster of Differentiation
cGMP	zyklisches Guanosin-5'-monosulfat
CINC-2	Zytokininduziertes Neutrophilen Chemoattractant
CO_2	Kohlendioxid
CR	Komplementrezeptor
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CRP	C-reaktives Protein
CXCR2	Chemokin-Rezeptor-2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOR	delta-Opioidrezeptor
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
Fc	Fragment C
FiO_2	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
G_i	inhibitorisches G-Protein
G/l	Giga pro Liter
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

INR	International Normalized Ratio
K ⁺	Kalium-Ionen
KC	Keratinozyten Chemoattractant
KOR	kappa-Opioidrezeptor
LASER	Light Amplification by stimulated emission of radiation
LBP	LPS binding Protein
LPS	Lipopolysaccharid
l/min/m ²	Herzindex (Blutvolumen in Liter pro Minute pro Quadratmeter Körperoberfläche)
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
mg/dl	Milligramm pro Deziliter
mg/kgKG/h	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht und Stunde
ml	Milliliter
ml/kgKG/die	Milliliter pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag
ml/kgKG/h	Milliliter pro Kilogramm Körpergewicht pro Stunde
µg/kgKG/h	Mikrogramm pro Kilogramm Körpergewicht pro Stunde
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Min	Minute(n)
MIP-2	Makrophagen-Inflammations-Protein-2
mm HG	Millimeter Quecksilber Säule
mmol/l	Milli-Mol pro Liter
MOR	my-Opioidrezeptor
m-RNA	messenger-Ribonukleinsäure
MRSA	Methicillin resistenter St.aureus
mW	Milli-Watt

n	Anzahl
NF- κ B	nukleärer Faktor Kappa B
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
O ²⁻	Sauerstoffradikal
OR	Opioidrezeptor
OR-AK	Opioidrezeptor-Antikörper
p	Wahrscheinlichkeit
PaCO ₂	arterieller Kohlendioxid-Partialdruck
PAF	Platelet-Activating-Factor
PaO ₂	arterieller Sauerstoff-Partialdruck
PAT-INT	Intensivpatient der Studie nach Nummer
PBS	Phosphate buffered saline
PCT	Pro-Calcitonin
PMN	Polymorphkerniger Neutrophiler
POMC	Proopiomelanocortin
SD	Standardabweichung
sec	Sekunden
SIRS	Systemic inflammatory response syndrom
St.aureus	Staphylococcus aureus
STD	Stunde(n)
SSC	Sideward Scatter
SvO ₂	venöse Sauerstoffsättigung
T _x	Messtag mit Nummerierung (x)
TE	Messung am Entlassungstag
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TLR	Toll like Rezeptor
TSS	Toxic-Schock-Syndrom
TSST-1	Toxic-Schock-Syndrom-Toxin-1
U/min	Umdrehungen pro Minute

8.4. Verwendete Materialien

Substanz bzw. Material	Hersteller
Aqua ad iniectabilia 1000ml	Baxter S.A., Lessines, Belgien
FACS-Brand-Lysing-Lösung	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACScan-Reagenzröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FITC-markierte Anti-DOR-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
FITC-markierte Anti-KOR-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
FITC-markierte Anti-MOR-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
LPS	Mikrobiologisches Institut der Universitätsklinik Gießen
PBS	BAG, Lich, Deutschland
S-Monovette EDTA 2,7ml	
S-Monovette EDTA 7,5ml	
St. aureus	Mikrobiologisches Institut der Universitätsklinik Gießen
TNF-alpha	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

9. DANKSAGUNG

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank allen, die einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Gunter Hempelmann danke ich für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit in der Abteilung für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, sowie die umfangreichen Laboreinrichtungen und Materialien, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Frau PD Dr. med. Ingeborg Welters für die Überlassung des Themas, die Unterstützung bei der Präsentation und der Veröffentlichung der Ergebnisse dieser Arbeit und für die Geduld über die drei Jahre, die ich mit dieser Arbeit verbracht habe. Ein Dankeschön für die freundschaftliche Betreuung und dass sie jederzeit ansprechbar war.

Dipl.-Math. Martin Mogk (Büro für Statistik Mogk & Reitze GbR) für die statistische Auswertung dieser Studie und graphische Verarbeitung der Daten.

Dem **Labor der Abteilung Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin** in Gießen für ihre Mitarbeit im Labor und die Organisation der benötigten Materialien.

Meinen Eltern **Elke** und **Robert Schmidt** für die jahrelange Unterstützung und Ermöglichung des Medizinstudiums und dieser Arbeit.

Herrn Christian Reyher für die Einarbeitung am FACS-Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson.

Allen Probanden für ihre Bereitschaft zur Teilnahme an dieser Studie.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

11. VERÖFFENTLICHUNGEN

British Journal of Anaesthesia 98 (2): 281–97P (2007)
doi:10.1093/bja/ael319

BJA

ABSTRACTS

Proceedings of the Anaesthetic Research Society Meeting

The Royal College of Anaesthetists, London, UK

November 23–24, 2006

*(The name of the author presenting the paper is shown in bold type. * Indicates non-member. All authors have certified that, where appropriate, studies have been conducted with the approval of the relevant Human Ethics Committee or Animal Experimental Review Committee.)*

Proceedings of the Anaesthetic Research Society Meeting

Acknowledgements: This work was supported by the Medical Research Council, UK, the Westminster Medical School Research Trust, London and Carbuos Metalicos SA, Madrid.

Keywords: cytokines, lipopolysaccharide; receptors, opioid; neutrophils

References

- 1 Ma D, et al. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006; **26**: 199–208
- 2 Clark WM, et al. *Neural Res* 1997; **19**: 641–8

Opioid receptor expression on neutrophils: effect of LPS treatment

I. D. Welters* and A. Schmidt*

Department of Anaesthesia, Intensive Care and Pain Management, Rudolf-Buchheim-Str. 7, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Campus Giessen, 35396 Giessen, Germany

Opioids possess immunomodulating properties and are involved in the regulation of immunocyte activity.^{1, 2} These effects are mediated by opioid receptors (OR) on peripheral white blood cells which can be detected and quantified by flow cytometry.³ The objective of this study was to investigate OR expression on neutrophils using polyclonal antibodies against δ -, κ - and μ -opioid receptors (DOR, KOR, MOR). Furthermore, we wanted to assess the influence of LPS treatment on neutrophil OR expression.

The study was reviewed by the local ethics committee. After informed consent, 100 μ l EDTA-anticoagulated blood were obtained from 11 healthy volunteers and incubated with LPS (100 ng ml⁻¹) for 3, 6 and 12 h. After washing, samples were incubated with 5 μ l of fluoresceine-isothiocyanate (FITC)-labelled polyclonal antibodies against human MOR, KOR and DOR.

Rabbit IgG antibodies served as a negative control. After red cell lysis, quantitative analysis of OR using live gating on neutrophils was performed. The percentage of positive cells as well as mean fluorescent intensities (MFI) were determined.

Stimulation with LPS for 6 h increased the percentage of DOR expressing cells significantly from 2.1% to 9.9% positive cells. After 12 h of stimulation, nearly 20% of neutrophils expressed DOR. During LPS stimulation MFI increased from 47.6 (15.7) to 303 (129) after 6 h. Mean fluorescent intensity for KOR reached a maximum after 12 h of stimulation, rising from 58.7 (19.4) to 452 (56.2). During LPS stimulation, the percentage of positive cells increased from 5.4% to 23%. MOR MFI increased from 43.4 (16.3) to 411.8 (290.2) 12 h after stimulation with LPS, while the percentage of positive cells increased from 5.4% to 13.3%.

Our results demonstrate that expression of all OR subtypes is increased significantly on neutrophils after stimulation of whole blood with LPS. Further studies are warranted to elucidate the specific actions and functions of opioids and their analogues as well as opioid receptors in health and acute inflammation.

Acknowledgement: This study was funded by the Anaesthesia Research Fund, University Hospital Giessen, Germany.

Keywords: cytokines, lipopolysaccharide; receptors, opioid; neutrophils

References

- 1 Welters ID, Menzebach A, Goumon Y, et al. *Anesthesiology* 2000; **92**: 1677–84
- 2 Menzebach A, Hirsch J, Hempelmann G, Welters ID. *Br J Anaesth* 2003; **91**: 546–50
- 3 Beck M, Mirmohammadsadegh A, Franz B, et al. *Pain* 2002; **98**: 187–94

Critical Care Volume 11 Suppl 2, 2007
**27th International Symposium on Intensive Care and Emergency
 Medicine**
 Brussels, Belgium, 27–30 March 2007

Published online: 22 March 2007
 These abstracts are available online at <http://ccforum.com/supplements/11/S2>
 © 2007 BioMed Central Ltd

2005. Five casualty cards were picked randomly every day from May 2005. The assessment and management of pain in each case was recorded.
Results There were 155 patients in each month. In January, none of the patients were assessed for the severity of their pain; 34 patients received analgesia, of which 15 received weight-based and 19 received age-based analgesia. In May, 84 patients were assessed for the severity of their pain with the Alder Hey triage pain score; 63 received weight-based and two received age-based analgesia. The rest had no pain.
Conclusion The Alder Hey triage pain score should be introduced in A&E as it serves as an effective means of assessing pain in children of all age groups. Analgesia should be prescribed based on the weight of the children.

P429
Pain after cardiac surgery

A Kianfar¹, K Shadvar¹, A Mahoori², R Azarfarin¹
¹Madani Heart Center, Tabriz, Israel; ²Cardiac Anesthesia, Urumie, Israel
 Critical Care 2007, 11(Suppl 2):P429 (doi: 10.1186/cc5589)

Background Acute pain is common after cardiac surgery and can keep patients from participating in activities that prevent postoperative complications especially respiratory complications. Accurate assessment and understanding of pain are vital for providing satisfactory pain control and optimizing recovery. This study was performed to find the location, distribution, and intensity of pain in a sample of adult cardiac surgery patients during their postoperative ICU stay.
Methods In a prospective study, pain location, distribution (number of pain areas per patient), and intensity (0–10 numerical rating scale) were documented on 250 consecutive adult patients on the first, second and third postoperative day (POD). Patient characteristics (age, sex, size, and body mass index) were analyzed for their impact on pain intensity. There were 140 male and 110 female patients, with a mean \pm SD age of 65.7 ± 13.5 years.
Results The maximal pain intensity was significantly higher on POD 1 and 2 (3.7 ± 2 and 3.9 ± 1.9 , respectively) and lower on POD 3 (3.2 ± 1.5). The order of overall pain scores among activities ($P < 0.001$) from highest to lowest was coughing, moving or turning in bed, getting up, deep breathing or using the incentive spirometer, and resting. After chest tubes were discontinued, patients had lower pain levels at rest ($P = 0.01$), with coughing ($P = 0.05$). Age and sex was found to have an impact on pain intensity, with patients < 60 years old and male patients having a higher pain intensity than older patients on POD 2 (4.7 ± 2.0 vs 3.2 ± 2.4 , $P = 0.02$ and 4.5 ± 2.3 vs 2.9 ± 2.2 , respectively).
Conclusions Pain relief is an important outcome of care. A comprehensive, individualized assessment of pain that incorporates activity levels is necessary to promote satisfactory management of pain. We recommend the use of remifentanyl infusion for postoperative pain relief in suitable cardiac surgery patients.

P430
**Opioid receptor expression on neutrophils: effect of
 tumour necrosis factor alpha treatment**

A Schmidt¹, I Welters²
¹University of Giessen, Germany; ²Academic Unit of Critical Care Medicine, Liverpool, UK
 Critical Care 2007, 11(Suppl 2):P430 (doi: 10.1186/cc5590)

Introduction Opioids and endogenous opioid peptides possess immunomodulating properties and are involved in the regulation of

immunocyte activity. These effects are mediated by opioid receptors (OR) on peripheral white blood cells that can be detected and quantified by flow cytometry. We investigated OR expression on neutrophils using polyclonal antibodies against δ -opioid, κ -opioid and μ -opioid receptors (DOR, KOR, MOR) to assess spontaneous and TNF α -induced OR expression on neutrophils.
Methods After approval by the local ethics committee and informed consent, 100 μ l whole blood samples from 11 healthy volunteers (EDTA served as anticoagulant) was incubated with 10 μ l TNF α (100 ng/ml) for 3, 6, 12 and 24 hours. Samples were washed and incubated with 5 μ l fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labelled polyclonal antibodies against human MOR, KOR and DOR. Rabbit IgG antibodies served as a negative control. After red cell lysis, flow cytometry was performed to quantify OR expression using live gating on neutrophils. The percentage of positive cells as well as mean fluorescent intensities (MFIs) were determined.
Results Stimulation with TNF α increased the percentage of DOR-expressing cells significantly from 2.1% to 12.8% positive cells after 6 hours. After 12 hours of stimulation 28.6%, and after 24 hours even 68.1%, of neutrophils expressed DOR. The MFI increased during TNF α stimulation from 47.6 ± 15.7 to 254.8 ± 110 after 6 hours, staying levelled at this height. After 6 hours of stimulation, the MFI for KOR reached a maximum, rising from 59.5 ± 19.4 to 513.9 ± 162 . During TNF α stimulation, the percentage of positive cells increased from 5.4 to 65.0% after 24 hours (17.5% after 6 hours). Fourteen per cent of neutrophils expressed MOR after 6 hours (initially 5.4%) and up to 57.2% after 24 hours. The MOR MFI was measured at 43.4 ± 16.3 to 410 ± 263.6 6 hours after stimulation with TNF α .
Conclusion Our results display that stimulation of whole blood with TNF α amplifies OR expression of all subtypes significantly on neutrophils. We suggest further studies to clarify the specific actions of opioids and their receptors in health and acute inflammation.

P431
**Intravenous anesthesia with S-(+)-ketamine for 'on-pump'
 coronary artery bypass surgery: hemodynamic profile and
 effect on troponin T levels**

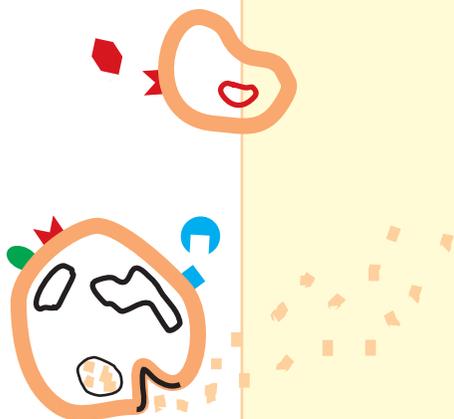
C Neuhaeuser¹, V Preiss¹, M Mueller¹, S Scholz¹, M Kwapiz¹, I Welters²
¹University Hospital, Giessen, Germany; ²University of Liverpool, School of Clinical Science, Liverpool, UK
 Critical Care 2007, 11(Suppl 2):P431 (doi: 10.1186/cc5591)

Introduction In patients with ischemic coronary artery disease the 'sympathomimetic' effects of ketamine can cause myocardial damage. However, the S-isomer of ketamine may have various advantages. We studied the cardiovascular stability and safety of intravenous anesthesia with S-(+)-ketamine for coronary artery bypass graft surgery (CABGS).
Methods After approval of the local ethics committee and written informed consent, 315 patients scheduled for elective 'on-pump' CABGS were enrolled in the study. Patients were randomly allocated to three anesthetic protocols: sufentanil–sevoflurane–propofol (SSP), sufentanil–propofol (SP), and S-(+)-ketamine–midazolam–propofol (KMP). Standard invasive hemodynamic monitoring was performed using a pulmonary artery catheter and hemodynamic variables were reported. Measurements were taken after induction of anesthesia, after weaning from cardiopulmonary bypass, and 6 hours postoperatively. Serial plasma troponin T levels were taken: before induction of anesthesia, after surgery, and 6 and 24 hours postoperatively. All cardiovascular adverse events were recorded (such as electrocardiographic signs of ischemia, myocardial infarction, 28-day mortality).

S171

SCHLUSSERKLÄRUNG

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



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5516-0



9 783835 165516